蛋白 A 磁珠(MSP-PRA-Z1)

产品简述

- MSP-COOH-Z1 偶联重组蛋白 A 得蛋白 A 磁珠 MSP-PRA-Z1
- 羧基磁珠 MSP-COOH-Z1 对水溶性蛋白的非特异吸附可忽略
- 10 mg 蛋白 A 磁珠 MSP-PRA-Z1，pH 7.4 时压积体积~10 µL
- 离子交换纯化无标记兔多抗，饱和结合容量 4~7 mg/g 磁珠
- Protein A 纯化鼠血清 IgG，饱和结合容量 15~20 mg/g 磁珠
- 碱磷酶标记 Protein A 纯化鼠 IgG，饱和结合量~3.5 mg/g 磁珠
- 碱磷酶标记 Protein A 纯化鼠 IgG，20 µg 全分离需~15 mg 磁珠
- 吸附 IgG 很快，达平衡仅需~15 min；免疫沉淀仅需~30 min
- 用于筛选来自杂交瘤的 IgG 单克隆抗体，效率和灵敏度更高
- 磁响应快、悬浮好、结构稳定；分离 IgG 性能批间波动<6%

性能/规格

指标/特征	性能/性状
保存液	20 mM 磷酸钠，pH 7.4，0.09%叠氮钠，0.01% Tween 20，0.1%抗氧化剂
产品形态	中性缓冲液，黑褐色混悬液
保质期	2~8 ^{0}C、不开封、避光保存；保质期不短于 18 个月
结合容量	~3.5 mg/g 磁珠，碱磷酶标记甲胎蛋白 IgG 单抗为探针（Protein A 纯化单抗）
分离效价	~1.4 mg/g 磁珠，碱磷酶标记甲胎蛋白 IgG 单抗为探针（Protein A 纯化单抗）
非特异吸附	对常见水溶蛋白质的非特异吸附，低于检测限（测量方法见附录）

应用过程示例

一、试剂、器材

1. 缓冲液：以下为常用的缓冲液及其组成，可根据需要调整

   ① Binding/Wash Buffer: 20 mM PBS, 0.9% NaCl, 0.02%Tween-20, pH 7.4

   ② NP40 Cell Lysis Buffer: 150mM NaCl, 1% NP40, 50mM Tris-HCl, pH 7.4

   ③ Elution Buffer: 100 mM Glycine-HCl, pH 2.8

   ④ Neutralization Buffer: 0.4 M Tris (不调节 pH，可新鲜配制使用)

2. 基本器材：磁分离架、漩涡振荡器、移液器、吸头、EP 管、四维旋转混合仪、冰箱
3. 磁珠用量：据实验目的及待分离对象分子量，确定磁珠对抗体的用量比例。

二、操作流程

1. 样品制备：据样品属性设计处理方法；对如下四类常见样品，处理方法供参考。

1.1 血清样品：若目标蛋白丰度较高，用结合缓冲液稀释血清至目标蛋白为 10~100 mg/L；如目标蛋白浓度低于此值则无需稀释，置于冰上备用(或置于-20℃长期保存)。

1.2 悬浮细胞：离心收集细胞 (4℃，500 g，10 min)，弃上清称重，按每毫克细胞 50 μL 的比例用 20mM PBS, pH 7.4 洗涤 2 次；按每毫克细胞 5~10 μL 的比例加入结合缓冲液，同时加蛋白酶抑制剂(如终浓度 1 mM 的 PMSF)，混匀后冰上放置 10 min；离心收集上清液 (4℃，14000 g，10 min)，置于冰上备用(或置于-20℃长期保存)。

1.3 贴壁细胞：去培养基，按每 1.0×10^{5}个细胞 150 μL 比例用 20mM PBS (pH 7.4) 洗 2 次；用刮棒刮脱收集细胞至 1.5 mL EP 管内，按每 1.0×10^{5}个细胞 20~30 μL 比例加结合缓冲液，加蛋白酶抑制剂(如终浓度为 1 mM 的 PMSF)，混匀后置冰上 10 min；离心收集上清液(4℃，14000 g，10 min)，置冰上备用(或置-20℃长期保存)。

