

Protein A Magnetic Beads

Cat# PM0001

产品概述

Protein A Magnetic Beads 是粒径为 200nm 的纳米磁珠表面上共价结合 Protein A 蛋白，纳米级磁珠提供的超大比表面积，具有更多的结合位点，磁珠使用量更少，非特异性吸附率低。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（Streptococcal bacteria）表达的免疫球蛋白结合蛋白，二者功能相似。主要通过与免疫球蛋白（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，Protein A 蛋白包含 5 个免疫球蛋白结合的结构域，可结合 human IgG1、IgG2、IgG4，mouse IgG2a、IgG2b 及 rabbit IgG，Protein G 蛋白包含 2 个免疫球蛋白结合的结构域，可结合 human IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，mouse IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3，rat IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c，以及 rabbit、goat 多克隆抗体等。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，可以节省 40%的时间。

产品性能

基质	硅基磁珠
配体	重组 Protein A 蛋白
粒径	200 nm
磁珠浓度	10 mg/mL
结合能力	≥ 0.9 mg hIgG/mL 磁珠
适用范围	IP, Co-IP, ChIP, RIP 等

产品/组分信息

产品名称	货号	规格
Protein A Magnetic Beads	PM0001-0.1ML	0.1 mL
Protein A Magnetic Beads	PM0001-1ML	1 mL
Protein A Magnetic Beads	PM0001-5×1ML	5×1 mL

储存方式

2~8℃保存，不可冷冻。

使用说明

注意事项

- 1. 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。
- 2. 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 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。

3. 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。
4. 本产品仅供科学研究使用。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

缓冲液配置

建议以下缓冲液在使用前用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤

IP Lysis Buffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100 (或者 1% NP-40), pH7.4,

Elution Buffer: 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

Neutralization Buffer: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

细胞样品的制备

贴壁细胞样品

1. 移去培养基，用 PBS 洗涤细胞两次，按比例加入 IP Lysis Buffer（注意添加 1mM PMSF 等相应的抑制剂）裂解细胞，混匀后置于冰上静置 5~20 min（期间混匀几次），使细胞充分裂解（也可通过超声充分裂解细胞，30 s on, 10 s off，振幅设定 35%，2-3 个循环）。
2. 4℃、12,000rpm、15 min 离心收集上清液，置于冰上以备后续实验（或置于-80℃长期保存）。
3. 培养皿 IP Lysis Buffer 推荐使用体积：

培养皿大小/表面积	IP Lysis Buffer 体积
100 mm × 100 mm	500~1,000 μL
100 mm × 60 mm	100~300 μL
6 孔板	100~200 μL

悬浮细胞样品

1. 4℃、1000 g、3min，离心收集细胞，弃上清。
2. 用 PBS 洗细胞一次，4℃、500~1,000 g、5min，弃上清。
3. 用预冷的 IP Lysis Buffer 重悬细胞，每 50mg 细胞使用 500 μL IP Lysis Buffer（注意添加 1mM PMSF 等相应的抑制剂）裂解细胞，混匀后置于冰上静置 5~20 min（期间混匀 2~3 次），使细胞充分裂解（可通过超声充分裂解细胞，30 s on, 10 s off，振幅设定 35%，2-3 个循环）。
4. 4℃、12000rpm、15min 离心收集上清液，置于冰上以备后续实验（或置于-80℃长期保存）。

血清样品

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

免疫复合物的制备

【注】：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，可能需要优化才能得到最大产量。

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

1. 在 1.5mL 离心管中，将每个样品的细胞裂解液与 2~10 μg 免疫沉淀抗体结合。每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500~1,500 μg 。
2. 用 IP Lysis Buffer 将抗体以及制备好的样品稀释至 300~500 μL 。
3. 在室温下置于翻转混合仪翻转孵育 10min，使抗原和抗体充分结合，如结合能力较弱则可在室温反应 1h~2h 或 4℃ 反应过夜，以形成免疫复合物。

免疫沉淀

【注】：为保证磁珠均匀分布，使用前涡旋振荡 1 min，使其充分混匀。

1. 将 20~50 μL 的 Protein A Magnetic Beads 加入 1.5 mL 离心管中，加入 500 μL 预冷的 PBS，轻柔混匀，将离心管放入磁力架中，使磁珠吸附到离心管的一侧，用移液器吸取并弃上清。
2. 向离心管中加入 200~500 μL IP Lysis Buffer，轻微涡旋混匀 1 min，用磁力架收集磁珠，弃上清，重复一次。
3. 将抗原样品/抗体混合物加入装有磁珠的离心管中，漩涡振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪翻转孵育 10min，如结合能力较弱则可在室温反应 1h~2h 或 4°C 2-4h，以形成免疫复合物。
4. 孵育完毕后，用磁力架收集磁珠，弃上清（可保留部分上清，用于检测免疫沉淀的效果）。向离心管中加入 1000 μL IP Lysis Buffer，轻柔混匀磁珠 5~10min。将离心管放入磁力架中 15 秒，收集磁珠，弃上清，重复洗涤 3 次。可通过检测洗涤得到的洗涤液的 OD_{280} 来判断是否洗涤完全，若 OD_{280} 大于 0.05，需要适当增加洗涤次数。
5. 变性洗脱：向离心管中加入 80~100 μL SDS-PAGE Loading Buffer (1 $\times$) 混合均匀，煮沸 10 min。将离心管放入磁力架中去除磁珠，保留含有目的抗原的上清，Western blotting 检测沉淀及共沉淀蛋白质。

【注】：如需保持蛋白活性，也可采用低 pH 洗脱：向离心管中加入 100 μL Elution Buffer。保持混匀在室温下孵育 10min。用磁力架吸附磁珠，收集洗脱液至新的 EP 管中。每 100 μL 洗出液中加入 20 μL Neutralization Buffer 来中和低 pH 至 7.0-8.0。

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

CYTOCH