

经典 Protein A 免疫(共)沉淀试剂盒(磁珠法)

Classic Magnetic Protein A IP/Co-IP Kit

本产品 4°C 运输；保存于 4°C，保质期 12 个月，其中 **Protein A 磁珠** 严禁冻结，长期存放请保证试剂管竖立向上，磁珠浸没于保存液中。

货号规格

货号	规格
YJ203	≥40次

产品简介

本产品能够高效完成抗原免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验，其核心成分 Protein A 磁珠采用新一代纳米表面生物技术，将 Protein A 高密度共价偶联在超顺磁性纳米微球表面，是纯化大多数免疫球蛋白的理想工具。与传统的 Protein A 免疫沉淀琼脂糖凝胶相比，Protein A 磁珠具有更大的特异性表面区域及更多的表面抗体结合位点，非特异性结合低，并且每次免疫 (共) 沉淀可以节省 40% 的时间，使用起来简便高效。

此外，本试剂盒中配有经过优化预制的各种缓冲液，为免疫 (共) 沉淀实验提供了合适的反应条件，增强了实验的稳定性，可应用于多种样品，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均可适用。

产品内容

组分名称	体积及数量
Protein A 磁珠	1 mL
裂解/漂洗缓冲液	125 mL
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)	10 mL
洗脱缓冲液	5 mL
中和缓冲液	1 mL

操作步骤

样本处理

- 根据样品种类选择相应的处理方法：
 - 血清样品**：若目标蛋白丰度较高，建议用 **裂解/漂洗缓冲液** 稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 50-150 μg/mL，置于冰上备用 (或置于 -20°C 长期保存)；
 - 悬浮细胞**：离心收集细胞 (4°C, 500×g, 10 min)，弃上清后称重，按每毫克细胞 50 μL 的比例用 1×PBS (货号：PS110) 洗涤 2 次；按每毫克细胞 5-10 μL 的比例加入 **裂解/漂洗缓冲液**，同时加入蛋白酶抑制剂 (货号：GRF101)，混匀后置于冰上孵育 5-20 min (期间混匀几次)；离心收集上清液 (4°C, 12,000-16,000×g, 10 min)，置于冰上备用 (或置于 -20°C 长期保存)；
 - 贴壁细胞**：移去培养基，按每 1.0×10⁵ 个细胞 150 μL 的比例用 1×PBS (货号：PS110) 洗涤两次；用细胞刮刀刮落细胞，收集至 1.5 mL 离心管内，按每 1.0×10⁵ 个细胞 20-30 μL 的比例加入 **裂解/漂洗缓冲液**，同时加入蛋白酶抑制剂 (货号：GRF101)，混匀后置于冰上孵育 5-20 min (期间混匀几次)；离心收集上清液 (4°C, 12,000-16,000×g, 10 min)，置于冰上备用 (或置于 -20°C 长期保存)；



- D. 大肠杆菌：离心收集大肠杆菌(4°C, 12,000×g, 2 min), 弃上清后称重, 按每克菌体(湿重)10 mL 的比例用 1×PBS(货号: PS110) 洗涤 2 次; 按每克菌体(湿重)5~10 mL 的比例加入**裂解 / 漂洗缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂(货号: GRF101), 重悬菌体, 超声裂解细胞, 离心收集上清(4°C, 12,000~16,000×g, 10 min)。
- E. 组织样品: (1) 把组织剪切成细小的碎片;
(2) 按照每 20 mg 组织样本 150~250 μL 的比例加入 **裂解 / 漂洗缓冲液**;
注意: 如果样本裂解不充分, 可以适当提高 裂解 / 漂洗缓冲液 的用量; 若需要高浓度的蛋白样品, 也可适当降低 裂解 / 漂洗缓冲液 的用量。
(3) 用玻璃匀浆器匀浆, 直至样本充分裂解;
注意: 若组织样本非常细小, 可以适当剪切后直接加入 裂解 / 漂洗缓冲液, 通过强烈涡旋振荡使其裂解充分。
(4) 充分裂解后, 10,000~14,000×g 离心 3~5 min, 小心地将上清液(蛋白样品)移入新的离心管中, 即可进行后续步骤。

抗原与抗体结合

- 用移液器吸取 500 μL 步骤 1 制备好的样品加入 1.5 mL 离心管中, 接着在其中加入 2~10 μg 抗体(加入体积可根据抗体浓度计算);
注意: 所加入样品中的总蛋白量推荐为 500~1,000 μg。
- 置于翻转混合仪上孵育(常温 1 h, 4°C 4~6 h 或过夜), 形成 **抗原 - 抗体复合物**;

