

Protein A beads

介绍:

Protein A 是一种发现于金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的细胞壁表面蛋白, 分子量为 42 kDa, 能特异性地与哺乳动物免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) Fc 区结合, 同时也会和人 VH3 家族的 Fab 区结合。本产品为改造过的重组 Protein A (25 kDa), 与纳米级氨基磁珠共价偶联结合, 且仅保留了与 IgG 等 Fc 端结合相关的氨基酸序列, 去除了结合位点以外可能导致非特异性结合的序列, 从而可以有效减少非特异性结合。

Protein A beads 可特异性地结合相应抗体, 如 human IgG1、IgG2、IgG4, mouse IgG2a、IgG2b 及 rabbit IgG 等, 每个 Protein A 分子可以结合 5 个 IgG 分子, 主要用于免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)、免疫共沉淀 (Co-IP) 或染色质免疫沉淀 (Chromatin Immunoprecipitation, Ch-IP), 以及血清、细胞培养上清液或腹水等样品中抗体的纯化等。针对常见的免疫球蛋白亚类的结合能力及不同物种的总结合能力情况见下表 (Table 1)。

本产品具有多种显著的使用优势。首先, 可实现抗体结合的高含量与结合特异性。与传统的 Protein A 琼脂糖凝胶相比, 本产品孔径更小, 不易产生非特异性吸附, 同时结合量高。1ml 磁珠悬浮液含约 10 mg 磁珠以及不少于 0.6 mg 重组 Protein A, 同时单个重组 Protein A 含有的 5 个 Fc 结合域可结合不少于 0.7 mg Human IgG, 具体最大结合量与抗体类型以及靶蛋白等有关系。实验时, 通常 500 μ l 样品使用 10-20 μ l Protein A beads 悬浊液即可进行高效的免疫沉淀实验。其次, 可实现抗体或抗体复合物的超快速结合。Protein A beads (~200 nm) 因其超大比表面积而便于进行磁珠与抗体或抗体复合物的快速有效结合。通常 10 min 内即可完成抗体或其复合物的吸附过程, 30 min 内完成目的蛋白免疫沉淀操作。缩短操作时间可以有效避免在长时间操作过程中目的蛋白的降解或变性, 充分保证目的蛋白的活性。由于采用磁性分离, 每次进行 IP 和 Co-IP 相比于琼脂糖凝胶可以节省 40% 的时间。最后, 可使用多样化的方法来洗脱。依据目的蛋白的结构、生物学功能及后续应用的设计要求等因素, 可以使用酸性溶液、SDS-PAGE 上样缓冲液或竞争性多肽等多种洗脱液进行洗脱。(产品具体参数见 Table 2)

Species	Subclass	Protein A binding	Protein G binding
Human	IgA	++	-
	IgD	++	-
	IgE	++	-
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	-	++++
	IgG4	++++	++++
Mouse	IgM	++	-
	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
Rat	IgM	+/-	-
	IgG1	-	+
	IgG2a	-	++++
	IgG2b	-	++
Avian egg yolk	IgG3	+	++
	IgY	-	-
		++	++++
		++	+
Cow		-	++
Dog		++	+
Goat		-	++
Guinea Pig	IgG1	++++	++
	IgG2	++++	++
Hamster		+	++
Horse		++	++++
Koala		-	+
Llama		-	+
Monkey (rhesus)		++++	++++
Pig		+++	+++
Rabbit		++++	+++
Sheep		+/-	++

Table 1 affinity data for Protein A and Protein G for different sources and subtypes of IgG. ++++ = Strong Binding; ++~+++ = Medium Binding; += Weak Binding; +/- = Weak or No Binding; - = No Binding.

Characteristics	Description
Product content	10mg/ml magnetic beads in specific protective buffer
Beads size	~200nm
Magnetization	Superparamagnetic
Coupled protein	Recombinant Protein A
M.W. of protein	~25kDa (Protein A)
Antibody concentration	≥0.6mg Protein A per ml beads
Binding capacity	≥ 0.7mg human IgG per ml beads
Specificity	Antibodies from many different species, including mouse, human, rabbit, cow, goat and sheep
Elution method	Elution with acid, competing peptide or SDS-PAGE loading buffer
Application	IP, Co-IP, Protein purification

Table 2 The main related indicators of Protein A beads.

