# rProtein A/G 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。

**rProtein A/G Magarose Beads** 使 rProtein A/G 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。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/G 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/G |
| 结合能力 | ＞10 mg Rabbit IgG/ml 磁珠 |
| 粒径范围 | 30-100 μm |
| 储存缓冲液 | 含 20% 乙醇的 1×PBS |
| 磁珠体积 | 磁珠体积占悬浮液体积的 20% |
| 储存温度 | 2 - 8℃ |

## 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 μm 或 0.45μm 滤膜过滤。

**平衡/ 洗杂液：**0.15 M NaCl，20 mM $Na_2HPO_4$，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（dimetyl pimelimidate dihydrochloride）

**终止液：**50 mM Tris，pH 7.5

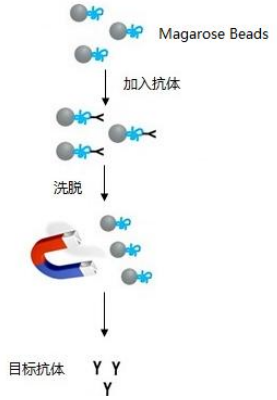
### 2.2 样品准备

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 μm 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/G 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 1min，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，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。

**2.3.6 洗脱组分中和**

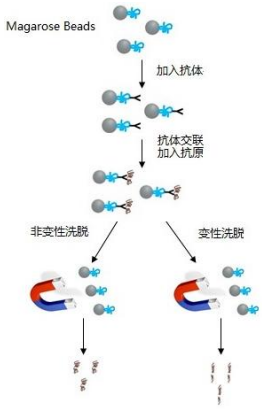
向洗脱组分中加入洗脱体积十分之一的中和液，调节 pH 值至 7.0-8.0。

**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**

在预处理的磁珠管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。

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（dimetyl 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。)

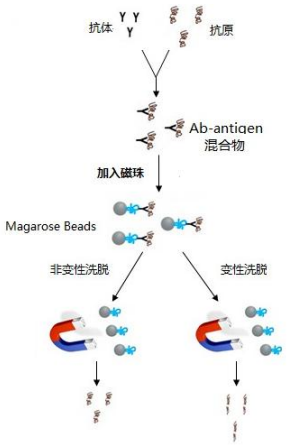
**3）抗原洗脱：**提供以下两种抗原洗脱方案，可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。

**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，向其中加入等体积磁珠量的 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。

**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**

将抗体与含有目的蛋白的裂解液混合，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 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/G Magarose Beads | SM005000 | 0.2 ml |
| | SM005002 | 2 ml |
| | SM005005 | 5 ml |
| | SM005025 | 25ml |
| | SM005100 | 100ml |
| | SM00501L | 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 | varible | — | ++ |
| | IgD | — | — | — |
| | IgE | — | — | — |
| | IgG1 | ++++ | ++++ | ++++ |
| | IgG2 | ++++ | ++++ | ++++ |
| | IgG3 | — | ++++ | ++++ |
| | IgG4 | ++++ | ++++ | ++++ |
| | IgM | varible | — | ++ |
| Avian egg yolk | IgY | — | — | — |
| Cow | | ++ | ++++ | ++++ |
| Dog | | ++++ | ++ | ++++ |
| Goat | | — | ++++ | ++++ |
| Guinea pig | IgG1 | ++++ | ++ | ++++ |
| | IgG2 | ++++ | ++ | ++++ |
| Hamster | | + | ++ | |
| Horse | Total IgG | ++ | ++++ | ++++ |
| Koala | | — | + | |
| Llama | | — | + | |
| Monkey(rhesus) | | ++++ | ++++ | ++++ |
| Mouse | IgG1 | + | ++++ | ++ |
| | IgG2a | ++++ | ++++ | ++++ |
| | IgG2b | +++ | +++ | +++ |
| | IgG3 | ++ | +++ | +++ |
| | IgM | variable | — | — |
| Pig | | +++ | +++ | ++++ |
| Rabbit | Total IgG | ++++ | +++ | ++++ |

++++=结合能力强; ++=结合能力中等; —=结合能力弱或没有结合

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

| 种属 | 亚型 | Protein A | Protein G | Protein A/G |
|---|---|---|---|---|
| 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