

Protein G Agarose

产品编号	产品名称	包装
P2009	Protein G Agarose	2ml

产品简介:

- 本Protein G Agarose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 G Agarose适合于免疫沉淀mouse IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, rat IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}, rabbit and goat polyclonal Abs, 以及human IgG₁, IgG₂, IgG₃和IgG₄。
- Protein G共价交联到4% agarose beads上，2ml Protein G Agarose中共含有约2mg重组的Protein G。2 ml Protein G Agarose共可以结合约11mg human IgG。
- Protein G Agarose配制在TBS溶液中，2ml中共含有0.5ml Agarose beads。
- 本Protein G 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
P2009	Protein G Agarose	1ml/管, 共2管
—	说明书	1份

保存条件:

4℃保存，一年有效。

注意事项:

- 请勿冷冻保存本产品。
- Protein G 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4℃或冰上操作。
- 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:

A1. 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。

A2. 对于组织样品参考贴壁细胞使用裂解液的比例进行裂解。

A3. 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):

B1. 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 G Agarose，4℃缓慢摇动30分钟至2小时。

B2. 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 G 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:

C1. 加入0.2-2微克用于免疫沉淀的一抗，4℃缓慢摇动过夜。

C2. 再加入20微升充分重悬的Protein G Agarose，4℃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。)

C3. 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 G

Agarose。

- C4. 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C3。
- C5. 完成最后一次洗涤后，去除上清，加入20-40微升1XSDS-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。
- C6. 100℃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-20℃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：

- A1. 用0.45微米或0.2微米孔径的滤膜过滤所用的溶液。
- A2. 所有的溶液必须用超声等方法脱气(degas)。
- A3. 选择适当的纯化柱，用适当量的Protein G Agarose装填纯化柱。
- A4. 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：

- B1. 把含有待纯化的抗体上样到纯化柱。
- B2. 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。
- B3. 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 G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：

- C1. 用10-20倍柱体积的TBS洗涤纯化柱，使纯化柱达到中性的pH。
- C2. 用TBS来保存再生的纯化柱。

使用本产品的文献：

1. Guo M, Huang T, Cui Y, Pan B, Shen A, Sun Y, Yi Y, Wang Y, Xiao G, Sun G.
PrPC interacts with tetraspanin-7 through bovine PrP154-182 containing alpha-helix 1.
Biochem Biophys Res Commun. 2008 Jan 4;365(1):154-7.
2. Zhu CG, Deng XY, Shi F
Rapid detection of brucella abortus by a novel proximity ligation - based loop - mediated isothermal amplification method
Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology,2009 Jun,17(2), 154-163
3. Liu M, Wang X, Lei L, Zhao Z, Shen J.
The identification, expression profile, and preliminary characterization of Tsunagi protein fromSchistosoma japonicum.
Parasitol Res. 2010 Aug;107(3):615-21.
4. Zhou ZL, Luo ZG, Yu B, Jiang Y, Chen Y, Feng JM, Dai M, Tong LJ, Li Z, Li YC, Ding J, Miao ZH.
Increased accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α with reduced transcriptional activity mediates the antitumor effect of triptolide.
Mol Cancer. 2010 Oct 11;9:268.
5. Liu XG, Ma SH, Sun JZ, Ren J, Shi Y, Sun L, Dong XY, Qin P, Guo CS, Hou M, Peng J.
High-dose dexamethasone shifts the balance of stimulatory and inhibitory Fc γ receptors on monocytes in patients with primary immune thrombocytopenia.
Blood. 2011 Feb 10;117(6):2061-9.
6. Jia Y, Cong R, Li R, Yang X, Sun Q, Parvizi N, Zhao R.
Maternal Low-Protein Diet Induces Gender-Dependent Changes in Epigenetic Regulation of theGlucose-6-Phosphatase Gene in Newborn Piglet Liver.
J Nutr. 2012 Jul 25.
7. 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.
8. Han M, Deng HY, Jiang R.
Effect of Trastuzumab on Notch-1 Signaling Pathway in Breast Cancer SK-BR3 Cells.
Chin J Cancer Res. 2012 Sep;24(3):213-9. doi: 10.1007/s11670-012-0213-9.
9. Guo Z, Song E, Ma S, Wang X, Gao S, Shao C, Hu S, Jia L, Tian R, Xu T, Gao Y.
Proteomics strategy to identify substrates of LNX, a PDZ domain-containing E3 ubiquitin ligase.
J Proteome Res. 2012 Oct 5;11(10):4847-62. doi: 10.1021/pr300674c. Epub 2012 Aug 29.
10. Ren J, Li D, Li Y, Lan X, Zheng J, Wang X, Ma J, Lu S.
HDAC3 interacts with sumoylated C/EBP α to negatively regulate the LXRA expression in rat hepatocytes.
Mol Cell Endocrinol. 2013 Jul 15;374(1-2):35-45. doi: 10.1016/j.mce.2013.04.013. Epub 2013 Apr 29.
11. Tang S, Bai C, Yang P, Chen X.

