

Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)

产品编号	产品名称	包装
P2169-1ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	1ml
P2169-5ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	5ml
P2169-20ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	20ml
P2169-100ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	100ml

产品简介:

- 碧云天的Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶), 也称Iodoacetyl琼脂糖凝胶、巯基蛋白琼脂糖凝胶、Iodoacetyl Resin, 由高质量的碘乙酸衍生物与高度交联的6%琼脂糖共价偶联而成, 可快速、高效、特异地与含巯基的抗原结合, 从而实现抗原的固定化, 进而利用抗原抗体的特异性反应对免疫血清中的抗体进行高效纯化, 是常用的抗体高效纯化介质。碘乙酰琼脂糖凝胶也可以与含巯基的多肽、蛋白或其它生物样品结合, 从而用于去除样品中含巯基的生物杂质。
- 卤代乙酰基(Haloacetyls)与巯基化合物在生理至碱性条件下(pH7.2-9)会发生亲核取代反应, 形成稳定的硫醚键, 该反应主要分为两步: 第一步为亲核取代, 即巯基中的硫原子作为亲核试剂, 攻击卤代物中的卤素原子形成一个中间体; 第二步为消除反应, 中间体经过一系列的质子转移和电子重排形成最终的产物。本产品主要基于碘乙酰在生理环境下容易与谷胱甘肽和半胱氨酸发生反应, 形成相应的硫醚和碘化氢[1], 从而进一步用于亲和纯化。本产品抗体纯化领域内应用非常广泛, 可以特异地结合并固定含巯基的抗原、多肽或蛋白等生物配体, 用于抗体的纯化或含巯基的多肽或蛋白的去除等。本产品的实验流程参考图1。

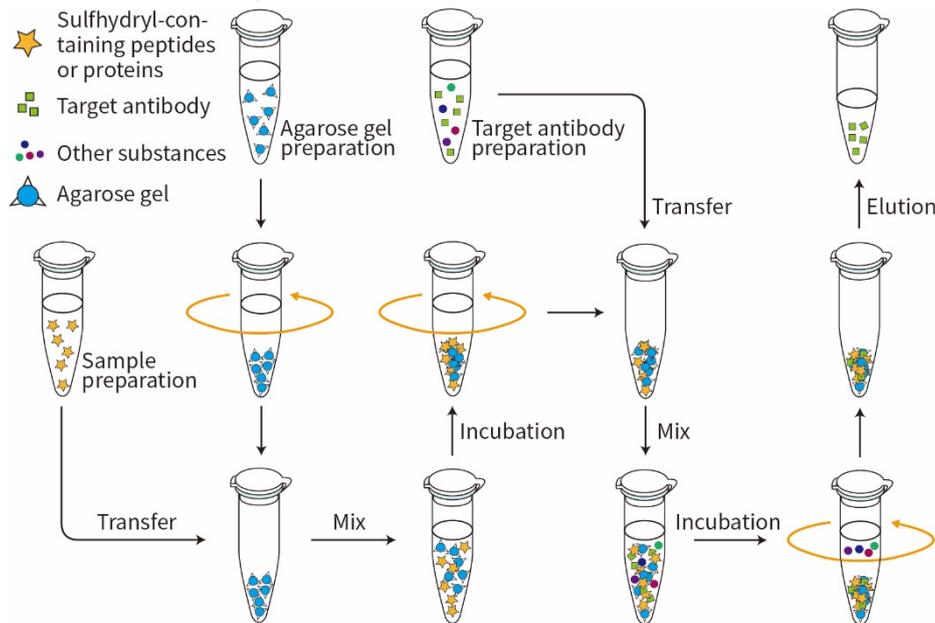


图1. 碧云天Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶) (P2169)的实验流程图。

- 本产品结合容量高。**与同类的很多产品相比, 本产品具有非常高的结合容量, 对复杂样品中含巯基的抗原、多肽或蛋白等生物配体可以快速进行结合和固定。本产品中Iodoacetyl Agarose为50%的凝胶悬浊液, 每毫升Iodoacetyl Agarose沉淀可结合不少于1mg含巯基的七肽, 也可结合不少于3mg IgG。本产品固定Protein A后用于纯化兔IgG的效果参考图2。

