

## Protein A/G 免疫沉淀磁珠

Cat#: M0134

(本品仅用于科学研究，不可用于诊断及治疗)

### 1. 背景信息

本产品由高品质的 Protein A/G 蛋白质与磁珠共价偶联制成，可用于免疫沉淀 (IP)，也可用于免疫共沉淀 (Co-IP)、染色质 IP (ChIP) 或 RNA IP (RIP)。本产品具有高载量；操作迅速便捷 (最短可在 40 分钟内完成一个 IP 流程)；特异性强，非特异性吸附低；可结合范围广 (与常见哺乳动物的 IgG 均可以结合) 等特点。

### 2. 性能指标

- 应用范围：** 来源于细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水等样品的多个物种的 IgG 类蛋白质 (包含大部分 IgG 亚型) 的免疫 (共) 沉淀 (见附件)。
- 偶联物属性：** 高纯度的重组 Protein A/G 蛋白质
- 磁珠属性：** 琼脂糖包裹的超顺磁珠，平均粒径 40um。
- 强度：** 采用酸性洗脱法，可反复使用 5 次以上。
- 成分：** 1mL PBS (含 0.02% 叠氮钠) 中，含有 0.25mL 共价偶联 Protein A/G 的磁珠。
- 保存方法：** 在已加入 0.02% 叠氮钠的 PBS 保存液中，4°C 可保存 1 年。

### 3. 用前必读

以下试剂及设备，需要客户自备，试剂推荐配方见说明书附件 1，推荐抗原制备方案见 3。

磁力架 1 个，1.5mL 离心管若干  
细胞裂解液，酸性洗脱液，中和液，PBS，PBST，2x 蛋白上样缓冲液  
待测抗原样品及检测抗体

#### 注意事项 (开箱前必读)

- 3.1 本产品 4°C 可保存 1 年，冷藏条件下运输。
- 3.2 混匀磁珠时，请采用柔和涡旋，上下颠倒，及摇床混匀等方法。勿离心、干燥磁珠，勿使用超声处理磁珠，勿使酸处理磁珠时间超过 10min。
- 3.3 以下操作步骤，使用磁珠悬液用量为 40μl (含 10μl 磁珠)，可从 15μl 血清或者 100μl 细胞上清中结合 20ug IgG，请根据待结合抗体量，调节磁珠使用量。
- 3.4 各物种的抗体 (IgG, IgM, IgA, IgD) 与 Protein A/G 结合亲和力不同，使用请认真阅读本说明书附件 2。

### 4. 使用方法 (所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。)

#### 4.1 血清及分泌表达抗原处理

如果目标蛋白质含量较高，建议用 1xPBST 稀释样品至目标蛋白质终浓度为 10-100μg/mL，-20°C 保存使用。

#### 4.2 细胞裂解液制备

- 4.2.1 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中，1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。
- 4.2.2 预冷的 1xPBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。
- 4.2.3 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，（例如：T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%，一般约  $0.5-1 \times 10^7$  细胞，需要加入 1mL 细胞裂解液）。反复吹打后冰上放置 10-20min，让细胞充分裂解。
- 4.2.4 用超声破碎仪将细胞裂解液超声，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4°C 离心 10min。取上清，-80°C 冷冻保存。

#### 4.3 装柱及孵育

- 4.3.1 处理检测抗体：根据实验目的，用 1xPBS 将抗体总体积调整至 500 $\mu$ L。
- 4.3.2 将磁珠充分混悬，取 20 $\mu$ L 磁珠悬液（含 5 $\mu$ L 磁珠），置于 1.5 mL EP 管中，加入 500  $\mu$ L 1xPBS，充分混悬，置于磁力架上，磁性分离，弃上清；重复以上洗涤步骤 2 次。
- 4.3.3 将稀释好的抗体加入预洗好的磁珠，轻柔混匀，在摇床上室温孵育 10min。
- 4.3.4 磁性分离，弃上清（或保存上清液至新的 EP 管中，以备后续检测抗体和磁珠的结合效率，判断抗体与磁珠是否结合充分）。
- 4.3.5 加入 500 $\mu$ L 1xPBS 至磁珠，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复四次。

