

Protein A 磁珠

Protein A Magnetic Beads

本产品 4°C 运输; 保存于 4°C, 禁止产品冻结, 长期存放请保证试剂管竖立向上, 保质期 24 个月。

货号规格

YJ001 1 mL

产品简介

本产品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 IP 和 Co-IP 可以节省 40% 的时间, 使用起来简便高效。

Protein A 磁珠可应用于多种样品, 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。

产品参数

项目	参数
磁珠大小	200 nm
磁珠浓度	10 mg/mL
IgG 结合能力	0.9 mg/mL
应用范围	IP, Co-IP 等

自备试剂

缓冲液	推荐配方
结合缓冲液	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1%~0.5% detergent (TritonX-100, Tween 20 or NP40), pH 7.5
漂洗缓冲液	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1%~0.5% detergent, pH 7.5
洗脱缓冲液	0.1 M~0.2 M Glycine, 0.1%~0.5% detergent, pH 2.5~3.1 (or 0.1 M citric acid, 0.1%~0.5% detergent, pH 2.5~3.1)
中和缓冲液	1 M Tris, pH 8.0

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 **结合缓冲液** 或 1×PBS (货号: PS110) 稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 10~100 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 **结合缓冲液** , 同时加入蛋白酶抑制剂(货号: GRF101), 混匀后置于冰上孵育 10 min; 离心收集上清液(4°C, 14000×g, 10 min), 置于冰上备用(或置于-20°C长期保存);

C. 贴壁细胞: 移去培养基, 按每 1.0×10^5 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 1.0×10^5 个细胞 20~30 μL 的比例加入 **结合缓冲液** , 同时加入蛋白酶抑制剂(货号: GRF101), 混匀后置于冰上孵育10 min; 离心收集上清液(4°C, 14000×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, 12000×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 **结合缓冲液** , 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, 12000×g, 10 min)。

◆ 磁珠预处理

2. 用移液器轻柔吹打 **Protein A 磁珠** , 使其充分混悬, 取 25~50 μL 磁珠悬液置于 1.5 mL 离心管中;
3. 加入 500 μL **结合缓冲液** 或 1×PBS, 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;
4. 重复步骤 3 两次;

◆ 抗体与磁珠结合

5. 稀释: 用 **结合缓冲液** 或 1×PBS 稀释抗体样品至终浓度为 5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 置于冰上备用;
6. 结合: 将 500 μL 上步稀释好的抗体加入预处理后的磁珠中, 置于翻转混合仪上孵育(常温 2h, 4°C 4~6h 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, 把上清液转移到新的离心管中备用(上清液可用于检测抗体是否存在残留), 离心管中剩余的即为 **抗体-磁珠复合物** ;

注意: 结合过程中, 磁珠可能会出现聚团或呈片状, 属于正常现象, 不会影响实验结果。

7. 洗涤: 在上一步得到的 **抗体-磁珠复合物** 中加入 500 μL **结合缓冲液** 或 1×PBS, 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;

◆ 抗原与抗体-磁珠复合物结合

8. 结合: 向洗涤后的 **抗体-磁珠复合物** 中加入 500 μL 步骤 1 制备好的样品, 置于翻转混合仪上孵育(常温 2h, 4°C 4~6h 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** ;

9. 洗涤: 在上一步得到的 **抗原-抗体-磁珠复合物** 中加入 1 mL **洗涤缓冲液** 或 1×PBS, 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。再重复此步骤三次;

10. 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 9 洗涤后的 **抗原-抗体-磁珠复合物** 中加入 60 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液(货号: LT101) 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 9

洗涤后的 抗原-抗体-磁珠复合物 中加入 25~50 μL 洗脱缓冲液, 室温孵育 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, 并立即加入 1 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 $^{\circ}\text{C}$, 使用时应避免由于污染或干燥而导致的聚集。磁珠在低 pH 值的洗脱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 结合缓冲液 和 洗脱缓冲液 中添加终浓度为 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结合缓冲液洗涤至中性, 然后用含有 0.1% (V/V) Tween-20 的 Tris buffer (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。

◆ 如何提高抗体与磁珠结合效率?

答: 磁珠抗体间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 配基的亲效率和效率。如抗体所属亚型与 Protein A 的亲合度较低, 可以通过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(25~10 mM NaCl)等方法提高亲和效率。

◆ 如何提高磁珠在免疫沉淀反应中的特异性?

答: 可以先将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。对于蛋白质/核酸共沉淀或染色质免疫共沉淀也推荐使用此法。

◆ 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。

注意事项

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
2. 本产品仅限科研使用。