

# rProtein A Magarose Beads

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 操作流程.....	1
3. 订购信息及相关产品.....	4

## 1. 产品介绍

**琼脂糖基质磁性微球 (Magarose Beads)** 系列产品具有超顺磁性、快速磁响应性、丰富羟基官能团和相对集中的粒径等特点，是医学与分子生物学研究中重要的载体工具。Smart-Lifesciences 采用独特的生产工艺技术制备出的粒径分布在 30-100  $\mu\text{m}$  左右的磁性琼脂糖微球，粒径适中，更适合生物检查和纯化实验的需求。

**rProtein A Magarose Beads** 将 rProtein A 高密度定向包被到超顺磁性微球表面，该产品具有更高的抗体结合能力和较低的蛋白非特异吸附率，洗脱条件更均一，一步纯化即可从血清样品中分离出纯度大于 90% 的抗体。Protein A 是一种分离自金黄色葡萄球菌的细胞壁蛋白，主要通过 Fc 片段结合哺乳动物 IgG，但是不与狗 IgG 结合，不结合人 IgM、IgD 和 IgA。蛋白 A 与蛋白 G 与不同来源及亚类的免疫球蛋白结合能力不一样。天然 Protein A 有五个 IgG 结合区域和一些未知功能的区域，重组 protein A 去除了与白蛋白及细胞表面结合位点，只含有五个 IgG 结合区域，减少了非特异性吸附。

本产品为微米级磁性微球，具有超大比表面积，可大幅度缩短抗体吸附所需的时间。产品性能见表 1。本产品适用于血浆、腹水、组织培养上清液等样品中的抗体纯化，也可用于抗体固定及其它相关研究。用户可根据目标抗体的种属来源及亚型选择磁珠的类别，Protein A，Protein G 和 Protein A/G 与不同抗体的亲和性比较参见附表。

表 1. rProtein A Magarose Beads 产品性能

项目	性能
基质	磁性琼脂糖微球
配体	重组蛋白 A
结合能力	>40 mg hIgG/ml 磁珠
粒径范围	30-100 $\mu\text{m}$
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1XPBS
磁珠体积	磁珠体积占悬浮液体积的 20%
储存温度	2 - 8 $^{\circ}\text{C}$

## 2. 操作流程

### 2.1 缓冲液准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

**平衡/洗杂液:** 0.15 M NaCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0

**洗脱液:** 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

**中和液:** 1 M Tris-HCl, pH 8.5

**交联液:** 0.2 M 三乙醇胺, pH 8.2

**交联剂:** DMP (dimethyl pimelimidate dihydrochloride)

**终止液:** 50 mM Tris, pH 7.5

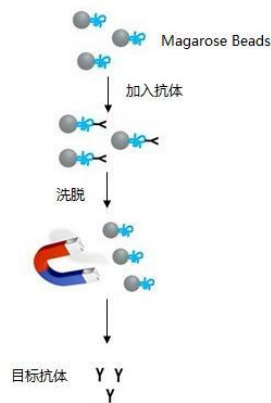
### 2.2 样品准备

上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用平衡/洗杂液透析。样品在上样前建议离心或用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率。

本产品分为两种应用：抗体纯化流程和免疫沉淀流程，免疫沉淀流程还分为直接法和间接法。

### 2.3 抗体纯化操作流程

抗体纯化流程示意图如下：



### 2.3.1 磁珠准备

不同种类的磁珠具有不同的抗体结合能力，在抗体纯化操作之前，建议估算待纯化样品中的抗体含量(一般血清样品中抗体含量约 8~10 mg/ml，细胞培养物中抗体浓度依表达量不同而变化较大)，然后根据磁珠的抗体结合能力，计算磁珠的大概用量，建议样品中抗体的含量小于磁珠最大载量的 80%左右。