原料/组成

Component	K1303-1ml	K1303-5*1ml
Protein A beads	1 ml	5*1 ml

保存条件

4 °C保存，两年有效。

实验操作

1. 样品的制备。

选择合适的裂解液（pH 为 6-8）并冰上或 4°C 放置，随后裂解细胞或组织进行免疫沉淀或免疫共沉淀、标签蛋白的纯化等操作。新鲜制备好的样品，建议尽量当天完成免疫沉淀等后续操作，但如果样品不能当天使用，也可以适当分装后 -80 °C 冻存。（裂解液可选择使用 K1020 RIPA Lysis Buffer (Strong)、K1121 RIPA Lysis Buffer (Medium)、K1122 RIPA Lysis Buffer (Strong)、K1123 Cell lysis buffer for WB and IP、K1124 Cell lysis buffer for WB and IP without inhibitors 等）。

2. Protein A beads 的准备。

由于 Protein A beads 储存在特殊保护液中，所以需要在加入样品前适当洗涤。

- a. 用移液器轻轻吹打重悬 Protein A beads，按照每 500 μl 样品 10 μl 或 20 μl 磁珠悬浊液，取适量 Protein A beads 至 1 个洁净离心管中，加入 1X TBS 至最终体积为约 0.5 ml。说明：如果初始体积大于 0.2 ml，可以考虑先直接置于磁力架上分离 10 s，去

Tel: 021-55669583; Fax: 021-55669583

<http://www.apexbio.cn/>; Email: sales@apexbio.cn.

除上清，然后再加入 1X TBS 至最终体积为约 0.5ml。

- b. 用移液器轻轻吹打重悬 Protein A beads。置于磁力架上分离 10 秒，去除上清。重复上述步骤两次。
 - c. 按照初始体积的量，用 1X TBS 重悬 Protein A beads。
3. 抗体与 Protein A beads 的结合。
- a. 抗体的准备：按抗体使用说明中推荐的稀释比例用 1X TBS 稀释抗体，配制成抗体工作液；或将抗体配制成终浓度 5-50 $\mu\text{g/ml}$ 的抗体工作液。置于冰上备用。可选做：使用抗体种属相同的正常 IgG 配制相同稀释比或终浓度的正常 IgG 工作液，以用于去除非特异性结合或作为阴性对照。所谓种属相同的正常 IgG 是指，例如后续免疫沉淀时用的抗体是小鼠 IgG，则在本步骤中可以用 1X TBS 稀释适量的 normal mouse IgG 以用于降低背景或作为阴性对照。
 - b. 抗体吸附：将步骤 2 准备好的 Protein A beads 进行磁性分离，吸除上清，加入 500 μl 抗体工作液或正常 IgG 工作液，重悬后在室温翻转混合仪上翻转孵育 15 min-1 h。*注：也可以直接在步骤 2 的 Protein A beads 中加入适量抗体或正常 IgG 进行孵育。*
 - c. 洗涤：加入 500 μl 的 1X TBS，用移液器轻轻吹打重悬 Protein A beads。置于磁力架上分离 10 s，去除上清。重复洗涤三次。按照初始体积的量，用 1X TBS 重悬 Protein A beads。*注：孵育和洗涤过程中，如果磁珠发生聚团或呈片状属正常现象，不会影响实验结果。*
4. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP):
- a. 去除非特异性结合(可选做)：步骤 3 中准备的结合了正常 IgG 的 Protein A beads 与样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时后磁性分离，上清样品用于后续实验。本实验步骤的目的是去除与正常 IgG 产生非特异性结合的蛋白。
 - b. 样品与结合了抗体或正常 IgG 的 Protein A beads 孵育。按照每 500 μl 蛋白样品加入 10 μl 或 20 μl 磁珠悬浊液的比例加入结合了抗体或正常 IgG 的 Protein A beads，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。
注 1：孵育过程中，如果磁珠发生聚团或呈片状属正常现象，不会影响实验结果。
注 2：也可先将适量抗体或正常 IgG 与样品室温孵育 1-2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后，再加入 10-20 μl 磁珠悬浊液室温孵育 1 h。具体见常见问题 2。

-
- c. 磁分离。孵育完毕后，置于磁力架上分离 10 s，去除上清。注：可保留部分上清液，用于检测免疫沉淀的效果。
- d. 洗涤。加入 500 μ l 的 1X TBS，用移液器轻轻吹打重悬磁珠。置于磁力架上分离 10 s，去除上清。重复洗涤三次。注：也可以通过检测洗涤得到的洗涤液的 OD_{280} 来判断是否洗涤完全，若 OD_{280} 大于 0.05，应适当增加洗涤次数。

