

Pepsin Agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶)

产品编号	产品名称	包装
P2049-1ml	Pepsin Agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶)	1ml
P2049-5ml	Pepsin Agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶)	5ml
P2049-20ml	Pepsin Agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶)	20ml

产品简介:

- 碧云天的Pepsin Agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶), 也称Pepsin琼脂糖凝胶、Immobilized Pepsin、Pepsin Agarose Gel、Immobilized Pepsin Agarose Resin、固定化胃蛋白酶琼脂糖树脂, 是由高质量的胃蛋白酶与高度交联的6%琼脂糖共价偶联而成, 可有效地从免疫球蛋白(IgG)中生成和纯化F(ab')₂片段, 避免胃蛋白酶对于F(ab')₂的污染(图1)。本产品还可以用于消化样品中的含有蛋白酶酶切位点的多肽或蛋白以及用于消化产生活性多肽[1]。

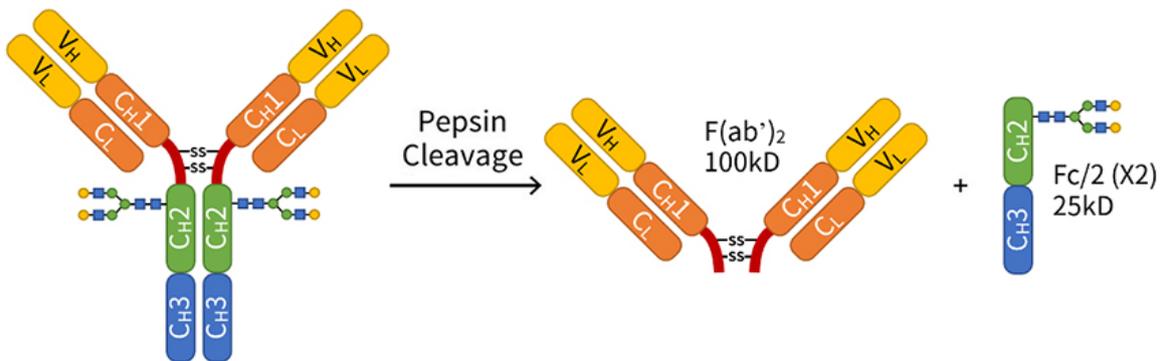


图1.碧云天Pepsin Agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶) (P2049)的消化原理图。

- 胃蛋白酶(EC 3.4.23.1), 即酸性肽链内切酶, 是胃蛋白酶原与胃粘液中盐酸相互作用产生的一种天冬氨酸蛋白酶[2,3], 分子量为35kDa左右, 常从猪胃黏膜中分离纯化获得。胃蛋白酶是一种非特异性酸性蛋白酶, 具有广泛的底物特异性, 可优先切割P1和P1'位置的芳香族氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸)的肽键。如果含硫氨基酸靠近芳香族氨基酸的肽键, 也会容易被胃蛋白酶水解。胃蛋白酶只能水解肽键, 不能水解非肽酰胺键或酯键。胃蛋白酶在酸性环境下具有较高的活性, 其最佳活性的pH值在1.5-2左右, 当在pH>6的中性或碱性环境中, 胃蛋白酶会发生解链而丧失活性。
- 本产品蛋白结构功能研究、蛋白质组学研究等领域内应用非常广泛, 可以特异性地切割抗体铰链区的重链, 用于生成和纯化具有抗体活性片段-二价抗原分子F(ab)₂片段等; 也可以作为蛋白酶消化、生成活性多肽等。本产品的使用流程参考图2。

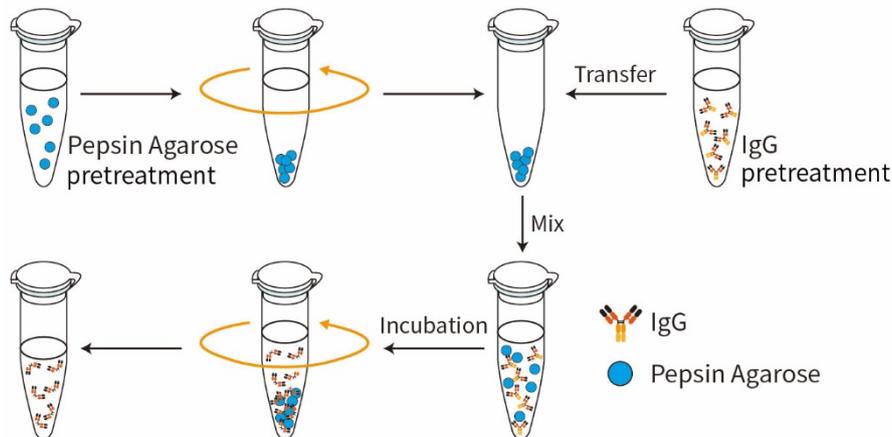


图2. 碧云天Pepsin Agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶) (P2049)的使用流程图。

