

Protein A Magnetic Beads

蛋白 A 磁珠



产品信息:

货号	规格
MJA-102	1ml (50mg/ml)

产品介绍:

Protein A Magnetic Beads 是一种二氧化硅基质的超顺磁珠，其表面共价缀合超纯（纯度>97%）重组蛋白 A。Protein A Magnetic Beads 经过专门设计和严格质量管理检测，大小均匀，具有极好分散度。

当使用的一级抗体确定时，本产品可用于免疫沉淀和细胞分选。同时，也被广泛用于从血清样品，腹水，血浆或组织培养上清中快速有效的一步纯化多个种类的 IgG 蛋白。

表 1 总结了本磁珠的结合亲和力和特异性。

产品特点:

- 适用于快捷，简便的一步高通量程序;无需纯化柱或过滤器，或者重复的移液或离心(Fig.1)
- 由于磁珠的亲水性表面，非特异性结合率极低
- 极高的结合容量
- 对样本体积要求低，便于自动化操作
- 性价比高



Table 1

Species	Antibody	Binding (Protein A)	Species	Antibody	Binding (Protein A)	
Mouse	IgG 1	++	Sheep	IgG1	++	
	IgG 3	++++		IgG2	++++	
	IgG 2a	++++		Total IgG	++	
	IgG 2b	++++	Horse	IgG(ab)	++	
	IgM	-		IgG(c)	++	
	Total IgG	++++		IgG(T)	-	
Human	IgG1	++++	Goat	Total IgG	++	
	IgG2	++++		IgG1	++	
	IgG3	++		IgG2	++++	
	IgG4	++++	Cow	Total IgG	++	
	IgA	++		IgG1	++	
	IgD	-		IgG2	++++	
	IgM	++	Rabbit	Total IgG	++	
	Fab	++		Total IgG	++++	
	scFv	++		Total IgG	++++	
	Total IgG	++++	Guinea Pig	Total IgG	++++	
	Rat	IgG 1	++	Pig	Total IgG	++++
		IgG 2a	-	Cat	Total IgG	++++
IgG 2b		-	Dog	Total IgG	++++	
IgG 2c		++++	++++ (Strong Binding); +++ (Medium Binding); ++ (Weak Binding); - (No Binding); N/A (No Information)			
Total IgG		++				

产品属性:

组成	二氧化硅包裹的氧化铁的，表面固定重组蛋白A的磁珠
磁珠大小	直径1微米
磁珠数	~1.7×10 ⁸ 珠/毫克
表面积	100 m ² /g
磁化强度	~40 EMU/g
磁化的类型	超顺磁性
稳定性	短期: pH 3-11;长期: pH 4-10
存储	在4°C储存，不可冷冻

缓冲液成分:

- Protein A Beads (悬浮在 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.1% BSA, 1 mM EDTA, pH7.4, 0.1% Na3 缓冲液中)
- 1x Protein A Binding/Washing Buffer (57.7 mM Na2HPO4, 42.3 mM NaH2PO4, pH 7.0)
- 1x Protein A Elution Buffer (0.2 M Glycine/HCl, pH 2.5)
- 1x Protein A Neutralization Buffer (1.0 M Tris-HCl, pH 9.0)

所需耗材:

磁力分离器 (适用于手动操作): 根据实验时生物样品的体积，使用者可以选择以下不同型号的磁力分离器：8孔磁力架可以容纳8个单独的1.5-2.0 ml离心管；24孔磁力架可以容纳24个单独的1.5-2.0 ml离心管；4孔磁力架-15可以容纳4个单独的15ml离心管；4孔磁力架-50可以容纳四个单独的50 ml离心管。

操作过程:

此过程可被等比例放大或缩小

提示:

1. 该方案是经过优化的，可用于纯化来自不同来源的大多数IgG抗体。然而，由于没有两种抗体完全相同，因此不可能为所有IgG纯化设计一个通用试剂盒。为了获得最佳结果，每个用户必须根据故障排除部分中的建议，确定纯化单个抗体时的最佳工作条件，尤其是弱结合抗体（见表1）。