5. 洗脱：

根据目的蛋白的特点及后续实验要求，可以选择如下方法之一进行洗脱。

- a. 酸性洗脱法：本方法为非变性法，比较快速且高效。洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于后续分析检测。

(a) 溶液的配制：酸性洗脱液(1.0 M Glycine-HCl, pH3.0)，中和液(1.0 M Tris-HCl, pH9.0, 0.15M NaCl)。

(b) 每 10-20 μ l 原始磁珠体积，加入 100 μ l 酸性洗脱液，混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育 5 min。注 1：孵育时间不宜超过 15 min。注 2：洗脱液的体积可以酌情适当调整，同时须注意后续的中和液体积也需要作相应调整。

(c) 孵育完毕后，置于磁力架上分离 10 s，将上清转移到新的离心管中，并立刻加入 10 μ l 中和液，适当混匀。

(d) 为了获得最大的洗脱效率，可重复步骤 b 和 c，并将相同样品合并。

(e) 洗脱并中和的目的蛋白置于 4 $^{\circ}$ C 待用，或者 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 长期保存。

注 1：酸性洗脱法虽然高效，但仍可能低于竞争洗脱法或 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法。

注 2：由于目的蛋白的差异可能对酸性洗脱法的洗脱效率有一定的影响，如果对洗脱效率的要求比较高，可对酸性洗脱液的 pH 在 2.5-3.1 之间进行一定的调整，相应的中和液的 pH 值或量也要进行一定的调整，例如 100 μ l 酸性洗脱液(0.1M Glycine-HCl, pH2.8) 和 15 μ l 中和液(1M Tris-HCl, pH8.5)。

- b. SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法：本方法为变性法，得到的蛋白样品适合 SDS-PAGE 电泳或 Western 检测。

(a) 选取合适的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，加入水配制成 1X。通常 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液含有 DTT 等还原剂，其洗脱得到的蛋白样品中会含有抗体的轻链和重链。

-
- (b) 每 10-20 μl 原始磁珠体积的磁珠, 加入 100 μl 1X SDS-PAGE 上样缓冲液, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min。注: 洗脱液的体积可以酌情适当调整。
- (c) 置于磁力架上分离 10 s, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳或 Western 检测。
- c. 多肽竞争洗脱法: 如果目的蛋白是标签蛋白, 并使用相应的标签抗体进行免疫沉淀, 则可使用相应的多肽进行竞争洗脱。本方法为非变性法, 洗脱效率高, 且洗脱后的蛋白保持原有的生物活性, 便于后续分析检测。以下以 Flag 标签蛋白为例:
- (a) 3X Flag 多肽洗脱液的配制: 取适量 3X Flag 多肽(A6001)溶解于 1X TBS 中, 使其终浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 或稀释 5mg/ml 的 3X Flag 多肽溶液(A6001)至 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
- (b) 每 10-20 μl 原始磁珠体积, 加入 100 μl 3X Flag 多肽洗脱液(150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上, 室温摇晃孵育 30-60 min, 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1-2 h。为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱。
- (c) 孵育完毕后, 置于磁力架上分离 10 s, 将上清转移到新的离心管中。上清即为洗脱的 Flag 标签蛋白。
- (d) 洗脱的 Flag 标签蛋白置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 待用, 或者 -20 $^{\circ}\text{C}$ 或 -80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。
6. 免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation, Co-IP):
- 参考免疫沉淀的方法进行, 但免疫共沉淀(Co-IP)通常宜使用未经冻存的新鲜蛋白样品, 以确保蛋白复合物不会因为冻融而被破坏。普通的免疫沉淀虽然可以使用冻存的蛋白样品, 但通常使用新鲜的蛋白样品更佳。
7. 抗体的纯化:
- a. 参照步骤 3, 把 Protein A beads 加入到待纯化的抗体样品中, 混匀后室温侧摆摇床或旋转混合仪上孵育 1 h。吸去上清, 然后用 1X TBS 洗涤 3 次。
- b. 参照步骤 5a, 用适量酸性洗脱液进行洗脱, 并用中和液进行中和。
8. 常见问题:
- I. 如何提高抗体与磁珠结合效率?
- 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, 如抗体所属亚型与 Protein A、G 或 A/G 的亲和力较低, 可以通过增加抗体与磁珠的孵育时间、提高 TBS 的 pH 值(8-9)或降低离子强度(25-100 mM NaCl)等方法提高亲和力。
- II. 如何提高磁珠在免疫沉淀或免疫共沉淀反应中的特异性?

