

Version: 02
Update: 06/12/2023

AmMag™ Protein A Magnetic Beads

Cat No: L00695

目录

I. 产品描述	1
1. 用途	1
2. 原理	1
3. 材料说明	1
II. 操作步骤	2
1、磁珠预处理	2
2、目的抗体吸附和磁珠洗涤	2
3、抗体洗脱	2
4、CIP	3
III. 应用案例	3
1、应用案例1: GenScript AmMag™ Protein A 磁珠耐碱性测试	3
2、应用案例2: 不同厂家 Protein A 磁珠耐碱性测试对比	3
3、应用案例3: 从小鼠腹水中纯化抗体	4
IV. 故障排除	4
V. 通用信息	5
1. 储存和稳定性	5
2. 技术支持	5
3. 警告	5
4. 相关产品	5

I. 产品描述

1. 用途

GenScript AmMag™ Protein A 磁珠专为高通量抗体纯化和优化而开发。

2. 原理

将 AmMag™ Protein A Magnetic Beads 添加到含有抗体的样品中并在振荡器上孵育（孵育时间取决于样品浓度），使抗体与磁珠结合。结合到磁珠上的抗体可以通过使用磁性分离装置来促进酸性洗脱。磁分离免去样本离心步骤，减少样品纯化时间及成本投入，更适合高通量样本纯化。

蛋白 A 是一种从金黄色葡萄球菌中分离出来的细菌细胞壁蛋白，主要与 IgG 的 Fc 区结合。耐碱蛋白 A 不仅保持与免疫球蛋白分子 Fc 区的特异性结合能力，而且耐受碱性条件，可经受严格的清洗程序（详见 II.4 CIP 部分）。在 1 mg/mL human IgG 的浓度下，1 mL 沉降磁珠可以捕获 40 mg 抗体。

3. 材料说明

➤ 提供材料

GenScript AmMag™ Protein A Magnetic Beads 是直径为 45-100 μm 的超顺磁珠，共价包被耐碱蛋白 A。磁珠储存在 20% 乙醇中，以 25% 浆液形式提供。

➤ 额外需要的材料

漩涡振荡器或旋转混合仪
 磁性分离架 (L00722 和 L00723)
 试管和移液器

➤ 额外需要的缓冲液

结合/洗涤缓冲液: 1×PBS, 0.1% Tween 20 (可选), pH 7.0

洗脱缓冲液: 1. 0.1 M 甘氨酸, pH 2-3
 2. 0.1M NaAc-HAc, pH3.6

注意: 请使用上述缓冲液之一进行洗脱。

中和缓冲液: 1 M Tris, pH 8.5

磁珠再生缓冲液: 0.1M NaOH

II. 操作步骤

该方案使用 100 μ L AmMag™ Protein A Magnetic Beads 纯化 human IgG 样品。根据您的样品体积和抗体浓度, 以确定最适合纯化的磁珠体积。

表1 L00695 动态载量

样品浓度 (hIgG)	动态载量 (mg/mL)			
	室温/2h	37°C/过夜	4 °C/2h	4 °C/过夜
0.01 mg/mL	2.5	2.5	2.5	2.5
0.02 mg/mL	5	5	5	5
0.1 mg/mL	20	30	15	20
0.5 mg/mL	35	60	30	50
1 mg/mL	45	70	40	60
3 mg/mL	70	100	60	85

1、磁珠预处理

- 1) 摇晃瓶子使磁珠完全重悬。
- 2) 吸取 400 μ L 悬浆液 (100 μ L 纯磁珠) 转移到一个干净的 EP 管中。
- 3) 将 EP 管放在磁力架上以收集磁珠, 吸取并丢弃上清液。
- 4) 向 EP 管中加入 1 mL 结合/洗涤缓冲液并颠倒试管数次以混合。使用磁分离架收集磁珠并丢弃上清液, 重复此步骤两次。(对于需要控制内毒素的客户, 请按照步骤 5-6 进行。)
- 5) 向装有磁珠的 EP 管中加入 1 mL 0.1 M NaOH, 孵育 15 分钟。然后使用磁分离架收集磁珠并丢弃上清液, 重复此步骤两次。
- 6) 向 EP 管中加入 1 mL 结合/洗涤缓冲液, 颠倒试管数次。使用磁分离架收集磁珠并丢弃上清液, 重复此步骤两次。

2、目的抗体吸附和磁珠洗涤

- 1) 将含有目标抗体的样品加入 EP 管中, 轻轻倒置试管混合。
- 2) 将 EP 管在室温下混合或在旋转器上孵育, 孵育时间可以参照表 1 (1~4 小时或过夜)。
注意: 如果目的蛋白质不稳定且容易降解, 可以添加 100 mM PMSF 以防止蛋白质降解。
- 3) 使用磁分离架收集磁珠并弃去上清液。如有必要, 保留上清液进行分析。
- 4) 向 EP 管中加入 1 mL 结合/洗涤缓冲液并充分混匀, 使用磁力架收集磁珠并弃去上清液。再重复洗涤步骤三遍。

