

Protein A 磁珠

Catalog Number: EA-IP-015M

Note: 请勿离心，轻柔混匀后使用。

性能指标

应用范围	应用于抗体结合的目的蛋白或其蛋白复合物的免疫沉淀等实验。
抗体属性	高纯度的重组 Protein A。
凝胶属性	磁珠，平均粒径 3 μm 。
凝胶载量	1mL 磁珠悬液，含约 20mg 磁珠，共价偶联 $\geq 0.6\text{mg}$ 重组 Protein A，可结合 $\geq 0.7\text{mg}$ IgG。
主要成分	0.25mL Protein A 磁珠，保存于 0.75mL 含防腐剂的 PBS 中。

注意事项

1. 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。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品以悬液形式提供亲和磁珠，使用前先温和重悬磁珠悬液，然后按照需求取用。
4. 勿离心、冷冻、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。
5. 混匀磁珠时，请采用移液枪轻柔吹打，柔和涡旋，上下颠倒及摇床混匀等方法。勿使用超声等方法。
6. 各物种的抗体 (IgG, IgM, IgA, IgD) 与 Protein A 结合亲和力不同，使用请认真阅读本说明书附件。
7. 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 $40\mu\text{L}$ (含 $10\mu\text{L}$ 磁珠)，可从 $15\mu\text{L}$ 血清或者 $100\mu\text{L}$ 细胞上清中结合 $20\mu\text{g}$ 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 $1\times\text{PBS}$ 稀释至蛋白质终浓度为 $10\sim 100\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以备后续实验。

2) 细胞内表达目标蛋白样品处理

- a. 将悬浮细胞或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. 用预冷至 4°C 的 $1\times\text{PBS}$ 重悬细胞， 1000rpm 离心 3min，弃上清。重复 1 次。
- c. 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。

- d. 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°C 离心 10min。取上清，以备后续实验。

2. 装柱及孵育

1) Protein A 磁珠准备

- a. 温和重悬 Protein A 磁珠，混合均匀，取 $40\mu\text{L}$ 磁珠悬液 (约含 $10\mu\text{L}$ 磁珠) 至离心管中。
- b. 加入 $500\mu\text{L}$ 的 $1\times\text{PBS}$ 轻柔重悬清洗磁珠，磁力架上静置 10 sec 后，弃上清，重复上述步骤 2 次。

注：多个样品时，可将磁珠重悬后分装到数个反应管中分别进行反应。

For Research Use Only

2) 抗体与 Protein A 磁珠的结合

- 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，配制成抗体工作液。或将抗体总体积调整至 500μL，置于冰上备用。
- 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。
- 磁性分离，取上清液至新的离心管中，以便后续使用。
- 加入 500μL 1×PBS 至磁珠，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复 4 次。得到抗体-磁珠复合物。

3) 目的蛋白与抗体-磁珠复合物结合

- 孵育：在抗体-磁珠复合物中加入 500μL 准备好的样本，摇床上室温孵育 30min，也可 4°C 孵育 2h 或更长时间。
- 离心分离：孵育完毕后，磁性分离，弃上清。加入 500μL 1×PBST，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复 4 次。

4) 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

此方法只适用于 SDS-PAGE 检测。

- 加入 20μL 1×PBS 和 5μL 5×上样缓冲液，煮样 5min，冷却至室温并离心。
- 取上清进行 SDS-PAGE 实验，以备后续的 Western Blotting 检测。

酸性洗脱法

酸性洗脱方式，成本低，操作时间短，一般不引起蛋白变性，便于对蛋白的后续分析检测。

- 将预冷的 0.5mL 或 20 倍磁珠体积，pH 3.0 的酸性洗脱液加入上述沉淀，悬浮磁珠，室温孵育 5min。

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。

- 孵育结束后，磁性分离，转移上清到新的离心管中，并立即加入 1/10 体积的 pH 8.0 的中和液，混匀。
- 按照后续实验需求处理和保存蛋白质。

背景信息

Protein A 磁珠由高质量的重组 Protein A 与磁珠共价偶联而成，可特异性地结合相应抗体，主要用于免疫沉淀、免疫共沉淀或染色质免疫沉淀等。

储存方法

4°C 可保存 12 个月。

附件

Protein A 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	+++
Sheep	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	+++

“+”表示亲和力的相对强度，“-”表示无亲和力。