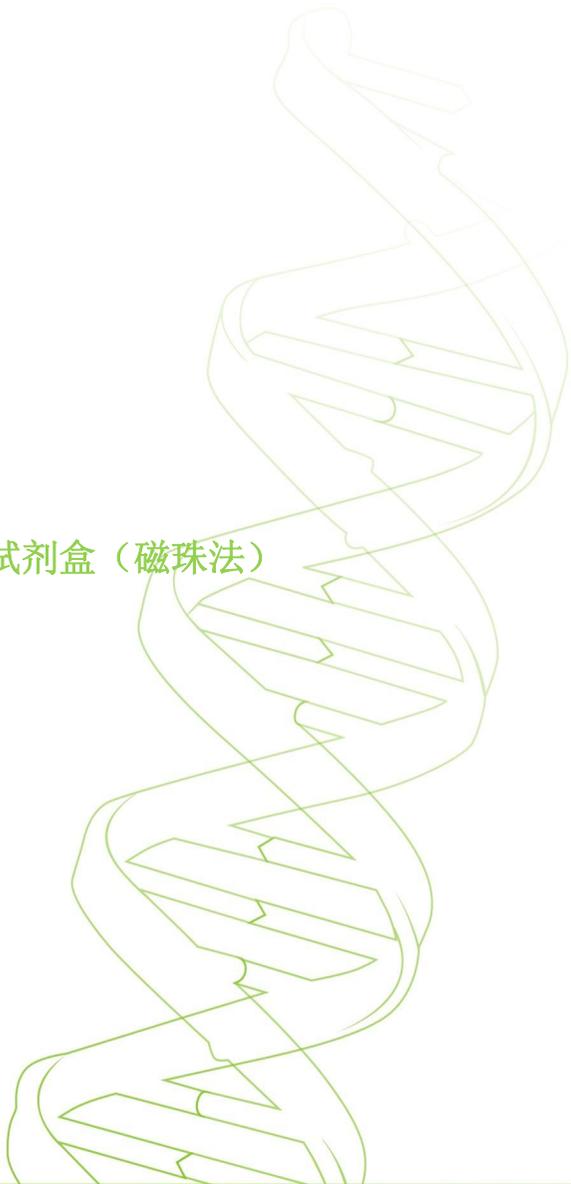


# Imagene®

Protein A 4FF 蛋白纯化试剂盒（磁珠法）



**CODONX**  
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY  
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

# Protein A 4FF 蛋白纯化试剂盒（磁珠法）

目录号：IM-001K11

目录编号	包装单位
IM-001K11	1ml

## 1/产品介绍

本产品具有超顺磁性、快速磁响应性、丰富羟基官能团和相对集中的粒径等特点，是医学与分子生物学研究中重要的载体工具。采用独特的生产工艺技术制备出的粒径分布在 30-100 $\mu\text{m}$  左右的磁性琼脂糖微球粒径适中，更适合生物检查和纯化实验的需求。微米级磁性微球，具有超大比表面积，可大幅度缩短抗体吸附所需的时间。

Protein A 4FF 蛋白纯化试剂盒（磁珠法）将 rProtein A 高密度定向包被到超顺磁性微球表面，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。Protein A 是一种分离自金黄色葡萄球菌的细胞壁蛋白，主要通过 Fc 片段结合哺乳动物 IgG，但是不与狗 IgG 结合，不结合人 IgM、IgD 和 IgGA。蛋白 A 与蛋白 G 与不同来源及亚类的免疫球蛋白结合能力不一样。天然 Protein A 有五个 IgG 结合区域和一些未知功能的区域，重组 Protein A 去除了与白蛋白及细胞表面结合位点，只含有五个 IgG 结合区域，减少了非特异性吸附。

## 2/产品性能

项目	性能
基质	磁性琼脂糖微球
配体	重组蛋白 A
结合能力	>40 mg Rabbit IgG/ml 磁珠
粒径范围	30-100 $\mu\text{m}$
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1 $\times$ PBS
磁珠体积	磁珠体积占悬浮液体积的 20%

储存温度	2-8°C
------	-------

### 3/缓冲液准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22µm 或 0.45µm 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 0.15M NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0

洗脱液: 0.1M 甘氨酸, pH3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

交联液: 0.2M 三乙醇胺, pH 8.2

交联剂: DMP(Dimethyl Pimelimidate Dihydrochloride)

终止液: 50 mM Tris, pH 7.5

**本试剂盒在 2-8°C 储存, 不可冷冻。**

### 4/样品准备

上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值, 可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释, 或者样品用平衡/洗杂液透析。样品在上样前建议离心或用 0.22 µm 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率。

本产品分为两种应用: **抗体纯化流程和免疫沉淀流程**, 免疫沉淀流程还分为**直接法和间接法**。

### 5/抗体纯化操作流程

#### 5.1 磁珠准备

不同种类的磁珠具有不同的抗体结合能力, 在抗体纯化操作之前, 建议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 8~10mg/ml, 细胞培养物中抗体浓度依表达量不同而变化较大), 然后根据磁珠的抗体结合能力, 计算磁珠的大概用量, 建议样品中抗体的含量小于磁珠最大载量的 80%左右。

#### 5.2 磁珠预处理

将蛋白磁珠颠倒数次, 保证磁珠完全混匀, 取计算量(根据样品体积和抗体含量计算)的磁珠悬浮液, 转移至离心管中, 放置在磁分离器上, 静置大约 1min, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃上清液。再将离心管从磁分离器上取下来, 加入与悬浮液等体积的

