

Protein A 琼脂糖磁珠

Protein A Magarose Beads

本产品 4°C 运输；保存于 4°C，禁止产品冻结，长期存放请保证试剂管竖立向上，琼脂糖磁珠 浸没于保护液中，保质期 24 个月。

货号规格

货号	规格
YJ101	1 mL×2

产品简介

琼脂糖磁珠 (Magarose Beads) 系列产品是医学与分子生物学研究中重要的载体工具，其粒径相对集中，表面布满丰富的羟基官能团，具有超顺磁性以及快速磁响应性等特点。

Protein A 琼脂糖磁珠是由琼脂糖磁珠 (Magarose Beads) 与 Protein A 共价结合形成的复合微粒，其具有更高的抗体结合能力和较低的非特异蛋白吸附率，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。因其本身为微米级磁性微球，所以不需要离心操作，可大幅度缩短抗体吸附所需的时间。

本产品适用于血浆、腹水以及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。

产品参数

项目	参数
平均粒径	30~100 μm
浓度	20% (V/V)
配基	Protein A
介质	磁性琼脂糖微球
抗体结合能力	≥2 mg Human IgG/mL of Beads
应用范围	IP, Co-IP, ChIP, RIP 等

自备试剂

缓冲液	推荐配方
结合/洗涤缓冲液	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1%~0.5% detergent (TritonX-100, Tween 20 or NP40), pH 7.5
洗脱缓冲液	0.1 M~0.2 M Glycine, 0.1%~0.5% detergent, pH 2.5~3.1 (or 0.1 M citric acid, 0.1%~0.5% detergent, pH 2.5~3.1)
中和缓冲液	1 M Tris, pH 8.0



样本处理

1. 根据样品种类选择相应的处理方法:

- A. 血清样品: 若目标蛋白丰度较高, 建议用 **结合缓冲液** 或1×PBS(货号: PS110)稀释血清样品至目标蛋白终浓度为10~100 μg/mL, 置于冰上备用(或置于-20°C长期保存);
- B. 悬浮细胞: 离心收集细胞 (4°C, 500×g, 10 min), 弃上清后称重, 按每毫克细胞 50 μL 的比例用 1×PBS(货号: PS110) 洗涤 2 次; 按每毫克细胞 5~10 μL 的比例加入 **结合缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101), 混匀后置于冰上孵育 10 min; 离心收集上清液 (4°C, 14,000×g, 10 min), 置于冰上备用 (或置于 -20°C 长期保存);
- C. 贴壁细胞: 移去培养基, 按每 1.0×10^5 个细胞 150 μL 的比例用 1×PBS(货号: PS110) 洗涤两次; 用细胞刮刀刮落细胞, 收集至 1.5 mL 离心管内, 按每 1.0×10^5 个细胞 20~30 μL 的比例加入 **结合缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101), 混匀后置于冰上孵育 10 min; 离心收集上清液 (4°C, 14,000×g, 10 min), 置于冰上备用 (或置于 -20°C 长期保存);
- D. 大肠杆菌: 离心收集大肠杆菌 (4°C, 12,000×g, 2 min), 弃上清后称重, 按每克菌体 (湿重) 10 mL 的比例用 1×PBS(货号: PS110) 洗涤 2 次; 按每克菌体 (湿重) 5~10 mL 的比例加入 **结合缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101), 重悬菌体, 超声裂解细胞, 离心收集上清 (4°C, 12,000×g, 10 min)。
- E. 组织样品: 建议使用 **免疫 (共) 沉淀裂解液** (货号: PC105) 进行裂解, 具体操作如下:
- (1) 把组织剪切成细小的碎片;
 - (2) 按照每 20 mg 组织样本 150~250 μL 的比例加入裂解液;
注意: 如果样本裂解不充分, 可以适当提高裂解液的用量; 若需要高浓度的蛋白样品, 也可适当降低裂解液的用量。
 - (3) 用玻璃匀浆器匀浆, 直至样本充分裂解;
注意: 若组织样本非常细小, 可以适当剪切后直接加入裂解液, 通过强烈涡旋振荡使其裂解充分。
 - (4) 充分裂解后, 10,000~14,000×g 离心 3~5 min, 小心地将上清液 (蛋白样品) 移入新的离心管中, 即可进行后续步骤。

磁珠预处理

2. 用移液器轻柔吹打 **Protein A 琼脂糖磁珠**, 使其充分混悬, 取 25~50 μL 磁珠悬液置于 1.5 mL 离心管中;
3. 加入 500 μL **结合缓冲液** 或 1×PBS, 用移液器轻柔吹打重悬磁珠, 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 吸弃上清;
4. 重复步骤 3 两次;