- 本产品消化能力强。**与同类的很多产品相比, 本产品具有非常强的消化能力, 对复杂样品中不同IgG进行快速消化, 每毫升Pepsin Agarose沉淀含有约2-3mg Pepsin, 可以消化不少于40mg IgG。
- 本产品稳定性高、底物特异性强。**与游离的胃蛋白酶相比, 固定后的胃蛋白酶活性维持时间更长, 孵育时间可以延长至过夜。本产品可特异性地切割蛋白中芳香L-氨基酸的肽键、抗体铰链区的重链等, 获得的产物纯度高, 可进一步用于Western、ELISA、

质谱分析等一系列后续的分析测试。本产品使用的琼脂糖是以高品质Beyorose™ 6FF为基质，该基质是高度交联的6%琼脂糖(Agarose)，与Sephacryl 6 Fast Flow的性能基本一致，确保了琼脂糖凝胶本身有很好的稳定性和很高的纯度，可以切实有效避免非特异性反应。

- **本产品使用便捷。** 本产品可快速地消化IgG后直接通过离心去除胃蛋白酶琼脂糖凝胶的方式停止酶切反应，也省去了采用离子交换等柱分离纯化方法来分离片段与蛋白酶的步骤。
- 本产品的主要指标如下表：

Characteristics	Description
Product content	50% settled gel in specific protective buffer
Agarose structure	6% cross-linked agarose
Average particle size	45-165µm
Coupled protein	Pepsin
M.W. of protein	~35kDa
Protein concentration	2-3mg Pepsin per ml settled gel (>6000 units)
Digestion capacity	≥40mg IgG for 1 ml settled gel
Specificity	Cleaves somewhat nonspecifically at exposed residues, prefers carboxylside of aromatic residues, does not cleave at valine, alanine or glycine
Application	Antibody fragmentation, cleaves predominantly into F(ab') ₂ fragments

- 本产品为50%凝胶悬液，包装体积为总体积，每毫升本产品中共含有0.5ml凝胶沉淀物。如果每个样品使用50µl琼脂糖凝胶悬液，每毫升本产品可以用于20个样品反应。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2049-1ml	Pepsin Agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶)	1ml
P2049-5ml	Pepsin Agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶)	5ml
P2049-20ml	Pepsin Agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶)	20ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。4°C保存，至少一个月有效。

注意事项：

- 本产品使用前要适当充分重悬，即颠倒若干次使琼脂糖凝胶混合均匀，混匀操作须轻柔，不宜剧烈涡旋震荡等，避免蛋白变性、琼脂糖凝胶破碎等。
- 本产品含有微量的防腐剂，使用前宜先用TBS或Digestion Buffer等适当溶液洗涤凝胶3次，以充分消除防腐剂可能产生的干扰。
- 在纯化时，建议设置阳性和阴性对照组。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作，并应始终放置在4°C或冰浴，以减缓蛋白降解或变性。为有效抑制蛋白降解，可以在蛋白样品中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，例如碧云天生产的P1005/P1006蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 100X)、P1048/P1049蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 质谱兼容, 50X)、P1010/P1011蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 100X)、P1050/P1051蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 50X)等。
- 如果离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物，可以将样品溶液用0.45µm的滤膜过滤。
- 高浓度的DTT、巯基乙醇、盐酸胍等对本产品与配体的结合可能有一定影响，但Western及IP细胞裂解液(P0013)、RIPA裂解液(P0013B/C/D)或NP-40裂解液(P0013F)等都完全兼容本产品。碧云天生产的不同裂解液的主要特点和差异，以及如何选择裂解液可参考我们的相关网页：<http://www.beyotime.com/support/lysis-buffer.htm>。
- 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. 缓冲液的准备。

参考下表，根据具体的实验用途配制相应的缓冲液。

Buffer	Components
Digestion Buffer	60mM Sodium acetate (pH3.5)
Wash Buffer	1M Tris·HCl, pH8.5

注：所用水和缓冲液在使用之前建议用0.22µm (FF342/FF362/FF372)或0.45µm (FF345/FF365/FF375)孔径滤膜过滤，以减少杂质，提高蛋白纯化效率。

2. 样品处理。如下以IgG为例，如果样品不是IgG，可以适当参考执行。

a. 如果IgG样品为粉末，取1-10mg纯化、冻干的IgG样品溶于1ml Digestion Buffer，使样品IgG的浓度为1-10mg/ml。如果溶

液的pH显著不同于Digestion Buffer, 可以参考步骤2b进行处理。

- b. 如果IgG样品为溶液, 需要使用Digestion Buffer透析IgG, 或通过超滤和Digestion Buffer洗涤, 使用IgG样品处于Digestion Buffer中。将IgG的浓度调整至1-10mg/ml, 体积为1ml。