### 2.3.2 磁珠预处理

将 rProtein A Magarose Beads 颠倒数次，保证磁珠完全混匀，取计算量（根据样品体积和抗体含量计算）的磁珠悬浮液，转移至离心管中，放置在磁分离器上，静置大约 1 min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃上清液。再将离心管从磁分离器上取下来，加入与悬浮液等体积的平衡液，使用枪头反复吹打 5 次，将离心管置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃上清液，重复洗涤 2 次。

### 2.3.3 抗体吸附

在步骤 2.3.2 预处理的磁珠中加入样品溶液，漩涡振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，促使样品和磁珠充分接触并吸附，混合 30 min 以上（具体时间根据结合效果调整），置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。

### 2.3.4 洗杂

向离心管中加入 5 倍磁珠体积的洗杂液，振荡悬浮，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。该操作重复两次。

### 2.3.5 抗体洗脱

在上述离心管中加入 3-5 倍磁珠体积的洗脱液，用移液器吹打 5 次，然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，5-10 min 后，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸取上清液，收集洗脱组分，即为目标抗体。重复洗脱 2 次，增加回收率。

### 2.3.6 洗脱组分中和

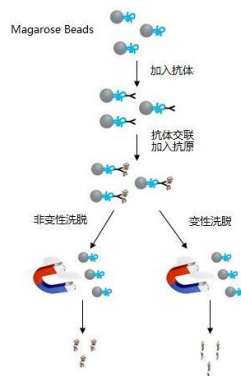
向洗脱组分中加入洗脱体积十分之一的中和液，调节 pH 值至 7.0-8.0。

### 2.3.7 磁珠保存

使用后的磁珠用 1 ml 洗脱液重悬磁珠，然后置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。该操作重复两次。再加入 1 ml 平衡液，悬浮磁珠，然后置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。再按照 4 倍磁珠体积加入 20%乙醇，置于 2~8℃ 保存。

## 2.4 免疫沉淀直接法操作流程

免疫沉淀直接法操作流程示意图如下：



### 2.4.1 磁珠准备

参考 2.3.1 和 2.3.2

### 2.4.2 抗体吸附

在预处理的磁珠中加入所需量的抗体溶液，漩涡振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，促使样品和磁珠充分接触并吸附，约 30 min 后，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。

### 2.4.3 洗杂

向离心管中加入 5 倍磁珠体积的洗杂液，振荡悬浮，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。该操作重复两次。

### 2.4.4 抗体交联 (备选)

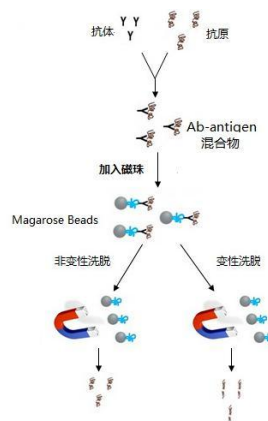
- 1) 如果需要将抗体和目标抗原复合物共同洗脱，请忽略本步骤，直接进行操作 2.4.5。50  $\mu$ l-1 ml 磁珠量均可以按照以下步骤操作，无需额外增加交联液体积。
- 2) 加入 1 ml 交联液，振荡悬浮，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。该操作重复两次。
- 3) 再加入 1 ml 含有 20 mM DMP (dimethyl pimelimidate dihydrochloride) 的交联液，此试剂需要现用现配。振荡悬浮，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，促使溶液和磁珠充分接触，约 30 min 后，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清。
- 4) 使用 1 ml 终止液悬浮磁珠，终止交联反应，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，促使溶液和磁珠充分接触，约 15 min 后，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。
- 5) 加入 1 ml 平衡液，颠倒混匀，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。再重复两次。