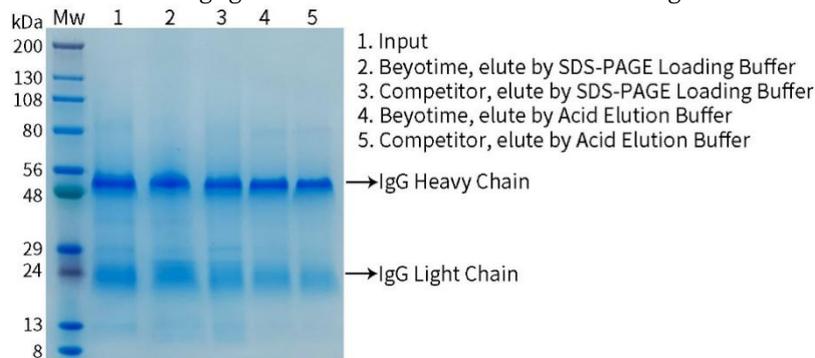


图2. 碧云天Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶) (P2169)结合Protein A后用于纯化兔IgG的效果图。泳道1为Input, 即为用于纯化的兔IgG; 泳道2和4为本产品结合Protein A后纯化的兔IgG、再分别经SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X) (P0015A)洗脱或酸性洗脱后得到的样品; 泳道3和5为B公司同类产品(Competitor)结合Protein A后纯化兔IgG、再经SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X) (P0015A)洗脱或酸性洗脱后得到的样品。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本产品特异性强。** 本产品可特异性地结合含巯基的多肽或蛋白等生物配体以作为抗原, 进而利用抗原抗体的特异性对免疫血清中的抗体进行高效纯化, 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	45-165 μ m
Ligand	The derivative of Iodoacetic acid
Binding capacity	Per ml settled gel: \geq 1mg sulfhydryl-containing peptides of 7 amino-acids, \geq 3mg IgG
Specificity	Free sulfhydryls ligands
pH Stability	pH5-10
Elution method	Elution with acid or SDS-PAGE loading buffer for single-use applications
Application	Antibody purification

- 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50 μ l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
P2169-1ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	1ml
P2169-5ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	5ml
P2169-20ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	20ml
P2169-100ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	100ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C避光保存, 一年有效。4 $^{\circ}$ C避光保存, 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 $^{\circ}$ 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, 例如碧云天的P1005/P1006蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 100X)、P1048/P1049蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(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蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(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0.45 μ m的滤膜过滤。酸性溶液洗脱或使用SDS-PAGE洗脱后的琼脂糖不可重复使用。为了尽量减少碘乙酰基的脱落, 无论是手动操作还是自动操作, 低pH洗脱步骤都不要超过10分钟。
- 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
Coupling Buffer	50mM Tris-HCl, 5mM EDTA-Na (pH8.5)
Blocking Buffer	50mM L-Cysteine-HCl in Coupling Buffer
Storage Buffer	1X PBS (pH8.0) containing 20% Ethanol

Binding/Wash Buffer	1X PBS (pH8.0)
Elution Buffer	100mM Glycine·HCl, pH2.0-2.5
Neutralizing Buffer	1M Tris·HCl, pH8.5

注1: 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。

注2: 推荐的缓冲液适用于大多数目标生物配体的固定和后续的亲和纯化, 也可根据目的蛋白的稳定性更换其它缓冲体系。对于特殊样品, 需自行进行适当的优化。

2. 样品的制备。

- 本产品结合含有游离巯基的抗原、多肽或蛋白, 对于合成的抗原、多肽或重组蛋白, 实验前建议使用Ellman法检测蛋白是否存在游离巯基。推荐使用碧云天游离巯基检测试剂盒(DTNB法) (S0138)。如果确定含有游离巯基, 将0.1-1mg抗原、多肽或蛋白样品溶于100µl-1ml Coupling Buffer中。
- 多肽或蛋白样品还原: 若多肽或蛋白中不含游离的巯基, 可使用还原剂断开二硫键, 暴露出游离巯基。先将0.1-1mg多肽或蛋白样品溶于100µl-1ml Coupling Buffer, 再加入TCEP至终浓度为25mM。推荐使用碧云天TCEP (DTT Substitute) (ST045)。

注1: TCEP是一种高效、无异味、不含硫醇基的水溶性还原剂, 是DTT的替代物, 可选择性还原多肽或蛋白质中的二硫键。而且由于不含巯基, 不会干扰碘乙酰基的偶联, 因此, 还原后的多肽或蛋白样品上柱前不需要进行脱盐或透析处理。

