

## Protein A+G Sepharose Beads

### 产品简介:

本 Protein A+G Sepharose 主要用于免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)、免疫共沉淀 (Co-IP) 或者抗体的纯化。

Protein A+G Sepharose 适合于免疫沉淀所有 Protein A Sepharose 和 Protein G Sepharose 单独可以免疫沉淀的抗体, 包括: mouse IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgA, ; rat IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>2c</sub>; rabbit、goat、pig、cow、sheep、horse 以及 human IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 和 IgG<sub>4</sub> 等。

本产品为 50% 的悬液, 1 ml Protein A+G Sepharose 可结合约 25 mg human IgG。

### 产品优势:

- 适用范围广: 适用于各种抗体的免疫沉淀或者纯化
- 背景低: 改造的 protein A/G, 极低的非特异性吸附
- 重复性好: 同样实验条件下, 保障实验结果的可重复性

### 贮藏条件:

常温运输; 4° C 保存, 两年有效。

### 使用方法:

#### 1. 免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP):

##### 1) 蛋白样品的准备:

- 取 10cm 细胞培养皿中的贴壁细胞, 吸除细胞培养液, PBS 洗涤两次, 然后加入 500 微升至 2 毫升细胞裂解液裂解细胞 (如 RIPA);
- 对于组织样品, 参考贴壁细胞使用裂解液的比例进行裂解;
- 取悬浮细胞, 离心收集细胞后, PBS 洗涤一次, 然后参考贴壁细胞的裂解方法进行裂解。

☆注意: a) 具体的裂解方法, 应参考不同裂解液的详细使用方法; b) 不同量的细胞, 应选用适当裂解液的用量进行裂解 (如果裂解获得的蛋白样品浓度过高, 可以用裂解液或 PBS 适当稀释, 如果蛋白样品浓度过低, 在以后的裂解过程中宜适当减少裂解液的用量)。

★推荐: 建议在细胞处理时加入全能核酸酶 Benzonase Nuclease, 降低背景, 保障实验的可重复性。

## 2) 去除非特异性结合(可选做):

A. 取 0.2-1mL 蛋白样品, 蛋白量约为 0.2-1mg, 加入约 1 $\mu$ g 和免疫沉淀时使用的 IgG 种属相同的普通 IgG 和 20 $\mu$ L 充分重悬的 Protein A+G Sepharose, 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动 30 分钟至 2 小时。

B. 2500rpm(约 1000g)离心 5 分钟, 取上清用于后续的免疫沉淀。

☆注意: 所谓种属相同IgG 是指, 假如后续免疫沉淀时用的是小鼠 IgG, 则在本步骤中可以加入normal mouse IgG, 如无normal IgG 可以加入其它不影响后续检测的其它mouse IgG 类型的抗体。通过和normal IgG 和Protein A+G Sepharose 的孵育, 可以充分降低非特异性的结合, 降低背景。

## 3) 免疫沉淀:

A. 加入 0.5-2 $\mu$ g 用于免疫沉淀的一抗, 4 $^{\circ}$  C 缓慢摇动过夜。

B. 再加入 10-20 $\mu$ L 充分重悬的 Protein A+G Sepharose, 4 $^{\circ}$  C 缓慢摇动 1-3 个小时。

☆注意: 10-20 $\mu$ L Protein A+G Sepharose, 即 20-40 $\mu$ L 50% 充分重悬的 Protein A+G Sepharose。

C. 2500rpm(约 10(8)g)离心 5 分钟, 或瞬时高速离心, 小心吸除上清。

☆注意: 宁可残留少量上清, 也不能吸掉Protein A+G Sepharose。

D. 用准备蛋白样品时的裂解液或PBS 洗涤沉淀 5 次, 裂解液或 PBS 的用量每次为 0.5-1 毫升。洗涤时离心条件和吸除上清的要求同上面的步骤 C。

E. 完成最后一次洗涤后, 去除上清, 加入 20-50 $\mu$ L 1x SDS-PAGE 电泳上样缓冲液, 震荡重悬沉淀, 瞬时高速离心把样品离心至管底。

F. 沸水浴处理 3-5 分钟, 取部分或全部样品用于 SDS-PAGE 电泳, 暂时不用的样品可以 -20 $^{\circ}$  C 保存。

## 2. 免疫共沉淀:

参考 1 中免疫沉淀的方法进行, 但免疫共沉淀(Co-IP) 通常必须使用未经冻存的新鲜蛋白样品。普通的免疫沉淀虽然可以使用冻存的蛋白样品, 但推荐用新鲜的蛋白样品为佳。

★推荐: 建议在细胞裂解时加入全能核酸酶 Benzonase Nuclease, 降低背景, 保障实验的可重复性。

## 注意事项:

- 1、请勿冷冻保存本产品;
- 2、Protein A+G Sepharose 使用前一定要充分颠倒若干次, 使 Sepharose 混合均匀。
- 3、所有步骤中, 蛋白样品都需要在 4 $^{\circ}$  C 或冰上操作。

## 包装规格:

货号;	规格	包装规格
JXP001	1ml (50% slurry)	1ml X1 管