

## Product Data Sheet

Product Name: Protein A Magnetic Beads  
Cat. No.: GK30002

### 产品介绍

GLPBIO Protein A Magnetic Beads常用于IgG 抗体富集和免疫沉淀。Protein A Magnetic Beads使用纳米表面生物技术将Protein G共价连接到直径为0.2  $\mu\text{m}$ 的超顺磁性磁珠微球表面，磁珠表面抗体结合位点多，使用简便有效。GLPBIO Protein A Magnetic Beads具有大面积特异的表面区域，能够极大缩短抗体吸附和抗原结合的时间。GLPBIO Protein A Magnetic Beads对来自多种物种的抗体Fc区具有高亲和力，适用于从血清、细胞裂解物、细胞分泌液上清以及动物腹水中纯化抗体，且非特异性结合低。

### 产品特性

项目	特性
磁珠浓度	10 mg/mL
IgG 结合量	0.5 mg/mL
适用范围	IP, Co-IP, CHIP
适用抗体种属	广谱抗体种属

### 操作说明

推荐缓冲液 (自备)  
结合/洗涤缓冲液 PBST: 1 $\times$ PBS + 0.5% Tween-20, pH 7.4  
洗脱缓冲液 0.15 M Glycine, pH 2.5-3.1

#### 1. 抗原样品的准备(请根据不同的样品选择合适的处理方法)

样品	样品处理
血清	若目标蛋白丰度较高，建议稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 10-100 $\mu\text{g/mL}$ ，置于冰上备用 (或置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 长期保存)。
悬浮细胞	离心收集细胞 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 500g, 10 mins)，弃上清后称重，按照每毫克细胞 50 $\mu\text{L}$ 的比例用 1 $\times$ PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次；按每毫克细胞 5-10 $\mu\text{L}$ 的比例加入细胞裂解缓冲液，同时加入蛋白酶抑制剂，混匀后置于冰上处理 10 mins；离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 14000 g, 10mins)，收集上清液，置于冰上备用 (或置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 长期保存)。
贴壁细胞	移去培养基，按每 $1\times 10^5$ 的细胞 150 $\mu\text{L}$ 的比例用 1 $\times$ PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次；用细胞刮棒刮脱细胞，收集至 1.5 mL EP 管内，按每 $1\times 10^5$ 的细胞 20-30 $\mu\text{L}$ 的比例加入细胞裂解缓冲液，同时加入蛋白酶抑制剂，混匀后置于冰水处理 10 mins；离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 14000 g, 10 mins)，收集上清液，置于冰上备用 (或置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 长期保存)。
大肠杆菌	离心大肠杆菌 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 12000 g, 2 mins)，弃上清后称重，按每克 (湿重) 菌体 10 mL 的比例用 1 $\times$ PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次；按每克 (湿重) 菌体 5-10 mL 的比例加入细胞裂解缓冲液，同时加入蛋白酶抑制剂，重悬菌体，超声裂解细胞，离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 17000 g, 10 mins)，收集上清液，置于冰上备用 (或置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 长期保存)。

#### 2. 磁珠预处理

将磁珠充分混悬，取 25-50  $\mu\text{L}$  磁珠，置于 1.5 mL EP 管中，加入 400  $\mu\text{L}$  结合/洗涤缓冲液，充分混悬，置于磁力架，磁性分离，弃上清；重复以上洗涤步骤 2 次。

#### 3. 抗体与磁珠结合

(1) 抗体预处理：使用结合/洗涤缓冲液将抗体稀释至终浓度为 5-50  $\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 抗体-磁珠结合：将稀释好的 400  $\mu\text{L}$  抗体加入步骤 2 处理好的磁珠中，充分混悬，置于翻转混合仪孵育 (常温，30 mins； $4^{\circ}\text{C}$ ，2 hours)，磁性分离，上清液收集于新的 EP 管中，以备后续检测。

**Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.**

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

## Product Data Sheet

(3) 洗涤: 加入 400  $\mu$ L 结合/洗涤缓冲液, 充分混悬磁珠, 磁性分离, 弃上清; 重复洗涤 4 次。注: 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. 抗原与抗体-磁珠复合物结合

(1) 抗原-抗体-磁珠复合物结合: 加入 400  $\mu$ L 步骤 1 准备的抗原样品, 充分混悬, 置于翻转混合仪孵育 (常温, 30 mins; 4°C, 2 hours), 磁性分离, 弃上清。

(2) 洗涤: 使用 400  $\mu$ L 结合/洗涤缓冲液充分重悬磁珠, 磁性分离, 弃上清; 重复洗涤 4 次。

### 5. 抗原洗脱

本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合用于 SDS-PAGE 检测。

步骤: 分离磁珠, 弃上清, 向磁珠中加入 25-50  $\mu$ L 1 $\times$ SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀, 95 C 加热 5 mins。分离磁珠, 收集上清, 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。

步骤: 分离磁珠, 弃上清, 向磁珠中加入 25-50  $\mu$ L 洗脱缓冲液, 室温孵育 10 mins; 分离磁珠, 收集上清至新的 EP 管, 并立即滴入总体积 1/10 体积的中和缓冲液 (0.1 M NaOH), 将洗脱产物 pH 调节至中性, 样品用于后期功能分析。

注: 本步骤洗脱的抗原为抗原-抗体复合物, 如操作者需要单独洗脱目标抗原, 推荐使用交联剂, 并按相关实验说明操作。

## 保存条件

4°C      2 年

## 注意事项

1. 本产品 pH 值为 6-8, 禁止冻结。
2. 本产品应避免离心、干燥或冻存, 禁止长时间置于磁场, 可能会引起磁珠聚团, 抗体结合后操作过程应轻柔, 避免抗体脱落。
3. 为最大限度的降低蛋白质降解, 请配合使用蛋白酶抑制剂 cocktails
4. 使用前请先通过查阅附录确认抗体所属亚型与 Protein A 的亲合度, 如亲合度不佳, 可以通过增加抗体与磁珠的孵育时间 (30-120 mins)、提高结合缓冲液的 pH 值 (8-9) 以及降低离子强度 (25-100 mM NaCl) 等方法提高亲和效率。
5. 为提高磁珠在免疫沉淀反应中的特异性, 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 磁珠捕获复合物。
6. 磁珠在低 pH 的洗脱缓冲液中发生聚集属于正常现象。在结合/洗涤缓冲液和洗脱缓冲液中添加浓度为 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/洗涤缓冲液洗涤至中性, 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 2 mins, 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。
7. 超声处理会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落, 所以磁珠在捕获抗体后不宜使用该方法重悬磁珠。
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。
9. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

**Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.**

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA