

## Protein A/G 磁珠说明书

### 【产品简介】

Protein A/G抗体纯化磁珠产品，由 NHS 活化的超顺磁性微球与ProteinA/G 共价结合形成的复合微粒，该产品具有较高的抗体结合能力和较低的蛋白非特异吸附率，洗脱条件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；尤其适用于同时纯化多个样品，样本和磁珠的体积范围也可灵活的调整，纯化的过程能够简便的放大，且配备不同的磁力架可同时处理 1-96 个样本。

### 【产品信息】

|        |                       |
|--------|-----------------------|
| 产品名称   | Protein A/G 磁珠        |
| 货号     | NG-MB0029             |
| 基质     | 聚合物                   |
| 配基     | Protein A/G           |
| 粒径     | 1 $\mu$ m             |
| 抗体结合能力 | 1.3-1.6mg/mL          |
| 磁珠浓度   | 10mg/mL               |
| 保质期    | 2-8 $^{\circ}$ C; 2 年 |

### 【实验前准备】

推荐缓冲液:

Binding/ Wash Buffer: PBST (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% Tween-20), pH 7.2-7.4

Elution Buffer: 100mMGly, 0.1% Tween-20, pH 2.5

Neutriliation buffer: 1.0M Tris-HCl, pH 9.0

Storage buffer: PBST (含 0.05% NaN<sub>3</sub>)

### 【操作步骤】

以纯化人血清为例，具体操作如下：

#### 1. 样品处理

取人血清 100 $\mu$ L (一般血清样品中抗体含量约 2-8mg/mL)至 1.5mL 离心管中，加入900 $\mu$ L Binding/Washing buffer，充分混匀。

#### 2. 磁珠预处理

- 1) 充分混匀磁珠后，取 200 $\mu$ L 磁珠悬液到 2mL 离心管中，磁性分离，弃上清；
- 2) 加入 1mL Binding/Washing Buffer 于离心管中，反复颠倒 3-5 次使磁珠充分重悬，磁性分离，弃上清；该步骤重复一次。

注：磁珠的用量可根据磁珠对目标抗体的最大结合量进行调节，可根据磁珠的抗体结合能力计算磁珠的大概用量，建议磁珠用量应为目标抗体含量的 1.2-1.5 倍。

#### 3. 抗体结合

在处理好的磁珠管中加入步骤 1 处理的样品溶液，振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手动轻轻翻转，使样品和磁珠充分接触混合结合 15mins，进行磁性分离，弃上清。

#### 4. 清洗磁珠

加入 1mL 的 Binding/Washing Buffer 于离心管中，反复颠倒 3-5 次使磁珠充分重悬，磁性分离，弃上清；再重复该步骤 2 次。

## 5. 目标抗体洗脱

- 1) 加入 0.5-1mL Elution Buffer，室温下置于翻转混合仪或者手动轻轻翻转 10mins，置于磁力架上进行磁性分离，收集洗脱液到新的离心管中，即为纯化的目标抗体；
- 2) 若需要，可重复上述步骤，收集洗脱液至新离心管中，以检测目标抗体是否完全洗脱（Elution Buffer 用量建议最终洗脱抗体浓度在 0.5-1.2mg/mL，以确保一次洗脱可将 95%以上的目标抗体被洗脱下来，用量过少会导致洗脱后仍有部分抗体残留于磁珠上）。

## 6. 抗体中和

在以上含抗体的洗脱液中加入 1/10 抗体洗脱体积的 Neutrilization buffer，混匀使其 pH 值保持在中性环境下，以维持抗体的生物活性，避免失活。

### 【磁珠后处理】

- 1) 向装有磁珠的离心管中加入 1mL Elution Buffer，涡旋震荡 5s，磁性分离弃上清。重复操作 2 次；
- 2) 加入 1mL Binding/Washing buffer，涡旋 5s，磁性分离弃上清；重复操作 2 次；
- 3) 加入 Storage buffer 重悬磁珠，置于 2-8°C 保存。

### 【磁珠再生】

磁珠多次使用后会有沉淀蛋白、强疏水性蛋白、脂蛋白等杂质非特异性吸附到磁珠上，为了保证磁珠的使用效率，建议持续使用 5 次后进行磁珠再生处理。

- 1) 约每 1mL（10mg/mL）磁珠加入 1mL（1%，v/v）Triron X-100 磁珠再生缓冲液，振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手动翻转混合 10mins 后进行磁性分离，弃上清；
- 2) 加入 1mL Binding/Washing buffer 进行重悬，磁性分离，弃上清，重复该操作 3 次；
- 3) 加入 1mL Storage buffer 重悬磁珠，置于 2-8°C 保存。

### 【流程优化】

磁珠与抗体的结合效率与抗体的种属来源及所属亚型有关，请确认抗体的类型与 Protein A/G 配基的亲合效率（附表）：

1. 抗体所属亚型与 Protein A/G 的亲合度较低：
  - a. 增加抗体与磁珠的孵育时间（30-120mins）；
  - b. 提高结合缓冲液的 pH 值（8-9）；
  - c. 降低离子强度（25-100mM NaCl）等方法提高亲和效率；
  - d. 选择与目标抗体具有更高亲和度的配基（如 Protein G 或 Protein A）。
2. 抗体与 Protein A/G 配基亲合度太高导致抗体洗脱效率低：
  - a. 降低洗脱缓冲液的 pH 值 1.9-2.5；
  - b. 增大洗脱缓冲液的离子强度（可选用 2-3 M MgCl<sub>2</sub>）；
  - c. 延长洗脱时间，提高洗脱效率。

### 【注意事项】

1. 磁珠使用前应充分混匀，确保磁珠悬液处于均一状态。
2. 磁珠使用后于保存液中储存 2-8°C，避免冷冻或离心。

【附表】

| 种属 | 亚型    | ProteinA/G Binding | 种属   | 亚型    | Protein A/G Binding |
|----|-------|--------------------|--|-------|---------------------|
| 人  | IgA   | Variable           | 狗  | IgG   | **                  |
|    | IgD   | o                  | 恒河猴  | IgG   | ****                |
|    | IgG1  | ****               | 仓鼠   | IgG   | **                  |
|    | IgG2  | ****               | 奶牛   | IgG   | ****                |
|    | IgG3  | ****               | 马  | IgG   | ****                |
|    | IgG4  | ****               | 山羊   | IgG   | **                  |
|    | IgM   | o                  | 大鼠   | IgG1  | *                   |
| 小鼠 | IgG1  | ****               |  | IgG2a | ****                |
|    | IgG2a | ****               |  | IgG2b | **                  |
|    | IgG2b | ***                |  | IgG3  | **                  |
|    | IgG3  | ***                | 绵羊   | IgG   | **                  |
|    | IgM   | o                  | 猫  | IgG   | ****                |
| 兔子 | IgG   | ***                | 猴  | IgG   | ****                |
| 豚鼠 | IgG1  | ***                | “*” =weakbinding;<br>“**” =mediumbinding;<br>“****” =strongbinding ;<br>“o” =nobinding |       |                     |
|    | IgG2  | ***                |  |       |                     |