



rProtein A/G 免疫沉淀磁珠 (IP Grade)

rProtein A/G MagPoly Beads (IP Grade)

货号: C0914

规格: 1ml / 5ml

产品介绍:

rProtein A/G 免疫沉淀磁珠 (rProtein A/G MagPoly Beads) 是由高质量的 Recombination Protein 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, 操作简便高效。Protein A/G 免疫磁珠同时共价偶联了蛋白 A 和蛋白 G, 比单独的蛋白 A 或者蛋白 G 都有更广的结合范围, 实用性更高。

rProtein A/G 免疫沉淀磁珠性能参数:

产品性能	产品参数
基质(Matrix)	聚合物磁性微球
配体 (Ligand)	重组蛋白 A/G
结合能力 (Binding) /mg 磁珠	>50 μ g hIgG
粒径 (Particle)	1 μ m
磁珠浓度 (Concentration)	10mg/ml
储存缓冲液 (Storage buffer)	PBS, 0.01% Tween-20, 0.02% NaN3
保存条件	2°C - 8°C, 2 年有效

天然蛋白 A (Protein A) 是一种发现于金黄色葡萄球菌的细胞壁表面蛋白, 天然蛋白 G (Protein G) 是一种分离自 G 型或 C 型链球菌属的细胞表面蛋白, 二者功能相似, 主要通过与其免疫球蛋白 (Ig) 的 Fc 区相互作用, 可结合大多数哺乳动物的 IgG, 但在两者结合特异性上有所不同 (详见附表)。本品使用的是基因改造后的蛋白 A 和蛋白 G, 不仅维持其本身的 Ig 亲和特性, 同时也去除了天然蛋白本身的非主要结合域以降低非特异性结合。用户可根据目标抗体的种属来源及亚型选择配体的类别, Protein A, Protein G 和 Protein A/G 与不同抗体的亲和性比较参见附表。本品适用的范围广泛, 可应用于细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水以及其它的免疫抗原等样本。

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 μ l rProtein A/G MagPoly Beads, 可根据需要适当的增加或减少磁珠使用量。

1. 缓冲液准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

平衡/洗液: 0.15M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0

洗脱液: 0.1M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1M Tris-HCl, pH 8.5

交联液: 0.2 M 三乙醇胺, pH 8.2

交联剂: DMP (dimethylpimelimidate dihydrochloride) (20 mM DMP 需要现用现配)

终止液: 50 mM Tris, pH 7.5

2. 磁珠准备

(1) 将 rProtein A/G MagPolyBeads 颠倒或漩涡混合均匀。

(2) 取 50 μ l rProtein A/G MagPoly Beads 加入新的 EP 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 EP 管从磁分离器上取下来，加入 200 μ l 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。

3. 抗体吸附

(1) 加入 100 μ l 平衡液将磁珠悬浮，加入目标抗体溶液，充分混匀。

(2) 室温孵育 10min，可以振荡或漩涡混合均匀。

(3) 将 EP 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 500 μ l 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。

4. 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，直接进行抗原结合反应操作。

(注：50ul-1ml 磁珠量均可以按照以下步骤操作，无需额外增加交联液体积。)

(2) 加入 1ml 交联液，振荡悬浮，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。该操作重复两次。

(3) 再加入 1ml 含有 20 mM DMP (dimethylpimelimidate 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 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。

(4) 使用 1ml 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 15min 后，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。

(5) 加入 1ml 平衡液，颠倒混匀，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。再重复两次。

5. 抗原结合反应

(1) 加入含有抗原的样品 (通常 100-1000 μ l)，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 10min，使抗原与抗体充分结合，如结合力较弱则可在室温下反应 1h 或者在 4 $^{\circ}$ C 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 1ml 洗液，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。

6. 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 μ l 1 \times SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95 $^{\circ}$ C 加热 5min。

(2) 置于磁性分离器上，进行磁性分离，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 50 μ l 洗脱液，混合均匀，室温孵育 5min。

(2) 置于磁性分离器上，进行磁性分离，收集洗脱液至新的 EP 管中。

(3) 重复步骤(1)和(2)，收集洗脱液，与(2)中洗脱液混合，加入中和液中和至 pH7.0-8.0。

附表.

蛋白质 A/G/L 的结合特性 Binding Characteristics of Protein A/G/L

Species		Protein A	Protein G	Protein L
Human	IgG	+++	+++	+++
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	-	+++	+++
	IgG4	++++	++++	++++
Rabbit	IgG	+++	+++	+
Mouse	IgG	++	++	+++
	IgG1	+	++++	+++
	IgG2a	++++	++++	+++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	-	-	+++
Rat	IgG	+	++	+++
	IgG1	-	+	+++
	IgG2a	-	++++	+++
	IgG2b	-	++	+++
	IgG2c	++	++	+++
	IgG3	+	++	?
Guinea pig	IgG1	++	+	?
	IgG2	++	+	?
Cow	IgG	+	+++	-
	IgG1	+	+++	-
	IgG2	+++	+++	-
Goat / Sheep	IgG	+	++	-
	IgG1	+	+++	-
	IgG2	+++	+++	-
Horse	IgG	++	++++	?
Dog	total Ig	++	+	?
Pig	total Ig	+++	++	+++
Cat	IgG	+++	+	?
Chicken	IgY	-	-	-
Monkey(rhesus)	IgG	++++	++++	?
Hamster		+	++	+++
Koala		-	+	?
Llama		-	+	?
++++, Strong Binding ++~++++, Medium Binding +, Weak Binding +/-, Weak or No Binding -, No Binding				