1.4 大肠杆菌细胞：离心收集大肠杆菌(4℃，12000 g，2 min)，弃上清后称重，按每克(湿重)菌体 10 mL 比例用 20mM PBS (pH 7.4)洗 2 次；按每克(湿重)菌体 5~10 mL 比例加入结合缓冲液，同时加入蛋白酶抑制剂(如终浓度为 1 mM 的 PMSF)，重悬菌体，超声裂解细胞，离心收集上清 (4℃，17000 g，10 min)。

2. 抗体 I 工作液

用结合缓冲液稀释抗体 I 到 20~400 mg/L(据对抗原亲和力调整)，置冰上备用。

3. 磁珠预处理

将磁珠漩涡振荡 1.0 min 以上充分混匀，移液器取 25~50 μL 磁珠悬液于 1.5 mL EP 管中，加 200 μL 结合缓冲液稀释，用移液器吹打充分混匀；将 EP 管置磁分离架上磁分离 1 min 以上使磁珠全部吸附到管壁，用移液器去上清液；从磁分离架上取下 EP 管，加入结合缓冲溶液再洗涤两次(最后一次洗涤去上清液后，尽快进行下述抗体结合)。

4. 抗体 I 结合反应

抗体 I 吸附：将 200μL 抗体 I 样品加到步骤 2 处理后磁珠中，温和混匀，用四维混合仪或手工操作，持续温和混合反应 ~15 min；将 EP 管置于磁分离架上磁分离 1 min 以上使磁珠全部吸附到 EP 管壁，用移液器去除上清液；从磁分离架上取下 EP 管。

洗涤：尽快向含磁珠 EP 管中加 200 μL 结合缓冲液，用移液器充分吹打均匀；磁分离，弃上清液；重复洗涤两次(最后一次洗涤去上清液后，尽快进行下述抗原结合)。

5. 抗体 I 交联反应(备选)

如在洗脱抗原时要避免洗脱抗体，适合用 BS3 (Thermo Scientific, Cat. #21580) 作为抗体 I 与蛋白 A 之间氨基的交联剂；相关操作细节，参照该试剂的操作说明。

6. 目标抗原免疫沉淀反应

抗原吸附：将 200 µL 步骤 1 处理样品加到步骤 4 或 5 处理后磁珠中，用移液器充分吹打混合均匀；置四维旋转混合仪上或手工温和操作，室温持续混合反应~15 min (如抗体亲和力较弱，可在室温下反应 1 h 或在 4°C下反应过夜)。

洗涤：磁分离上述吸附抗原所得磁珠-抗体 I-抗原复合物，收集上清液置于冰上备后续检测；向 EP 管中加入 200 µL 洗涤缓冲液，用移液器吹打使磁珠-抗体 I-抗原复合物充分混合均匀，磁分离磁珠复合物，弃上清液；照上步操作再洗涤一次；最后，加入 200 µL 洗涤缓冲液，将磁珠-抗体 I-抗原复合物转移至新的 1.5 mL EP 管中，备用。

注：抗原洗脱前将磁珠复合物转移到新 EP 管，避免管壁上非特异性吸附蛋白被洗脱。

7. 抗原洗脱和检测

以下两种抗原洗脱方案供参考，可据后期检测的需要选择或设计合适的洗脱方法

变性洗脱：步骤 6 所得磁珠复合物，磁分离尽可能去上清液，加 25 µL 1× SDS-PAGE Loading Buffer (自备)，用移液器吹打充分混合均匀，100°C加热 10 min；磁力吸附磁珠到管壁，收集上清液进行 SDS-PAGE；最后，染色、WB 等方法检测。

酸洗脱：步骤 6 所得磁珠复合物，磁分离尽可能去上清液；加 20 µL 洗脱缓冲液，室温孵育 10 min (期间温和混匀数次)；磁力吸附磁珠，转移上清液至新 EP 管，立即加 2.0 µL 中和缓冲液，混匀；此法洗脱抗原样品，适于进一步检测生物活性。

8. 在线检测固定化抗体 I 所识别成分

假设固定化抗体 I 识别抗原为蛋白 X，而蛋白 X 与蛋白 Y 相互作用形成复合物

8.1 抗体 II 结合磁珠-抗体 I-抗原复合物中的蛋白 Y

磁珠复合物中蛋白 Y 吸附抗体 II：将特异识别蛋白 Y 的抗体 II 用结合缓冲液稀释到 1.0 mg/L 为工作液；将步骤 6 所得磁珠复合物的悬液磁力去上清，加入 200 µL 稀释后的抗体 II 工作液，移液器吹打使抗体 II 与磁珠-抗体 I-抗原复合物混合均匀；四维旋转混合仪上或手工温和操作，室温持续混合孵育反应~15 min。

