

rProtein A/G MagBeads(IP Grade) 蛋白 A/G 免疫磁珠

产品简介

rProtein A/G 免疫沉淀磁珠使用“纳米表面生物技术”(S-TEC)，将 rProtein A/G 高密度定向包被到粒径为 200 nm 的纳米磁珠表面，纳米级磁珠提供的超大比表面积，具有更多的结合位点、更高的抗体结合能力和极低的蛋白非特异性吸附率，一步纯化即可从血清样品中分离出纯度>90%的抗体，使用简便有效。

天然蛋白 A (Protein A) 是一种发现于金黄色葡萄球菌的细胞壁表面蛋白，天然蛋白 G (Protein G) 是一种分离自 G 型或 C 型链球菌属的细胞表面蛋白，二者功能相似，主要通过与其免疫球蛋白 (Ig) 的 Fc 区相互作用，可结合大多数哺乳动物的 IgG，但在两者结合特异性上有所不同。rProtein A/G 免疫磁珠同时共价偶联了蛋白 A 和蛋白 G，比单独的蛋白 A 或者蛋白 G 都有更广的结合范围，实用性更高。同时，本品使用的是基因改造后的蛋白 A 和蛋白 G，不仅维持其本身的 Ig 亲和特性，同时也去除了天然蛋白本身的非主要结合域以降低非特异性结合。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。

另外我司亦提供 rProtein A/G IP/Co-IP Kit 蛋白 A/G 免疫 (共) 沉淀试剂盒 (Cat#36421ES)，包含足够完成 40 个反应的试剂，每个反应使用 25 uL 磁珠，同时可进行 10 个阴性对照。

产品信息

货号	36417ES03 / 36417ES08
规格	1 mL / 5 mL

产品性质

基质 (Matrix spherical)	硅基磁珠
配体 (Ligand)	重组蛋白 A/G
结合能力 (Binding Capacity)	≥0.7 mg hIgG /mL 磁珠
粒径 (Particle size)	200 nm
磁珠浓度 (Concentration)	10 mg/mL
应用 (Application)	IP、COIP、CHIP、RIP 等

储存条件

2~8°C保存，有效期 2 年。

使用说明

工作液浓度应根据具体实验确定，建议进行预实验摸索最佳实验浓度。

1. 缓冲液配制

【注】建议以下缓冲液在使用前用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

裂解缓冲液: 0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, pH7.4 或 WB/IP 裂解液 (Cat#20118ES)

平衡/结合/洗杂缓冲液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH7.0

交联缓冲液: 0.2 M 三乙醇胺, pH8.2

中和缓冲液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

洗脱缓冲液: 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

交联剂: DMP(Dimethyl pimelimidate dihydrochloride)

终止液: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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 , 1000g, 5 min), 用手指把细胞用力弹散。按照 6 孔板每孔细胞加入 150-250 μL 裂解液的比例加入含蛋白酶抑制剂的裂解液(裂解液应在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mM)。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, 用 PBS 清洗细胞两遍; 用细胞刮棒刮脱细胞, 收集至 1.5mL EP 管内, 按照 6 孔板每孔加入 150-250 μL 裂解液的比例加入含蛋白酶抑制剂的裂解液(裂解液应在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mM)。用枪吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触。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 $1\times$ 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. 磁珠预处理

- 1) 将磁珠漩涡振荡 1 min, 使其充分混悬;
- 2) 取 50 μL 磁珠悬液置于 1.5 mL EP 管中, 放置在磁分离器上, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃保护液。
- 3) 将 EP 管从磁分离器上取下来, 加入 200 μL 结合缓冲液洗涤, 进行磁性分离, 吸弃上清, 重复洗 2 次。

4. 抗体吸附

- 1) 加入目标抗体溶液 (5-25 μg 抗体总量), 充分混匀, 体积不足 500 μL 时用平衡液补足。
- 2) 室温孵育 10 min 以上(具体时间根据结合效果调整), 可以振荡或漩涡混合均匀。
- 3) 将 EP 管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清液。如需要可留做进一步检测。
- 4) 加入 500 μL 洗杂液混合均匀, 置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清液。重复洗杂至少 3 次。

5. 抗体交联(备选)

- 1) 如果需要将抗体和目标抗原复合物共同洗脱, 请忽略本步骤, 直接进行操作 6。50 μL -1mL 磁珠量均可以按照以下步骤操作, 无需额外增加交联液体积。
- 2) 加入 1 mL 交联液, 振荡悬浮, 置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。该操作重复两次。
- 3) 再加入 1 mL 含有 20 mM DMP (dimethylpimelimidate dihydrochloride) 的交联液, 此试剂需要现用现配。振荡悬浮, 在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管, 促使溶液和磁珠充分接触, 约 30 min 后, 置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。
- 4) 使用 1 mL 终止液悬浮磁珠, 终止交联反应, 在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管, 促使溶液和磁珠充分接触, 约 15 min 后, 置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。
- 5) 加入 1 mL 平衡液, 颠倒混匀, 置于磁分离器上, 大约 1 min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。再重复两次。

6. 抗原结合反应

- 1) 加入含有抗原的样品(通常 100-1000 μL), 用移液器轻轻吹打使抗原与磁珠-抗体复合物均匀分散。
- 2) 在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管 10 min, 使抗原与抗体充分结合, 如结合力较弱则可在室温下反应 1h 或者在 4°C 下反应过夜。

3) 上述完成抗原吸附的磁珠-抗体-抗原复合物进行磁性分离，收集上清液，以备后续检测。

4) 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。

7. 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 80-100 μL 1 \times SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min。

2) 置于磁性分离器上，进行磁性分离，或者离心，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 300 μL 洗脱液，混合均匀，室温孵育 10 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。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途。

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。