

产品信息:

品牌	货号	产品名称	规格
KEL Biotech	KC1374-001	Protein A/G Magrose Beads	1ml
KEL Biotech	KC1374-500ul	Protein A/G Magrose Beads	500ul

产品规格:

形态: 50% slurry (50%悬浊液)

产品描述:

天然蛋白A (Protein A) 是一种发现于金黄色葡萄球菌的细胞壁表面蛋白, 天然蛋白G (Protein G) 是一种分离于链球菌属的细胞表面蛋白, 二者功能相似, 主要与免疫球蛋白 (IgG) 的Fc区相互作用, 可结合大多数哺乳动物的IgG。Protein A和Protein G通常共价偶联在固体载体如琼脂糖珠或者磁珠上, 直接用于做免疫沉淀 (IP) 或免疫共沉淀 (CoIP) 来进行蛋白功能相关研究, 或者直接装在层析柱上来纯化单克隆或者多克隆抗体。

本产品使用的是改造后的重组Protein A和Protein G, 去除了天然蛋白本身的非主要结合域以降低非特异性结合。本产品同时将蛋白A和蛋白G共价偶联到琼脂糖凝胶微球表面, 比单独的蛋白A或者蛋白G有更广的结合范围, 能结合绝大多数物种的IgG, 实用性更高。

产品性质:

☞ 基质: 磁性琼脂糖微球; 配体: 重组蛋白 A/G; 载量: 10-15 mg 人 IgG/mL 基质;
☞ 粒径: 30-100 μ m; pH 稳定范围: 3-10;

应用范围:

可用于免疫沉淀 (IP) /免疫共沉淀 (CoIP)、染色质免疫沉淀 (ChIP) /RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP)、抗体纯化等。

产品特性:

存储缓冲液: 1XPBS (含有 20%乙醇)。

保存条件: 可在 4℃ 保存 1 年, -20℃ 保存 2 年, 避免高速离心, 干燥和反复冻融。

使用方法:

1 蛋白样品的准备:

- ① 贴壁细胞: 取10cm细胞培养皿中的贴壁细胞, 吸除细胞培养液, PBS 洗涤 2次, 然后加入1 mL细胞裂解液裂解细胞 (如普通 IP 裂解液或弱的RIPA裂解液, 使用前加入蛋白酶抑制剂 cocktail);
- ② 悬浮细胞: 离心收集细胞后, PBS 洗涤1次, 然后参考贴壁细胞的裂解方法进行裂解;
- ③ 动植物组织样本: 参考贴壁细胞使用裂解液的比例进行裂解, 植物组织还需要先进行液氮研磨再裂解;

注意: 不同量的细胞, 应选用适当裂解液的用量进行裂解 (如果裂解获得的蛋白样品浓度过高, 可以用裂解液或 PBS 适当稀释, 如果蛋白样品浓度过低, 在裂解过程中宜适当减少裂解液的用量), 通常裂解液的总蛋白浓度选择在 1.0-2.0 mg/mL 范围内较合适, 如果目的蛋白浓度偏低, 也可以增加总蛋白用量;

2 去除非特异性结合 (可选):

- 1) 取 0.5-1 mL 细胞或组织裂解液, 蛋白量约为 1.0-2.0 mg, 加入约 1 μ g 与免疫沉淀时使用的 IgG 种属相同的普通 IgG 和 20 μ L 充分重悬的 rProtein A/G Magrose Beads, 4℃ 旋转混合 1-2 h。
- 2) 2500 rpm (约 1000g) 离心 5 min, 取上清用于后续的免疫沉淀实验。

注意: 种属相同的 IgG 是指与后续免疫沉淀所用一抗宿主相同的正常 IgG, 此步骤可以预先去除样本中与rProtein A/G Magrose Beads 非特异性结合的蛋白, 从而降低背景。



3 免疫沉淀操作流程-1:

