

使用说明书

【产品名称】 Protein A 琼脂糖磁珠

【产品型号】 MAg25K/Protein A

【目录号】 P24

【产品介绍】

Enriching Beads® Protein A 琼脂糖磁珠以交联琼脂糖为基质，Protein A 被在磁性微球表面。与同类产品相比，Enriching Beads® Protein A 琼脂糖磁珠表面具有更多的抗体结合位点。在 IP 实验中，只需使用更少的磁珠量，非特异性结合低，使用简便有效，具有大面积特异的表面区域，从而大大缩短抗体吸附和抗原结合的时间，可以在 30 分钟内完成完整的 IP 实验。此产品适用的范围广泛，例如细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水。

【产品规格】

平均粒径	25µm
固形物浓度	10% (v/v)
分散液	PBS, pH 7.4, 0.1%BSA,0.02%NaN ₃
抗体结合量	20~30mg Human IgG/mL (100% v/v)

【产品特点】

- ◇ 抗体结合位点丰富；
- ◇ 非特异性吸附低。

【作用对象】适用于细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水以及其它的免疫抗原等。

【有效期】1 年（2~8 °C 保存）

【操作流程】

缓冲液	配方
Binding/Wash Buffer	PBST, pH 7.4: PBS with 0.02% Tween-20
NP40 Cell Lysis Buffer	150mM NaCl, 1% NP40, 50mM Tris, pH 7.4
Elution Buffer	100mM Glycine, pH 2.8
Neutralization Buffer	1M Tris-HCl, pH 8.5

抗原样品制备

本操作说明书提供以下四种样品处理方法，建议您根据不同来源的抗原样品选择适

当的方式进行预处理，使待检测抗原释放至样品溶液中。

血清样品处理：若目标蛋白丰度较高，建议用 **Binding Buffer** 稀释血清样品至目标蛋白浓度为 $10\sim 100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ，置于冰上备用（或置于 -20°C 长期保存）。

悬浮细胞样品处理：离心收集细胞（ 4°C , $500\ \text{g}$, $10\ \text{min}$ ），弃上清后称重，按 1.0×10^5 个细胞 $20\sim 30\ \mu\text{L}$ 的比例加入 **PBS** 洗涤 2 次；按 1.0×10^5 个细胞 $20\sim 30\ \mu\text{L}$ 的比例加入 **NP40 Cell Lysis Buffer**，同时加入蛋白酶抑制剂（如终浓度为 $1\ \text{mM}$ 的 **PMSF**），混匀后置于冰上处理 $10\ \text{min}$ ；离心收集上清液（ 4°C , $14000\ \text{g}$, $10\ \text{min}$ ），置于冰上备用（或置于 -20°C 长期保存）。

贴壁细胞样品处理：移去培养基，用 **PBS** 洗涤两次；用胰酶消化或者细胞刮刀，收集至 $1.5\ \text{mL}$ 离心管内，按 1.0×10^5 个细胞 $20\sim 30\ \mu\text{L}$ 的比例加入 **PBS** 洗涤 2 次；按 1.0×10^5 个细胞 $20\sim 30\ \mu\text{L}$ 的比例加入 **NP40 Cell Lysis Buffer**，同时加入蛋白酶抑制剂（如终浓度为 $1\ \text{mM}$ 的 **PMSF**），混匀后置于冰上处理 $10\ \text{min}$ ；离心收集上清液（ 4°C , $14000\ \text{g}$, $10\ \text{min}$ ），置于冰上备用（或置于 -20°C 长期保存）。

大肠杆菌样品处理：离心收集大肠杆菌（ 4°C , $12000\ \text{g}$, $2\ \text{min}$ ），弃上清后称重，按每克（湿重）菌体 $10\ \text{mL}$ 的比例用 **PBS** 洗涤 2 次；按每克（湿重）菌体 $5\sim 10\ \text{mL}$ 的比例加入 **Binding Buffer**，同时加入蛋白酶抑制剂（如终浓度为 $1\ \text{mM}$ 的 **PMSF**），重悬菌体，超声裂解细胞，离心收集上清（ 4°C , $17000\ \text{g}$, $10\ \text{min}$ ）。

磁珠预处理

1. 移液器吹打或漩涡振荡器混匀磁珠，取 $50\ \mu\text{L}$ 磁珠悬浮液（ 10% , v/v ）至离心管中， $1.5\ \text{mL}$ 磁力架磁性分离去除保存液；

