



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

Rabbit IgG Agarose (兔 IgG 琼脂糖凝胶)

产品编号	产品名称	包装
R32444-1ml	Rabbit IgG Agarose (兔 IgG 琼脂糖凝胶)	1ml
R32444-5ml	Rabbit IgG Agarose (兔 IgG 琼脂糖凝胶)	5ml

产品简介:

源叶生产的 Rabbit IgG Agarose (兔 IgG 琼脂糖凝胶), 也称 Rabbit Normal IgG Agarose (兔正常 IgG 琼脂糖凝胶)、兔 IgG IP Agarose (兔 IgG 免疫沉淀琼脂糖凝胶)、Rabbit IgG Affinity Gel (兔 IgG 亲和凝胶)等, 由高品质的未经任何标记的非特异性兔 IgG (non-specific IgG)与琼脂糖共价偶联而成。本产品通常用作免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)、免疫共沉淀 (Co-IP)、染色质免疫沉淀 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)等免疫沉淀相关实验时兔来源抗体琼脂糖凝胶的阴性对照 (Negative control)。

本兔 IgG 琼脂糖凝胶中的兔 IgG (Rabbit IgG)为正常的兔 IgG (Normal Rabbit IgG), 是一种未经任何标记的非特异性 IgG (non-specific IgG)。

本兔 IgG 琼脂糖凝胶可以排除 IgG 本身和一些蛋白或其它生物分子的非特异性结合, 从而用于降低背景或作为阴性对照。

本产品非特异吸附低: 本产品每毫升凝胶沉淀 (settled gel) 中 IgG 的含量高达约 5mg IgG (通常每毫升凝胶沉淀中 IgG 的含量为约 1-2mg), 用于特异性抗体在免疫沉淀之前的预处理去除非特异性结合 (preclean) 的效果会非常理想。同时, 该琼脂糖凝胶基本不会识别任何抗原。使用量参考目的蛋白等分子免疫沉淀时抗体偶联琼脂糖凝胶的用量。

本产品的主要指标如下表:

Characteristics	Description
Product content	50% settled gel in 50% glycerol with 10mM phosphate-buffered saline and preservative (pH7.4)
Matrix	4% cross-linked agarose
Average bead size	~90µm
Antibody	Normal Rabbit IgG
Isotype	Rabbit IgG
M.W. of antibody	Approximately 150kDa
Antibody concentration	~5mg Rabbit IgG per ml settled gel
Binding capacity	None
Elution method	Elution with acid, competing peptide or SDS-PAGE loading buffer
Reagents compatibility	Compatible with commonly used reagents at certain concentrations
Application	Control for IP, Co-IP, or reduce background



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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。

产品组成:

产品编号	产品名称	包装
R32444-1ml	Rabbit IgG Agarose (兔 IgG 琼脂糖凝胶)	1ml
R32444-5ml	Rabbit IgG Agarose (兔 IgG 琼脂糖凝胶)	5ml
—	说明书	1 份

保存条件:

-20°C 保存，一年有效。

注意事项:

本产品使用前一定要充分重悬，即充分颠倒若干次使混合均匀。

本产品含有微量的防腐剂，不会影响常规的蛋白或蛋白复合物的纯化和免疫沉淀。但如果后续涉及酶活性测定，使用本产品前宜预先使用 TBS 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。

在免疫沉淀或纯化时，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。

高浓度的 DTT、巯基乙醇、盐酸胍等对本产品的非特异性结合可能有一定影响，但 Western 及 IP 细胞裂解液、RIPA 裂解液或 NP-40 裂解液等都完全适用。

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。

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. 样品的制备。如下的样品制备步骤仅供参考，优先推荐使用特异性抗体偶联的琼脂糖凝胶进行免疫沉淀时的样品制备方法。

a. 选择合适的裂解液，用于制备细胞或组织的裂解液。优先推荐选择 Western 及 IP 细胞裂解液用于细胞或组织样品的裂解。根据特定的实验目的，如有必要，也可以使用 RIPA 裂解液用于样品的制备。如果使用自行配制的或其它公司生产的裂解液，需要确保裂解液的 pH 为 6-8。

b. 具体的细胞或组织样品裂解液的制备步骤请参考裂解液的使用说明。制备好的裂解液上清宜冰上或 4°C 存放，随后即可用于免疫沉淀或免疫共沉淀、标签蛋白的纯化等操作。新鲜制备好的样品，建议尽量当天完成免疫沉淀等后续操作，但如果样品不能当天使用，也可以适当分装后 -80°C 冻存。

2. Rabbit IgG Agarose (兔 IgG 琼脂糖凝胶)的准备。

由于 Rabbit IgG Agarose 储存在含 50%甘油以及防腐剂的保护液中，所以需要在加入样品前适当洗涤。

a. 轻轻重悬 Rabbit IgG Agarose，尽量形成均匀的凝胶悬液，按照通常每 100μl 细胞裂解液中加入 20μl 混合均匀的凝胶悬液(以下免疫沉淀法中都以 20μl 凝胶悬液为例)，取适量 Rabbit IgG Agarose 至一洁净离心管中，加入适当的洗涤液如 1X TBS 等至最终体积为约 0.5ml。

