

1、适用场景

MagneStar® MA-Protein A磁珠主要适用于从小体积样本中纯化抗体，如抗体的小规模制备以及抗体药物的前期筛选。此类磁珠为琼脂糖基质，具有高孔隙率、高载量的优势。此外，琼脂糖基质的亲水性保证磁珠具有极低的非特异性吸附。本产品通常用于从血清、细胞培养上清液或腹水中分离抗体，以及从细胞或组织提取物中进行免疫亲和捕获，包括免疫沉淀和免疫共沉淀。既可以捕获特定靶蛋白（抗原）也可以捕获靶蛋白-蛋白复合物。其优势在于结合能力、得率、可重复性、纯度、简单快速及可自动化。

2、基本原理

免疫沉淀（IP）：免疫沉淀是抗原检测和纯化中使用最广泛的方法之一。其原理非常简单：针对特定靶蛋白的抗体（单克隆或多克隆）与样品（例如细胞裂解物）中的该靶标形成免疫复合物。然后免疫复合物被捕获或沉淀在抗体结合蛋白（如Protein A或G）的固相支持物上（例如磁珠），并且任何未沉淀在磁珠上的蛋白质都被洗掉。最后从磁珠中洗脱抗原和抗体（如果它没有共价连接到磁珠上或使用变性缓冲液时），并通过SDS-PAGE进行分析，随后进行蛋白质印迹检测以验证是何种抗原。

免疫共沉淀（Co-IP）是一种常用的技术，通过使用靶蛋白特异性抗体间接捕获与特定靶蛋白结合的蛋白质，从而鉴定生理相关的蛋白质-蛋白质相互作用。然后通过分析这些蛋白质复合物以确定新的结合伴侣、结合亲和力、结合动力学和靶蛋白的功能。

3、注意事项

MagneStar® MA-Protein A磁珠储存于20%乙醇中，浓度为25%沉降体积比。每1 mL混匀后的分散液中含有250 μ L的沉降磁珠。使用前需要将分散介质置换为纯水或结合缓冲液。

MagneStar® MA-Protein A磁珠采用耐碱型Protein A配基，可以通过碱清洗的方式循环再生15 – 30次。

磁珠不可冷冻！ 冷冻会带来不可逆的变性。

在使用之前，特别是从大瓶中分装时，应当将其中的分散液充分混匀，然后再移取。

4、基本流程

以下列出用MagneStar® MA-Protein A磁珠进行免疫亲和捕获实验的通用型流程，具体的缓冲液配比、磁珠用量、孵育时间及温度等关键参数可根据需要自行优化。

① 根据样本体积选择适当的反应管以及磁力架。此处我们选择1.5 mL离心管；

② 配置以下缓冲液：

漂洗缓冲液：25 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5（若需要减少非特异性结合，可将NaCl浓度提高至0.5 M）

洗脱缓冲液：100 mM 甘氨酸, pH 2.0

洗脱缓冲液（可选）：SDS-PAGE样品还原缓冲液

细胞裂解液：用于调节IP反应体积

中和缓冲液：1 M 磷酸盐或1 M Tris, pH 7.5 – 9

- ③ 样本制备：将抗原样本与10 μg 抗体在1.5 mL离心管中混合。用细胞裂解缓冲液将反应体积调整至500 μL 。在室温下孵育1 – 2 h或在4°C下混匀孵育过夜；
- ④ 磁珠预处理：将磁珠涡旋振荡30 s，使磁珠充分重悬。取10 μL 25% (v/v) 的磁珠悬液置于另一个1.5 mL离心管中，进行磁分离，弃上清液。用1 mL漂洗液，充分混匀后磁分离弃上清，清洗2次；
- ⑤ 结合：将步骤④抗原样本/抗体混合物加入步骤⑤制备的含有预清洗磁珠的1.5 mL离心管中，在室温下混合孵育1 h；
- ⑥ 磁珠漂洗：孵育结束后，磁吸分离保留上清用于分析。每次加入500 μL 漂洗液，充分混匀，磁吸分离弃上清，漂洗2次。之后再向管中加入500 μL 纯水并轻轻混匀，磁吸弃上清；
- ⑦ 洗脱：向管中加入100 μL 洗脱缓冲液。在室温下混匀孵育10 min。磁吸分离，并保存含有目标抗原的上清液；
- ⑧ 抗体中和：每100 μL 洗脱液加入15 μL 中和缓冲液；
- ⑨ （可选洗脱）：向管中加入100 μL 的SDS-PAGE样品还原缓冲液，并在加热块中以96°C – 100°C加热样品10 min，磁吸分离，并保存含有目标抗原的上清液。注意：如果您将使用兔抗体制备Western blot（一抗或二抗），请勿加热样品。在室温下孵育 10 min，并进行混合。

5、常见问题

Q：为什么有些厂商的磁珠呈现黑色，而有些厂商的磁珠呈现棕色？

A：这是由于磁珠中磁性氧化铁的存在形式不同所致。若四氧化三铁占比较高，则磁珠呈现黑色。若三氧化二铁占比较高，则磁珠呈现棕褐色。颜色的差异不影响磁珠的使用。

Q：MagneStar® MA-Protein A磁珠是否可以循环使用？

A：为避免样品交叉污染，不建议在不同样本上重复使用磁珠。若为同类样本，可以通过碱清洗的方式对磁珠进行再生后循环使用。推荐的清洗液为0.1 – 0.5 M的NaOH，可重复使用次数在15 – 30次之间。

Q：回收的蛋白较少是什么情况导致的？

A：样本中的目标蛋白含量较少，增加抗体样本投量；磁珠投量不足，增加磁珠投入量；蛋白降解了，添加蛋白酶抑制剂。

Q：蛋白未洗脱是什么情况导致的？

A：通常情况下使用低pH的缓冲液进行洗脱。如果低pH值能有效洗脱，但会导致蛋白不可逆的功能损伤，那么可以考虑提高缓冲液的离子强度。如果低pH缓冲液不能有效洗脱，则考虑提高pH，或考虑测试各种洗脱缓冲液条件（例如使用变性剂、有机试剂），但还是尽可能找一种温和但有效的洗脱条件。

Q：不想让抗体一起洗脱下来该怎么做？

A：需要将抗体修饰上linker并在交联剂的作用下与磁珠形成共价连接，才能在正常的洗脱条件下不将抗体与靶标蛋白一起洗脱，该实验流程不属于本方案的内容，如有需要请联系本公司。