

Biolinkedin® Protein A/G 琼脂糖磁珠

包装清单

名称	货号	包装
Protein A/G	L-1204	1mL
琼脂糖磁珠	L-1204A	5mL

产品概述

Biolinkedin® Protein A/G 琼脂糖磁珠是粒径为 70 μ m 的琼脂糖磁珠表面上共价结合了大量的 Protein A/G 蛋白, 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。重组 Protein A/G 蛋白包含 Protein A 的 5 个免疫球蛋白结合区域和 Protein G 的 2 个结合区域, 结合能力较单一的 Protein A 和 Protein G 有很大提高。本产品广泛应用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中抗原的免疫沉淀 (IP) 或免疫共沉淀 (Co-IP)。由于采用磁性分离, 使得每次 IP 和 Co-IP 可以节省 40% 的时间。

产品特性

基质	磁性琼脂糖磁珠
配体	重组 Protein A/G 蛋白
粒径	30~100 μ m
磁珠浓度	磁珠体积占悬浮液体积的 20%
结合能力	≥ 2.0 mg hIgG/mL 磁珠
适用范围	IP, Co-IP, ChIP, RIP
保质期	在 2~8 $^{\circ}$ C 稳定保存两年

操作流程

注意：缓冲液自行准备或直接购买我司 IP 试剂盒。

贴壁细胞样品：

1. 移去培养基, 用 PBS 洗细胞两次。
2. 收集细胞至 1.5mL EP 管内, 按比例加入 IP Lysis/Wash Buffer, 同时加入 PMSF 等相应的抑制剂, 混匀后置于冰上静置 5~20min (期间混匀几次)。
3. 4 $^{\circ}$ C, 12000~16000xg, 10min 离心收集上清液, 置于冰上以备后续实验 (或置于 -80 $^{\circ}$ C 长期保存)。

培养皿 IP Lysis/Wash Buffer 推荐使用体积：

培养皿大小/表面积	IP Lysis/Wash Buffer 体积
100 mm x 100 mm	500~1000 μ L
100 mm x 60 mm	100~300 μ L
6 孔板	100~200 μ L

悬浮细胞样品：

1. 4 $^{\circ}$ C、500~1000xg、10min, 收集细胞, 弃上清。
2. 用 PBS 洗细胞一次, 即用 PBS 将细胞团重悬, 4 $^{\circ}$ C、500~1000xg、5min, 收集细胞, 弃上清。
3. 用预冷的 IP Lysis/Wash Buffer 重悬细胞。每 50mg 细胞使用 500 μ L IP Lysis/Wash Buffer。同时加入 PMSF 等相应的抑制剂, 混匀后置于冰上静置 5~20min (期间混匀几次)。
4. 4 $^{\circ}$ C, 12000~16000xg, 10min 离心收集上清液, 置于冰上以备后续实验 (或置于 -80 $^{\circ}$ C 长期保存)。

血清样品：

一般建议用 IP Lysis/Wash Buffer 稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 50~150 μ g/mL, 置于冰上备用 (或置于 -20 $^{\circ}$ C 长期保存)。

免疫复合物的制备

注意：样品所需的量和孵育时间均依赖于每个特定的抗体-抗原体系, 因而可能需要优化才能得到最大产量。

以下实验方案针对 2~10 μ g 亲和纯化的抗体, 根据需要可以按比例放大。

1. 在离心管中 将每个样品的细胞裂解液与 2~10 μ g 免疫沉淀抗体结合。每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500~1500 μ g。
2. 用 IP Lysis/Wash Buffer 将抗体以及制备好的样品稀释至 300~500 μ L。
3. 在室温下孵育 1~2h, 或 4 $^{\circ}$ C 2~4h, 以形成免疫复合物。

免疫沉淀：

注意：为保证磁珠均匀分布, 使用前通过反复颠倒或轻微涡旋混匀瓶中磁珠。

1. 将 20~50 μ L 的 Biolinkedin® Protein A/G 琼脂糖磁珠加入 1.5mL 离心管中。
2. 向磁珠中加入 500 μ L 预冷 PBS, 轻柔混匀。
3. 将离心管放入磁力架中收集磁珠到离心管的一边。去除上清。
4. 向离心管中加入 200~500 μ L IP Lysis/Wash Buffer。颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1min。用磁力架收集磁珠。去除上清。