注 1：使用大孔径吸头(如用剪刀剪去部分吸头)吸取凝胶悬液会比较方便。

注 2：此处及后续步骤中的 1X TBS 都优先推荐使用特异性抗体偶联的琼脂糖凝胶洗涤时的溶液，后续描述中的 1X TBS 仅作示例说明。

b. 轻轻重悬 Rabbit IgG Agarose，6000×g 在 4°C 离心 30 秒，小心去除上清，不要吸到凝胶。重复上述步骤两次。

c. 按照初始体积的量，用 1X TBS 重悬 Rabbit IgG Agarose。

3. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)。如下的免疫沉淀实验步骤仅供参考，优先推荐使用特异性抗体偶联的琼脂糖凝胶进行免疫沉淀时完全相同的实验步骤。

a. 加入凝胶与孵育。按照每 100μl 蛋白样品加入 20μl 凝胶悬液的比例加入经过洗涤的 Rabbit IgG Agarose，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，4°C 孵育 1-2 小时。如需提高结合效率，可 4°C 孵育过夜。



b. 离心分离。孵育完毕后，6000×g 在 4℃ 离心 30 秒，小心去除上清，不要吸到凝胶。注：可保留部分上清液，用于检测免疫沉淀的效果。

c. 洗涤。加入 500μl 的 1X TBS，轻轻重悬 Rabbit IgG Agarose，冰浴并置于摇床上 5 分钟，然后 6000×g 在 4℃ 离心 30 秒，小心去除上清，不要吸到凝胶。重复洗涤三次。样品置于冰上用于洗脱。

4. 洗脱。如下的洗脱实验步骤仅供参考，优先推荐使用特异性抗体偶联的琼脂糖凝胶进行洗脱时完全相同的实验步骤。以下以 Anti-Flag 亲和凝胶和本产品为例进行说明。

根据蛋白质特点及后续实验要求，可以选择下面 3 种洗脱方法之一。Anti-Flag 亲和凝胶采用如下的一种方式洗脱时，兔 IgG 琼脂糖凝胶作为阴性对照，需要使用相同的洗脱方式。

1) 3X Flag 竞争洗脱法：本方法为非变性法，洗脱效率高，且洗脱后的样品中不含 Flag 抗体的轻链和重链。

a. 3X Flag 多肽储存液的配制：取适量 3X Flag 多肽溶解于 1X TBS 中，使其终浓度为 150μg/ml，或稀释 5mg/ml 的 3X Flag 多肽溶液至 150μg/ml。

b. 每 20μl 原始凝胶悬液体积，加入 100μl 3X Flag 多肽洗脱液(150μg/ml)，混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温摇晃孵育 30-60 分钟，或 4℃ 孵育 1-2 小时。为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复洗脱。3X Flag 多肽洗脱液体积一般为凝胶悬液的 5 倍。

c. 孵育完毕后，6000×g 在 4℃ 离心 30 秒，将上清转移到新的离心管中。上清即为洗脱的 Flag 标签蛋白。

d. 洗脱的 Flag 标签蛋白置于 4℃ 待用，或者 -20℃ 或 -80℃ 长期保存。

2) 酸性洗脱法：本方法为非变性法，比较快速且高效。洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于后续分析检测。

a. 溶液的配制：酸性洗脱液(0.1M Glycine-HCl, pH3.0)，中和液(0.5M Tris-HCl, pH7.4, 1.5M NaCl)。

b. 每 20 μ l 原始凝胶悬液体积, 加入 100 μ l 酸性洗脱液, 混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上, 室温孵育 5 分钟。酸性洗脱液体积一般为凝胶悬液的 5 倍。注: 孵育时间不宜超过 15 分钟。

c. 孵育完毕后, 6000 $\times$ g 在 4 $^{\circ}$ C 离心 30 秒, 将上清转移到新的离心管中, 并立刻加入 10 μ l 中和液, 适当混匀。

d. 为了获得最大的洗脱效率, 可重复步骤 b 和 c, 并将相同样品合并。

e. 洗脱并中和的 Flag 标签蛋白置于 4 $^{\circ}$ C 待用, 或者 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 长期保存。

注 1: 酸性洗脱法虽然高效, 但仍可能低于竞争洗脱法或 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法。

注 2: 由于目的蛋白的差异可能对酸性洗脱法的洗脱效率有一定的影响, 如果对洗脱效率的要求比较高, 可对酸性洗脱液的 pH 在 2.5-3.1 之间进行一定的调整, 相应的中和液的 pH 值或量也要进行一定的调整, 例如 100 μ l 酸性洗脱液(0.1M Glycine-HCl, pH2.8)和 15 μ l 中和液(1M Tris-HCl, pH8.5)。

3) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法: 本方法为变性法, 得到的蛋白样品适合 SDS-PAGE 电泳或 Western 检测。

a. SDS-PAGE 上样缓冲液的配制: 可以直接使用 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(2X), 但含有 DTT 等还原剂, 用该上样缓冲液洗脱得到的样品中含有 Flag 抗体的轻链和重链。也可以自行参考《分子克隆》等配制不含 DTT 的 2X SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。

b. 每 20 μ l 原始凝胶悬液体积, 加入 20 μ l 2X SDS-PAGE 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟。

c. 6000 $\times$ g 在 4 $^{\circ}$ C 或室温离心 30 秒, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳或 WB 检测。

注: 由于上样缓冲液中 SDS 会破坏 Flag 抗体, 所以洗脱后的凝胶不能重复使用。