碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线：400-168-3301或800-8283301
订货e-mail：order@beyotime.com
技术咨询：info@beyotime.com
网址：http://www.beyotime.com
碧云天网站 微信公众号

Protein A Agarose (Fast Flow，进口分装)

产品编号	产品名称	包装
P2006	Protein A Agarose (Fast Flow，进口分装)	2ml

产品简介：

- 本Protein A Agarose (Fast Flow)为进口分装，主要用于免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)或免疫共沉淀(Co-IP)，也可以用于抗体的纯化。
- Protein A Agarose适合于免疫沉淀mouse IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgA, rabbit IgG，以及human IgG_1, IgG_2和IgG_4。
- Protein A共价交联到6% agarose beads (Fast Flow)上，2ml Protein A Agarose中共含有约2.5mg重组的Protein A。2 ml Protein A Agarose共可以结合约20mg human IgG。推荐的线性流速(Linear flow rate)为 50-300cm/h。
- Protein A Agarose配制在TBS溶液中，2ml中共含有0.5ml Agarose beads。
- 本Protein A Agarose如果用于常规的免疫沉淀，可以免疫沉淀100次。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2006	Protein A Agarose (Fast Flow，进口分装)	1ml×2
—	说明书	1份

保存条件：

4ºC保存，一年有效。

注意事项：

- 请勿冷冻保存本产品。
- Protein A Agarose使用前一定要充分重悬，即充分颠倒若干次使混合均匀。
- 从蛋白样品收集开始，所有步骤中蛋白样品都必须在4ºC或冰上操作。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)：

a. 蛋白样品的准备：

(a) 对于10厘米细胞培养皿中的贴壁细胞，吸除细胞培养液，PBS洗涤一次，然后加入500微升至2毫升细胞裂解液裂解细胞。可以使用碧云天生产的Western及IP细胞裂解液(P0013)或各种RIPA裂解液(P0013B、P0013C、P0013D或P0013E)等进行细胞的裂解。

(b) 对于组织样品参考贴壁细胞使用裂解液的比例进行裂解。

(c) 对于悬浮细胞，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：详细的裂解方法参考不同裂解液的详细使用方法。对于不同的培养器材，参考10厘米培养皿的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。

b. 去除非特异性结合(**可选做**)：

(a) 取200微升至1毫升蛋白样品，蛋白量约为200微克至1毫克，加入约1微克和免疫沉淀时使用的IgG种属相同的普通IgG和20微升充分重悬的Protein A Agarose，4ºC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：所谓种属相同的IgG是指，例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 Agarose的孵育，可以充分降低非特异性的结合，降低背景。

c. 免疫沉淀：

(a) 加入0.2-2微克用于免疫沉淀的一抗，4ºC缓慢摇动过夜。

(b) 再加入20微升充分重悬的Protein A Agarose，4ºC缓慢摇动1-3个小时。(为方便后续的洗涤操作可以把加入充分重悬的Protein G Agarose的量调整为40微升。)

(c) 2500rpm(约1000g)离心5分钟，或瞬时高速离心，小心吸除上清，注意宁可留下少量上清也不能吸掉Protein A Agarose。

(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(c)。

(e) 完成最后一次洗涤后，去除上清，加入20-40微升1X SDS-PAGE电泳上样缓冲液Vortex重悬沉淀，瞬时高速离心把样品离心至管底。

(f) 100ºC或沸水浴处理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-20ºC保存。

2. 免疫共沉淀：

参考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，但也宜用新鲜的蛋白样品为佳。

3. 抗体纯化：

a. 准备工作：

(a) 用0.45微米或0.2微米孔径的滤膜过滤所用的溶液。

(b) 所有的溶液必须用超声等方法脱气(degas)。

(c) 选择适当的纯化柱，用适当量的Protein A Agarose装填纯化柱。

(d) 用10-20倍柱体积的TBS洗涤并平衡纯化柱，流速可以用恒流泵控制为1ml/min。如无恒流泵，也可以完全依靠重力洗涤并平衡纯化柱。

b. 抗体纯化：

(a) 把含有待纯化的抗体上样到纯化柱。

(b) 待纯化的抗体过柱后，用10-20倍柱体积的TBS洗涤，以去除未结合和非特异性结合的蛋白。洗涤是否完全可以通过测定280nm的吸光度进行确定。

(c) 洗涤完后，用10ml 50mM glycine，pH2.7作为洗脱液，洗脱结合的抗体。某些抗体和Protein A的结合能力很强，在pH2.7时洗脱效果不太理想，可以使用50mM glycine， pH1.9作为洗脱液。分管收集洗脱下的抗体，根据蛋白浓度或后续的检测效果确定洗脱峰在哪几个收集管中。

c. 纯化柱的再生：

(a) 用10-20倍柱体积的TBS洗涤纯化柱，使纯化柱达到中性的pH。

(b) 用TBS来保存再生的纯化柱。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P2006	Protein A Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2009	Protein G Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2012	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml

