

# rProtein A/G 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.....	2

## 1. 产品介绍

**rProtein A/G MagPoly Beads** 是 rProtein A/G 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。产品性能见表 1。

用户可根据目标抗体的种属来源及亚型选择微球的类别，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 MagPoly Beads 产品性能

性能	指标
基质	聚合物磁性微球
配体	重组蛋白 A/G
结合能力	>50 $\mu\text{g}$ hIgG/mg 磁珠
粒径	1 $\mu\text{m}$
磁珠浓度	10 mg/ml
储存缓冲液	PBS, 0.01% Tween-20, 0.02% $\text{NaN}_3$
储存温度	2-8 $^{\circ}\text{C}$

## 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  $\mu\text{l}$  rProtein A/G 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  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

**裂解缓冲液:** 50mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1% IGEPAL-CA630, 1mM PMSF, pH=7.4

**平衡/洗杂液:** 0.15 M NaCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0

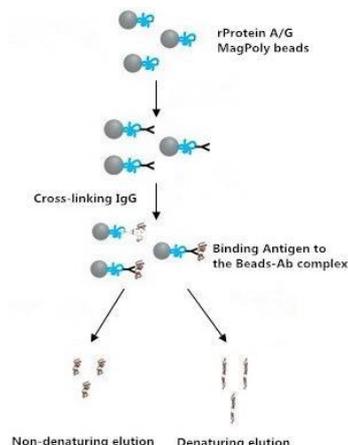
**洗脱液:** 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

**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 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 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 $\mu$ l
100×60 mm	250-500 $\mu$ l
6 孔板	200-400 $\mu$ l/孔
24 孔板	100-200 $\mu$ l/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  $\mu$ l。
- 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/G MagPoly Beads 颠倒或漩涡混合均匀。
- 2) 取 50  $\mu$ l rProtein A/G 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 $\mu$ l 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) 加入抗体溶液 (5-25  $\mu$ g 抗体总量), 充分混匀, 体积不足 500  $\mu$ l 时用平衡液补足。
- 2) 室温孵育 10 min 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 $\mu$ l 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。
- 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 30min 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 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。

#### 2.6 抗原结合反应

- 1) 加入含有抗原的细胞裂解样品 (步骤 2.2, 通常 100-1000  $\mu$ l), 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  $\mu$ l 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, 或者离心, 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 10 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) 收集洗脱液混合, 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
rProtein A/G MagPoly Beads	NBS0150 - 1ml	1 ml
	NBS0150 - 5 ml	5 ml
	NBS0150 - 10 ml	10 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