注2: TCEP会干扰BCA法对蛋白浓度的测定, 使用TCEP还原后的蛋白, 不建议采用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定。

3. 碘乙酰琼脂糖凝胶准备。

- 吸取琼脂糖凝胶。**轻轻重悬碘乙酰琼脂糖凝胶, 尽量形成均匀的凝胶悬浊液, 取20-100µl置于BeyoGold™ 1.5毫升离心管(无色, Nuclease free) (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。
- 洗涤琼脂糖凝胶。**加入Coupling Buffer至最终体积为约0.5ml, 轻轻重悬碘乙酰琼脂糖凝胶。600×g在4°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碘乙酰琼脂糖凝胶。**注1:** 通常每个样品的琼脂糖凝胶用量约为20-100µl。具体可根据目标生物配体浓度, 参考产品主要指标表中琼脂糖凝胶的‘Binding capacity’, 计算目标生物配体的加入量。根据不同的实验目的, 例如可以考虑目标生物配体的加入量为琼脂糖凝胶载量的1-2倍, 使琼脂糖凝胶饱和, 即把琼脂糖凝胶充分利用, 此时通常实验目的是分离纯化; 再例如加入琼脂糖凝胶的载量是待分离纯化的目标生物配体的2-3倍, 以确保目标生物配体能被充分分离纯化, 此时通常实验目的是为了对样品中的目标生物配体进行定量分析。

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. 偶联含巯基样品(以抗原样品为例)。

- 琼脂糖凝胶重悬。**接步骤3b, 用2倍原始琼脂糖凝胶体积的Coupling Buffer重悬碘乙酰琼脂糖凝胶。
- 偶联。**加入适量步骤2中用Coupling Buffer稀释的样品, 轻轻重悬碘乙酰琼脂糖凝胶, 置于旋转混合仪上, 室温孵育30-60分钟。**注:** 如有必要, 可以在2-8°C旋转混合1小时, 以防止目标蛋白降解。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。
- 洗涤。**取1ml Coupling Buffer加入碘乙酰琼脂糖凝胶中, 轻轻重悬碘乙酰琼脂糖凝胶, 600×g在4°C离心5分钟, 吸取并保留上清用于测定蛋白浓度以测定偶联效率, 去除剩余的上清, 不要吸到凝胶。再重复洗涤3次。**注:** 可通过未偶联前抗原浓度和偶联后上清的抗原浓度, 计算并确定抗原的偶联效率。如果用于去除样品中含巯基的多肽或蛋白, 本步骤吸取并保留的上清即为所需获得的样品。如有需要, 可以通过检测结合前后上清液中游离的多肽或蛋白量的差值来计算去除率。
- 封闭。**加入与原始琼脂糖体积相同的Blocking Buffer, 盖上盖子, 置于旋转混合仪上, 室温孵育30分钟。封闭好后, 600×g在4°C离心5分钟, 去除上清, 不要吸到凝胶。
- 储存。**如果立即使用, 直接进入纯化抗体步骤。如果以后再使用, 先取1ml Binding/Wash Buffer加入碘乙酰琼脂糖凝胶中, 轻轻重悬碘乙酰琼脂糖凝胶, 600×g在4°C离心5分钟, 去除上清, 不要吸到凝胶, 再重复洗涤3次。再加入2倍原始琼脂糖凝胶体积的Storage Buffer 2-8°C储存。**注:** 需避光储存, 严禁冻结。

5. 纯化抗体。

- 洗涤琼脂糖凝胶。**接步骤4e, 加入Binding/Wash Buffer至最终体积为约0.5ml, 轻轻重悬琼脂糖凝胶。600×g在4°C离心5分钟, 小心去除上清, 不要吸到凝胶。重复本洗涤步骤2次, 即共洗涤3次。最终去除上清, 并根据后续的实验目的, 用适量的适当溶液重悬琼脂糖凝胶。
- 抗体结合。**加入适量用Binding/Wash Buffer稀释的抗体, 轻轻重悬偶联琼脂糖凝胶, 置于旋转混合仪上, 室温孵育30-60分钟。**注:** 如有必要, 可以在2-8°C旋转混合1小时, 以防止目标蛋白降解。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。
- 洗涤。**取1ml Binding/Wash Buffer加入琼脂糖凝胶中, 轻轻重悬琼脂糖凝胶, 600×g在4°C离心5分钟, 去除上清, 不要吸到凝胶。再重复洗涤3次。
- 洗脱。**根据目的生物配体的特点及后续实验要求, 可以选择如下方法之一或其它合适方法进行洗脱。