### 2.4.5 抗原沉淀反应

- 1) **抗原吸附：**加入含有抗原的样品，用移液器轻轻吹打使抗原与磁珠-抗体复合物均匀分散。在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管 10 min，使抗原与抗体充分结合，如结合力较弱则可在室温下反应 1 h 或者在 4℃ 下反应过夜。
- 2) **洗杂：**将上述完成抗原吸附的磁珠-抗体-抗原复合物进行磁性分离，收集上清液，置于冰上以备后续检测。向离心管中加入 5 倍磁珠体积的洗杂液，用移液器轻轻吹打使磁珠-抗体-抗原复合物均匀分散，然后进行磁性分离，弃上清液；从磁分离器上取下离心管，再重复洗涤两次。建议最后加入 2 倍磁珠体积的洗杂液，用移液器将磁珠-抗体-抗原复合物悬液转移至新的 1.5 ml 离心管中，并执行磁性分离，移弃上清。(避免将管壁上原有的非特异性吸附蛋白一起洗脱)
- 3) **抗原洗脱：**提供以下两种抗原洗脱方案，可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。  
**变性洗脱法：**此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。从磁分离器上取下离心管，向其中加入磁珠量等体积的 1×SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95℃ 加热 10 min。然后进行磁性分离或离心分离，收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。  
**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。从磁分离器上取下离心管，3-5 倍磁珠体积的洗脱液，用移液器吹打 5 次，然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，10 min 后，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸取上清液，收集洗脱组分，即为目标抗原，收集上清液至新的离心管中，并立即加入十分之一体积的中和液，将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0，用于后期功能分析。可以重复 2-3 次。

## 2.5 免疫沉淀间接法操作流程

免疫沉淀间接法操作流程示意图如下：



### 2.5.1 抗体与抗原混合

将抗体与含有目的抗原的样品混合，室温震荡孵育 30 min-60 min，或者 2-8℃ 孵育过夜，取决于抗体与抗原的结合效率以及抗原的稳定性，需要自己优化结合条件。形成抗原-抗体混合物。

注意：抗体的加入量要考虑到下面磁珠的量，抗体的加入量过多会影响到抗原-抗体混合物与磁珠的结合。建议抗体加入量为磁珠 80% 的最大载量。

### 2.5.2 磁珠准备

参考 2.3.1 和 2.3.2

### 2.5.3 抗原-抗体混合物的吸附

将步骤 2.5.1 中得到的抗原-抗体混合物加入到处理好的磁珠中，漩涡振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，促使样品和磁珠充分接触并吸附，约 30 min 后，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。

### 2.5.4 洗杂

向离心管中加入 5 倍磁珠体积的洗杂液，振荡悬浮，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。该操作重复两次。

**2.5.5 抗原洗脱：**提供以下两种抗原洗脱方案，可根据后期检测的需要选择洗脱方法。

**1) 变性洗脱法：**此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。

从磁分离器上取下离心管，向其中加入磁珠量等体积的 1×SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95℃ 加热 10 min。然后进行磁性分离或离心，收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。

**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。从磁分离器上取下离心管，3-5 倍磁珠体积的洗脱液，用移液器吹打 5 次，然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，10 min 后，置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，吸取上清液，收集洗脱组分，即为目标抗原，收集上清液至新的离心管中，并立即加入十分之一体积的中和液，将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0，用于后期功能分析。可以重复 2-3 次。

## 3. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
rProtein A Magarose Beads	NBS0030-1ml	1 ml
	NBS0030-5ml	5 ml
	NBS0030-25ml	25 ml
	NBS0030-100ml	100 ml
	NBS0030-1L	1 L
rProtein G Magarose Beads	NBS0040-1ml	1 ml
	NBS0040-5ml	5 ml
	NBS0040-25ml	25 ml
	NBS0040-100ml	100 ml
	NBS0040-1L	1 L

附表. Protein A、Protein G 和 Protein A/G 对不同抗体的结合能力

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		+	++	

附表. Protein A、Protein G 和 Protein A/G 对不同抗体的结合能力 (续表)

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
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	+/-	++	++

++++=结合能力强; +++=结合能力中等; —=结合能力弱或没有结合