抗体与磁珠结合

5. 稀释: 用 **结合缓冲液** 或 1×PBS 稀释抗体样品至终浓度为 5~50 μg/mL, 置于冰上备用;
6. 结合: 将 500 μL 上步稀释好的抗体加入预处理后的磁珠中, 置于翻转混合仪上孵育 (常温 2 h, 4°C 4~6 h 或过夜), 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 把上清液转移到新的离心管中备用 (上清液可用于检测抗体是否存在残留), 离心管中剩余的即为 **抗体 - 磁珠复合物**;
注意: 结合过程中, 磁珠可能会出现聚团或呈片状, 属于正常现象, 不会影响实验结果。
7. 洗涤: 在上一步得到的 **抗体 - 磁珠复合物** 中加入 500 μL **结合缓冲液** 或 1×PBS, 用移液器轻柔吹打重悬磁珠, 接着在磁力架上静置 1 min, 待磁珠吸附到离心管侧壁上后, 吸弃上清。再重复此步骤两次;

抗原与抗体-磁珠复合物结合

8. 结合：向洗涤后的 **抗体-磁珠复合物** 中加入 500 μL 步骤1制备好的样品，置于翻转混合仪上孵育（常温 2h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 4~6h 或过夜），接着在磁力架上静置 1min，待磁珠吸附到离心管侧壁上后，吸弃上清，离心管中剩余的即为 **抗原-抗体-磁珠复合物**；
9. 洗涤：在上一步得到的 **抗原-抗体-磁珠复合物** 中加入 1mL **洗涤缓冲液** 或 1 \times PBS，用移液器轻柔吹打重悬磁珠，接着在磁力架上静置 1min，待磁珠吸附到离心管侧壁上后，吸弃上清。再重复此步骤三次；
10. 洗脱：本操作说明书提供以下两种抗原洗脱方案，操作者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**：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向步骤 9 洗涤后的 **抗原-抗体-磁珠复合物** 中加入 60 μL 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液（货号：LT101）混合均匀，100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min。待冷却后，将离心管在磁力架上静置 1min，待磁珠吸附到离心管侧壁上后，收集上清，进行 SDS-PAGE 检测。
 - 非变性洗脱**：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。向步骤 9 洗涤后的 **抗原-抗体-磁珠复合物** 中加入 25~50 μL **洗脱缓冲液**，室温孵育 10 min；将离心管在磁力架上静置 1min，待磁珠吸附到离心管侧壁上后，收集上清液至新的离心管，并立即加入 1 μL **中和缓冲液** 将洗脱产物 pH 调节至中性，用于后期功能分析。

常见问题及对策

如何避免磁珠在储存或使用过程中可能出现的聚集情况？

答：磁珠应保存在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ ，使用时应避免由于污染或干燥而导致的聚集。磁珠在低 pH 值的洗脱缓冲液中发生聚集属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。在 **结合 / 洗涤缓冲液** 和 **洗脱缓冲液** 中添加终浓度为 0.1%(V/V) 的非离子型去垢剂（如 Triton X-100、Tween-20 或 NP-40）可有效防止磁珠聚集。经过低 pH 值洗脱操作的磁珠可以用结合缓冲液洗涤至中性，然后用含有 0.1%(V/V) Tween-20 的 Tris buffer(pH7.5) 振荡重悬磁珠，并用超声波水浴处理 2 min，即可使磁珠恢复均匀状态，以上处理均不影响磁珠的抗体结合效率。

磁珠在使用过程中出现结块现象？

答：磁珠在极少数情况下会出现结块现象，一般较难振荡打散，从而导致分布不均匀，这主要是因为磁珠在磁场中放置太久而牢固地结合在一起。用超声波水浴处理 2 min 即可打散磁珠，但要注意超声处理也会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落，因此磁珠在加样后洗脱前不宜使用该方法。

如何提高抗体与磁珠结合效率？

答：磁珠抗体间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 琼脂糖磁珠** 配基的亲合效率。如抗体所属亚型与 **Protein A 琼脂糖磁珠** 的亲合度较低，可以通过增加抗体与磁珠的孵育时间（30~120 min）、提高结合缓冲液的 pH 值（8~9）及降低离子强度（25~10 mM NaCl）等方法提高亲和效率。

如何提高磁珠在免疫沉淀反应中的特异性？

答：可以先将抗体与样品进行孵育，形成 **抗体-抗原复合物**，再用 **Protein A 琼脂糖磁珠** 捕获复合物。这种方法可以提高抗体与抗原的结合效率，并降低磁珠与样品接触的时间，从而提高沉淀产物的特异性。对于蛋白质 / 核酸共沉淀或染色质免疫共沉淀也推荐使用此法。

如何解决磁珠易粘附管壁的现象？

答：建议使用低吸附率的耗材进行磁珠操作。另外，在缓冲液中添加 0.01%~0.1%(V/V) 的非离子型去垢剂（如 Triton X-100、Tween-20 或 NP-40）可以有效降低耗材对磁珠的粘附。

注意事项

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
2. 本产品仅限科研使用。

