

## Protein A/G Magnetic beads

货号: P1233

存储条件: 4°C 保存, 两年有效, 长期保存可放 -20°C。

### 产品简介

Protein A/G Magnetic Beads, 也称 Protein A/G 免疫磁珠、Protein A/G 免疫沉淀磁珠、SPA/G 磁珠、蛋白 A/G 磁珠、蛋白 A/G 免疫磁珠或蛋白 A/G 免疫沉淀磁珠, 是由高质量的重组 Protein A、G 与纳米级氨基磁珠共价偶联而成, 可特异性地结合相应抗体, 主要用于免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)、免疫共沉淀 (Co-IP) 或染色质免疫沉淀 (Chromatin Immunoprecipitation, Ch-IP), 也可以用于血清、细胞培养上清液或腹水等样品中抗体的纯化等。Protein A/G 磁珠适合于免疫沉淀所有 Protein A 磁珠和 Protein G 磁珠单独可以免疫沉淀的抗体, 包括 human IgG1、IgG2、IgG3、IgG4, mouse IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3, rat IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、rabbit、goat 等多克隆抗体。

### 使用说明:

#### 1. 样品的制备。

- 使用 LABLEAD R1090 ripa 中 (适用于胞浆蛋白) 或者 R1091 ripa 强 (适用于膜蛋白和核蛋白) 用于细胞或组织样品的裂解。根据特定的实验目的, 选择合适的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。
- 具体的细胞或组织样品裂解的制备步骤可参考裂解液的使用说明。制备好的裂解液上清宜置于冰上或 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, 如样品不能当天使用, 也可以适当分装后 -80°C 冻存。

#### 2. Protein A/G 磁珠的准备。

由于 Protein A/G 磁珠储存在特殊保护液中, 所以需要在加入样品前适当洗涤。

- 用移液器轻轻吹打重悬 Protein A/G 磁珠, 按照每 500μl 样品 10μl 或 25μl 磁珠悬浊液, 取适量 Protein A/G 磁珠至一洁净离心管中, 加入 1X TBS 或者裂解液至最终体积为约 0.5ml。

**说明:** a. 初始体积大于 0.2ml, 可以直接置于磁力架上分离 10 秒, 去除上清, 然后再加入 1X TBS 或者裂解液 至最终体积为约 0.5ml。

- 用移液器轻轻吹打重悬 Protein A/G 磁珠。置于磁力架上分离 10 秒, 去除上清。重复上述步骤两次。

- 按照初始体积的量, 用 1X TBS 或者裂解液 重悬 Protein A/G 磁珠。

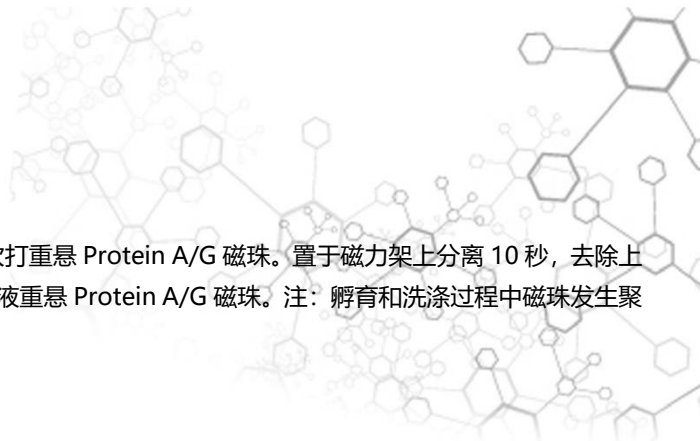
#### 3. 抗体与 Protein A/G 磁珠的结合。

- 抗体的准备: 按抗体使用说明中推荐的稀释比例用 TBS 稀释抗体, 配制抗体工作液; 或将抗体配制终浓度 5-50μg/ml 的抗体工作液。置于冰上备用。

**可选做:** 使用抗体种属相同的正常 IgG 配制相同稀释比或终浓度的正常 IgG 工作液, 以用于去除非特异性结合或作为阴性对照。此处种属相同的正常 IgG 是指: 后续免疫沉淀时用的抗体是小鼠 IgG, 则在本步骤中可以用 TBS 稀释适量的 normal mouse IgG 以用于降低背景或作为阴性对照。