使用本产品的文献：

1. Yan HL, Xue G, Mei Q, Ding FX, Wang YZ, Sun SH. Calcium-dependent proapoptotic effect of Taenia solium metacestodes annexin B1 on human eosinophils: A novel strategy to prevent host immune response. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(10):2151-63.
2. Xian GZ, Wu SD, Chen CC, Su Y. Western blotting in the diagnosis of duodenal-biliary and pancreaticobiliary refluxes in biliarydiseases. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2009 Dec;8(6):608-13.
3. Zhang Y, Li YM, Liu LD, Jiang L, Ji M, Jiang RJ, Guo L, Liao Y, Li QH. Host cell protein C9orf9 promotes viral proliferation via interaction with HSV-1 UL25 protein. Virol Sin. 2011 Jun;26(3):171-80.
4. Mao X, Cao B, Wood TE, Hurren R, Tong J, Wang X, Wang W, Li J, Jin Y, Sun W, Spagnuolo PA, MacLean N, Moran MF, Datti A, Wrana J, Batey RA, Schimmer AD. A small-molecule inhibitor of D-cyclin transactivation displays preclinical efficacy in myeloma and leukemia via phosphoinositide 3-kinase pathway. Blood. 2011 Feb 10;117(6):1986-97.
5. Gui L, Wang B, Li FH, Sun YM, Luo Z, Xiang JH. Blocking the large extracellular loop (LEL) domain of FcTetraspanin-3 could inhibit the infection of white spot syndrome virus (WSSV) in Chinese shrimp, Fenneropenaeus chinensis. Fish Shellfish Immunol. 2012 Jun; 32(6):1008-15.
6. Liu T, Cheng W, Huang Y, Huang Q, Jiang L, Guo L. Human amniotic epithelial cell feeder layers maintain human iPS cell pluripotency via inhibitedendogenous microRNA-145 and increased Sox2 expression. Exp Cell Res. 2012 Feb 15;318(4):424-34.
7. Ruan SQ, Wang ZH, Wang SW, Fu ZX, Xu KL, Li DB, Zhang SZ. Heregulin-β1-induced GPR30 upregulation promotes the migration and invasion potential of SkBr3breast cancer cells via ErbB2/ErbB3-MAPK/ERK pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Apr 6;420(2):385-90.
8. Zhao F, Zhang S, Chen L, Wu Y, Qin J, Shao Y, Wang X, Chen Y. Calcium-and integrin-binding protein-1 and calcineurin are upregulated in the right atrialmyocardium of patients with atrial fibrillation. Europace. 2012 Dec;14(12):1726-33.
9. Jiang L, Lin J, Han H, Dong H, Zhao Q, Zhu S, Huag B. Identification and Characterization of Eimeria tenella Apical Membrane Antigen-1 (AMA1). PLoS One. 2012;7(7):e41115.
10. Huai J, Zhang Y, Liu QM, Ge HY, Arendt-Nielsen L, Jiang H, Yue SW. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4 with annexin A2 and tubulin beta 5. Neurosci Lett. 2012 Mar 14;512(1):22-7.
11. Jiang L, Lin J, Han H, Zhao Q, Dong H, Zhu S, Huang B. Identification and partial characterization of a serine protease inhibitor (serpin) of Eimeria tenella. Parasitol Res. 2012 Feb;110(2):865-74.
12. Liu Y, Su Y, Wang J, Sun S, Wang T, Qiao X, Run X, Li H, Liang Z. Rapamycin decreases tau phosphorylation at Ser214 through regulation of cAMP-dependent kinase. Neurochem Int. 2013 Mar;62(4):458-67.
13. Yuan L, Zhang L, Dong X, Zhao H, Li S, Han D, Liu X. Apoptin selectively induces the apoptosis of tumor cells by suppressing the transcription of HSP70. Tumour Biol. 2013 Feb;34(1):577-85.
14. Zhao F, Zhang S, Shao Y, Wu Y, Qin J, Chen Y, Chen L, Gu H, Wang X, Huang C, Zhang W. Calreticulin overexpression correlates with integrin-α5 and transforming growth factor-β1 expression in the atria of patients with rheumatic valvular disease and atrial fibrillation. Int J Cardiol. 2013 Oct 3;168(3):2177-85.
15. Liu T, Shen D, Xing S, Chen J, Yu Z, Wang J, Wu B, Chi H, Zhao H, Liang Z, Chen C. Attenuation of exogenous angiotensin II stress-induced damage and apoptosis in human vascular endothelialcells via microRNA-155 expression. Int J Mol Med. 2013 Jan;31(1):188-96.
16. Liu T, Hou L, Huang Y. EZH2-specific microRNA-98 inhibits human ovarian cancer stem cell proliferation via regulating the pRb-E2F pathway. Tumour Biol. 2014 Jul;35(7):7239-47.
17. Mei M, Ye J, Qin A, Wang L, Hu X, Qian K, Shao H. Identification of novel viral receptors with cell line expressing viral receptor-binding protein. Sci Rep. 2015 Jan 21;5:7935.

