

HB230106

## rProtein A MagBeads(IP Grade)蛋白 A 免疫磁珠

### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
rProtein A MagBeads(IP Grade)蛋白 A 免疫磁珠	36418ES03	1mL
	36418ES08	5mL

### 产品描述

rProtein A 免疫沉淀磁珠是粒径为 200nm 的纳米磁珠表面上共价偶联了大量的 Protein A 蛋白, 纳米级磁珠提供的超大比表面积, 具有更多的结合位点, 磁珠用量更少, 非特异性吸附率低。重组 Protein A 蛋白更适用于结合 mouse IgG2a, IgG2b, IgA, rabbit IgG, 以及 human IgG1, IgG2 和 IgG4。本品适用的范围广泛, 可应用于细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水以及其它的免疫抗原等样本的免疫沉淀 (IP)和免疫共沉淀(COIP)。

### 产品性质

基质 (Matrix spherical)	硅基磁珠
配体 (Ligand)	重组 Protein A
结合能力 (Binding Capacity)	>0.9 mg hIgG /mL 磁珠
粒径 (Particle size)	200 nm
磁珠浓度 (Concentration)	10mg/mL
应用 (Application)	IP、COIP、CHIP、RIP 等

### 运输和保存方法

冰袋运输。2-8°C长期储存, 有效期 2 年。

### 注意事项

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 本产品仅作科研用途!

### 使用方法

#### 1. 缓冲液配制

平衡/结合/洗杂液:	0.15M NaCl, 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.0
中和缓冲液:	1M Tris-HCl, pH 8.5
洗脱缓冲液:	0.1M 甘氨酸, pH 3.0
终止液:	50 mM Tris, pH 7.5

注: 上述缓冲液为推荐的缓冲液配制, 但 IP 实验中不同类型的抗体与抗原结合的亲和性是有区别的, 抗体与抗原结合还会受到 IP Lysis/Wash Buffer 的影响, 因此可自行优化操作细节或者筛选及配制缓冲液进行实验。

#### 2. 抗原样品制备

本操作说明书提供以下四种样品处理方法, 建议您根据不同来源的抗原样品选择适当的方式进行预处理, 使待检测抗原释放至样品溶液中。

**血清样品处理:** 若目标蛋白丰度较高, 建议用结合缓冲液稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 10-100  $\mu$ g/mL, 置于冰上备用 (或置于 -20°C 长期保存)。

**悬浮细胞样品处理:** 离心收集细胞 (4°C, 500g, 10 min), 弃上清后称重, 按每毫克细胞 50  $\mu$ L 的比例用 1 $\times$ PBS 洗涤 2 次; 按每毫克细胞 5-10  $\mu$ L 的比例加入结合缓冲液, 同时加入蛋白酶抑制剂, 混匀后置于冰上处理 10 min; 离心收集上清液 (4°C,

14000g, 10 min), 置于冰上备用(或置于-20°C长期保存)。

**贴壁细胞样品处理:** 移去培养基, 按每  $1.0 \times 10^5$  个细胞 150  $\mu\text{L}$  的比例用  $1 \times \text{PBS}$  洗涤两次; 用细胞刮棒刮脱细胞, 收集至 1.5 mL EP 管内, 按每  $1.0 \times 10^5$  个细胞 20-30  $\mu\text{L}$  的比例加入结合缓冲液, 同时加入蛋白酶抑制剂, 混匀后置于冰上处理 10 min; 离心收集上清液(4°C, 14000g, 10 min), 置于冰上备用(或置于-20°C长期保存)。

**大肠杆菌样品处理:** 离心收集大肠杆菌(4°C, 12000g, 2 min), 弃上清后称重, 按每克(湿重)菌体 10 mL 的比例用  $1 \times \text{PBS}$  洗涤 2 次; 按每克(湿重)菌体 5-10 mL 的比例加入结合缓冲液, 同时加入蛋白酶抑制剂, 重悬菌体, 超声裂解细胞, 离心收集上清(4°C, 17000g, 10 min)。

### 3. 免疫复合物的制备:

注意: 样品所需的量和孵育时间均依赖于每个特定的抗体-抗原体系, 因而可能需要优化才能得到最大产量。

以下实验方案针对 2~10  $\mu\text{g}$  亲和纯化的抗体, 根据需 要可以按比例放大。

- 1) 在离心管中, 将每个样品的细胞裂解液与 2~10  $\mu\text{g}$  免疫沉淀抗体结合。每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500~1500  $\mu\text{g}$ 。
- 2) 用 IP Lysis/Wash Buffer 将抗体以及制备好的样品稀释至 300~500  $\mu\text{L}$ 。
- 3) 在室温下孵育 1~2 h, 或 4°C 2~4 h, 以形成免疫复合物。

**4. 磁珠预处理:** 将磁珠漩涡振荡 1 min, 使其充分混悬; 取 25-50  $\mu\text{L}$  磁珠悬液置于 1.5 mL EP 管中。加入 500  $\mu\text{L}$  预冷结合缓冲液洗涤, 进行磁性分离, 吸弃上清, 重复 1 次。加入 200  $\mu\text{L}$  结合缓冲液重悬磁珠备用。

### 5. 免疫沉淀

- 1) 将抗原样品/抗体混合物加入装有磁珠的离心管中, 保持混匀室温下孵育 1~2 h, 或 4°C 2~4 h。
- 2) 上述磁珠-抗体-抗原复合物进行磁性分离, 收集上清液, 以备后续检测。
- 3) 向离心管中加入 1 mL 洗杂液, 用移液器轻轻吹打使磁珠-抗体-抗原复合物均匀分散, 然后进行磁性分离, 弃上清液; 从磁分离器上取下离心管, 再重复洗涤两次。

### 6. 抗原洗脱

**A. 变性洗脱** 此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。

- 1) 从磁分离器上取下离心管, 向其中加入 25  $\mu\text{L}$   $1 \times \text{SDS-PAGE Loading Buffer}$  混合均匀, 95°C 加热 5 min。
- 2) 置于磁性分离器上, 进行磁性分离, 收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。

#### B. 非变性洗脱

- 1) 向磁珠-抗体-抗原复合物中加入 50  $\mu\text{L}$  洗脱液, 混合均匀, 室温孵育 5 min。
- 2) 置于磁性分离器上, 进行磁性分离, 收集洗脱液至新的 EP 管中。
- 3) 重复步骤 1) 和 2), 收集洗脱液, 与 2) 中洗脱液混合, 加入中和液中和至 pH7.0-8.0。