磁珠预处理

- 用移液器轻柔吹打 **Protein A/G 磁珠**, 使其充分混悬, 取 25 μL 磁珠悬液置于 1.5 mL 离心管中;
- 加入 500 μL **裂解 / 漂洗缓冲液**, 用移液器轻柔吹打重悬磁珠, 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 吸弃上清;
- 重复步骤 5 一次;

磁珠与抗原-抗体复合物结合

- 结合:** 将步骤 3 所得的 **抗原 - 抗体复合物** 加入预处理后的磁珠中, 置于翻转混合仪上孵育(常温 1 h, 4°C 4~6 h 或过夜)。接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 吸弃上清, 离心管中剩余的即为 **抗原 - 抗体 - 磁珠复合物**;
- 洗涤:** 在上一步得到的 **抗原 - 抗体 - 磁珠复合物** 中加入 500 μL **裂解 / 漂洗缓冲液**, 用移液器轻柔吹打重悬磁珠, 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 吸弃上清。再重复此步骤两次;
注意: 如后续做非变性洗脱, 建议再向洗涤后的 抗原 - 抗体 - 磁珠复合物 中加入 500 μL 超纯水, 轻柔重悬磁珠, 在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 吸弃上清;
- 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: 此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向步骤 8 洗涤后的 **抗原 - 抗体 - 磁珠复合物** 中加入 80~100 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液(由 5× 稀释为 1×) 混合均匀, 100°C 加热 10 min。待冷却后, 将离心管在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 收集上清, 进行 SDS-PAGE 检测。
非变性洗脱: 此方法洗脱的样品保持原有的生物活性, 可用于后期功能分析。向步骤 8 洗涤后的 **抗原 - 抗体 - 磁珠复合物** 中加入 50~100 μL **洗脱缓冲液**, 室温孵育 5~10 min; 将离心管在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 收集上清液至新的离心管, 每 100 μL 洗出液中加入 10 μL **中和缓冲液** 将洗脱产物 pH 调节至中性, 用于后期功能分析。

常见问题 及对策

如何避免磁珠在储存或使用过程中可能出现的聚集情况？

答：磁珠应保存在 2~8°C，使用时应避免由于污染或干燥而导致的聚集。不过，磁珠在低 pH 值的缓冲液中发生聚集属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。在 **裂解 / 漂洗缓冲液** 中添加浓度为 0.1%(V/V) 的非离子型去垢剂（如 Triton X-100、Tween-20 或 NP-40）可有效防止磁珠聚集。经过低 pH 值洗脱操作的磁珠可以用 **裂解 / 漂洗缓冲液** 洗涤至中性，然后用含有 0.1%(V/V) Tween-20 的 Tris 缓冲液（pH 7.5）振荡重悬磁珠，并用超声波水浴处理 2 min，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。

磁珠在使用过程中出现结块现象？

答：磁珠在极少数情况下会出现结块现象，一般较难振荡打散，从而导致分布不均匀，这主要是因为磁珠在磁场中放置太久而牢固地结合在一起。用超声波水浴处理 2 min 即可打散磁珠，但要注意超声处理也会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落，因此磁珠在加样后洗脱前不宜使用该方法。

如何解决磁珠易粘附管壁的现象？

答：建议使用低吸附率的耗材进行磁珠操作。另外，在缓冲液中添加 0.01%-0.1%(V/V) 的非离子型去垢剂（如 Triton X-100、Tween-20 或 NP-40）可以有效降低耗材对磁珠的粘附。

抗原为何没有免疫沉淀下来？

答：① 样品中抗原含量过少，不足以被检测到
建议：通过 SDS-PAGE 或 Western Blot 验证裂解液中蛋白的表达和裂解效率；如有必要，可加大样品用量；
② 抗体无法结合抗原
建议：改用另一种特异性抗体，尤其可以选择另一种识别不同抗原表位的抗体；
③ **裂解 / 漂洗缓冲液** 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（比如可选用含有 0.5% CHAPS 的 TBS 缓冲液）。

为何获得的蛋白量过低？

答：① 蛋白质被降解
建议：加入蛋白酶抑制剂；
② 所用的 **Protein A 磁珠** 量不够
建议：提高 **Protein A 磁珠** 用量；
③ 样品中的目标蛋白量不够
建议：提高抗原样品量。

为何有多条非特异条带？

答：有非特异性的蛋白结合在磁珠上
建议：在 **裂解 / 漂洗缓冲液** 中加入 50~350 mM NaCl，并加大洗脱力度和次数。

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其结合力；
2. 免疫（共）沉淀实验中不同类型的抗体与抗原间的亲和力是有区别的，抗体与抗原结合还会受到 **裂解 / 漂洗缓冲液** 的影响，因此，如使用本试剂盒不能获得最佳的实验结果，可自行优化操作细节或者筛选及配制合适缓冲液进行实验；
3. 磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥，使用前应充分振荡混匀；
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
5. 本产品仅限科研使用。