18. Hou L, Liu T, Wang J. Isoflurane suppresses the self-renewal of normal mouse neural stem cells in a p53-dependent manner by activating the Lkb1-p53-p21 signalling pathway. Mol Med Rep. 2015 Nov; 12(5):7412-8.

19. Tan M, Tang C, Zhang Y, Cheng Y, Cai L, Chen X, Gao Y, Deng Y, Pan M. SIRT1/PGC-1α signaling protects hepatocytes against mitochondrial oxidative stress induced by bile acids. Free Radic Res. 2015; 49(8):935-45.

20. Shen C, Huo LR, Zhao XL, Wang PR, Zhong N. Novel interactive partners of neuroligin 3: new aspects for pathogenesis of autism. J Mol Neurosci. 2015 May;56(1):89-101.

21. Liu T, Qin W, Hou L, Huang Y. MicroRNA-17 promotes normal ovarian cancer cells to cancer stem cells development via suppression of the LKB1-p53-p21/WAF1 pathway. Tumour Biol. 2015 Mar;36(3):1881-93.

22. Liu T, Hou L, Zhao Y, Huang Y. Epigenetic silencing of HDAC1 by miR-449a upregulates Runx2 and promotes osteoblast differentiation. Int J Mol Med. 2015 Jan;35(1):238-46.

23. Sun Y, Ning T, Liu Z, Pang J, Jiang D, Guo Z, Song G, Yang D. The OsSec18 complex interacts with P0(P1-P2)2 to regulate vacuolar morphology in rice endosperm cell. 2015 Feb 17;15:55.

24. Su C, Xia X, Shi Q, Song X, Fu J, Xiao C, Chen H, Lu B, Sun Z, Wu S, Yang S, Li X, Ye X, Song E, Song Y. Neohesperidin Dihydrochalcone versus CCl_4-Induced Hepatic Injury through Different Mechanisms: The Implication of Free Radical Scavenging and Nrf2 Activation. J Agric Food Chem. 2015 Jun 10;63(22):5468-75.

25. Su C, Zhang P, Song X, Shi Q, Fu J, Xia X, Bai H, Hu L, Xu D, Song E, Song Y. Tetrachlorobenzoquinone activates Nrf2 signaling by Keap1 cross-linking and ubiquitin translocation but not Keap1-Cullin3 complex dissociation. Chem Res Toxicol. 2015 Apr 20;28(4):765-74.

26. Gao S, Wang P, Hua Y, Xi H, Meng Z, Liu T, Chen Z, Liu L. R OR functions as a ceRNA to regulate Nanog expression by spongin g miR-145 and predicts poorprognosis in pancreatic cancer. Oncotar get. 2016 Jan 12;7(2):1608-18.

27. Li Z, Wang S, Zhao W, Sun Z, Yan H, Zhu J. Oxidized low-densi ty lipoprotein up regulates microRNA-146a via JNK and NF-κB sig naling. Mol Med Rep. 2016 Feb;13(2):1709-16.

28. Su C, Shi Q, Song X, Fu J, Liu Z, Wang Y, Wang Y, Xia X, So ng E, Song Y. Tetrachlorobenzoquinone induces Nrf2 activation via rapid Bach1 nuclear export/ubiquitination and JNK-P62 signaling. Toxicology. 2016 Jul 1;363-364:48-57.

29. Xue J, Jiang W, Chen Y, Liu Y, Zhang H, Xiao Y, Qiao Y, Huang K, Wang Q. Twenty-six circulating antigens and two novel diagnostic candidate molecules identified in the serum ofcanines with experimental acute toxoplasmosis. Parasit Vectors. 2016 Jun 29;9(1):374

30. Guo YJ, Dong SY, Cui XX, Feng Y, Liu T, Yin M, Kuo SH, Tan EK, Zhao WJ, Wu YC. Resveratrol alleviates MPTP-induced motor impairments and pathological changes by autophagicdegradation of α-synuclein via SIRT1-deacetylated LC3. Mol Nutr Food Res. 2016 Oct;60(10):2161-2175.

31. Lai YJ, Liu L, Hu XT, He L, Chen GJ. Estrogen Modulates ubc9 Expression and Synaptic Redistribution in the Brain of APP/PS1 Mice and Cortical Neurons. J Mol Neurosci. 2017 Feb 1. doi: 10.1007/s12031-017-0884-2. [Epub ahead of print]

32. Huang Y, Tao T, Liu C, Guan H, Zhang G, Ling Z, Zhang L, Lu K, Chen S, Xu B, Chen M. Up regulation of miR-146a by YY1 depletion correlates with delayed progression of prostate cancer. Int J Oncol. 2017 Feb;50(2):421-431.

Version 2017.09.27