

## 抗体纯化磁珠 Protein A Matrix Antibody Purification Kit

货号：M2360

规格：1mL / 5mL

保存：2-8°C，有效期 1 年。

### 产品内容：

抗体纯化磁珠系列产品是利用蛋白偶联技术使 Protein A (or A/G) 共价包被到 NHS 活化的超顺磁性微球表面。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，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。

本产品为纳米级磁性微球，具有超大比表面积，可大幅度缩短抗体吸附所需的时间，熟练操作可在 15 min 内完成抗体吸附过程，30 min 内完成抗体纯化流程。抗体纯化磁珠试剂盒配有经过优化的预制缓冲液，为抗体纯化实验提供了最佳的反应条件，增强了抗体纯化实验的稳定性。

### 产品组成：

产品名称	规格
抗体纯化磁珠 Protein A (or A/G) for Antibody Purification①	5 mL
抗体结合缓冲液 Antibody Binding Buffer ②	200 mL
抗体洗脱缓冲液 I Antibody Elution Buffer I (pH4.5) ③	100 mL
抗体洗脱缓冲液 II Antibody Elution Buffer II (pH2.0) ④	100 mL
抗体中和缓冲液 Antibody Neutrilization buffer ⑤	50 mL
磁珠洗涤缓冲液 Beads Washing Buffer ⑥	50 mL
磁珠储存缓冲液 Beads Storage Buffer ⑦	50 mL
磁珠再生缓冲液 Beads Regeneration Buffer ⑧	50 mL

### 适用范围：

本产品可重复使用，适用于血浆、腹水、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。

### 注意：

磁珠结合 Human IgG 能力(Antibody Capacity)分别为: Protein A: 1.4~1.6 mg/mL; Protein A/G: 1.8~2.0 mg/mL。

### 操作步骤 (仅供参考)

不同种类的免疫磁珠具有不同的抗体结合能力，在执行抗体纯化操作之前，操作者应首先估算待纯化样品中的抗体含量（一般血清样品中抗体含量约 2~8 mg/mL，细胞培养物中抗体浓度因表达量不同而变化较大）；然后根据所选免疫磁珠的抗体结合能力（见免疫磁珠相关产品列表或者产品组成的 Antibody Capacity 数据），计算免疫磁珠的大概用量，免疫磁珠用量过多或过少均影响抗体纯化的效果，建议免疫磁珠用量的最大载量应为样品抗体含量的 80%~100%。





以下操作步骤按照纯化抗体，取用 100  $\mu\text{L}$  Protein A 抗体纯化磁珠为例进行详细描述。操作者可以参照以下步骤中各种缓冲液的用量及容器大小，按比例调整实际操作中各成分的用量。

1、**样品处理**：取抗体含量约为 0.1~0.15 mg 的样品置于新的 1.5 mL EP 管中，加入抗体结合缓冲液 (②) 至总体积为 500  $\mu\text{L}$  (如样品体积大于 500  $\mu\text{L}$  则无需加入)，混合均匀。

2、**磁珠预处理**：将抗体纯化磁珠 (①) 漩涡振荡 30 s，使磁珠充分重悬；取 100  $\mu\text{L}$  磁珠悬液置于另一新的 1.5 mL EP 管中。对磁珠悬液进行磁性分离(将 EP 管放置于磁性分离器)上，使磁珠吸附在管壁至溶液澄清；该操作描述以下省略，弃上清液。从磁性分离器上取下 EP 管。用抗体结合缓冲液 (②) 洗涤 2 次，弃上清液，管中磁珠可直接用于抗体分离)。

3、**抗体吸附**：在步骤 2 预处理的磁珠管中加入步骤 1 处理的样品溶液，漩涡振荡均匀，在室温下 (约 25 $^{\circ}\text{C}$ ) 置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转 EP 管，促使样品和磁珠充分接触并吸附，翻转约 15 min 后进行磁性分离，移弃上清液。

4、**磁珠洗涤**：向 EP 管中加入 1 mL 抗体结合缓冲液 (②)，振荡重悬磁珠后进行磁性分离，移弃上清液；该操作重复 3 次。

5、**抗体洗脱 (方式 1-高盐弱酸性洗脱)**：

1) **抗体洗脱**：在步骤 4 完成磁珠洗涤的 EP 管中加入 0.5~1.0 mL 抗体洗脱缓冲液 (③)，用移液器吹打或者涡旋震荡下迅速重悬，然后在室温下 (约 25 $^{\circ}\text{C}$ ) 置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转 EP 管，翻转 10 min 后进行磁性分离，收集上清液至新的 EP 管；

2) **抗体透析**：因抗体洗脱缓冲液 (③) 含有较高浓度的盐分，收集的抗体溶液不能直接用于 SDS-PAGE 检测，但可以用抗体洗脱缓冲液调零进行抗体浓度测定。抗体洗脱缓冲液呈偏酸性 (pH 4.5)，建议操作者用自行配制的中性低盐溶液 (即透析液) 立即对收集的抗体溶液进行透析处理，以降低抗体失活率，获得较高活性和稳定性的抗体溶液。

6、**抗体洗脱 (方式 2-低 pH 洗脱)**：

1) **抗体洗脱**：在步骤 4 完成磁珠洗涤的 EP 管中加入 0.5~1.0 mL 抗体洗脱缓冲液 (④)，用移液器吹打或者涡旋震荡下迅速重悬，然后在室温下 (约 25 $^{\circ}\text{C}$ ) 置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转 EP 管，翻转 10 min 后进行磁性分离，收集上清液至新的 EP 管；