(a) **酸性洗脱缓冲液洗脱。**每个样品加入100µl Elution Buffer, 混匀后置于旋转混合仪上, 室温孵育5分钟, 置于离心机中600×g在4°C离心5分钟, 将上清转移到新的离心管中, 立即加入10µl Neutralizing Buffer, 适当混匀。洗脱液置于4°C待用, 或者-20°C长期保存。

注：酸性洗脱缓冲液能破坏绝大部分的抗体与抗原的相互作用。但为了确保更好的洗脱效果，可预先用300μl 0.1% Tween-20的水溶液洗涤琼脂糖凝胶1次。

(b) SDS-PAGE Loading Buffer或0.1% SDS洗脱。每个样品加入100μl或适量的1X SDS-PAGE Loading Buffer或0.1% SDS，95°C加热3分钟。置于离心机中600×g在4°C离心5分钟，取上清用于SDS-PAGE电泳检测等。

注1：如果选择SDS-PAGE Loading Buffer或0.1% SDS进行洗脱，那么洗脱液将包含抗体和少量抗原。

常见问题：

Problem	Possible Causes	Solution
Protein/peptide precipitates in Coupling Buffer.	Protein/peptide was not soluble in Coupling Buffer.	Dissolve sample in ≤30% DMSO or DMF or 6M Guanidine·HCl in Coupling Buffer.
Low coupling efficiency.	Sulfhydryls were oxidized.	Reduce protein/peptide with DTT or TCEP and proceed immediately with desalting and coupling procedure to prevent reformation of disulfide bonds.
	Sulfhydryl-containing reductant was not removed from sample.	(1) Remove reductant from the reduced sample using a desalting column before coupling agarose. (2) Reduce sample using TCEP.
Column flows exceedingly slow.	Air bubbles in column.	Remove air bubbles by stirring or centrifugation the agarose.
The purity of elution fraction is low.	The column was not washed thoroughly.	Increase the volume of Binding/Wash Buffer.

参考文献：

1. F Dickens. Biochemical Journal. 1933. 27 (4): 1141–1151.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P2015-2ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2ml
P2015-10ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	10ml
P2015-50ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	50ml
P2015-200ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	200ml
P2017-2ml	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2ml
P2017-10ml	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	10ml
P2017-50ml	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	50ml
P2017-200ml	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	200ml
P2019-2ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2ml
P2019-10ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	10ml
P2019-50ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	50ml
P2019-200ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	200ml
P2157-1ml	Biotin Agarose (生物素琼脂糖凝胶)	1ml
P2157-5ml	Biotin Agarose (生物素琼脂糖凝胶)	5ml
P2157-20ml	Biotin Agarose (生物素琼脂糖凝胶)	20ml
P2159-1ml	Streptavidin Agarose (链霉亲和素琼脂糖凝胶)	1ml
P2159-5ml	Streptavidin Agarose (链霉亲和素琼脂糖凝胶)	5ml
P2159-20ml	Streptavidin Agarose (链霉亲和素琼脂糖凝胶)	20ml
P2165-1ml	Heparin Agarose (肝素琼脂糖凝胶)	1ml
P2165-5ml	Heparin Agarose (肝素琼脂糖凝胶)	5ml
P2165-20ml	Heparin Agarose (肝素琼脂糖凝胶)	20ml
P2169-1ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	1ml
P2169-5ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	5ml
P2169-20ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	20ml
P2169-100ml	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	100ml
S0138S	游离巯基检测试剂盒(DTNB法)	100-200次
S0138M	游离巯基检测试剂盒(DTNB法)	500-1000次

ST043-1g	DTT	1g
ST043-5g	DTT	5g
ST043-25g	DTT	25g
ST043-100g	DTT	100g
ST045-1g	TCEP (DTT Substitute)	1g
ST045-5g	TCEP (DTT Substitute)	5g
ST045-25g	TCEP (DTT Substitute)	25g
ST045-100g	TCEP (DTT Substitute)	100g

Version 2024.03.22