洗涤：完成抗体 II 结合的磁珠-抗体 I-抗原-抗体 II 复合物，磁分离去上清液；向 EP 管中加入 200 µL 洗涤缓冲液，用移液器温和吹打使磁珠复合物充分混匀，再磁分离弃上清液；再洗涤一次；加 200 µL 洗涤缓冲液混匀，悬液到新 1.5 mL EP 管中。

注：将磁珠复合物转移到新的 EP 管中避免管壁上非特异性吸附抗体 II 干扰后续检测。

8.2 碱磷酶标记抗体 III 结合磁珠-抗体 I-抗原-抗体 II 复合物

磁珠复合物吸附碱性磷酸酶标记抗抗体 II 的抗体 III/AP(本质为二抗)：将抗体 III/AP 用结合缓冲液稀释到 1.0 mg/L 为工作液；步骤 8.1 所得磁珠复合物悬液磁分离去上清液，尽快加入 200 μL 稀释后抗体 III/AP，移液器温和吹打使磁珠复合物与抗体 III/AP 充分混合均匀；四维旋转混合仪上或手工温和操作，室温持续混合孵育反应~15 min。

洗涤：将上述结合了抗体 III/AP 的磁珠复合物磁分离弃上清；向 EP 管中加 200 μL 洗涤缓冲液，移液器温和吹打使磁珠复合物充分混匀，再磁分离弃上清液；再洗涤一次；再加 200 μL 洗涤缓冲液，移液器温和吹打混匀；悬液转移至新 1.5 mL EP 管中。

注：磁珠转移到新的 EP 管，避免管壁非特异性吸附抗体 III/AP 干扰后续检测。

8.3 磁珠复合物中标记酶活性检测

将步骤 8.2 所得磁珠复合物悬液磁分离弃上清；加入 800 μL PNPP (5.0 M) 的二乙醇胺-HCl 缓冲液 (1.0 M，pH 9.8)，用移液器温和吹打充分混匀；置于四维旋转混合仪上或手工持续温和混合，室温孵育反应 30 min；立即加 200 μL 浓度为 1.0 M 的 NaOH 溶液，用移液器快速吹打充分混匀终止反应；将底物反应管磁分离 1 min 以上获得澄清的上清液，取上清液 800 μL 测定 405 nm 吸收；设置以阴性和阳性对照，换算出在上述条件下磁珠吸附的蛋白 Y 的含量。

注：在线检测节省时间，操作更简便且灵敏度更高，所述流程对检测不同蛋白 X 或蛋白 Y 通用，但需保障复合物中抗体 II 与抗体 I 匹配(复合物中所结合抗体 I 不妨碍后续结合抗体 II)；碱磷酶标记时检测标记酶活性可用上述显色底物或发光底物，用辣根酶标记时适合用发光底物，如用显色底物需先磁分离去磁珠并将上清液转移到新的 EP 管中再加入强酸促进产物显色。

9. 蛋白 A 磁珠用于筛选单克隆抗体

抗体 X 制备：用结合缓冲液，稀释抗体 X 到 20~500 mg/L，置于冰上备用。

抗体 X 吸附：将 200 μL 稀释抗体 X 加到按步骤 3 处理所得蛋白 A 磁珠中，温和操作充分混匀，四维旋转混合仪上或手工持续温和混合，室温混合吸附~15 min；磁分离 1 min 以上使磁珠全部吸附到 EP 管壁，去尽上清液。

洗涤：尽快向 EP 管中磁珠加 200 μL 结合缓冲液，用移液器温和吹打充分混匀；磁分离，弃尽上清液；再洗涤一次；用 200 μL 结合缓冲液重悬，转移到新 EP 管。

检测结合抗体 X：可参照步骤 7 所述酸洗脱活性抗体 X 再检测，或参照步骤 8 所述在线检测吸附抗体 X；具体操作见步骤 7 和步骤 8 所述，需优化检测成分用量及标记。

比较蛋白 A 磁珠 MSP-PRA-Z1 分离兔多抗中 IgG

吸附/洗涤缓冲液：20 mM 磷酸钠 pH 7.4； 洗脱缓冲液：0.10 M 甘氨酸-HCl，pH 2.8；

中和缓冲液：1.0 M Tris； 参比蛋白 A 磁珠：Dynabeads™ Protein A (货号 10001D)

