



# rProtein A MagPoly 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.....	3

## 1. 产品介绍

**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 µg Rabbit IgG/mg 磁珠
粒径	1 µm
磁珠浓度	10 mg/ml
储存缓冲液	PBS, 0.01% Tween-20, 0.02% NaN <sub>3</sub>
储存温度	2 -8°C

## 2. 操作流程

本操作流程主要为免疫沉淀反应，每次反应使用 50 µl **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 µm 或 0.45 µm 滤膜过滤。

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

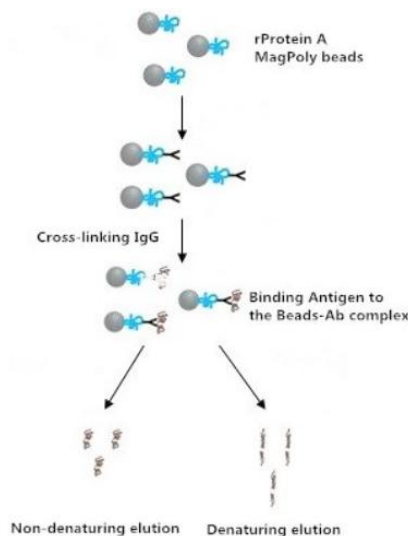
**洗脱液：** 0.1 M 甘氨酸, pH3.0

**中和液：** 1 M Tris-HCl, pH8.5

**交联液：** 0.2 M 三乙醇胺, pH 8.2

**交联剂：** DMP (dimethylpimelimidate dihydrochloride)

**终止液：** 50 mM Tris, pH 7.5





## 2.2 样品准备

### 方案：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 5 min，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 10 min，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
100×100 mm	500-1000 μl
100×60 mm	250-500 μl
6 孔板	200-400 μl/孔
24 孔板	100-200 μl/孔

### 方案 II：悬浮培养细胞的裂解

- 1) 将细胞悬液以 1000×g 离心 5 min，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 5 min，收集细胞，弃上清。
- 3) 向细胞团块中加入预冷裂解缓冲液。每 50 mg 细胞团块使用 500 μl。
- 4) 将上述裂解好的样品在冰上孵育 5 min，期间混匀几次。13000×g 离心 10 min，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 50 μl 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 200 μl 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 100 μl 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 500 μl 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。50 μl-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 (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 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。
- 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 15min 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。

## 2.6 抗原结合反应

- 1) 加入含有抗原的样品（步骤 2.2，通常 100-1000 μl），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 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。
- 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 1 ml 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 μl 1×SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95℃ 加热 10 min。
- 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  $\mu$ l 洗脱液，混合均匀，室温孵育 5 min。
- 2) 置于磁性分离器上，进行磁性分离，吸取上清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，加入中和液中中和至 pH7.0-8.0。

### 3. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
rProtein A MagPoly Beads	SM037001	1 ml
	SM037005	5 ml
	SM037010	10 ml
	SM037050	50 ml

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