

## 产品成分

本产品是重组偶联有Protein A/G的Magarose beads, 可以与大部份哺乳动物免疫球蛋白Fc结合, 本产品结合力高, 载量高, 可应用于免疫沉淀/免疫共沉淀实验。具体性能如下表:

指标	性能
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微球 (固体体积)
粒径 (um)	20-99
pH稳定范围	3-10
储存缓冲液	含20%乙醇的1×PBS
储存温度	2°C-8°C

## 包装规格

1 mL/5 mL

## 使用方法

使用本产品前, 先确认一抗种属和亚型, 参考下表确认本产品与之兼容。如不确定亚型或出于兼容考虑, 可以考虑Protein A/G Magarose beads, 其结合能力参考下表。

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	++++	++	++++
	IgG2	++++	++	++++
Hamster		+	++	—
Horse		++	++++	++++
Koala		—	+	—
Llama		—	+	—
Monkey (rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	++	++	++
	IgG3	++	++	++
	IgM	variable	—	—
Pig		++	++	++++
Rabbit	no distinction	++++	++	++++
Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++

	IgG3	+	++	++
Sheep		+/-	++	++

++++=结合能力强; ++=结合能力中等; -=结合能力弱或没有结合。

### 免疫沉淀

#### 方式一 (SDS Sample buffer洗脱法)

1. 用预冷的含蛋白酶抑制剂的RIPA buffer裂解细胞或组织。取1-3 mg总蛋白的裂解物 (体积控制在300-500 uL), 加入80%-100%裂解物体积的Incubation buffer, 加入1-4 ug特异性抗体, 4°C旋转过夜。
2. 吸取等量蛋白裂解物, 加入等量Incubation buffer并加入同种属等量的IgG孵育作为Control IgG对照组。4°C旋转过夜。
3. 将 Protein A/G Magarose Beads 轻柔颠倒数次, 保证磁珠完全混匀, 按每个IP取30-50 uL 磁珠悬浮液, 计算需要使用的磁珠总体积, 移液器取计算体积的磁珠悬浮液转移至离心管中, 将离心管放置在磁分离器上, 静置30 s-1 min, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃清液。再将离心管磁从分离器上取下来, 加入1 mL的PBS, 使用枪头轻轻反复吹打5次, 将离心管置于磁分离器上, 大约1 min, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃清液, 总共洗涤3次, 用PBS重悬至取用磁珠的原体积。
4. 加入30-50 uL重悬的 Protein A/G Magarose beads, 4°C 旋转孵育1-4 h。
5. 用1 x Washing buffer (现加蛋白酶抑制剂) 洗涤沉淀复合物, 磁性分离, 弃上清, 累计洗涤3次。最后一次洗涤上清尽量去除干净。
6. 加入100 uL 1 x Sample Buffer, 重悬IP复合物beads, 沸水浴加热5 min。
- \*为了获得更高的IP产物浓度, 1x Sample Buffer可以适当减少, 一般不建议低于50 uL。
7. 磁性分离吸附磁珠后, 小心吸取上清转入新的EP管中。
8. 取20-40 uL样品进行免疫印迹检测, 设置Control IgG对照和Input对照。

#### 方式二 (酸洗脱法)

- 用预冷的含蛋白酶抑制剂的RIPA buffer裂解细胞或组织。取1-3 mg总蛋白的裂解物300-500 uL于1.5 mL微量离心管中, 加入80%-100%裂解物体积的Incubation buffer, 加入1-4 ug特异性抗体, 4°C旋转过夜。
1. 吸取等量蛋白裂解物, 加入等量Incubation buffer并加入同种属等量的IgG孵育作为Control IgG对照组。4°C旋转过夜。
  2. 将 Protein A/G Magarose Beads 轻柔颠倒数次, 保证磁珠完全混匀, 按每个IP取30-50 uL 磁珠悬浮液, 计算需要使用的磁珠总体积, 移液器取计算体积的磁珠悬浮液转移至离心管中, 将离心管放置在磁分离器上, 静置30 s-1 min, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃清液。再将离心管磁从分离器上取下来, 加入1 mL的PBS, 使用枪头轻轻反复吹打5次, 将离心管置于磁分离器上, 大约1 min, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃清液, 总共洗涤3次, 用PBS重悬至取用磁珠的原体积。
  3. 向纯化柱中加入30-50 uL重悬的 Protein A/G Magarose beads, 4°C 旋转孵育1-4 h。
  4. 将离心管放置在磁分离器上, 静置30 s-1 min, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃清液。
  5. 用1 x Washing buffer (现加蛋白酶抑制剂) 洗涤沉淀复合物, 磁性分离, 弃上清, 累计洗涤3次。最后一次洗涤上清尽量去除干净。
  6. 向离心管中加入80 uL Elution buffer, 使用枪头轻轻反复吹打5次, 室温静置5-10 min, 期间可以轻轻摇晃2-3次, 重悬沉淀复合物, 以达到更好的洗脱效果, 将离心管放置在磁分离器上, 静置30 s-1 min, 待溶液变澄清后, 用移液器将洗脱产物转移至新的做好标记的离心管中。
  7. 向有洗脱产物的离心管中加入10 uL 碱中和液以及23 uL 5 x Sample Buffer, 沸水浴加热5 min。
  - \*为了获得更高的IP产物浓度, Elution buffer, 碱中和液和5 x Sample Buffer可以按比例减少, 一般不建议Elution buffer低于50 uL。
  8. 取20-40 uL样品进行免疫印迹检测, 设置Control IgG对照和Input对照。

#### 参考配方:

RIPA裂解液	配制: 1000 mL
Tris	6 g
NaCl	8.76 g
脱氧胆酸钠	5 g
SDS	1 g
NaF	0.42 g
EDTA.2Na.2H <sub>2</sub> O	1.86 g
Triton X-100	10 mL

盐酸调pH至7.4, 补ddH<sub>2</sub>O定容至1000 mL, 4°C保存

注: PMSF及其它蛋白酶抑制剂现用现加

5X SDS sample buffer	配制: 50 mL
Tris HCl (1M母液, pH 7.0)	12.5 mL
甘油	17.5 mL
SDS	7.5 g
溴酚蓝	15 mg

补ddH<sub>2</sub>O至37.5 mL, 分装并保存在-20°C

现用现加还原剂: 25% DTT (2M母液)

Incubation buffer		配制: 1000 mL
KCl		0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O		1.14 g
NaCl		8 g
NaF		0.42 g
EDTA·2Na·2H <sub>2</sub> O		1.86 g
1 M NaOH调pH至7.4, 补ddH <sub>2</sub> O定容至1000 mL, 4°C保存		

Washing buffer (1 x TBST)		配制: 1000 mL
Tris		2.42 g
NaCl		8.76 g
KCl		0.373 g
Tween-20		2 mL
盐酸调pH至7.4, 补ddH <sub>2</sub> O定容至1000 mL		

洗脱液 (Elution buffer)		配制: 500 mL
NaCl		14.6 g
Glycine		5.625 g
调pH至1.5-2.0, 补ddH <sub>2</sub> O定容至500 mL, 4°C保存		

碱中和液 (Alkali neutralization buffer)	
NaOH溶液	0.9 M~1.3 M
The final concentration is adjusted according to Elution buffer	

## Validation Data



IP result of anti-RAD23B (IP: 67988-1-Ig, 4 ug; Detection: 67988-1-Ig 1:4000) with mouse testis tissue lysate 1560 ug.