

IPKine™ 蛋白 A/G 磁珠

Cat #: BMR2080

Size: 1 mL/5 mL

	蛋白 A/G 磁珠		
REF	货号: BMR2080	LOT	批号: 见产品标签
	应用: IP、Co-IP		
	配体: 重组蛋白 A/G		结合能力: > 500 µg Rabbit IgG/mL 磁珠
	储存缓冲液: PBS, 0.01% Tween-20, 0.02% NaN ₃		磁珠浓度: 10 mg/mL
	保质期: 4°C保存 24 个月, 避免冷冻		

原理

蛋白 A 和蛋白 G 是免疫沉淀和抗体纯化的常用选择, 因为它们既稳定又有靶向性。来自多个物种的 IgG 类抗体与蛋白 A 和或蛋白 G 结合, 使抗体被蛋白-磁珠捕获, 蛋白 A 和蛋白 G 与 IgG 亚型的结合具有不同的亲和力, 这取决于物种和重链的性质。IPKine™ 蛋白 A/G 磁珠为免疫 (共) 沉淀提供了一种简单、快速、高效的方法。

包装清单

组分	规格		Storage conditions
	1 mL	5 mL	
ProteinA/G Magnetic Beads	1 mL	5 mL	4°C, 避免冷冻

自备耗材

- 磁分离架
- 垂直旋转混合仪
- 低温离心机
- 可调节式移液枪及枪头
- PBS
- 匀浆器 (如果是组织样本)
- 抗体同种属的正常 IgG
- SDS-PAGE Loading Buffer

试剂准备

ProteinA/G Magnetic Beads: 即用型; 4°C保存, 避免冷冻。

用于配制缓冲液的水和化学试剂需要高纯度, 缓冲液使用之前使用 0.22 µm 或 0.45 µm 滤膜过滤。对于大多数蛋白质, 可以使用以下推荐缓冲液:

Lysis Buffer: 50mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1% IGEPAL-CA630, 1mM PMSF, pH7.4

Wash Buffer: 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0

Elution Buffer: 0.1 M Glycine, pH 3.0

Neutralization Buffer: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

实验步骤

一、免疫沉淀

A. 蛋白样品的准备

1. 细胞蛋白提取

(1) 细胞收集 (贴壁细胞: 10 cm 细胞培养皿中单层细胞长满 80%-90%, 吸除细胞培养液, PBS 洗涤一次; 悬浮细胞: 离心收集 5×10^6 个细胞, PBS 洗涤一次)。

(2) 加 0.5-1 mL 预冷的 Lysis Buffer 到细胞中, 4°C裂解细胞 5 min, 期间用移液器反复吹打, 然后将细胞悬浮液转移到新的离心管中。

(3) 12,000 rpm, 4°C, 离心 10 min, 收集上清, 然后采用 BCA 法测定蛋白浓度 (推荐使用 Abbkine 货号: KTD3001 蛋白质定量试剂盒 (BCA 法))。

2. 组织蛋白提取:

(1) 植物或动物组织样品: 称取 0.1 g 组织, 加入 1 mL Lysis Buffer, 液氮或匀浆器研磨。

(2) 将匀浆液转移至新的离心管中, 4°C冰上裂解 5 min。

(3) 12,000 rpm, 4°C, 离心 10 min, 收集上清, 然后采用 BCA 法测定蛋白浓度 (推荐使用 Abbkine 货号: KTD3001 蛋白质定量试剂盒 (BCA 法))。

注意: 总蛋白浓度选择在 0.5-1 µg/µL 范围内较为合适。通常针对目标蛋白的表达量不同, 需要对总蛋白浓度进行预实验调整。免疫共沉淀(Co-IP)通常必须使用未经冻存的新鲜蛋白样品。普通的免疫沉淀虽然可以使用冻存的蛋白样品, 但也宜用新鲜的蛋白样品为佳。

