

## TECHNOTE 205

## Protein A 、 G 磁珠应用案例



Enriching Biotechnology

Telephone: +86 021 55809378

E-mail address: marketing@bio-enriching.com

## 一. 缓冲液配制

注: 建议采用磷酸缓冲液, 洗脱后不影响下游的标记。

### 1.1 A 缓冲液

1mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O(MW358.14)..... 358.14g

1500 mM NaCl I(MW68.08g/mol) ..... 87.7g

溶于 1 升水, 滤膜过滤

### 1.2 B 缓冲液

1mol/L NaH<sub>2</sub>P<sub>04</sub> (MW156.01).....156.01g

1500 mM NaCl I(MW68.08g/mol) ..... 87.7g

溶于 1 升水, 滤膜过滤

### 1.3 C 吸附和洗涤缓冲液

根据所需 pH 值, 按下表 1 配制。按照所列比例量取后混合, 然后再加 9 倍体积的水, 稀释成应用溶液。

如果洗脱下的抗体有些杂带, 可加吐温 20 至终浓度 0.05%

### 1.4 D 中和缓冲液

A 液 77.4ml 、 B 液 22.6ml; 两液混合成 PH7.4 的中和缓冲液

### 1.5 E 洗脱液

0.1mol/L NaH<sub>2</sub>P<sub>04</sub> (MW156.01) .....15.601g

150 mM NaCl I(MW68.08g/mol) ..... 8.77g

溶于 1 升水, 滤膜过滤, HCl 调整 pH 至 3.0

## 二. 应用举例

### 2.1 从小鼠腹水中分离纯化 IgG2a

1. 取磁珠体积 1mL 的 Protein G 琼脂糖磁珠;

2. 5mL 缓冲液 C 清洗 Protein G 琼脂糖磁珠，磁性分离去除上清液；（缓冲液 C 配制方法：取 A 液 35.2ml、B 液 64.8ml，再加 900ml 水，混合后 pH6.5）；

3. 将 0.2ml 小鼠腹水用缓冲液 C 稀释到 2ml，0.45 $\mu$ m 滤膜过滤，加入含磁珠的离子管中；

4. 室温孵育结合 15~30min；

5. 磁性分离，去除上清液，用缓冲液 C 再次清洗 3 次；

6. 磁性分离，用 2mL 的洗脱液 E 洗脱。

7. 在洗脱液加入 0.2mL 中和缓冲液，以 pH 试纸确认溶液为中性。溶液太酸，会损伤抗体活性（中和缓冲液配制方法：A 液 77.4ml 、B 液 22.6ml；两液混合成 pH7.4 的中和缓冲液

8. 将分离纯化的 IgG2a 与对照品同时进行 SDS-PAGE 电泳分析。

9. 用纯水清洗 Protein G 琼脂糖磁珠三次，再用 20%的乙醇清洗三次，最后将 Protein G 琼脂糖磁珠置于+4~8 $^{\circ}$ C 环境中保存（中和缓冲液配制方法：A 液 77.4ml 、B 液 22.6ml；两液混合成 pH7.4 的中和缓冲液

表一 25 $^{\circ}$ C 下 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液的配制

pH	A 液	B 液
	1mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	1mol/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ml)
5.8	7.9	92.1
6.0	12.0	88.0
6.2	17.8	82.2
6.4	25.5	74.5
6.6	35.2	64.8
6.8	46.3	53.7
7.0	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6
7.6	84.5	15.5
7.8	89.6	10.4
8.0	93.2	6.8

根据比例量取混合，然后在加 9 倍体积的水，稀释成应用溶液。

## 2.2 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)

### 2.2.1 蛋白样品的准备

1) 对于 10 厘米细胞培养皿中的贴壁细胞，吸除细胞培养液，PBS 洗涤一次，然后加入 500 微升至 2 毫升细胞裂解液裂解细胞。

3) 对于组织样品参考贴壁细胞使用裂解液的比例进行裂解。

4) 对于悬浮细胞，离心收集细胞后，PBS 洗涤一次，然后参考贴壁细胞的裂解方法进行裂解。

**注：**详细的裂解方法参考不同裂解液的详细使用方法。对于不同的培养器材，参考 10 厘米培养皿的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，在以后的裂解过程中宜适当减少裂解液的用量。

### 2.2.2 去除非特异性结合(可选做)

1) 取 200 微升至 1 毫升蛋白样品，蛋白量约为 200 微克至 1 毫克，加入约 1 微克和免疫沉淀时使用的 IgG 种属相同的普通 IgG 和 20 微升充分重悬的 Protein A/G 琼脂糖磁珠，4°C 缓慢摇动 30 分钟至 2 小时。

2) 磁性分离，取上清用于后续的免疫沉淀。

**注：**所谓种属相同的 IgG 是指，例如后续免疫沉淀时用的是小鼠 IgG，则在本步骤中可以加入 normal mouse IgG，如无 normal IgG 可以加入其它不影响后续检测的其它 mouse IgG 类型的抗体。通过和 normal IgG 和 Protein A/G 琼脂糖磁珠的孵育，可以充分降低非特异性的结合，降低背景。

### 2.2.3 免疫沉淀

1) 加入 0.2-2 微克用于免疫沉淀的一抗，4°C 缓慢摇动过夜；

2) 再加入 20 微升充分重悬的 Protein A/G 琼脂糖磁珠，4°C 缓慢摇动 1~3h。（为方便后续的洗涤操作可以吧加入充分重悬的 Protein A/G 琼脂糖磁珠的量调整为 40 微升）；

3) 磁性分离，小心吸除上清；

4) 用准备蛋白样品时的裂解液或 PBS 洗涤沉淀 5 次，裂解液或 PBS 的用量每次为 0.5-1 毫升。

5) 完成最后一次洗涤后，除上清，加入 20-40 微升 1XSDS-PAGE 电泳上样缓冲液 Vortex 重悬沉淀，磁性分离；

6) 100°C 或沸水浴处理 3~5 分钟，取部分或全部样品用于 SDS-PAGE 电泳，暂时不用的样品可以 -20°C 保存。