

Magbeads™ 蛋白 A 磁珠抗体纯化/免疫沉淀试剂盒

【产品信息】

英文名称: Magbeads™ Protein A Magnetic Beads Antibody Purification/Immunoprecipitation Kit

货号	名称	规格
MB1201kit	Magbeads™ 蛋白 A 磁珠抗体纯化/免疫沉淀试剂盒	40 T

试剂盒组成:

名称	体积
Magbeads™ 蛋白 A 磁珠	1 mL
结合液	30 mL
10×PBS	30 mL
洗涤液	30 mL
洗脱液	1 mL
中和液	200 μL

【适用范围】

广泛适用于腹水、血浆、细胞培养物等各种样本目标蛋白的分离、纯化和浓缩, 可根据实验人员需求进行抗体纯化、免疫沉淀 (IP)、免疫共沉淀 (Co-IP)、染色质免疫沉淀 (ChIP) 等。操作简单, 快速温和, 对靶蛋白的物理压力极小, 尤其适合分离和浓缩不稳定易分解的成分。

【储存条件】

2-8℃ 运输和保存, 每次用完后及时密封放回冰箱冷藏, 保质期 12 个月。

【操作步骤】

本部分内容提供了一种通用的免疫沉淀操作步骤, 不同抗体和抗原可在此基础上进行优化, 以得到最优实验结果。本步骤中依据磁珠用量 50 μL 推荐各种试剂的用量, 使用者可以根据实际需要按比例增加或减少用量。

➤ 抗原样本预处理

使用者应根据抗原样本的来源选择合适的处理方法, 以使抗原充分释放到溶液中, 并保持合适的浓度。本说明书提供以下几种抗原预处理方法, 供使用者参考。

1. 血清样本: 用结合液稀释至抗原浓度为 10-100 μg/mL。如抗原浓度低于此值, 则无需稀释。
2. 悬浮细胞样本: 4℃ 离心收集细胞, 弃上清后称重, 按每毫克细胞 50 μL 的比例用 1×PBS 洗涤 2 次。按每毫克细胞 5-10 μL 的比例加入结合液, 同时加入蛋白酶抑制剂 (如终浓度 1mM 的 PMSF), 混匀后置于冰上处理 10 min。离心收集上清液 (4℃, 14000 g, 10 min), 置于冰上备用 (或置于 -20℃ 长期保存)。

3. 贴壁细胞样本：移去培养基，按每 1.0×10^5 个细胞 $150 \mu\text{L}$ 的比例用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤两次。用细胞刮棒刮脱细胞，收集至离心管内，按每 1.0×10^5 个细胞 $30 \mu\text{L}$ 的比例加入结合液，同时加入蛋白酶抑制剂，混匀后置于冰上处理 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）。
4. 大肠杆菌样品处理：离心收集大肠杆菌（ 4°C , 12000 g , 2 min ），弃上清后称重，按每克（湿重）菌体 10 mL 的比例用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤2次。按每克（湿重）菌体 $5-10 \text{ mL}$ 的比例加入结合液，同时加入蛋白酶抑制剂，重悬菌体，超声裂解细胞，离心收集上清（ 4°C , 17000 g , 10 min ）。

➤ 磁珠预处理

1. 分散：将磁珠涡旋振荡 30 s ，或摇床振荡 5 min ，或颠倒混匀 5 min ，使磁珠充分重悬。
2. 移液器吸取 $50 \mu\text{L}$ 磁珠，转移到离心管中。
3. 预洗涤：向离心管中加入 $200 \mu\text{L}$ 结合液，充分混匀，将离心管放置于磁力架上，静置约 1 min ，使磁珠全部吸附在管壁上，上清液澄清透明，移液器吸取并丢弃上清液，从磁力架上取下离心管。每次磁分离后应及时将离心管从磁力架上取下，避免因磁分离时间过长导致磁珠不易分散。
4. 重复预洗涤步骤两次。洗涤后的去上清磁珠应尽快使用，以防干燥聚集。

➤ 抗体结合

1. 取 $2-20 \mu\text{g}$ 抗体，用结合液稀释为 $50 \mu\text{L}$ ，加入预处理后的磁珠中，移液器轻柔吹打混匀，尽量避免产生泡沫。抗体最佳用量需根据实验需求优化。
2. 室温（约 $20-25^\circ\text{C}$ ）条件下，翻转混合仪或手动轻柔翻转孵育 $10-15 \text{ min}$ 。
3. 磁分离：将离心管放置于磁力架上，静置约 1 min ，使磁珠全部吸附在管壁上，移液器吸取并丢弃上清液。
4. 向离心管中加入 $200 \mu\text{L}$ 结合液，充分混匀，将离心管放置于磁力架上，磁分离，丢弃上清。重复本步骤两次。
5. （如果在抗原洗脱步骤不希望抗体被一同洗脱，可选做本步骤）抗体交联：推荐使用 Thermo Scientific Pierce BS3 作为氨基间交联剂，并参考该交联剂的使用步骤。