- 抗体吸附: 将步骤 2 准备好的 Protein A/G 磁珠进行磁性分离, 吸除上清, 加入 500μl 抗体工作液或正常 IgG 工作液 (两组可同时做), 重悬后在室温翻转混合仪上翻转孵育 15 分钟-1 小时。注: 也可以直接在步骤 2 的 Protein A/G 磁珠中加入适量抗体或正常 IgG 进行孵育。





c. 洗涤：加入 500μl 的 1X TBS 或者裂解液，用移液器轻轻吹打重悬 Protein A/G 磁珠。置于磁力架上分离 10 秒，去除上清。重复洗涤三次。按照初始体积的量，用 1X TBS 或者裂解液重悬 Protein A/G 磁珠。注：孵育和洗涤过程中磁珠发生聚团或呈片状属正常现象，不会影响实验结果。

#### 4. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP):

a. 去除非特异性结合(选做)：步骤 3 中准备的结合了正常 IgG 的 Protein A/G 磁珠与样品 4°C 孵育 1 小时后磁性分离，上清样品用于后续实验。此步骤的目的是去除与正常 IgG 产生非特异性结合的蛋白。

b. 样品与结合了抗体或正常 IgG 的 Protein A/G 磁珠（可同时做两组）孵育。按照每 500μl 蛋白样品加入 10μl 或 25μl 磁珠悬浊液的比例加入结合了抗体或正常 IgG 的 Protein A/G 磁珠，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育 2 小时或 4°C 孵育过夜。

注 1：孵育过程中，磁珠发生聚团或呈片状属正常现象，不会影响实验结果。

注 2：也可先将适量抗体或正常 IgG 与样品室温孵育 1-2 小时或 4°C 孵育过夜后，再加入 10-20μl 磁珠悬浊液室温孵育 1 小时。

c. 磁分离。孵育完毕后，置于磁力架上分离 10 秒，去除上清。注：可保留部分上清液，用于检测免疫沉淀的效果。

d. 洗涤。加入 500μl 的 1X TBS 或者裂解液，用移液器轻轻吹打重悬磁珠。置于磁力架上分离 10 秒，去除上清。此步骤重复三次。注：也可以通过检测洗涤得到的洗涤液的 OD280 来判断是否洗涤完全，若 OD280 大于 0.05，应适当增加洗涤次数。

#### 5. 洗脱：

根据目的蛋白的特点及后续实验要求，可以选择如下方法之一进行洗脱。

**酸性洗脱法：**此方式为非变性法，比较快速且高效。洗脱后的蛋白维持生物活性，便于后续分析检测，如质谱检测或者酶活分析。

(a) 溶液的配制：酸性洗脱液(0.1M 甘氨酸, pH2.5)，中和液(1M Tris-HCl, pH10.1, 1.5M NaCl)。

(b) 每 10-25μl 原始磁珠体积，加入 50μl 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。

注：孵育时间不宜超过 15 分钟。洗脱液的体积可以酌情适当调整，同时须注意后续的中和液体积也需要作相应调整。

(c) 孵育完毕后，置于磁力架上分离 10 秒，将上清转移到新的离心管中，并立刻加入 5μl 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) 洗脱并中和的目的蛋白置于 4°C 待用，或者 -20°C 或 -80°C 长期保存。