注：客户可根据实际需要适当增减；

2. 加入 $100\ \mu\text{L}$ **PBS** 混匀磁珠（颠倒 30 秒或者漩涡振荡器混匀），磁性分离去除上清液（重复 2 次）；

抗体结合

1. 用 $100\ \mu\text{L}$ **PBST** 稀释 $2\sim 20\ \mu\text{g}$ 抗体样品，稀释后加入到装有磁珠的离心管中；

注：实际抗体使用量需根据实验摸索，可参看磁珠对应不同抗体亚型的亲和力表；

2. 将上述混合物放入摇床或旋转混合仪室温或 37°C 颠倒混匀或者涡旋混匀 $10\sim 15$ 分钟；

3. 将装有磁珠和抗体的离心管放入磁力架，待磁珠完全贴壁后，去除上清液；

4. 用 $100\ \mu\text{L}$ **PBST** 洗涤磁珠-抗体复合物 3 次。

抗体交联反应（备选）

如操作者需要将抗体和目标抗原复合物共同洗脱，请忽略本步骤，直接进行下一步骤；本步骤适用于操作者需要单独洗脱目标抗原的试验，推荐使用 **BS3** (Thermo Scientific, Cat. #21580) 作为交联剂，相关实验请参照该试剂的操作说明。

抗原沉淀反应

1. 抗原吸附：向上一步装有磁珠-抗体复合物的离心管中加入制备好的细胞裂解液 100~1000 μ L，用移液枪吹打混匀；
2. 37 $^{\circ}$ C 颠倒混匀或者低速涡旋混匀 15~20 分钟，使抗原和结合抗体的磁珠结合；
注：为使集合更充分，孵育时间和稳定可根据实际需求进行调整；
3. 将上一步的离心管和混合物放入磁力架，吸取上清（上清可丢弃也可保存做后续分析）；
4. 取 200 μ L PBS 洗涤磁珠-抗体-抗原复合物 3 次；
5. 洗涤完成后用 100 μ L PBS 重悬磁珠，用于下一步操作。

注：抗原洗脱前务必将磁珠转移新的离心管，避免将管壁上原有的非特异性吸附蛋白一起洗脱

抗原洗脱

本操作说明书提供以下两种抗原洗脱方案，操作者可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。

变性洗脱法：

1. 将装有磁珠-抗体-抗原复合物的离心管放入磁力架，待磁珠贴壁完全后吸去上清；
2. 向上述离心管中加入25 μ L Elution Buffer和5 μ L 5x SDS-PAGE Loading Buffer（自备）再用移液器重悬复合物；
3. 95~100 $^{\circ}$ C 煮沸5~10分钟；
4. 将煮沸后的离心管放入磁力架取上清做后续分析（注：上清液中含有抗原勿丢弃）。

非变性洗脱法：

1. 将沉淀抗原第5步骤中的磁珠放入磁力架，磁性分离去除上清液；
2. 向离心管中加入约30 μ L的Elution Buffer，用移液器轻轻混匀避免气泡产生，颠倒混匀或者低速涡旋混匀2~5分钟；
3. 将磁珠放入磁力架，磁性分离收集上清（注：上清液中含有抗原勿丢弃）；
4. 中和：上述步骤收集上清中抗原，若需做功能验证需加入Neutralization Buffer中和洗脱液（例：100 μ L Elution Buffer加入10 μ L Neutralization Buffer即可）。

Target Antigen Detection（沉淀后抗原分析）

A. 变性洗脱抗原适用方向

1. 蛋白染色鉴定
2. Western blotting
3. SDS-PAGE for Fluorography

B. 非变性洗脱抗原适用方向

1. 蛋白特征分析
2. 免疫

3. 酶学研究
4. 氨基酸序列分析
5. 蛋白晶体结构分析
- C. 未做洗脱抗原适用方向
 1. 蛋白相互作用
 2. 酶学研究
 3. 生物分析
 4. 免疫学分析

