

使用说明书

Instruction Manual

Protein A 免疫沉淀试剂盒

Protein A Immunomagnetic Kit

产品描述

TargetMol 的 Protein A 免疫沉淀磁珠采用生物纳米表面技术，将 Protein A 高密度定向包被到超顺磁性微球表面，可以用于蛋白质、蛋白质复合物、蛋白质核酸复合物和其他抗原的免疫沉淀（IP）。重组 Protein A 蛋白更适合于结合 mouse IgG2a, IgG2b, IgA, rabbit IgG, 以及 human IgG1, IgG2 和 IgG4。免疫沉淀磁珠试剂盒配有经过优化的预制缓冲液，为免疫沉淀实验提供了最佳的反应条件，增强了实验的稳定性。本品适用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中抗原的免疫沉淀反应。

产品特点

- 非特异性吸附低
- 高效率、高产量、低消耗
- 操作灵活、简便
- 实验结果可靠、重复性高

产品组成

产品编号	产品名称	产品包装
C0105B	Protein A 免疫沉淀磁珠 Protein A Immunomagnetic Beads	1 mL
C0124	细胞裂解缓冲液 Cell Lysis Buffer	20 mL
C0125	洗涤缓冲液 Washing Buffer (10×)	20 mL
C0126	酸性洗脱缓冲液 Acidity Elution Buffer	4 mL
C0127	中和缓冲液 Neutralization Buffer	2 mL

Protein A 免疫沉淀磁珠	特性
基质	硅基磁珠
粒径	200 nm
Human IgG 能力 (Antibody Capacity)	≥0.9 mg hIgG/mL 磁珠
磁珠浓度	10 mg/mL
应用推荐	IP, Co-IP, ChIP, RIP

操作说明

1. 抗原样品制备

选择合适的裂解液处理细胞样品，按照标准步骤制备细胞裂解液，置于冰上备用，或于-20℃长期保存。

2. 免疫复合物的制备

样品用量和孵育时间取决于具体的抗体-抗原体系，因此可能需要优化以实现最大产量。本实验方案适用于 2~10 µg 亲和纯化抗体的反应规模，可根据需要按比例放大。

- 1) 在离心管中，将每个样品的细胞裂解液与 2~10 µg 免疫沉淀抗体混合。建议每个免疫沉淀反应的总蛋白量为 500~1500 µg。
- 2) 用 Washing Buffer 将抗体和样品混合物稀释至 300~500 µL。
- 3) 使用翻转混合仪或手工轻轻翻转离心管混合，在室温下孵育 1~2 h，或在 4℃孵育 2~4 h，形成抗原/抗体混合物。

3. 磁珠预处理

- 1) 将免疫沉淀磁珠用漩涡振荡器振荡 1 min，使磁珠重新悬浮，取 25~50 µL 磁珠悬液放入 1.5 mL EP 管中。
- 2) 向 EP 中加入 500 µL Washing Buffer 进行洗涤，温和翻转 EP 管数次，使磁珠重新悬浮。将 EP 管放入磁性分离器，静置 1 min，进行磁性分离，吸去上清液，取下 EP 管。重复上述洗涤步骤 2 次。

4. 抗原沉淀反应

- 1) 将步骤 2 中制备的抗原/抗体混合物加入到装有磁珠的离心管中，轻轻混匀。
- 2) 使用翻转混合仪或手工轻轻翻转离心管混合，在室温下孵育 1~2 h，或在 4℃孵育 2~4 h。然后进行磁性分离，收集上清液，置于冰上备用以供后续检测。
- 3) 向离心管中加入 1000 µL Washing Buffer 进行洗涤，用移液器轻轻吹打，使磁珠-抗体-抗原复合物均匀分散，然后进行磁性分离，吸去上清液，取下 EP 管。重复洗涤两次。

5. 抗原洗脱

提供以下两种抗原洗脱方案，用户可根据后续检测的需要选择不同的洗脱方法。

- 1) 变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向 EP 管中加入 25 µL 1× SDS-PAGE Loading Buffer (自备)，混合均匀，95℃加热 5 min。然后进行磁性分离或者离心(室温，13000 g, 10 min)，收集上清液，进行 SDS-PAGE 检测。
- 2) 酸性洗脱法：向 EP 管中加入 100 µL Acidity Elution Buffer，置于旋转混合仪上在 37℃孵育 5-10 min。然后进行磁性分离或者离心，收集上清液。如需中和酸性洗脱液，可向 100 µL 洗脱液中加入 50 µL Neutralization Buffer，调整 pH 至中性。

保存条件

4℃，2 年。

注意事项

1. 避免冷冻磁珠。磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥。
2. 为了减少磁珠的损失，每次磁性分离的时间不应少于 1 min。
3. 在从磁珠保存管中取出磁珠之前，应充分震荡以确保均匀悬浮。操作过程中注意避免产生气泡。
4. 建议使用质量较好的移液器吸头和反应管，以避免因磁珠和溶液附着而造成损失。
5. 为确保最佳实验效果，请选择特异性较强的抗体进行免疫沉淀反应。
6. 操作者可根据实际需求，利用抗体结合反应步骤和抗原结合反应步骤中收集的上清液，检测抗体、抗原与磁珠的结合情况。
7. 在 IP 实验中，不同类型的抗体和抗原结合的亲和力会有所不同。因此，如果使用本试剂盒提供的缓冲体系未能获得理想的实验结果，操作者可以自行筛选和配制缓冲液进行实验。
8. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

附：免疫磁珠 Protein A 和 Protein A/G 与不同抗体亲和性比较

Species	Antibody Classes	Protein A/G	Protein A
Human	Total IgG	+++++	+++++
	IgG1, IgG2	+++++	+++++
	IgG3	+++++	+
	IgG4	+++++	+++++
	IgM	-	-
	IgD	-	-
	IgA	+	+
	IgA1, IgA2	+	+
	IgE	+++	+++
	Fab	-	-
	ScFv	-	-
Mouse	Total IgG	+++++	+++++
	IgM	-	-
	IgG1	+++	+
	IgG2a	+++	+++
	IgG2b	+++	+
Rat	IgG3	+++	+++++
	Total IgG	+++	+
	IgG1	+++	+
	IgG2a	+++++	-
	IgG2b	+	-
Cow	IgG2c	+++++	+++
	Total IgG	+++++	+
	IgG1	+++++	+
Goat	IgG2	+++++	+++++
	Total IgG	+++++	+
	IgG1	+++++	+
Sheep	IgG2	+++++	+++++
	Total IgG	+++++	+
	IgG1	+++++	+
Horse	IgG2	+++++	+++++
	Total IgG	+++++	+
	IgG(ab), IgG(c)	+	+
Rabbit	IgG(T)	+++++	-
	Total IgG	+++++	+++++
Guinea Pig	Total IgG	+++++	+++++
Hamster	Total IgG	+++	+++
Pig	Total IgG	+++++	+++++
Donkey	Total IgG	+++++	+++
Cat	Total IgG	+++++	+++++
Dog	Total IgG	+++++	+++++
Monkey	Total IgG	+++++	+++++
Chicken	Total IgY	-	-

注: “+++++” =strong binding, “+++” =medium binding, “+” =weak binding, “-” =no binding.