5. 将抗原样品/抗体混合物加入装有磁珠的离心管中，保持混匀室温下孵育 1~2h，或 4°C 2~4h。
6. 用磁力架收集磁珠，除去未结合的样品，保存以备分析。
7. 向离心管中加入 1000 μ L IP Lysis/Wash Buffer，轻柔混匀磁珠 5~10min。收集磁珠，弃上清。再重复洗两次。
8. **变性洗脱**：向离心管中加入 80~100 μ L SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1 \times)，将样品置于 100°C 水浴或者金属浴中加热 10min。通过磁力架分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。

备注:如需保持蛋白活性，也可采用以下洗脱方式。

低 pH 洗脱：向离心管中加入 100 μ L Elution Buffer。保持混匀在室温下孵育离心管 5~10min。通过磁力分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。每 100 μ L 洗出液中加入 20 μ L Neutralization Buffer 来中和低 pH。

注意事项

1. 进行实验操作之前，请务必认真阅读本操作说明书。
2. 请勿高速离心、干燥或冷冻磁珠，这些操作会导致磁珠聚集而降低结合能力。
3. IP 实验中不同类型的抗体与抗原结合的亲和性是有区别的，抗体与抗原结合还会受到 IP Lysis/Wash Buffer 的影响，因此**可自行优化操作细节或者筛选及配制缓冲液进行实验**。
4. 磁珠使用前应充分振荡均匀。磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥。
5. 本产品仅供科学研究使用。

相关产品

货号	产品名称
L-1001	Protein A 磁珠
L-1002	Protein G 磁珠
L-1003	Protein L 磁珠
L-1004	Protein A/G 磁珠
L-1005	Protein A 琼脂糖凝胶
L-1006	Protein G 琼脂糖凝胶
L-1007	Protein L 琼脂糖凝胶
L-1008	Protein A/G 琼脂糖凝胶
L-1201	Protein A 琼脂糖磁珠
L-1202	Protein G 琼脂糖磁珠
L-1203	Protein L 琼脂糖磁珠
L-1204	Protein A/G 琼脂糖磁珠
/	磁力架系列

问题解决

1. 抗原没有免疫沉淀下来

- ① 样品中所含的抗原过少，不足以被检测
建议：通过 SDS-PAGE 或蛋白免疫印迹验证裂解液中蛋白的表达和/或裂解效率；如果需要，加大样品量
- ② 抗体无法结合抗原
建议：选择另一种特异性抗体，或者选择另一种识别不同抗原表位的抗体。
- ③ IP Lysis/Wash Buffer 中的成分干扰了抗原与抗体的结合
建议：使用其它缓冲液进行免疫沉淀和漂洗（例如，含有 0.5% CHAPS 的 TBS）

2. 获得的蛋白量低

- ① 蛋白质被降解
建议：加入蛋白酶抑制剂
- ② 所使用的磁珠量不够
建议：提高捕获免疫复合物所使用的磁珠量
- ③ 样品中的目标蛋白量不够
建议：提高抗原样品量

3. 多条非特异条带

有非特异性的蛋白结合在磁珠上

建议：在 IP Lysis/Wash Buffer 中加入 50~350mM NaCl。加大洗脱力度和次数。

4. 磁珠聚集

磁珠在低 pH 的 Elution Buffer 中发生聚集属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。

建议：用 IP Lysis/Wash Buffer 至中性，然后用含有 0.1% (v/v) Tween-20 的 Tris buffer (pH7.5) 振荡重悬磁珠，并用超声波水浴处理，即可使磁珠恢复均匀状态，以上处理均不影响磁珠的抗体结合效率。也可添加终浓度为 0.1% (v/v) 的非离子型去垢剂(如 Tween-20 或 Triton X-100) 可有效防止磁珠聚集。

注意：超声处理也会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落，所以磁珠在加样后洗脱前不宜使用该方法。