

Protein A/G 免疫沉淀磁珠

Catalog Number: EA-IP-007M

Note: 请勿离心，轻柔混匀后使用。

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 类蛋白质的免疫（共）沉淀，覆盖大部分 IgG 亚型。
偶联物属性	高纯度的重组 Protein A/G。
凝胶属性	磁珠，平均粒径 3μm。
凝胶载量	1mL 磁珠，共价偶联 20mg 重组 Protein A/G。
主要成分	0.25mL Protein A/G 免疫磁珠，保存于 0.75mL 含防腐剂的 PBS 中。

注意事项

1. 本产品 4℃ 可保存 1 年，冷藏条件下运输。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
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。
5. 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。
6. 配套使用的相关试剂，需实验室自备。

使用方法

注：所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。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 20μg IgG，请根据待结合抗体量，调节磁珠使用量。

1. 目标蛋白样品制备

1) 血清及分泌表达目标蛋白样品处理

收集血清或培养基上清，检测目标蛋白浓度。如果目标蛋白质浓度较高，建议用 1×PBS 稀释至蛋白质终浓度为 10~100μg/mL，以备后续实验。

2) 细胞内表达目标蛋白样品处理

- a. 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。
- b. 贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，连同培养基转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。
- c. 用预冷至 4℃ 的 1×PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复 1 次。
- d. 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，反复吹打后冰上放置 10~20min。

注：一般 1mL 细胞裂解液可以处理约 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞。为了避免目标蛋白质降解，您可以添加蛋白酶抑制剂（PMSF 工作浓度：0.1~1.0mmol/L）。

For Research Use Only

- e. 用超声破碎仪处理细胞裂解液，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置30min 之后，12000rpm，4℃离心10min。

取上清，可立即进行下一步实验或置于-80℃冻存。

注：若无超声破碎仪，也可使用削成斜口的枪头或注射器反复吹吸，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。

2. CO-IP 实验设置（仅供参考，实验过程中请按实际需要调整）

1) 阴性对照

- a. 抗体的阴性对照：以磁珠偶联 Mouse IgG 亚型抗体为例，选择 Mouse IgG（货号：Q6004）做为抗体的阴性对照，使用方法与抗体相同。
- b. 蛋白的阴性对照：使用不表达靶蛋白 X 但表达无关蛋白 Y 的蛋白样品做对照，处理方法与待对照靶蛋白相同。

2) 阳性对照

- a. 以未添加磁珠凝胶偶联抗体处理的蛋白样品作为阳性对照，即 Input 组。上样缓冲液制备方法与实验组相同。

3. 装柱及孵育

- a. ProteinA/G 磁珠的准备：将磁珠充分混悬，取40μL 磁珠悬液（含10μL 磁珠），置于离心管中，加入500μL 1×PBS，充分混悬，置于磁力架上，磁性分离，弃上清；重复此洗涤步骤2次。
- b. 抗体准备：根据抗体说明书推荐的IP 稀释比，用1×PBS 稀释抗体，配制成为抗体工作液。或将抗体总体积调整至500μL。置于冰上备用。
- c. 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30min。
- d. 磁性分离，取上清液至新的离心管中，以便后续使用。
- e. 向磁珠中加入500μL 1×PBS，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复此步骤4次。得到抗体-磁珠复合物。

4. 目标蛋白与抗体-磁珠复合物结合

- a. 孵育：在抗体-磁珠复合物中加入400μL 准备好的样本（见步骤1），轻柔混匀，摇床上室温孵育30min，也可4℃孵育2h 或更长时间。
- b. 孵育完毕后，磁性分离，取上清液至新的离心管中，以便后续使用。
- c. 加入500μL 1×PBST，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复4次。

5. 目标蛋白洗脱

本说明书提供以下两种目标蛋白洗脱方案，请根据后期检测的需要选择不同的目标蛋白洗脱方法。

变性洗脱法

此方法的目标，适用于 SDS-PAGE 检测。

- a. 分离磁珠，弃上清，向磁珠中加入20μL 1×PBS 和5μL 5×上样缓冲液，混合均匀，95℃煮样5min。
- b. 磁性分离，收集上清，进行 SDS-PAGE 检测。

酸性洗脱法

For Research Use Only

此方法洗脱的目标蛋白，可用于后期功能分析。

- a. 分离磁珠，弃上清，向磁珠中加入50~100μL 酸性洗脱液，室温孵育 10min；

注：酸性环境会缩短免疫磁珠的使用寿命，应尽量缩短磁珠与酸性洗脱液的接触时间，建议不超过 10min。

- b. 分离磁珠，收集上清至新的离心管，并立即滴入总体积 1/10 体积的 10×PBST Buffer 中和，将洗脱产物pH 调节至中性，样品可用于后期功能分析。

背景信息

本产品由高品质的Protein A/G 与磁珠共价偶联制成，可用于免疫沉淀（IP）和免疫共沉淀（Co-IP）。本产品具有高载量，操作迅速便捷，特异性强和可结合范围广等特点。

储存方法

4 °C可保存 12 个月。

附件

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	+++++
Chicken	Total IgY	-
Monkey	Total IgG	+++++