



# rProtein A Magarose Beads

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 操作流程.....	2
3. 订购信息及相关产品.....	6

## 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 $\mu$ 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 使 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，具体见附表。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。

本产品可重复使用，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 磁珠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

性能	指标
基质	4%琼脂糖微球
配体	重组蛋白 A
结合能力 (/ml 磁珠)	> 10mg hIgG
粒径 ( $\mu$ m)	30-100
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 $^{\circ}$ C - 8 $^{\circ}$ C

## 2. 操作流程

### 2.1 材料准备

磁分离器

所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤。

### 2.2 样品准备

上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值, 可以用结合/洗涤缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释, 或者样品用结合/洗涤缓冲液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22 $\mu$ 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 推荐 Buffer

**结合/洗杂液:** 0.15M NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0

**洗脱液:** 0.1M 甘氨酸, pH 3.0

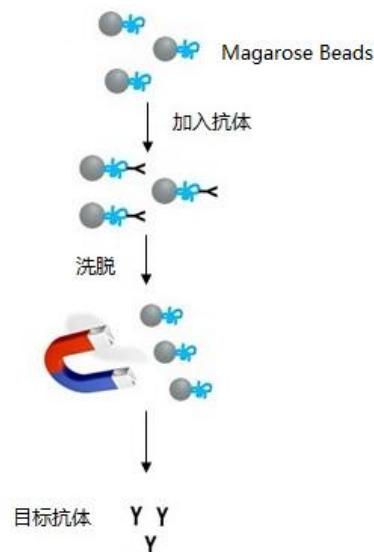
**中和液:** 1M Tris-HCl, pH 8.5

**交联液:** 0.2 M 三乙醇胺, pH 8.2

**终止液:** 50 mM Tris, pH 7.5

### 2.4 抗体纯化操作流程

抗体纯化流程示意图如下:



#### 2.4.1 磁珠准备

不同种类的免疫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 8~10mg/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。

#### 2.4.2 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 1min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃清液。再将离心管磁分离器上取下来，加入与悬浮液等体积的结合液，使用枪头反复吹打 5 次，将离心管置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃清液，重复洗涤 2 次。

#### 2.4.3 抗体吸附

在步骤 2.4.2 预处理的磁珠管中加入抗体溶液，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 30min 后，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。

#### 2.4.4 洗杂

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

#### 2.4.5 抗体洗脱

在上述离心管中加入 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，5-10min 后，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸取上清液，收集洗脱组分，即为目标抗体。

#### 2.4.6 洗脱组分中和

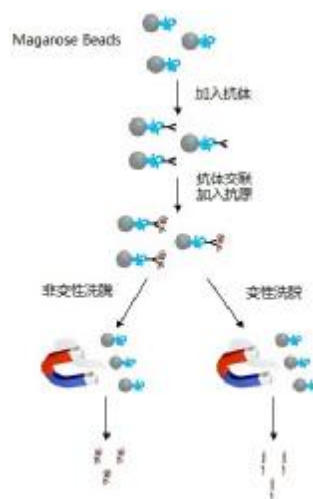
向洗脱组分中加入洗脱体积十分之一的中和液，调节 pH 值至 7.0-8.0。

#### 2.4.7 磁珠保存

使用后的磁珠用 1ml 洗脱液重悬磁珠，然后置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。该操作重复两次。再加入 1ml 结合 Buffer，悬浮磁珠，然后置于磁分离器上，大约 1min，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。

### 2.5 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：



### 2.5.1 磁珠准备

参考 2.4.1 和 2.4.2

### 2.5.2 抗体吸附

在预处理的磁珠管中加入抗体溶液，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 30min 后，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。

### 2.5.3 洗杂

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

### 2.5.5 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 10min，使抗原与抗体充分结合，如结合力较弱则可在室温下反应 1h 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 1ml 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 200 $\mu$ l 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。

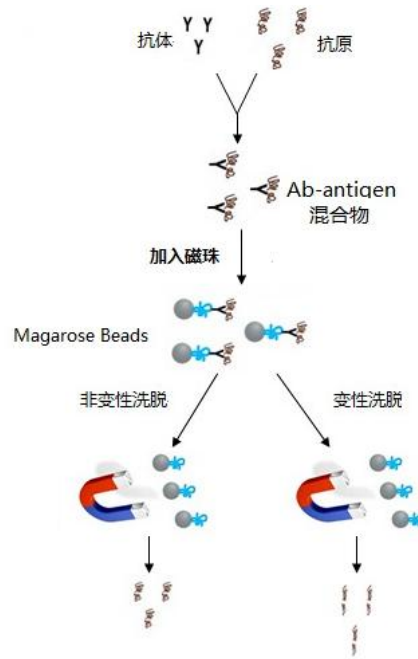
**变性洗脱法**：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。

从磁分离器上取下离心管，向其中加入 25 $\mu$ l 1 $\times$ SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95℃ 加热 5min。然后进行磁性分离，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，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，10min 后，置于磁分离器上，大约 1min，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。

## 2.6 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：



### 2.6.1 抗体与抗原混合

将抗体与含有目的蛋白的裂解液混合,室温震荡孵育 30min-60min ,或者 2-8 度孵育过夜,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。

### 2.6.2 磁珠准备

参考 2.4.2

### 2.6.3 抗原-抗体混合物的吸附

将步骤 2.6.1 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 30min 后,置于磁分离器上,大约 1min,待溶液变澄清后,吸弃上清液。

### 2.6.4 洗杂

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

**2.6.5 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不同的抗原洗脱方法。

- 1) **变性洗脱法:**此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。
- 2) 从磁分离器上取下离心管,向其中加入 25 $\mu$ l 1 $\times$ SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀,95 $^{\circ}$ C 加热 5min。然后进行磁性分离,收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。
- 3) **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，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，10min 后，置于磁分离器上，大约 1min，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