2. 为确保离子强度和pH值的最佳结合条件，有必要在纯化前用Binding/ Washing buffer按照至少1:1比例稀释血清样品、腹水或组织培养物。通过离心或 0.2 μ m 过滤器过滤，去除样品中的任何不溶性物质。
3. 在纯化IgG之前，用户应将试剂盒中包含的所有试剂平衡至室温，并通过用 4倍体积双蒸馏水稀释5x stock solutions制成1x working solutions。

A. 纯化过程

1. 轻轻摇动装有蛋白质 A磁珠的瓶子，直到磁珠完全悬浮。将适量的磁珠转移到新的试管中。

提示：每个用户应根据粗样品中的 IgG量，根据经验确定使用的最佳磁珠量。过多的磁珠会导致很高的背景;太少会降低蛋白产量。我们建议每 100 μ g IgG 抗体添加 100 μ l 完全悬浮的磁珠。通常，高效价兔抗血清的 IgG 含量约为 5mg/ml，小鼠腹水的 IgG 含量约为 10mg/ml，山羊或绵羊抗血清的 IgG 含量约为 20mg/ml。

2. 将试管放在磁力分离器上 1分钟。当试管留在磁力分离器上，上清液完全澄清时，去除上清液。将试管从分离器上取下，并使用 5倍体积的 1x Binding/Washing Buffer 通过漩涡清洗磁珠。再将试管放在磁力分离器上 1分钟。当试管留在磁力分离器上，上清液完全澄清时，去除上清液。
3. 重复步骤二两次。
4. 从磁力分离器上取下试管，通过添加适量的抗体样品和结合缓冲液的混合液（将粗样品或稀释抗体样品不 1xBinding/Washing Buffer 以 1:2 的比例混合）重新悬浮磁珠。使用移液器轻轻吹吸数次，充分混合，并在室温下培养 10-20分钟或 4 $^{\circ}$ C，旋转混合 30-45分钟。
5. 如步骤 2所述清洗磁珠，直到 280 nm 处洗脱液的吸光度接近背景水平（OD 280<0.05）。添加适量的 Elution Buffer 从磁珠上洗脱 IgG。用移液器轻轻吹吸几次并在 4 $^{\circ}$ C下旋转混合培养 10分钟。将试管放入磁力分离器中 1分钟，然后小心地将含有抗体的上清液移入干净的试管中。立即中和洗脱的抗体洗脱溶液，每 1.0 ml上清液加入 0.1 ml 的 neutralization buffer，并充分混合。
6. 通过透析、凝胶过滤色谱或其他方法对洗脱溶液进行脱盐和浓缩。

B. 可重生免疫磁珠的制备

注意：特异性抗体可以通过化学交联方式连接到蛋白 A磁珠上，创建可重复使用的免疫沉淀磁珠，避免抗体不目标蛋白（抗原）共同洗脱。抗体-蛋白 A交联磁珠可在 2-3小时内有效分离出高纯度的靶抗原。

使用者需准备的材料

- Cross-linking Buffer: 0.2 M Triethanolamine, pH 8.2
- Block Buffer: 1 M ethanolamine, pH 8.2
- Washing Buffer: 0.1 M Glycine-HCl, pH 5.2
- Storage Buffer: 1x PBS Buffer, pH 7.5, 0.1% Tween20, 0.02% NaN₃
- DMP: Dimethyl pimelinediimidate dihydrochloride
- PBS Buffer: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM, Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.5