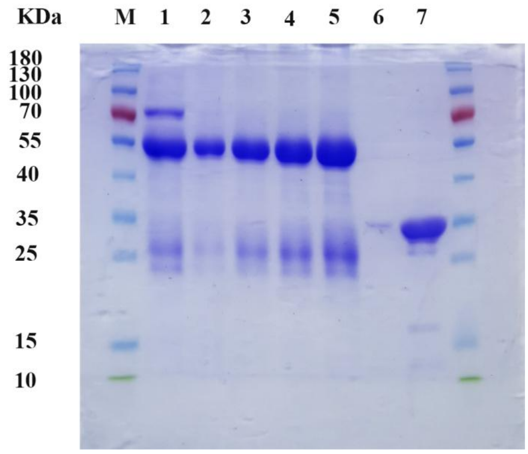
吸附体系：0.10 ml 吸附缓冲液，含离子交换纯化兔多抗 40 µg (有杂蛋白，约 10%)；磁珠用吸附缓冲液洗 2 次后，与含多抗吸附缓冲液混合；27 度，吸附 20 min；

分离抗体：磁力分离吸附抗体磁珠；洗涤缓冲液洗涤磁珠 3 次，每次 200 µL(最后一次换管)；

变性洗脱分析：最后一次洗涤磁珠后，磁力分离磁珠去尽上清液，加 1×SDS-PAGE 上样缓冲液 25 µL；混匀，沸水加热 20 min；去磁珠，全部上清液电泳；

酸洗脱再分析：最后一次洗涤磁珠后，磁力分离磁珠去尽上清液，加洗脱缓冲液 20 µL，混匀，27 度，10 min，磁力去磁珠，取全部上清，加 2µL 中和缓冲液；加 4×SDS-PAGE 上样缓冲液 5µL；混匀，沸水加热 20 min；将全部上清液上样电泳；

分析组 1：变性洗脱分析比较对离子交换纯化兔多抗 IgG 的分离能力



1: Anti-ECAP polyAb: 4.0 µg；

2: 0.25 mg MSP-PRA-Z1，变性洗脱；

3: 0.50 mg MSP-PRA-Z1，变性洗脱；

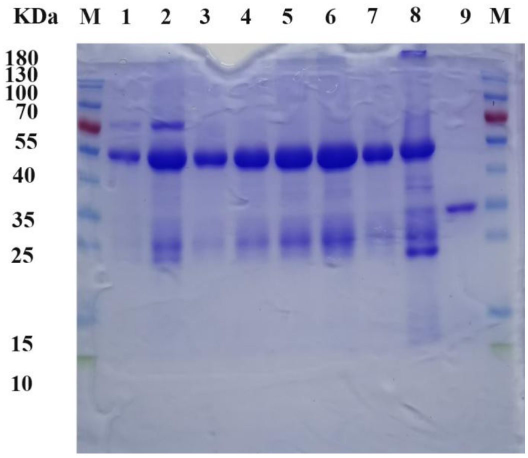
4: 0.75 mg MSP-PRA-Z1，变性洗脱；

5: 1.0 mg MSP-PRA-Z1，变性洗脱；

6：HZNL，原料蛋白 A，2.0 µg；

7：HZNL，原料蛋白 A，20.0 µg

分析组 2：酸洗脱再分析比较对离子交换纯化兔多抗 IgG 的分离能力



1: Anti-ECAP polyAb, 1.0 µg；

2: Anti-ECAP polyAb, 4.0 µg；

3: 0.25 mg MSP-PRA-Z1，酸洗脱；

4: 0.50 mg MSP-PRA-Z1，酸洗脱；

5: 0.75 mg MSP-PRA-Z1，酸洗脱；

6: 1.0 mg MSP-PRA-Z1，酸洗脱；

7: 1.0 mg Dynabeads 蛋白 A 磁珠，酸洗脱；

8: 3.0 mg Dynabeads 蛋白 A 磁珠，酸洗脱；

9: HZNL，原料蛋白 A，4.0 µg

比较蛋白 A 磁珠 MSP-PRA-Z1 和蛋白 G 磁珠 MSP-PRG-Z1 分离兔多抗及鼠血清多抗 IgG

吸附缓冲液： 20 mM 磷酸钠 pH 7.4； 洗脱缓冲液：0.10 M 甘氨酸-HCl，pH 2.8；

中和缓冲液：0.4 M Tris； 参比蛋白 A 磁珠：Dynabeads™ Protein A (货号 10001D)

