Protein A/G免疫沉淀磁珠

产品组分

货号	Cat#: B23201	Cat#: B23202
体积	1 mL	5 mL

产品参数：磁珠粒径60 uM，浓度10 mg/mL，结合量>400 μg human IgG/mL

储存方法

2-8℃保存，保质期2年。

实验步骤

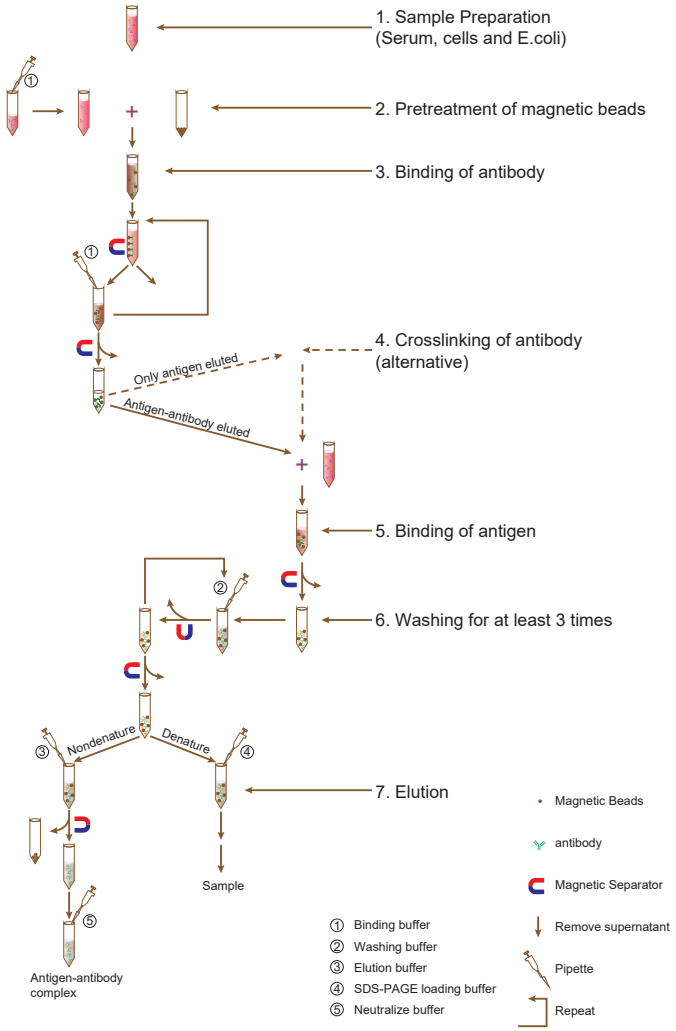


Figure 1. General Protocol for Immunoprecipitation

缓冲液	推荐配方（自备）
Binding buffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1%-0.5% detergent (TritonX-100, Tween 20 or NP40), pH 7.5
Wash buffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1%-0.5% detergent, pH 7.5
Elution buffer	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)
Neutralize buffer	1 M Tris, pH 8.0

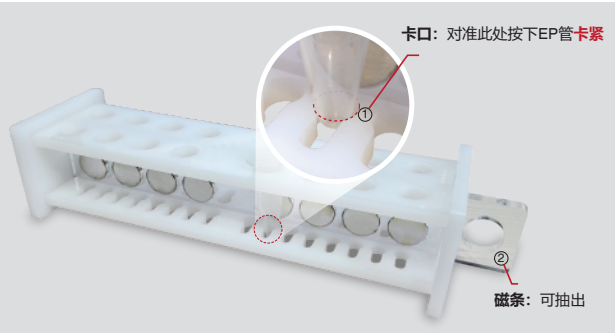
1. 抗原样品制备

本操作说明书提供以下三种样品处理方法。

A. 血清样品处理：若目标蛋白丰度较高， 建议用结合缓冲液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℃长期保存）。

B. 悬浮细胞样品处理：离心收集细胞（4℃, 500 g, 10 min），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的比例加入结合缓冲液，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℃, 14000 g, 10 min），置于冰上备用（或置于-20℃长期保存）。

C. 贴壁细胞样品处理：移去培养基，按每1.0×10^5个细胞150 μL的比例用1×PBS洗涤两次；用细胞刮棒刮脱细胞，收集至1.5 mL EP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，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）。