【磁珠再生】

1. 磁珠多次使用后会有沉淀蛋白、强疏水性蛋白、脂蛋白等杂质非特异性吸附到磁珠上，为了保证磁珠的使用效率，建议持续使用 5 次后进行磁珠再生处理。
2. 按约每 1 mL 10% (v/v) 磁珠加入 1 mL 1% (v/v) Triron X-100 磁珠再生缓冲液，振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转混合，10 min 后进行磁性分离，弃上清液。
3. 立即加入 1 mL Binding/Washing buffer 进行重悬，然后磁性分离，弃上清液，重复该操作 3 次。
4. 加入 1 mL Storage buffer 重悬磁珠，置于 2~8℃ 保存。

【注意事项】

1. 进行免疫沉淀操作之前，请务必认真阅读本操作说明书；
2. 本产品须与磁性分离器配套使用；
3. 磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥；
4. 请勿将磁珠冷冻或离心，以免引起不可逆聚集；
5. 为保证最佳的实验结果，请选择特异性较强的抗体进行免疫沉淀反应；
6. 操作者可根据实际需求，利用抗体结合反应步骤以及抗原结合反应步骤中收集的上清液检测抗体、抗原和磁珠的结合情况；
7. 对于 IP 实验，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结合缓冲液和洗涤缓冲液的影响，因此，如果操作者使用本试剂盒提供的缓冲体系不能获得很好的实验结果，可自行筛选及配制缓冲液进行实验；
8. 本磁珠表面包被的重组蛋白 Protein A 在极端条件下（如低 pH、加热处理）存在极低的蛋白脱落情况；
9. 不建议操作者用于分子量约 130 kD 目标蛋白的免疫沉淀实验；
10. 本产品仅供研究使用。

【常见问题与解答】

Q1: 如何提高抗体与磁珠结合效率？

A1: 磁珠与抗体的结合效率与抗体的种属来源及所属亚型有关，请确认抗体的类型与 **Protein A** 配基的亲合效率（附表 1）。增加抗体与磁珠的孵育时间（30~120 min）、提高结合缓冲液的 pH 值（8~9）及降低离子强度（25~100 mM NaCl）等方法可提高亲和效率。

Q2: 如何提高磁珠在免疫沉淀反应中的特异性？

A2: 抗体与样品进行孵育，形成抗体-抗原复合物，再用 **Protein A** 磁珠捕获复合物。这种方法可以提高抗体与抗原的结合效率，并降低磁珠与样品接触的时间，从而提高沉淀产物的特异性。对于 **ChIP&CoIP** 也推荐使用此法。

Q3: 如何提高抗体洗脱效率？

A3: 抗体与 **Protein A** 配基亲和力太高导致抗体洗脱效率低，可以通过降低洗脱缓冲液的 pH 值（1.9~2.5）、增大洗脱缓冲液的离子强度（可选用 2~3 M $MgCl_2$ ）或延长洗脱时间，提高抗体的洗脱效率。但应注意抗体在低 pH 条件下容易形成聚集物，抗体洗脱产物应马上用碱性缓冲剂（如 Tris、HEPES 等）调节 pH 至中性。

附表一：Protein A,G,L 与不同来源类型的抗体亲和性比较：

种类 Species	亚型 Antibody Class	蛋白 A Protein A	蛋白 G Protein G	蛋白 L Protein G
Human	IgG	+++	+++	+++
	IgG1	+++	+++	+++
	IgG2	+++	+++	+++
	IgG3	+	+++	+++
	IgG4	+++	+++	+++
	IgM	+	-	+++
	IgD	-	-	+++
	IgA	+	+++	+++
Mouse	IgG1	+	++	+++
	IgG2a	+++	+++	+++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	+++	+++	+++
	IgM	-	-	+++
Rat	IgG1	+	++	+++
	IgG2a	-	+++	+++
	IgG2b	-	+	
	IgG2c	+++	+++	+++
Cow	IgG1	+	+++	-
	IgG2	+++	+++	-
Goat	IgG1	+	+++	-
	IgG2	+++	+++	-
Horse	IgG(ab)	+	-	NA
	IgG(c)	+	-	NA
	IgG(T)	-	+++	NA
Rabbit	IgG	+++	+++	+
Pig	IgG	+++	+	+
Dog	IgG	+++	+	+++
Chicken	IgY	-	-	NA

英芮诚生化科技（上海）有限公司

地址：上海市杨浦区翔殷路 128 号 1 号楼 B 座 301 室

电话：021-55809378

网址：www.bio-enriching.com

电子邮件：marketing@bio-enriching.com

版权声明：© 英芮诚生化科技（上海）有限公司保留本使用说明书的所有权利。版本：V.170103