准备

1. 向上述纯化部分步骤 6 所得磁珠中加入 1ml 的 Cross-linking buffer，并且用移液器吹吸数次，将试管放在磁力分离器上 1 分钟。当试管留在磁力分离器上，上清液完全澄清时，完全去除上清液。
2. 添加 1.0ml 含有 25mM DMP 的 Cross-linkingbuffer。从磁力分离器上取下试管。混合均匀，在室温下轻轻摇动 45 分钟。
3. 将试管放在磁力分离器上 1 分钟。当试管留在磁力分离器上，上清液完全澄清时，完全去除上清液。
4. 添加 1.0ml Block Buffer，从磁力分离器上取下试管。混合均匀，将试管放在磁力分离器上 1 分钟。当试管留在磁力分离器上，上清液完全澄清时，完全去除上清液。
5. 添加 1.0ml Block Buffer，从磁力分离器上取下试管。混合均匀，在室温下轻轻摇动 1 小时。
6. 将试管放在磁力分离器上 1 分钟。当试管留在磁力分离器上，上清液完全澄清时，完全去除上清液。
7. 向磁珠中加入 1ml 的 PBS buffer，并且用移液器轻柔吹吸数次混匀，将试管放在磁力分离器上 1 分钟。当试管留在磁力分离器上，上清液完全澄清时，完全去除上清液。
8. 重复步骤 7
9. 向磁珠中加入 1ml 的 Washing Buffer，从磁力分离器上取下试管。并且用移液器轻柔吹吸数次混匀，将试管放在磁力分离器上 1 分钟。当试管留在磁力分离器上，上清液完全澄清时，完全去除上清液。

10. 将磁珠重新悬浮在 Storage Buffer 中。

C. 磁珠保存

磁珠应当储存在 PBS Buffer 中，含有 0.1% Tween-20, 0.02% NaN₃, pH 7.2 - 7.5 在 4° C 储存。

问题和解决方案

1. 有时候，为什么 IgG 不能从磁珠中洗脱？

- 洗脱缓冲液的 pH 值可能不正确。正确的 pH 值应为 2.5。
- 洗脱条件太温和，无法洗脱抗体。
- 为一些抗体只能在 pH 值为 2.0 时洗脱。

2. 免疫反应洗脱抗体的丢失或产量低的原因是什么？

一旦洗脱缓冲液通过添加中和缓冲液立即中和，它将不会影响大多数抗体的免疫反应性。然而，一些抗体（例如，一些单克隆抗体）不耐酸，并且在非常低的 pH 值下会不可逆地失去活性。对于那些低 pH 敏感性抗体，用户应尝试其他替代洗脱方法，如高盐洗脱缓冲液。

3. 为什么在抗体洗脱溶液中观察到多条带？

某些宿主蛋白可能不目标抗体发生非特异性相互作用。用户可在结合和洗脱缓冲液中添加 NaCl（50-200mM，最终浓度）。

D. 通用式亲和层析方法

提示：该方案是一个通用的亲和纯化方法。因为没有两种蛋白质是完全相同的，所以不可能为所有的蛋白质纯化设计一个通用的协议。为了获得最佳结果，每个用户必须确定纯化单个目标蛋白的最佳工作条件。

1. 将适量的磁珠转移到离心管中。将管放在磁力分离器上 1-3 分钟。当磁珠完全沉淀时，去除上清液。

注意：强烈建议根据粗样品中目标蛋白质的含量，进行滴定，以优化每个单独实验中使用的磁珠数量。使用过多的磁珠将导致较高的背景，而使用过少的磁珠将导致较低的产量。每毫克磁珠通常可不 1-20 μ g 靶蛋白结合。

2. 取下试管，加入 5 倍磁珠溶液体积的 PBS 缓冲液，通过震荡重新悬浮磁珠，涡旋

30 秒。将试管至于室温环境 1-3 分钟，再将管放在磁力分离器上 1-3 分钟。当磁珠完全沉淀时，去除上清液。

3.重复步骤 2 两次。

4. 向含有目标蛋白质的粗样品中添加洗涤过的磁珠，并在室温或所需温度下温浴 1-2 小时（温度越低，培养时间越长）。

5. 用 5 倍磁珠体积的 PBS 缓冲液或 1M NaCl 彻底清洗磁珠，直到 280nm 处洗脱液的吸光度接近背景水平（OD 280<0.05）。

6. 通过适当的方法，如低 pH（2-4）、高 pH（10-12）、高盐、高温、亲和洗脱或 SDS-PAGE 加载缓冲液中煮沸，洗脱目标蛋白。

BM20230202