磁力架使用说明

2. 磁珠预处理

将磁珠漩涡振荡1 min，使其充分混悬；取25~50 μL磁珠悬液置于1.5 mL EP管中。加入200 μL结合缓冲液洗涤，进行磁性分离（将离心管置于磁力架上，管底对准①卡口压紧，静置2分钟或待磁珠吸附于管壁），吸弃上清。抽出②磁条，加入200 μL结合缓冲液重复洗涤一次，插回②磁条，磁性分离并吸弃上清。加入200 μL结合缓冲液重悬磁珠备用。

3. 抗体结合反应

(1) 抗体工作液的制备：用结合缓冲液稀释抗体样品，配制成终浓度为5~50 μg/mL抗体工作液，置于冰上备用。

(2) 抗体吸附：将步骤2预处理的磁珠悬液进行磁性分离，吸弃上清；加入200 μL抗体工作液，迅速重悬后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转EP管，15 min后进行磁性分离，收集上清液置于冰上以备后续检测。

(3) 洗涤：抽出②磁条，向EP管中加入200 μL结合缓冲液，移液器轻轻吹打使磁珠-抗体复合物均匀分散，插回②磁条并进行磁性分离，吸弃上清。重复洗涤一次。

（***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。）

4. 抗体交联反应 (备选)

如果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，进行步骤5。

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。

5. 抗原沉淀反应

(1) 抗原吸附：加入200 μL步骤1中制备的抗原样品，用移液器轻轻吹打使抗原与磁珠-抗体复合物均匀分散。在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转EP管10 min，使抗原与抗体充分结合，如结合力较弱则可在室温下反应1 h或者在4℃下反应过夜。

(2) 洗涤：将上述完成抗原吸附的磁珠-抗体-抗原复合物进行磁性分离，收集上清液置于冰上以备后续检测。抽出②磁条，向EP管中加入200 μL洗涤缓冲液，移液器轻轻吹打使磁珠-抗体-抗原复合物均匀分散，插回②磁条并进行磁性分离，吸弃上清；重复洗涤两次。

(3) 转移：抽出②磁条，加入200 μL洗涤缓冲液，移液器将磁珠-抗体-抗原复合物悬液转移至新的1.5 mL EP管中*，插回②磁条并执行磁性分离，吸弃上清。

（***注意**：抗原洗脱前务必将磁珠转移到新的EP管，避免将管壁上原有的非特异性吸附蛋白一起洗脱。）

6. 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。

A. 变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于SDS-PAGE检测。

抽出②磁条，向其中加入20-50 μL 1×SDS-PAGE Loading Buffer（自备）混合均匀，95℃加热5 min。插回②磁条并执行磁性分离[也可以使用离心的方式（室温13000 g, 10 min）] 收集上清液进行SDS- PAGE检测。

B. 非变性洗脱法：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。

抽出②磁条，向EP管中加入20 μL洗脱缓冲液混合均匀，室温孵育10 min。插回②磁条并执行磁性分离［也可以使用离心的方式（4℃, 13000 g, 10 min）］，收集上清液至新的EP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

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/G配基的亲和效率。如抗体所属亚型与Protein A/G的亲和度较低，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（25～100 mM NaCl）等方法提高亲和效率。

Q2：如何提高磁珠在免疫沉淀反应中的特异性?

A2：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/G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。

Q3：如何避免磁珠在储存或使用过程中可能出现的聚集情况?

A3：磁珠应保存在2～8℃，使用时应避免由于污染而导致的不可逆聚集，或因干燥而导致的聚集。磁珠在低pH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Binding buffer和Elution buffer中添加终浓度为0.1%(v/v)的非离子型去垢剂（如NP-40、Tween-20或Triton X-100）可有效防止磁珠聚集。经过低pH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2min，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。

Q4：如何解决磁珠易粘附管壁的现象?

A4：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NP-40、Tween-20或Triton X-100）可以有效降低磁珠对耗材的粘附。

Q5: 磁珠在使用过程中出现结块现象?

A5：磁珠在使用时如果出现结块现象一般较难振荡打散，容易导致分布不均，出现该问题的原因是磁珠在磁场中放置太久而使磁珠牢固的结合在一起。用超声波水浴处理2min即可打散磁珠使其重新分散，但应注意超声处理也会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落，所以磁珠在加样后洗脱前不宜使用该方法。