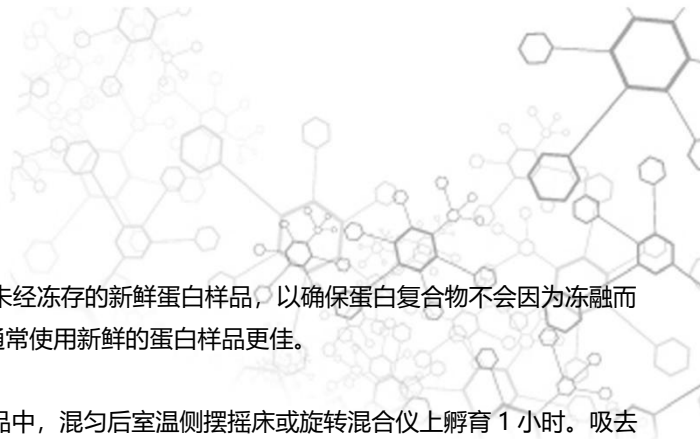
注：由于目的蛋白的差异可能对酸性洗脱法的洗脱效率有一定的影响，如洗脱效率不太高，可对酸性洗脱液的 pH 在 2.5-3.1 之间进行一定的调整，相应的中和液的 pH 值或量也要进行一定的调整，例如 50μl 酸性洗脱液(0.1M 甘氨酸, pH2.8)和 10 μl 中和液(1M Tris-HCl, pH8.5)。

**变形洗脱：**本方法为变性法，得到的蛋白样品适合 SDS-PAGE 电泳或 Western 检测。

每 10-25μl 原始磁珠体积的磁珠，加入 100μl 1X SDS-PAGE 上样缓冲液，95°C 加热 5 分钟。注：洗脱液的体积可以酌情适当调整。置于磁力架上分离 10 秒，取上清进行 SDS-PAGE 电泳或 Western 检测。

**竞争洗脱法：**如果目的蛋白是标签蛋白，并使用相应的标签抗体进行免疫沉淀，则可使用相应的多肽进行竞争洗脱。本方法为非变性法，洗脱效率高，且洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于后续分析检测。





## 6. 免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation, Co-IP):

参考免疫沉淀的方法进行，但免疫共沉淀(Co-IP)通常宜使用未经冻存的新鲜蛋白样品，以确保蛋白复合物不会因为冻融而被破坏。普通的免疫沉淀虽然可以使用冻存的蛋白样品，但通常使用新鲜的蛋白样品更佳。

## 7. 抗体的纯化:

a. 参照步骤 3，把 Protein A/G 磁珠加入到待纯化的抗体样品中，混匀后室温侧摆摇床或旋转混合仪上孵育 1 小时。吸去上清，然后用 1X TBS 或者裂解液洗涤 3 次。

b. 参照步骤 5 中酸洗脱方式，用适量酸性洗脱液进行洗脱，并用中和液进行中和。

c. 如上柱纯化抗体可参考一下方式:

c1 准备工作:

(a) 用 0.45um 或 0.2um 孔径的滤膜过滤所用的溶液。

(b) 所有的溶液必须用超声等方法脱气(degas)。

(c) 选择适当的纯化柱，用适当量的 Protein A/G Agarose 装填纯化柱。也可使用 LABLEAD 的预装柱产品。

(d) 用 10-20 倍柱体积的 TBS 洗涤并平衡纯化柱，流速可以用恒流泵控制为 1ml/min (1ml 预装柱)。如无恒流泵，也可以完全依靠重力洗涤并平衡纯化柱。

c2 抗体纯化:

(a) 把含有待纯化的抗体上样到纯化柱。

(b) 待纯化的抗体过柱后，用 10-20 倍柱体积的 TBS 洗涤，以去除未结合和非特异性结合的蛋白。洗涤是否完全可以通过测定 280nm 的吸光度进行确定。

(c) 洗涤完后，用 10ml 50mM glycine, pH2.7 作为洗脱液，洗脱结合的抗体。某些抗体和 Protein A/G 的结合能力很强，在 pH2.7 时洗脱效果不太理想，可以使用 50mM glycine, pH1.9 作为洗脱液。分管收集洗脱下的抗体，根据蛋白浓度或后续的检测效果确定洗脱峰在哪几个收集管中。

c3 纯化柱的再生:

(a) 用 10-20 倍柱体积的 TBS 洗涤纯化柱，使纯化柱达到中性的 pH。

(b) 用 TBS 来保存再生的纯化柱。

