

使用说明书

【产品名称】Protein A 琼脂糖磁珠免疫沉淀（IP）试剂盒

【产品型号】MAG25K/Protein A Kit

【目录号】P25

【产品介绍】

Enriching Beads® Protein A 琼脂糖磁珠免疫沉淀（IP）试剂盒包含磁珠悬浮液、结合&清洗液、细胞裂解液、洗脱液和中和液，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。

【产品信息】

内容	P25-002	P25-005	储存
MAG25K/Protein A	2mL	5mL	2~8℃ for 1 year
PBST pH 7.4	20mL	50mL	2~8℃ for 1 year
PBS pH 7.4	不提供		
NP40 Cell Lysis Buffer	10mL	25mL	-20℃ for 1 year
Elution Buffer	2mL	5mL	2~8℃ for 1 year
Neutralization Buffer	1mL	2mL	2~8℃ for 1 year

【操作流程】

磁珠预处理

1. 移液器吹打或漩涡振荡器混匀磁珠，取 50μL 磁珠悬浮液(10%,v/v)至离心管中，放入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 μL 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）；

细胞裂解液制备

细胞裂解液制备可参考标准步骤，我们建议采用本试剂盒提供的 NP40 Cell Lysis Buffer（注：如有需要可添加蛋白酶抑制剂如：PMSF 1mM 等，如细胞为原核细胞，则不建议用 NP40 Cell Lysis Buffer 而采用 PBS 进行超声破碎的裂解方式）

抗体结合

1. 用 100μLPBST 稀释 2~20μg 抗体样品，稀释后加入到装有磁珠的 1.5 或者 2mL 或者离心管中；
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℃ 颠倒混匀或者涡旋混匀 10~15 分钟；
3. 将装有磁珠抗体复合物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 μ L PBST 洗涤磁珠-抗体复合物 3 次。

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℃ 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℃ 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

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.170102