



蛋白 A 聚合物磁性微球

1 产品介绍

蛋白 A 聚合物磁性微球 (rProtein A MagPoly Beads) 是 rProtein A 高密度定向包被到超顺磁性聚合物微球表面, 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, 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。

表 1. rProtein A MagPoly Beads 产品性能

项目	性能
基质	聚合物磁性微球
配体	重组蛋白 A
载量	>50 μ g Rabbit IgG/mg 磁珠
粒径	1 μ m
磁珠浓度	10mg/ml
储存缓冲液	20mM Tris-HCl pH7.4, 0.01% Tween-20(v/v), 0.05% KroVin300(v/v)
储存温度	2 -8 $^{\circ}$ C

2 实验流程

本操作流程主要为免疫沉淀反应, 每次反应使用 50 μ l **rProtein A MagPoly Beads** 为例, 可根据需要适当的增加或减少磁珠使用量。

2.1 缓冲液准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 0.15M NaCl, 20mM Na₂HPO₄, pH7.0

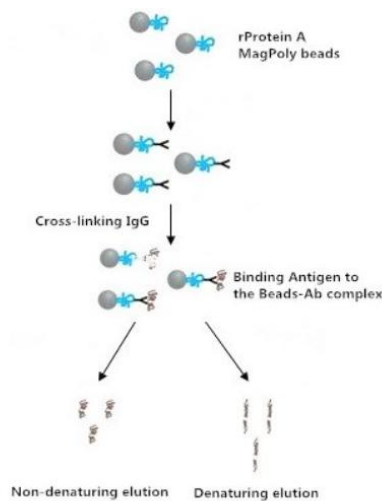
洗脱液: 0.1M 甘氨酸, pH3.0

中和液: 1M Tris-HCl, pH8.5

交联液: 0.2M 三乙醇胺, pH8.2

交联剂: DMP (dimethylpimelimidate dihydrochloride)

终止液: 50mM Tris-HCl, pH7.5





2.2 样品准备

方案 I: 贴壁细胞的裂解

- 1) 小心去除单层细胞的培养基。
- 2) 用预冷 PBS 清洗细胞两次。
- 3) 根据表 2 的推荐体积中加入预冷裂解缓冲液。冰上孵育 5min, 期间混匀几次。
- 4) 将上述裂解好的样品转移至一个新的离心管中, 约 13000×g 离心 10min, 分离细胞碎片。
- 5) 将上清转移到一个新管中, 进行蛋白浓度测定及后续实验, 标记为细胞裂解样品。

表 2. 针对各种标准培养皿的裂解缓冲液的推荐使用体积

培养皿大小/表面积	免疫沉淀裂解缓冲液体积
100×100mm	500-1000μl
100×60mm	250-500μl
6 孔板	200-400μl/孔
24 孔板	100-200μl/孔

方案 II: 悬浮培养细胞的裂解

- 1) 将细胞悬液以 1000×g 离心 5min, 收集细胞, 弃上清。
- 2) 用预冷 PBS 将细胞团轻轻重悬, 将细胞悬液以 1000×g 离心 5min, 收集细胞, 弃上清。
- 3) 向细胞团块中加入预冷裂解缓冲液。每 50mg 细胞团块使用 500μl。
- 4) 将上述裂解好的样品在冰上孵育 5min, 期间混匀几次。13000×g 离心 10min, 去除细胞碎片。
- 5) 将上清转移到一个新管中, 备蛋白浓度测定及后续实验, 标记为细胞裂解样品。

2.3 磁珠准备

- 1) 将 **rProtein A MagPoly Beads** 颠倒或漩涡混合均匀。
- 2) 取 50μl **rProtein A MagPoly Beads** 加入新的离心管中。放置在磁分离器上, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃保护液。
- 3) 将离心管从磁分离器上取下来, 加入 200μl 平衡液, 混匀, 放置在磁分离器上, 收集磁珠, 用移液器吸弃保护液。重复洗 2 次。

2.4 抗体吸附

- 1) 加入 100μl 平衡液将磁珠悬浮, 加入目标抗体溶液 (样品体积根据磁珠载量计算), 充分混匀。
- 2) 室温孵育 10min 以上 (具体时间根据结合效果调整), 可以振荡或漩涡混合均匀。
- 3) 将离心管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清液。如需要可留做进一步检测。
- 4) 加入 500μl 洗杂液混合均匀, 置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清液。重复洗杂至少 3 次。

2.5 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 2.6。50μl-1ml 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 1ml 交联液, 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。
- 3) 再加入 1ml 含有 20mM DMP (dimethylpimelimidate 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 30min 后, 置于磁分离器上, 大约 1min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。
- 4) 使用 1ml 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 15min 后, 置于磁分离器上, 大约 1min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。
- 5) 加入 1ml 平衡液, 颠倒混匀, 置于磁分离器上, 大约 1min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。再重复两次。

2.6 抗原结合反应

- 1) 加入含有抗原的样品 (步骤 2.2, 通常 100-1000μl), 用移液器轻轻吹打使抗原与磁珠-抗体复合物均匀分散。
- 2) 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。
- 3) 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, 以备后续检测。



4) 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。

2.7 抗原洗脱

A. 变性洗脱

此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。

- 1) 从磁分离器上取下离心管, 向其中加入 25 μ l 1 \times SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀, 95 $^{\circ}$ C 加热 10min。
- 2) 置于磁性分离器上, 进行磁性分离, 收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。

B. 非变性洗脱

- 1) 向磁珠-抗体-抗原复合物中加入 300 μ l 洗脱液, 混合均匀, 室温孵育 5min。
- 2) 置于磁性分离器上, 进行磁性分离, 吸取上清液为洗脱液至新的离心管中。
- 3) 重复步骤 1) 和 2) 两次, 收集洗脱液, 与 2) 中洗脱液混合, 加入中和液中和至 pH7.0-8.0。

3 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
蛋白 A 聚合物磁性微球 (rProtein A MagPoly Beads)	MP0801-01	50 μ l
	MP0801-02	1ml
	MP0801-03	5ml
	MP0801-04	10ml
	MP0801-05	50ml

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	++++	++	++++
Hamster	IgG2	++++	++	++++
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。