3、抗体洗脱

- 1) 向 EP 管中加入 500 μ L 洗脱缓冲液, 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°C) 置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转 EP 管孵育 5 分钟。
- 2) 使用磁分离架收集磁珠, 将含有洗脱抗体的上清液转移到干净的 EP 管中。
- 3) 重复步骤 1 和 2 两次。
 向每 500 μ L 洗脱液中加入 1/10 的中和缓冲液以中和 pH, 以利于维持抗体的生物活性, 避免抗体失活。如果需要, 可以通过透析或脱盐进行缓冲液交换。

4、CIP

CIP（原位清洗）：先用 500 μ L 1 X PBS 清洗磁珠，然后用 1 mL 的 0.1 M NaOH 孵育磁珠 15 分钟。磁性分离磁珠后弃上清液，再加入 1 mL 的 0.1 M NaOH 进一步处理 15 分钟。磁性分离磁珠后弃上清液，然后用 1 X PBS 清洗磁珠 3 次，之后将磁珠储存在 20% 乙醇中。

III. 应用案例

1、应用案例1：GenScript AmMag™ Protein A 磁珠耐碱性测试

使用 0.1 M NaOH 再生 AmMag™ Protein A 磁珠，并测试其载量。

实验条件：样品浓度 5 mg/mL，样品体积 5 mL，磁珠体积 0.1 mL，室温孵育 1 小时。

实验流程：

- 加入 5 MV PBS 洗涤磁珠 3 次（注：MV指加入的纯磁珠体积）；
- 加入 20 MV 0.1M NaOH 浸泡磁珠 15 分钟，重复 2 次，共 30 分钟；
- 加入 5 MV PBS 洗涤磁珠 3 次。

Saturated Capacity after Alkaline-treatment Cycles					
Sample	hlgG:5 mg/mL, 5 mL	hlgG:5 mg/mL, 5 mL	hlgG:5 mg/mL, 5 mL	hlgG:5 mg/mL, 5 mL	hlgG:5 mg/mL, 5 mL
AmMag™ Protein A Magnetic Beads Volume	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Incubation time	1 h	1 h	1 h	1 h	1 h
Cycles of NaOH treatment	0	10	20	30	40
Binding capacity(mg/mL)	91.71	76.57	74.82	73.17	73.48
Percentage drop in load		15.14%	18.42%	20.34%	19.88%

结论：AmMag™ Protein A Magnetic Beads重复碱处理 40 次后，饱和载量损失小于20%。

2、应用案例2：不同厂家 Protein A 磁珠耐碱性测试对比

实验条件：样品浓度5 mg/mL，样品体积 5 mL，磁珠体积 0.1 mL，室温孵育 1 小时。

磁珠品牌	洗脱液	洗脱1、2、3 体积 (mL)	洗脱1 浓度 (mg/mL)	洗脱2 浓度 (mg/mL)	洗脱3 浓度 (mg/mL)	载量 (mg/mL)	载量下降率 (%)
公司 Y	0.1 M 甘氨酸 (pH 3.0)	0.5	2.045	0.408	0.205	13.29	/
公司 Y-0.1 M NaOH处理			1.559	0.906	0.189	13.27	0.15
公司 T			12.751	1.555	0.19	72.48	/
公司 T-0.1 M NaOH处理			10.388	1.448	0.158	59.97	17.26
金斯瑞			15.693	1.653	0.199	87.725	/
金斯瑞-0.1 M NaOH处理			15.281	1.693	0.2	85.87	2.12

结论：（1）竞品公司Y Protein A耐碱磁珠载量最低；

（2）0.1 M NaOH 处理 24 h后，竞品公司T Protein A耐碱磁珠载量下降 17.26%，金斯瑞 Protein A 耐碱磁珠载量下降2.12%；

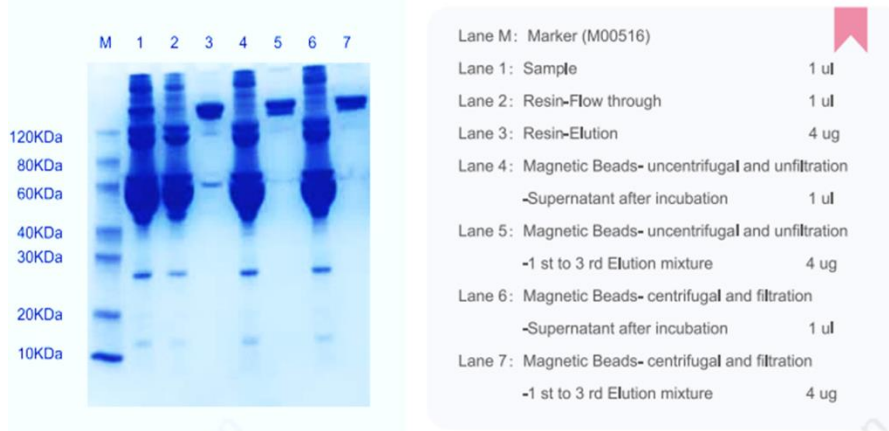
（3）从耐碱 24 h 处理结果可推算出，金斯瑞 AmMag™ Protein A Magnetic Beads 循环使用次数显著多于竞品公司磁珠。