平衡液，使用枪头反复吹打 5 次，将离心管置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃上清液，重复洗涤 2 次。

### 5.3 抗体吸附

在步骤 5.2 预处理的磁珠中加入样品溶液，漩涡振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，促使样品和磁珠充分接触并吸附，混合 30 min 以上(具体时间根据结合效果调整)，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。

### 5.4 洗杂

白离心管中加入 5 倍磁珠体积的洗杂液，振荡悬浮，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。该操作重复两次。

### 5.5 抗体洗脱

在上述离心管中加入 3-5 倍磁珠体积的洗脱液，用移液器吹打 5 次，然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，5-10min 后置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸取上清液，收集洗脱组分，即为目标抗体。重复洗脱 2 次，增加回收率。

### 5.6 洗脱组分中和

向洗脱组分中加入洗脱体积十分之一的中和液，调节 pH 值至 7.0-8.0。

### 5.7 磁珠保存

使用后的磁珠用 1mL 洗脱液重悬磁珠，然后置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。该操作重复两次。再加入 1mL 平衡液，悬浮磁珠，然后置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。再按照 4 倍磁珠体积加入 20% 乙醇，置于 2~8℃保存。

## 6/免疫沉淀直接法操作流程

### 6.1 磁珠准备

参考 5.1 和 5.2

### 6.2 抗体吸附

在预处理的磁珠中加入所需量的抗体溶液，漩涡振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，促使样品和磁珠充分接触并吸附，约 30 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。

### 6.3 洗杂

向离心管中加入 5 倍磁珠体积的洗杂液, 振荡悬浮, 置于磁分离器上, 大约 1min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。该操作重复两次。

### 6.4 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 6.5。

50  $\mu$ l-1 ml 磁珠量均可以按照以下步骤操作, 无需额外增加交联液体积。

2) 加入 1ml 交联液, 振荡悬浮, 置于磁分离器上, 大约 1min, 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(Dimethyl Pimelimidate 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 30 min 后, 置于磁分离器上, 大约 1min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清。

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 1min, 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 1min, 待溶液变澄清后, 吸弃上清液。再重复两次。

### 6.5 抗原沉淀反应

1) 抗原吸附: 加入含有抗原的样品, 用移液器轻轻吹打使抗原与磁珠-抗体复合物均匀分散。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 1h 或者在 4°C 下反应过夜。

2) 洗杂: 将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, 置于冰上以备后续检测。向离心管中加入 5 倍磁珠体积的洗杂液, 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, 再重复洗深两次。建议最后加入 2 倍磁珠体积的洗杂液, 用移液器将磁珠-抗体-抗原复合物悬液转移至新的 1.5ml 离心管中, 并执行磁性分离, 移弃上清。**避免将管壁上原有的非特异性吸附蛋白一起洗脱**

3) 抗原洗脱: 提供以下两种抗原洗脱方案, 可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗

脱方法。

**变性洗脱法：**此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。从磁分离器上取下离心管，向其中加入磁珠量等体积的  $1\times$ SDS-PAGE LoadingBuffer 混合均匀， $95^{\circ}\text{C}$  加热 10 min。然后进行磁性分离或离心分离，收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。

**非变性洗脱法：**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。从磁分离器上取下离心管，3-5 倍磁珠体积的洗脱液，用移液器吹打 5 次，然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，10 min 后，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸取上清液，收集洗脱组分，即为目标抗原，收集上清液至新的离心管中，并立即加入十分之一体积的中和液，将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0，用于后期功能分析。可以重复 2-3 次。

## 7/免疫沉淀间接法操作流程

### 7.1 抗体与抗原混合

将抗体与含有目的抗原的样品混合，室温震荡孵育 30 min-60 min，或者  $2-8^{\circ}\text{C}$  孵育过夜，取决于抗体与抗原的结合效率以及抗原的稳定性需要自己优化结合条件。形成抗原-抗体混合物。

注意：抗体的加入量要考虑到下面磁珠的量，抗体的加入量过多会影响到抗原-抗体混合物与磁珠的结合。建议抗体加入量为磁珠 80% 的最大载量。

### 7.2 磁珠准备

参考 5.1 和 5.2

### 7.3 抗原-抗体混合物的吸附

将步骤 7.1 中得到的抗原-抗体混合物加入到处理好的磁珠中，漩涡振荡均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，促使样品和磁珠充分接触并吸附，约 30 min 后，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。

### 7.4 洗杂

向离心管中加入 5 倍磁珠体积的洗杂液，振荡悬浮，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后，吸弃上清液。该操作重复两次。

### 7.5 抗原洗脱

提供以下两种抗原洗脱方案，可根据后期检测的需要选择洗脱方法。

- 1) 变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。从磁分离器上取下离心管，向其中加入磁珠量等体积的  $1 \times$  SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀， $95^{\circ}\text{C}$  加热 10 min。然后进行磁性分离或离心，收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。
- 2) 非变性洗脱法：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。从磁分离器上取下离心管，3-5 倍磁珠体积的洗脱液用移液器吹打 5 次，然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，10 min 后，置于磁分离器上，大约 1min，待溶液变澄清后吸取上清液，收集洗脱组分，即为目标抗原，收集上清液至新的离心管中，并立即加入十分之一体积的中和液，将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0 用于后期功能分析。可以重复 2-3 次。



**CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd**

Yizhuang Biomedical Park  
Building 6, No.88 6th Kechuang St.Economic-Technological Development Area,Beijing,China  
Tel: 010-56315162 [www.codonx.com](http://www.codonx.com)