1) 抗体吸附

- ① 吹吸或颠倒混匀 rProtein A/G Magrose Beads 的悬浊液，每个样品取 20 μ L 加到 1.5 mL 离心管中，加入 0.5-1.0 mL 结合缓冲液（也可用细胞裂解液或者 PBS）重悬，磁力架吸附 1 min，吸弃上清。
- ② 向上述已平衡的 beads 中加入 0.5-1.0 mL 结合缓冲液，并加入 1-5 μ g 正常的 IgG 或目的蛋白的抗体，在 4 度条件下，于旋转混合仪混匀结合 1-2h 后，磁力架吸附 1 min，收集 beads 备用，最后剩余少许 buffer 以防止 beads 干掉。

3) 免疫沉淀反应

- ① 抗原结合：向上述已经结合好抗体的 beads 中加入含抗原的样品（含目的蛋白的细胞或者组织裂解液），用移液器轻轻吹打或者颠倒混匀使 beads 在细胞裂解液中分散均匀，然后在 4℃ 条件下，置于旋转混合仪上轻轻翻转 1-2 h，使抗原与抗体充分结合，如果结合力较弱，则可结合过夜。
- ② 洗杂：将上述完成抗原结合的产物磁力架吸附 1 min，收集上清液置于冰上待检测（也可直接舍弃不检测）。向离心管中加入 1 mL 洗杂缓冲液（也可直接用细胞裂解液洗杂），与 beads 混匀后，在 4 度旋转混合仪上洗 5-10 分钟，磁力架吸附 1 min，弃上清，并重复洗涤 2 次，最后一次尽量吸干净 buffer。

3' 免疫沉淀操作流程-2:

1) 抗原和抗体的结合:

将 IgG 或者抗体分别与含有目的蛋白的细胞或者组织裂解液混合，4℃ 孵育至少 2h，或者 4℃ 孵育过夜。

注意：孵育时间取决于目的蛋白与抗体的结合效率以及目的蛋白的稳定性，需根据具体情况进行优化；抗体的加入量需参考后续加入凝胶（beads）的量，一般推荐加入 1-5 μ g IgG 或目的蛋白抗体。

2) 凝胶准备:

取 20 μ L rProtein A/G Magrose Beads 加入到 1.5 mL 离心管中，加入 0.5-1.0 mL 结合缓冲液（也可用细胞裂解液或者 PBS）重悬，磁力架吸附 1 min，吸弃上清。

3) 抗原-抗体混合物的吸附:

将含有抗原-抗体复合物的裂解液加入到已平衡的凝胶中，在 4℃ 条件下，置于旋转混合仪轻轻翻转 1-2h，使其充分接触并吸附，磁力架吸附 1 min，收集上清留待检测（也可直接舍弃不检测）。

4) 洗杂:

向离心管中加入 1 mL 洗杂缓冲液（也可直接用细胞裂解液洗杂），与 beads 混匀后，在 4 度旋转混合仪上洗 5-10 分钟，磁力架吸附 1 min，弃上清，并重复洗涤 2 次，最后一次尽量吸干净 buffer。

4 样品洗脱

1) 变性洗脱（该方法适于 SDS-PAGE 检测）:

向上述离心管中加入 20-40 μ L 1×SDS-PAGE loading buffer 混匀，95℃ 加热 5 min。1000 rpm 离心 1 min，收集上清进行后续 WB 分析。

2) 非变性洗脱（该方法洗脱的样品保持原有的生物活性，可用于后续功能分析）:

向上述免疫沉淀反应得到的 Beads 中加入 50 μ L 0.2 M pH2.5 的甘氨酸洗脱结合的蛋白，建议孵育时间 30 秒-2min，并不断混匀，室温下手动轻弹混匀或于旋转混合仪轻轻翻转，1000 rpm 离心 1 min，吸取上清，将其收集至新的离心管中，即为目标蛋白复合物，立即加入 5 μ L 的中和液 1.0 M Tris (pH10.4)，将 pH 调至 7.0-8.0，备用。