B. 去除非特异性结合(可选做):

1. 取 20 µL 的 Protein A/G Magnetic Beads 加入到 1.5 mL 离心管中, 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 吸弃上清。

注意: Protein A/G Magnetic Beads 使用前一定要充分重悬, 即充分颠倒若干次使混合均匀。

2. 加入 1 mL Wash Buffer, 重悬 Protein A/G Magnetic Beads, 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 吸弃上清, 重复 3 次。

3. 加入 0.2-1 mL (0.2-1 mg) 蛋白样品, 4°C摇转孵育 30 min。 (推荐用垂直旋转混合仪, 低速旋转)

4. 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 取上清用于后续的免疫沉淀。

C. 免疫沉淀:

1. 取 20 µL 的 Protein A/G Magnetic Beads 加入到 1.5 mL 离心管中, 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 吸弃上清。

2. 加入 1 mL Wash Buffer, 重悬 Protein A/G Magnetic Beads, 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 吸弃上清, 重复 3 次。

3. 加入 0.2-2 µg 抗体溶液, 重悬 Protein A/G Magnetic Beads, 体积不足 500 µL 时用 Wash Buffer 补足, 室温下置于垂直旋转混合仪孵育 30 min, 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 收集上清液, 沉淀用于后续 Step 4。可选做, **IgG 阴性对照:** 加入 0.2-2 µg 抗体种属相同的正常 IgG, 重悬 Protein A/G Magnetic Beads, 室温下置于垂直旋转混合仪孵育 30 min, 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 收集上清液, 沉淀用于后续 Step 4。此步可排除 IgG 本身和目的蛋白或其它特定生物分子的非特异性结合。

4. 加入 1 mL Wash Buffer, 重悬 Protein A/G Magnetic Beads, 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 吸弃上清, 重复 3 次。

5. 加入 0.2-1 mL (0.2-1 mg) 蛋白样品或上清(去除非特异性结合蛋白的上清), 在室温下置于垂直旋转混合仪孵育 1 h 或 4°C过夜。

6. 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 收集上清液, 沉淀用于后续 Step 7。

7. 加入 1 mL Wash Buffer, 重悬 Protein A/G Magnetic Beads, 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 吸弃上清, 重复 3 次。

8. 洗脱

(1) 变性洗脱法: 此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检测。向离心管中加入 20-50 µL 1×SDS-PAGE Loading

Buffer 混合均匀, 100°C加热 5 min, 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 收集上清液至新的离心管中, 进行 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检测分析。

(2) 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。向离心管中加入 20-50 μ L Elution Buffer 混匀, 然后在室温下孵育 10 min, 离心管置于磁分离架上, 静置 10 s, 收集上清液至新的离心管中, 并立即加入 1/10 Elution Buffer 体积的 Neutralization Buffer, 将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0, 用于后续功能分析。

二、免疫共沉淀:

参考免疫沉淀的方法进行。

附表

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
Human	IgA	Variable	—	++
	IgD	—	—	—
	IgE	—	—	—
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	—	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	Variable	—	—
Avian egg yolk	IgY	—	—	—
Cow		++	++++	++++
Dog		++++	++	++++
Goat		—	++++	++++
Guinea pig	IgG1	++++	++	++++
Hamster	IgG2	++++	++	++++
Horse	Total IgG	++	++++	++++
Koala		—	+	
Llama		—	+	
Monkey (rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	Variable	—	—
Pig		+++	+++	++++

Rabbit	Total IgG	++++	+++	++++
Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep	Total IgG	+/-	++	++

表 1. Protein A、 Protein G 和 Protein A/G 对不同抗体的结合能力，++++=结合能力强; ++=结合能力中等; —=结合能力弱或没有结合

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTD104	通用型免疫（共）沉淀（IP/Co-IP）工具箱（磁珠）
KTI1010	通用型免疫（共）沉淀（IP/Co-IP）工具箱（磁珠/抗小鼠）
KTI1020	通用型免疫（共）沉淀（IP/Co-IP）工具箱（磁珠/抗兔）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。