➤ 目的抗原免疫沉淀

1. 向完成抗体结合步骤的磁珠中加入 $100-200 \mu\text{L}$ 预处理的抗原样品，移液器轻柔吹打混匀。
2. 室温（约 $20-25^\circ\text{C}$ ）条件下，翻转混合仪或手动轻柔翻转孵育 10 min 。如抗体亲和力较弱，可适当延长孵育时间，如室温 1 h 或 4°C 过夜。
6. 磁分离，收集上清用于后续检测。向离心管加入 $200 \mu\text{L}$ 洗涤液，充分混匀，将离心管放置于磁力架上，

磁分离，丢弃上清。重复本步骤两次。

3. 向离心管加入 100 μL 洗涤液，充分混匀后，将混合液转移到干净的离心管中，磁分离，丢弃上清。该步骤目的是降低洗脱非特异性。

➤ 抗原洗脱

选择一：变性洗脱

1. 向完成免疫沉淀步骤的离心管中加入 20 μL 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液，移液器轻柔吹打混匀。
2. 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5-10 min，磁分离，收集上清，SDS-PAGE 检测上清液。

选择二：非变性洗脱

1. 向完成免疫沉淀步骤的磁珠中加入 20 μL 洗脱液，移液器轻柔吹打混匀，尽量避免产生泡沫。
2. 室温条件下，翻转混合仪或手动轻柔翻转孵育 5-10 min；
3. 磁分离，用移液器小心吸取上清，转移到干净离心管中。
4. 向洗脱下的上清中立刻加入 2-4 μL 中和液，轻柔混匀。
5. 非变性洗脱的抗原能够保持较好的生物活性，可以用于后续的功能分析。也可以直接用于 SDS-PAGE 电泳检测。

【常见问题及参考意见】

1. 抗原得率低

- 对于与蛋白 A 亲和力低的抗体，可适当延长抗体孵育时间，或选用 Magbeads™ 蛋白 G 磁珠抗体纯化（免疫沉淀）试剂盒（货号 MB1202kit）
- 对于与抗原亲和力低的抗体，可适当延长免疫沉淀孵育时间。需要注意的是，虽然孵育时间延长可增加得率，但也可能导致非特异性吸附增加，需要使用者根据实验需求优化出最合适的时间。
- 在磁珠结合抗体之前，预先将抗体与抗原共孵育，能够提高抗原抗体结合效率。
- 对于易变性的蛋白，可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下或冰上操作。

2. 磁珠聚集

- 磁珠在保存过程中避免冷冻和干燥，使磁珠始终处于溶液状态。
- 如果在使用过程中出现聚集，一般不影响磁珠使用，在结合液和洗脱液中加入浓度 0.1% 的表面活性剂可有效消除聚集。
- 使用后的磁珠用结合液洗涤，水浴超声 1-2 min 即可分散，不影响磁珠活性。

3. 提高特异性

- 在磁珠结合抗体之前，预先将抗体与抗原共孵育，可在一定程度上降低非特异性。
- 过量磁珠可能导致背景高。当抗体和抗原的投料量较少时，适当降低磁珠用量。
- 免疫沉淀步骤中，磁珠结合抗原后，可增加 2-3 次洗涤次数。

蛋白 A 与不同来源及亚型的抗体亲和力对照表

Species	Subclass	Protein A	Protien G
Human	IgG1,2,4	+++	+++
	IgG3	+	+++
	IgD,	-	-
	IgA, E, M	+	-
Mouse	IgG1	+	+++
	IgG2a, 2b, 3	+++	+++
	IgM	+	+
Rat	IgG1	+	+
	IgG2a	-	+++
	IgG2b	-	+
	IgG2c	+++	+
Goat	IgG1	+	+++
	IgG2	+++	+++
Rabbit	IgG	+++	+++
Sheep	IgG1	+	+++
	IgG2	+++	+++
Dog	IgG	+++	+
Bovine	IgG1	+	+++
	IgG	+++	+++
Horse	IgG	+	+++
Guinea Pig	IgG	+++	+
Chicken	IgY	-	-

相关产品

货号	名称	规格
MB1201-1mL	Magbeads™ 蛋白 A 磁珠	1 mL

MB1201-5mL	Magbeads™ 蛋白 A 磁珠	5 mL
MB1202-1mL	Magbeads™ 蛋白 G 磁珠	1 mL
MB1202-5mL	Magbeads™ 蛋白 G 磁珠	5 mL
MB1202kit	Magbeads™ 蛋白 G 磁珠抗体纯化（免疫沉淀）试剂盒	40 T
Mag0101	2 孔磁力架	
Mag0102	10 孔磁力架	
Mag0103	多功能磁力架	

本品仅限科研使用。

生产单位

公司名称：南京东纳生物科技有限公司

公司地址：南京市江宁区龙眠大道 568 号南京生命科技小镇 5 号楼北楼 6-7 楼

公司电话：025-8347 5811

公司邮箱：maglab@163.com

公司网址：www.nanocast.net