- 14-3-3 ϵ Boosts Bleomycin-induced DNA Damage Response by Inhibiting the Drug-resistant Activity of MVP.
J Proteome Res. 2013 Jun 7;12(6):2511-24. doi: 10.1021/pr301085c. Epub 2013 May 9.
- 12.Chen C, Chi H, Sun BG, Sun L.
The galectin-3-binding protein of *Cynoglossus semilaevis* is a secreted protein of the innate immune system that binds a wide range of bacteria and is involved in host phagocytosis.
Dev Comp Immunol. 2013 Apr;39(4):399-408. doi: 10.1016/j.dci.2012.10.008. Epub 2012 Nov 22.
- 13.Guo Z, Wang X, Li H, Gao Y.
Screening E3 substrates using a live phage display library.
PLoS One. 2013 Oct 4;8(10):e76622. doi: 10.1371/journal.pone.0076622. eCollection 2013.
- 14.Kan J, Guo W, Huang C, Bao G, Zhu Y, Zhu YZ.
S-propargyl-cysteine, a novel water-soluble modulator of endogenous hydrogen sulfide, promotes angiogenesis through activation of signal transducer and activator of transcription 3.
Antioxid Redox Signal. 2014 May 20;20(15):2303-16. doi: 10.1089/ars.2013.5449. Epub 2014 Jan 30.
- 15.Zhu Z, Liu Y, Li K, Liu J, Wang H, Sun B, Xiong Z, Jiang H, Zheng J, Hu Z.
Protein tyrosine phosphatase receptor U (PTPRU) is required for glioma growth and motility.
Carcinogenesis. 2014 Aug;35(8):1901-10. doi: 10.1093/carcin/bgu123. Epub 2014 May 29.
- 16.Liu Y, Zhu Z, Xiong Z, Zheng J, Hu Z, Qiu J.
Knockdown of protein tyrosine phosphatase receptor U inhibits growth and motility of gastric cancer cells.
Int J Clin Exp Pathol. 2014 Aug 15;7(9):5750-61. eCollection 2014.
- 17.Wang J, Bao W, Qiu M, Liao Y, Che Q, Yang T, He X, Qiu H, Wan X.
Forkhead-box A1 suppresses the progression of endometrial cancer via crosstalk with estrogen receptor α .
Oncol Rep. 2014 Mar;31(3):1225-34. doi: 10.3892/or.2014.2982. Epub 2014 Jan 20.
- 18.Li L, Gao P, Li Y, Shen Y, Xie J, Sun D, Xue A, Zhao Z, Xu Z, Zhang M, Li B, Jiang J.
JMJD2A-dependent silencing of Sp1 in advanced breast cancer promotes metastasis by downregulation of DIRAS3.
BreastCancer Res Treat. 2014 Oct;147(3):487-500. doi: 10.1007/s10549-014-3083-7. Epub 2014 Sep 6.
- 19.Hou N, Ren L, Gong M, Bi Y, Gu Y, Dong Z, Liu Y, Chen J, Li T.
Vitamin A Deficiency Impairs Spatial Learning and Memory: The Mechanism of Abnormal CBP-Dependent Histone Acetylation Regulated by Retinoic Acid Receptor Alpha.
Mol Neurobiol. 2014 May 24.