- 参考步骤 4b 中的备注，可以先将适量抗体与样品进行孵育，形成抗体-抗原复合物，再用 Protein A、G 或 A/G 磁珠捕获复合物，这样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方法。
- 参考步骤 4a，使用结合了正常 IgG 的磁珠与蛋白样品预孵育，可以减少抗体的非特异性结合。类似地，也可以在蛋白样品中先加入正常 IgG 预孵育，然后再加入抗体进行孵育，随后再加入磁珠进行抗体的免疫沉淀。
- 设置正常 IgG 作为抗体的对照，可以确定免疫沉淀或免疫共沉淀产物的特异性。

III. 如何避免磁珠在储存或使用过程中可能出现的聚集情况？

磁珠通常应保存在 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 TBS 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 洗脱操作的磁珠可以用 TBS 洗涤至中性，然后用含有 0.1 % (v/v) Tween-20 的 TBS 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。

IV. 如何解决磁珠易粘附在离心管等耗材表面的现象？

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 0.1% (v/v) 的非离子型去垢剂(如 Triton X-100、Tween-20 或 NP-40)可以有效降低磁珠在耗材表面的粘附。

V. 磁珠在使用过程中出现结块现象？

磁珠在使用时如果出现结块现象，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处理磁珠的结块问题。

VI. 其它常见问题、原因及解决方法：

Problem	Possible Causes	Solution
Very few or no target protein exists in the eluate.	Protein is not completely eluted.	Change elution methods.
	No target protein expressed.	Make sure the protein of interest contains the HA-tag by Western blot or dot blot analyses.
	Very low protein expression level.	1. Use larger volume of cell lysate.
		2. Optimize expression conditions to raise the protein expression level.
	Washes are too stringent.	Reduce the time and number of washes.
	Incubation times are inadequate.	Increase the incubation time.
	Interfering substance is present in sample.	Lysates containing high concentration of DTT, 2-mercaptoethanol, or other reducing agents may destroy antibody function, and must be avoided.
Detection system is inadequate. (WB)	1. Check primary and secondary antibodies using proper controls to confirm binding and reactivity.	
	2. Verify that the transfer was adequate by using prestained protein marker or staining the membrane with Ponceau S.	
	3. Use fresh detection substrate or try a different detection system.	
Background is too high.	Proteins bind nonspecifically to the antibody, insufficient washing on magnetic beads, or the microcentrifuge tubes.	1. Pre-clear lysate with Normal IgG to remove nonspecific binding proteins.
		2. After suspending beads for the final wash, transfer entire sample to a clean microcentrifuge tube before separation.
	Washes are insufficient.	1. Increase the number of washes.
		2. Prolong duration of the washes, incubating each wash for at least 15 minutes.
Multiple protein bands found in the eluate.	The protein is not stable at room temperature.	3. Increase the salt and/or detergent concentrations in the wash solutions.
		4. Centrifuge at lower speed to avoid nonspecific trapping of denatured proteins.
	Protein degradation due to proteases activity during purification process.	Purify the target protein at lower temperature, such as 4°C.
Non-specific binding.	Non-specific binding.	Add protease inhibitors to cell lysate.
		1. Prepare cell lysate again.
		2. Add additional wash steps.

Table 3 Other common problems, causes and solutions

注意事项

1. 使用前需颠倒若干次混匀磁珠，操作须轻柔，不宜剧烈涡旋震荡等，避免蛋白变性。
2. 维持 pH 为 6-8，避免高速离心、干燥或冻存。
3. 勿长时间将磁珠置于磁场中，否则可能会引起磁珠聚团。
4. 经测试，反复冻融 3 次以上不影响使用效果。
5. 收集蛋白样品后尽快完成纯化工作，并应始终 4 °C 或冰浴放置，以减缓蛋白降解或变性。
6. 为有效抑制蛋白降解，可以在蛋白样品中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，如蛋白酶抑制剂 Cocktail-K1007、磷酸酶抑制剂 Cocktail-K1015、去乙酰化酶抑制剂-K1017 等。
7. 酸性溶液洗脱时磁珠可能会发生聚集，属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。0.1 % 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，并且不会影响磁珠的抗体结合效率。高浓度的 DTT、巯基乙醇、盐酸胍等对本产品与标签蛋白的结合可能有一定影响。
8. 本产品仅限于科学用途使用。