3、应用案例3：从小鼠腹水中纯化抗体

Sample(M087-1, Mouse IgG2b, k)	Dilute 10 mL Mouse ascites with 10 mL PBS
MagBeads	AmMag™ Protein A Magnetic Beads
MagBeads volumn	1 mL
Wash Buffer	PBS
Elution Buffer	0.1 M Acetic Acid-Sodium Acetate,pH 3.6
AmMag™ SA	Cat No.L00768

Sample(M087-1, Mouse IgG2b, k)	Dilute 10 ml Mouse ascites with 10ml PBS
Resin	1ml Monofinity A Resin Prepacked columnn
Wash Buffer	PBS
Elution Buffer	0.1M Acetic Acid-Sodium Acetate,pH3.6
AKTA	Pure-25

Instrument	Sample Processing Method	1 st Elution volumn (mL)	1 st Elution concentration (mg/mL)	2 nd Elution volumn (mL)	2 nd Elution concentration (mg/mL)	3 rd Elution volumn (mL)	3 rd Elution concentration (mg/mL)	Antibody recovery (mg)
AmMag™S A	uncentrifugal and unfiltration	3.6	2.423	3.66	0.586	3.66	0.227	11.698
AmMag™S A	centrifugal and filtration	3.79	2.439	3.62	0.427	3.7	0.104	11.174
AKTA	centrifugal and filtration	4.4	2.533	/	/	/	/	11.145



结论：AmMag™ Protein A Magnetic Beads在纯化 IgG1 样品上纯度与回收率与填料相当。

IV. 故障排除

查看以下信息以解决您在使用 GenScript AmMag™ 蛋白 A 磁珠在实验中所遇到的问题。

问题	可能原因	解决办法
磁力架难以吸附磁珠	磁珠用量过多	减少磁珠使用量
已添加大量样品，但检测到的目标特异性抗体较少	样品中目的抗体浓度较低	细胞上清液样品使用无血清培养基。 将样品与磁珠在 4°C 下结合过夜。
目的抗体发生降解	该抗体对低 pH 洗脱缓冲液敏感 下游应用对中和的洗脱缓冲液敏感	尝试另一种洗脱试剂，例如 0.1M 醋酸钠，pH3.6 将蛋白酶抑制剂添加到结合/洗涤和洗脱缓冲液中。 将洗脱样品脱盐或透析到合适的缓冲液中。
洗脱液中未检测到抗体	样品中的抗体不能与蛋白A结合	尝试金斯瑞 Protein G MagBeads 或 Protein A/G MagBeads。

V. 通用信息

1. 储存和稳定性

在 2-8°C 未开封的情况下，本产品可以保存 2 年。**不要冻存产品**。在储存和所有处理步骤期间将磁珠保持在液体悬浮液中。干燥会导致结合能力丧失并导致性能下降。每次使用前需重新悬浮磁珠。

2. 技术支持

请联系金斯瑞以获取更多技术信息（参见联系方式）。产品说明书、SDS和COA文件可以在金斯瑞官方网站(<https://www.genscript.com.cn/product/documents?ent-SDS>)通过货号 (Cat.No.)、批次号 (Lot.No.) 查询获得。

3. 警告

本产品仅供研究使用。除非另有说明，否则不适用于任何动物或人类治疗或诊断用途。本产品含有 20 % EtOH 作为防腐剂。含有易燃液体和蒸气。闪点 38°C，R-10 易燃。

4. 相关产品

货号	产品名称
L00672	Protein A Magnetic Beads MX
L00673	Protein G Magnetic Beads MX
L00274	Protein G Magnetic Beads
L00273	Protein A MagBeads
L00776	AmMag™ Ni Magnetic beads
L00936	Streptavidin Magnetic Beads
L00277	Protein A/G Magnetic Beads
L00295	Ni-Charged Magnetic Beads
L00895	Glutathione Magnetic Beads
L00403	High-Affinity Iodoacetyl Resin
L00722	AmMag™ MR-mini Magnetic Rack
L00723	AmMag™ MR Magnetic Rack

For research and manufacturing use. Direct human use, including taking orally and injection are forbidden.

生产商：南京金斯瑞生物科技有限公司 江苏省南京市江宁区科学园雍熙路28号

Manufacturer: Nanjing GenScript Biotech Co., Ltd. No. 28 Yongxi Road, Jiangning District, Nanjing, Jiangsu, China