2) **抗体中和**：因抗体洗脱缓冲液 (④) pH 值较低，收集的抗体溶液需要立即加入一定量的抗体中和缓冲液 (⑤)，一般为收集抗体溶液体积的 1/20~1/10，最终使洗脱的抗体溶液 pH 值保持中性环境，以降低抗体失活率，获得较高活性和稳定性的抗体溶液。收集的抗体可直接用于 SDS-PAGE 检测及抗体浓度的测定。

7、**磁珠后处理**：使用后的磁珠用磁珠洗涤缓冲液 (⑥) 进行重悬，然后执行磁性分离，弃上清液，重复操作一次；加入 100  $\mu\text{L}$  磁珠储存缓冲液 (⑦)，置于 2~8 $^{\circ}\text{C}$  保存。

## 磁珠再生

1、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。

2、按约 1 mL 磁珠 5 mL 的比例加入磁珠再生缓冲液 (⑧)，振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转混合，10 min 后进行磁性分离，弃上清液。

3、按约 1 mL 磁珠 5 mL 的比例加入磁珠洗涤缓冲液 (⑥) 进行重悬，然后执行磁性分离，弃上清液，重复以上操作两次。

4、按照约 1 mL 磁珠 1 mL 的比例加入适量磁珠储存缓冲液 (⑦)，置于 2~8 $^{\circ}\text{C}$  保存。



## 注意事项

- 1、进行抗体纯化操作之前，请务必认真阅读本操作说明书。
- 2、本产品须与磁性分离器配套使用。
- 3、磁珠使用前应充分振荡均匀。
- 4、磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥。
- 5、请勿将磁珠冷冻或离心，以免引起不可逆聚集。
- 6、本产品仅供研究使用。

## 常见问题及解答(FAQ)

### Q1: 如何提高抗体与磁珠结合效率?

A1: 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 配基的亲效率和效率（附表 1），如抗体所属亚型与 Protein A 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（25~100 mM NaCl）等方法提高亲和效率，或选择与目标抗体具有更高亲和度的配基（如 Protein A/G）。

### Q2: 如何提高抗体洗脱效率?

A2: 抗体与 Protein A 配基亲合度太高导致抗体洗脱效率低，可以通过降低洗脱缓冲液的 pH 值（1.9~2.5）、增大洗脱缓冲液的离子强度（可选用 2~3 M MgCl<sub>2</sub>）或延长洗脱时间，提高抗体的洗脱效率。但应注意抗体在低 pH 条件下容易形成聚集物，抗体洗脱产物应马上用碱性缓冲剂（如 Tris、HEPES 等）调节 pH 至中性。

### Q3: 如何避免磁珠在储存或使用过程中可能出现的聚集情况?

A3: 磁珠应保存在 2~8°C，使用时应避免由于污染而导致的不可逆聚集，或因干燥而导致的聚集。磁珠在低 pH 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 Binding Buffer 和 Elution Buffer 中添加终浓度为 0.1%（v/v）的非离子型去垢剂（如 NP-40、Tween-20 或 Triton X-100）可有效防止磁珠聚集。经过低 pH 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。

### Q4: 如何解决磁珠易粘附管壁的现象?

A4: 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 NP-40、Tween-20 或 Triton X-100）可以有效降低磁珠对耗材的粘附。

### Q5: 磁珠在使用过程中出现结块现象?

A5: 磁珠在使用时如果出现结块现象一般较难振荡打散，容易导致分布不均，出现该问题的原因是磁珠在磁场中放置太久而使磁珠牢固的结合在一起。用超声波水浴处理 2 min 即可打散磁珠使其重新分散，但应注意超声处理也会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落，所以磁珠在加样后洗脱前不宜使用该方法。





附表 1: 免疫磁珠 Protein A 和 Protein A/G 与不同来源及类型的抗体亲和性比较

Species	Antibody Classes	Protein A/G	Protein A
Human	Total IgG	+++++	+++++
	IgG1, IgG2	+++++	+++++
	IgG3	+++++	+
	IgG4	+++++	+++++
	IgM	-	-
	IgD	-	-
	IgA	+	+
	IgA1, IgA2	+	+
	IgE	+++	+++
	Fab	-	-
	ScFv	-	-
Mouse	Total IgG	+++++	+++++
	IgM	-	-
	IgG1	+++	+
	IgG2a	+++	+++
	IgG2b	+++	+
	IgG3	+++	+++++
Rat	Total IgG	+++	+
	IgG1	+++	+
	IgG2a	+++++	-
	IgG2b	+	-
	IgG2c	+++++	+++
Cow	Total IgG	+++++	+
	IgG1	+++++	+
	IgG2	+++++	+++++
Goat	Total IgG	+++++	+
	IgG1	+++++	+
	IgG2	+++++	+++++
Sheep	Total IgG	+++++	+
	IgG1	+++++	+
	IgG2	+++++	+++++
Horse	Total IgG	+++++	+
	IgG(ab), IgG(c)	+	+
	IgG(T)	+++++	-
Rabbit	Total IgG	+++++	+++++
Guinea Pig	Total IgG	+++++	+++++
Hamster	Total IgG	+++	+++
Pig	Total IgG	+++++	+++++
Donkey	Total IgG	+++++	+++
Cat	Total IgG	+++++	+++++
Dog	Total IgG	+++++	+++++
Monkey	Total IgG	+++++	+++++
Chicken	Total IgY	-	-

注：“+”=weak binding, “+++”=medium binding, “+++++”=strong binding, “-”=no binding