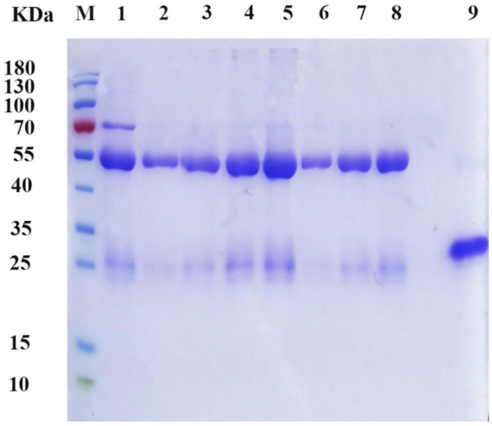
吸附体系 1：0.10 ml 缓冲液，含离子交换纯化兔多抗 40 μg 或蛋白 A 纯化小鼠血清多抗 40 μg；磁珠用吸附缓冲液洗 2 次后，与含多抗吸附缓冲液混合；27 度，吸附 20 min；

分离抗体：磁力分离吸附抗体磁珠；洗涤缓冲液洗涤磁珠 3 次，每次 200 μL(最后一次换管)；

变性洗脱分析：最后一次洗涤磁珠后，磁力分离磁珠去上尽清液，加 1×SDS-PAGE 上样缓冲液 25 μL；混匀，沸水加热 20 min；去磁珠，全部上清液电泳；

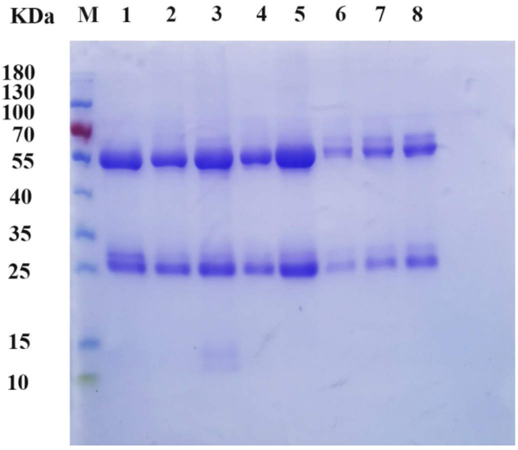
酸洗脱再分析：最后一次洗涤磁珠后，磁力分离磁珠去尽上清液，加洗脱缓冲液 20 μL，混匀，27 度，10 min，磁力去磁珠，取全部上清，加 2μL 中和缓冲液；加 4×SDS-PAGE 上样缓冲液 5μL；混匀，沸水加热 20 min；将全部上清液上样电泳；

分析组 1：比较对离子交换纯化兔多抗 IgG 的分离能力



1: rabbit Anti-ECAP polyAb, 4.0 μg;
2: 0.50 mg MSP-PRG-Z1，变性洗脱;
3: 1.0 mg MSP-PRG-Z1，变性洗脱;
4: 2.0 mg MSP-PRG-Z1，变性洗脱;
5: 4.0 mg MSP-PRG-Z1，变性洗脱;
6： 0.50 mg MSP-PRG-Z1，酸洗脱;
7: 1.0 mg MSP-PRG-Z1，酸洗脱;
8: 2.0 mg MSP-PRG-Z1，酸洗脱;
9: HZNL，原料蛋白 G, 8.0 μg

分析组 2：比较对蛋白 A 纯化小鼠血清 IgG 的分离能力



1: mouse IgG: 8.0 μg;
2: 0.25 mg MSP-PRA-Z1，酸洗脱;
3: 0.50 mg MSP-PRA-Z1，酸洗脱;
4: 1.0 mg Dynabeads 蛋白 A 磁珠，酸洗脱;
5: 4.0 mg Dynabeads 蛋白 A 磁珠，酸洗脱;
6: 0.50 mg MSP-PRG-Z1，酸洗脱;
7: 1.0 mg MSP-PRG-Z1，酸洗脱;
8: 2.0 mg MSP-PRG-Z1，酸洗脱;