3. 胃蛋白酶琼脂糖凝胶的准备。

- a. **吸取琼脂糖凝胶。**轻轻重悬胃蛋白酶琼脂糖凝胶, 尽量形成均匀的凝胶悬浊液, 取20-100 μ l置于1.5ml离心管(FTUB306)中待用。注: 使用大孔径吸头(如用剪刀剪去部分吸头)吸取凝胶悬浊液会比较方便。

- b. **洗涤琼脂糖凝胶。**加入Digestion Buffer至最终体积为约0.5ml, 轻轻重悬胃蛋白酶琼脂糖凝胶。600 \times g在4 $^{\circ}$ C离心5分钟, 小心去除上清, 不要吸到凝胶。再重复洗涤2次。最终去除上清, 并根据后续实验目的, 用适量适当溶液重悬胃蛋白酶琼脂糖凝胶。

注1: 通常每个样品的琼脂糖凝胶用量约为20-100 μ l。具体可根据目标蛋白样品的浓度, 参考产品主要指标表中琼脂糖凝胶的‘Digestion capacity’, 计算目标蛋白样品的加入量。根据不同的实验目的, 例如可以考虑目标蛋白样品的加入量为琼脂糖凝胶可消化量的1-2倍, 使琼脂糖凝胶饱和, 即把琼脂糖凝胶充分利用; 再例如可以考虑目标蛋白样品的加入量为琼脂糖凝胶可消化量的约50%, 以确保目标蛋白能被充分消化。

注2: 多个样品时, 可以取总琼脂糖凝胶量合并洗涤处理后再平分到各个样品管中, 洗涤液用量须相应增加。

注3: 也可参考相关方法进行填柱并使用重力柱法或FPLC法进行纯化。

4. 消化抗体(以免IgG为例, 不同IgG消化时间需自行测试和验证)。

- a. **琼脂糖凝胶重悬。**按步骤3b, 用2倍初始琼脂糖凝胶体积的Digestion Buffer重悬胃蛋白酶琼脂糖凝胶。

- b. **消化抗体。**加入步骤2中用Digestion Buffer准备的1ml样品, 轻轻重悬胃蛋白酶琼脂糖凝胶, 置于旋转混合仪或摇床上, 37 $^{\circ}$ C摇动孵育2小时。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)或BeyoVortex™调速式长轴旋转混匀仪(E6826)。

注: 不同物种IgG的消化效率存在较大差异, 酶切特定物种的IgG时, 建议适当摸索反应孵育时间。

- c. 孵育结束后, 600 \times g在4 $^{\circ}$ C离心5分钟, 吸取并收集上清, 得到粗消化液, 粗消化液中主要为F(ab')₂。

- d. **洗涤(选做)。**为最大程度的回收, 取2倍原始琼脂糖凝胶体积的Wash Buffer加入步骤c中胃蛋白酶琼脂糖凝胶沉淀中, 轻轻重悬胃蛋白酶琼脂糖凝胶, 600 \times g在4 $^{\circ}$ C离心5分钟, 吸取并保留洗涤液, 将洗涤液合并至粗消化液中。

注1: 洗涤并合并会降低F(ab')₂的最终浓度。

注2: 由于洗涤液通常为碱性, 会导致胃蛋白酶失活, 因此洗涤后本琼脂糖凝胶不可再次使用。如果需重复使用本琼脂糖凝胶, 须使用pH<6的洗涤液, 且仅限于同种IgG, 重复使用次数通常不超过3次。

- e. **纯化(选做)。**在粗消化液中加入适量的Protein A agarose中以除去未消化的IgG。推荐使用碧云天Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用) (P2015)。为了降低小的Fc片段对F(ab')₂片段污染, 可使用透析膜(50Kda)透析、凝胶过滤、超滤膜超滤或离子交换色谱过滤等方法进行进一步的纯化。

参考文献:

1. Kurimoto E, Harada T, Akiyama A, Sakai T, Kato K. J Biochem. 2001. 130(2):295-7.
2. Miki K. Nihon Rinsho. 1999. 57 Suppl:567-9.
3. Li H, Zhang S, Zhou S, Bao Y, Cao X, et al. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2023. 280(4):1841-1854.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P2015	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2/10/50/200ml
P2017	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2/10/50/200ml
P2019	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2/10/50/200ml
P2049	Pepsin agarose (胃蛋白酶琼脂糖凝胶)	1/5/20ml
P2157	Biotin Agarose (生物素琼脂糖凝胶)	1/5/20ml
P2159	Streptavidin Agarose (链霉亲和素琼脂糖凝胶)	1/5/20ml
P2165	Heparin Agarose (肝素琼脂糖凝胶)	1/5/20ml
P2169	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	1/5/20/100ml

Version 2024.06.22