rProtein A/G Magnetic Beads

产品规格信息

产品名称	货号	规格	价格	货期
rProtein A/G Magnetic Beads	TW000016	5 ml	1838 元	1-2 周
	TW000016L	10 ml	2888 元	1-2 周

1. 产品介绍

rProtein A/G Magnetic Beads 是 rProtein A/G 高密度定向包被到超顺磁性聚合物微球表面，该产品具有更高的抗体结合能力和较低的蛋白非特异吸附率，一步纯化即可从血清样品中分离出纯度大于 90%的抗体。产品性能见表 1。用户可根据目标抗体的种属来源及亚型选择微球的类别，Protein A，Protein G 和 Protein A/G 与不同抗体的亲和性比较参见附表。

表 1. rProtein A/G Magnetic Beads 产品性能

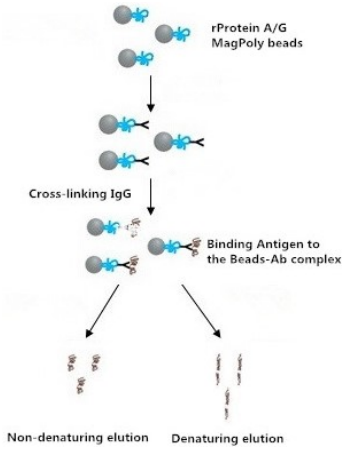
性能	指标
基质	聚合物磁性微球
配体	重组蛋白 A/G
结合能力	> 50 μg hIgG/mg 磁珠
粒径	1 μm
磁珠浓度	10 mg/ml
储存缓冲液	PBS，0.01% Tween-20，0.02% NaN_3
储存温度	2-8℃

2. 操作流程

本操作流程主要为免疫沉淀反应，每次反应使用 50 μl **rProtein A/G Magnetic Beads** 为例，可根据需要适当的增加或减少磁珠使用量。

2.1 缓冲液准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。
裂解缓冲液：50mM Tris-HCl，0.15 M NaCl，1% IGEPAL-CA630，1mM PMSF，pH=7.4
平衡/洗杂液：0.15 M NaCl，20 mM Na_2HPO_4，pH 7.0
洗脱液：0.1 M 甘氨酸，pH 3.0
中和液：1 M Tris-HCl，pH8.5
交联液：0.2 M 三乙醇胺，pH 8.2
交联剂：DMP（dimetylpimelimidate dihydrochloride）
终止液：50 mM Tris, pH 7.5



2.2 样品准备

方案 I：贴壁细胞的裂解

1) 小心去除单层细胞的培养基。
2) 用预冷 PBS 清洗细胞两次。
3) 根据表 2 的推荐体积中加入预冷裂解缓冲液。冰上孵育 5 min，期间混匀几次。
4) 将上述裂解好的样品转移至一个新的离心管中，约 13000×g 离心 10 min，分离细胞碎片。
5) 将上清转移到一个新管中，进行蛋白浓度测定及后续实验，标记为细胞裂解样品。

表 2. 针对各种标准培养皿的裂解缓冲液的推荐使用体积

培养皿大小/表面积	免疫沉淀裂解缓冲液体积
100×100 mm	500-1000 µl
100×60 mm	250-500 µl
6 孔板	200-400 µl/孔
24 孔板	100-200 µl/孔

方案 **II**：悬浮培养细胞的裂解
1) 将细胞悬液以 1000×g 离心 5 min，收集细胞，弃上清。
2) 用预冷 PBS 将细胞团轻轻重悬，将细胞悬液以 1000×g 离心 5 min，收集细胞，弃上清。
3) 向细胞团块中加入预冷裂解缓冲液。每 50 mg 细胞团块使用 500 µl。
4) 将上述裂解好的样品在冰上孵育 5 min，期间混匀几次。13000×g 离心 10 min，去除细胞碎片。
5) 将上清转移到一个新管中，备蛋白浓度测定及后续实验，标记为细胞裂解样品。

2.3 磁珠准备

1) 将 **rProtein A/G Magnetic Beads** 颠倒或漩涡混合均匀。
2) 取 50 µl **rProtein A/G Magnetic Beads** 加入新的离心管中。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) 将离心管从磁分离器上取下来，加入 200µl 平衡液，混匀，放置在磁分离器上，收集磁珠，用移液器吸弃保护液。重复洗 2 次。

2.4 抗体吸附

1) 加入抗体溶液（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) 将离心管置于磁分离器上，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 500µl 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。

2.5 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 2.6。
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（dimetylpimelimidate 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 30min 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。

2.6 抗原结合反应

1) 加入含有抗原的细胞裂解样品（步骤 2.2，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 1 h 或者在 4℃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。

2.7 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 25 µl 1×SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95℃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，吸取上清为洗脱液至新的离心管中。
3) 重复步骤 1）和 2）两次，收集洗脱液，与 2）收集洗脱液混合，加入中和液中和至 pH7.0-8.0。

附表. Protein A、Protein G 和 Protein A/G 对不同抗体的结合能力

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
Human	IgA	varible	—	++
	IgD	—	—	—
	IgE	—	—	—
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	—	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	varible	—	++
Avian egg yolk	IgY	—	—	—
Cow		++	++++	++++
Dog		++++	++	++++
Goat		—	++++	++++
Guinea pig	IgG1	++++	++	++++
Hamster	IgG2	++++	++	++++
Horse	Total IgG	++	++++	++++
Koala		—	+	
Llama		—	+	
Monkey(rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	variable	—	—
Pig		+++	+++	++++
Rabbit	Total IgG	++++	+++	++++
Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep	Total IgG	+/-	++	++

++++=结合能力强; ++=结合能力中等; —=结合能力弱或没有结合

No.168 Mashan Meiliang Road Binhu District,Wuxi,Jiangsu Province,China