#### 4.4 抗原与抗体-磁珠复合物结合

- 4.4.1 加入 400  $\mu$ L 准备好的抗原样品（见 4.1 及 4.2），轻柔混匀，在摇床上室温孵育 10min（如果抗体亲和力不够，4°C 孵育 2hr 以上）。
- 4.4.2 磁性分离，弃上清（或保存上清液至新的 EP 管中，以备后续检测抗体和抗原的结合效率，判断抗体与抗原是否结合充分）。加入 500 $\mu$ L 1xPBST，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复四次。

#### 4.5 抗原洗脱

本说明书提供以下两种抗原洗脱方案，请根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。

- 4.1.1 变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。  
步骤：分离磁珠，弃上清，向磁珠中加入 10 $\mu$ L 2x 上样缓冲液，按体积调整至 1x，混合均匀，95°C 煮样 5 mins。分离磁珠，收集上清，进行 SDS-PAGE。
- 4.1.2 酸性洗脱法：此方法洗脱的抗原，可用于后期功能分析。  
步骤：分离磁珠，弃上清，向磁珠中加入 50-100  $\mu$ L 酸性洗脱液，室温孵育 10 mins；分离磁珠，收集上清至新的 EP 管，并立即滴入总体积 1/10 体积的中和缓冲液，将洗脱产物 pH 调节至中性，样品用于后期功能分析

注：本步骤洗脱的抗原为抗原-抗体复合物，如操作者需要单独洗脱目标抗原，推荐使用交联剂，并按相关实验说明操作。

## 附件 1. 推荐试剂配方

| 组分            | 内容物/配方  |
|---------------|---|
| 细胞裂解液         | 50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton X-100 (说明见 5.3)   |
| 酸性洗脱液         | 0.15M Glycin-HCl 缓冲液, pH2.5-3.0   |
| 中和液           | 1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0  |
| 2x 上样缓冲液      | 125mM Tris HCl, pH6.8, with 4% SDS, 20%glycerol and 0.004% bromphenol blue  |
| 10xPBS, pH7.5 | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 35.8g, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 2.8g, NaCl 89g, 溶于 1L dd H <sub>2</sub> O, 加入 0.2% Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍成 1xPBS) |
| 1xPBST        | 1xPBS, 0.1% Tween-20, pH7.5   |

## 附件 2 Protein A/G 与各物种 IgG 结合的亲和力

|       |           |       |
|-------|-----------|-------|
| Human | Total IgG | +++++ |
|       | IgG1      | +++++ |
|       | IgG2      | +++++ |
|       | IgG3      | +++++ |
|       | IgG4      | +++++ |
|       | IgM       | +     |
|       | IgD       | -     |
|       | IgA       | +     |
|       | IgE       | +++   |
|       | Fab       | +     |
| ScFv  | +         |       |
| Mouse | Total IgG | +++++ |
|       | IgM       | -     |
|       | IgG1      | +++   |
|       | IgG2a     | +++++ |
|       | IgG2b     | +++++ |
|       | IgG3      | +++++ |
| Rat   | Total IgG | +++   |
|       | IgG1      | +++   |
|       | IgG2a     | +++++ |
|       | IgG2b     | +     |
|       | IgG2c     | +++++ |

|            |           |       |
|------------|-----------|-------|
| Cow        | Total IgG | +++++ |
|            | IgG1      | +++++ |
|            | IgG2      | +++++ |
| Goat       | Total IgG | +++++ |
|            | IgG1      | +++++ |
|            | IgG2      | +++++ |
| Shhep      | Total IgG | +++++ |
|            | IgG1      | +++++ |
|            | IgG2      | +++++ |
| Horse      | Total IgG | +++++ |
|            | IgG(ab)   | +     |
|            | IgG(c)    | +     |
|            | IgG(T)    | +++++ |
| Rabbit     | Total IgG | +++++ |
| Guinea Pig | Total IgG | +++++ |
| Hamster    | Total IgG | +++   |
| Pig        | Total IgG | +++++ |
| Donkey     | Total IgG | +++++ |
| Cat        | Total IgG | +++++ |
| Dog        | Total IgG | +++++ |
| Monkey     | Total IgG | +++++ |
| Chicken    | Total IgY | -     |



We focus on precise protein quantification

---