



rProtein A/G MagPoly Beads

Protein A/G 磁珠

Cat.No.: CW8302M

保存条件:

2-8°C保存, 禁止产品冻结, 长期存放请保证试剂管竖立向上, 磁珠浸没于保护液中。

产品内容

Component	CW8302M
rProtein A/G MagPoly Beads (10 mg/mL)	1 mL

产品简介

rProtein A/G MagPoly Beads是 rProtein 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。本产品可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反应。

产品参数

项目	性能
基质	聚合物磁性微球
配体	重组蛋白A/G
综合能力	> 50 μg Rabbit IgG/mg 磁珠
粒径	1 μm
磁珠浓度	10 mg/mL
储存缓冲液	20 mM Tris-HCl pH7.4, 0.01% Tween-20(v/v), 0.05% KroVin300 (v/v)

注意事项

1. 禁止产品冻结, 长期存放请保证试剂管竖立向上, 磁珠浸没于保护液中。
2. 本产品仅限科研使用。

操作步骤

本操作流程主要为免疫沉淀反应, 以每次反应使用50 μL rProtein A/G MagPoly Beads 为例, 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 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

裂解缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1% IGEPAL-CA630, 1 mM PMSF, pH7.4

平衡/洗杂液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH7.0

洗脱液: 0.1 M 甘氨酸, pH3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH8.5

交联液: 0.2 M 三乙醇胺, pH8.2

交联剂: DMP (dimethylpimelimidate dihydrochloride)

终止液: 50 mM Tris-HCl, pH7.5

2. 样品准备

贴壁细胞的裂解

- 1) 小心去除单层细胞的培养基。
- 2) 用预冷PBS清洗细胞两次。
- 3) 根据下表的推荐体积向细胞中加入预冷裂解缓冲液。冰上孵育5 min, 期间混匀几次。
- 4) 将上述裂解好的样品转移至一个新的离心管中, 约 $13,000\times g$ 离心10 min, 分离细胞碎片。
- 5) 将上清转移到一个新管中, 进行蛋白浓度测定及后续实验, 标记为细胞裂解样品。

不同标准培养皿的裂解缓冲液的推荐使用体积

培养皿大小/表面积	免疫沉淀裂解缓冲液体积
10 cm培养皿	500-1000 μL
60 mm培养皿	250-500 μL
6孔板	200-400 $\mu\text{L}/\text{孔}$
24孔板	100-200 $\mu\text{L}/\text{孔}$

悬浮培养细胞的裂解

- 1) 将细胞悬液以 $1,000\times g$ 离心5 min, 收集细胞, 弃上清。
- 2) 用预冷PBS将细胞团轻轻重悬, 将细胞悬液以 $1,000\times g$ 离心5 min, 收集细胞, 弃上清。
- 3) 向细胞团块中加入预冷裂解缓冲液。每50 mg细胞团块使用500 μL 。
- 4) 将上述裂解好的样品在冰上孵育5 min, 期间混匀几次。 $13,000\times g$ 离心10 min, 去除细胞碎片。
- 5) 将上清转移到一个新管中, 备蛋白浓度测定及后续实验, 标记为细胞裂解样品。

3. 磁珠准备

- 1) 将rProtein A/G MagPoly Beads颠倒或漩涡混合均匀。
- 2) 取50 μL rProtein A/G MagPoly Beads 加入新的离心管中。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) 将离心管从磁分离器上取下来, 加入200 μL 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。

4. 抗体吸附

- 1) 加入抗体溶液 (5-25 μg 抗体总量), 充分混匀, 体积不足 500 μL 时用平衡液补足。
- 2) 室温孵育10 min 以上 (具体时间根据结合效果调整), 可以振荡或漩涡混合均匀。
- 3) 将离心管置于磁分离器上, 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 μL 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。

5. 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。
- 2) 加入1 mL 交联液, 振荡悬浮, 置于磁分离器上, 大约1 min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。该操作重复两次。
- 3) 再加入1 mL 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30 min 后, 置于磁分离器上, 大约1 min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。
- 4) 使用1 mL 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15 min后, 置于磁分离器上, 大约1 min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。
- 5) 加入1 mL 平衡液, 颠倒混匀, 置于磁分离器上, 大约1 min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。再重复两次。

6. 抗原结合反应

- 1) 加入含有抗原的细胞裂解样品 (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10 min, 使抗原与抗体充分结合, 如结合力较弱则可在室温下反应1 h 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1 mL 洗杂液, 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。

7. 抗原洗脱

方案一 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10 min。
- 2) 置于磁性分离器上, 进行磁性分离, 或者离心, 收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。

方案二 非变性洗脱

- 1) 向磁珠-抗体-抗原复合物中加入300 μ L 洗脱液, 混合均匀, 室温孵育10 min。
- 2) 置于磁性分离器上, 进行磁性分离, 吸取上清为洗脱液至新的离心管中。
- 3) 重复步骤1) 和2) 两次, 收集洗脱液, 与2) 收集洗脱液混合, 加入中和液中和至pH7.0-8.0。