提 示

1. 冷冻、干燥和离心都造成磁珠团聚而无法再分散，失去效用；
2. 磁珠用前需重悬均匀，切忌剧烈震荡产生气泡导致蛋白变性；
3. 移液器吸头和反应管需避免因粘附磁珠而造成磁珠损失；
4. 本产品保存液中含剧毒成分，避免吞咽，必须远离儿童；
5. 本产品严禁用于人体，可用于研究及体外诊断；
6. 本产品保存液中含有叠氮钠，可能干扰辣根酶标记检测；
7. 本产品放置太久可能出现团块；长期储存阶段建议每3个月混匀一次。

附录 1：蛋白 A 磁珠产品规格及货号

产品名称	产品型号	产品货号	产品规格	产品形式
蛋白A磁珠（专利产品）	MSP-Protein A-Z1	18070206-0002g	0.10 mL*20 g/L (2 mg)	悬液，塑料管
		18070206-0010g	0.50 mL*20 g/L (10 mg)	悬液，塑料管
		18070206-0100g	5.0 mL*20 g/L (100 mg)	悬液，塑料瓶

常见问题及解答

1. 如何提高蛋白 A 磁珠在免疫共沉淀反应中的特异性？

答：本公司蛋白 A 磁珠中所用羧基磁珠 MSP-COOH-Z1 对蛋白非特异吸附非常低。在用蛋白 A 磁珠结合分离抗体前，先将抗体与样品进行孵育，形成抗体-抗原复合物，再用磁珠捕获复合物，这样有利于提高抗体与抗原的结合效率和降低磁珠与样品中蛋白吸附的反应时间，有利于降低非特异性吸附而提高共沉淀产物的特异性。

2. 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：蛋白 A 磁珠用于分离 IgG 常需使用酸性洗脱液。在酸性洗脱缓冲液中，本公司蛋白 A 磁珠容易聚集，主要是因为低 pH 使磁珠表面所带的羧基、磺酸基降低解离度，无法通过强静电排斥而保持分散状态。但是，短时间酸洗脱液处理并不影响磁珠的后续磁分离响应性。经酸洗脱液处理磁珠，尽快用结合缓冲溶液洗至中性，并用超声维持在室温处理 2.0 min，常可使磁珠恢复均匀分散状态并保留抗体结合效率。

3. 如何处理磁珠保存期间出现的团聚结块情况？

答：本公司蛋白 A 磁珠保存期间应悬浮在 2~8℃中性缓冲液中，需避免冷冻或干燥导致不可逆聚集。在长期保存期间，该磁珠出现团聚属于正常，因为该磁珠亲水性很强但表面接近中性，放置太久易于团聚。本公司蛋白 A 磁珠使用前，宜用移液器温和反复吹

打、温和蜗旋振荡器或低功率超声处理 2.0 min 促进磁珠重分散；在分离抗体过程中如出现团聚现象，不推荐蜗旋震荡或超声处理促分散以免被捕获抗体脱落。

附表 1. Protein A, G, A/G 与不同来源类型的抗体亲和性(仅供参考)

物种来源 Species	亚型 Antibody Class	蛋白 A Protein A	蛋白 G Protein G	蛋白 A/G Protein A/G
Mouse	Total IgG	+++	+++	+++
	IgG1	+	++	++
	IgG2a，IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	+++	+++	+++
	IgM	-	-	-
Human	Total IgG	+++	+++	+++
	IgG1，IgG2，IgG4	+++	+++	+++
	IgG3	+	+++	+++
	IgM	+	-	+
	IgD	-	-	-
	IgA	+	+++	+++
Rat	Total IgG	+	++	++
	IgG1	+	++	++
	IgG2a	-	+++	+++
	IgG2b	-	+	+
	IgG2c	+++	+++	+++
Cow	Total IgG	+	+++	+++
	IgG1	+	+++	+++
	IgG2	+++	+++	+++
Coat	Total IgG	+	+++	+++
	IgG1	+	+++	+++
	IgG2	+++	+++	+++
Horse	Total IgG	+	+++	+++
	IgG(ab)	+	-	+
	IgG(c)	+	-	+
	IgG(T)	-	+++	+++
Rabbit	Total IgG	+++	+++	+++
Monkey	Total IgG	+++	+++	+++
Pig	Total IgG	+++	+	+++
Dog	Total IgG	+++	+	+++
Cat	Total IgG	+++	+++	+++
Chicken	Total IgY	-	-	-