

rProtein A/G IP/Co-IP Kit

蛋白 A/G 免疫(共)沉淀试剂盒

产品简介

rProtein A/G IP/Co-IP kit (蛋白 A/G 免疫 (共) 沉淀试剂盒)是一种通过高质量的重组 Protein A/G 磁珠，配合用户自备的特异性抗体，进行目的蛋白免疫沉淀或免疫共沉淀的试剂盒。本试剂盒包含足够完成 40 个反应的试剂，每个反应使用 25 uL 磁珠，同时可进行 10 个阴性对照。

rProtein A/G 免疫沉淀磁珠使用“纳米表面生物技术”(S-TEC)，将 rProtein A/G 高密度定向包被到粒径为 200 nm 的纳米磁珠表面，纳米级磁珠提供的超大比表面积，具有更多的结合位点、更高的抗体结合能力和极低的蛋白非特异性吸附率。蛋白 A/G 免疫 (共) 沉淀试剂盒配有经过优化验证的必要试剂，为免疫 (共) 沉淀实验提供了最佳的反应条件，增强了免疫 (共) 沉淀实验的稳定性。本产品可广泛应用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中抗原的免疫 (共) 沉淀反应。

天然蛋白 A (Protein A) 是一种发现于金黄色葡萄球菌的细胞壁表面蛋白，天然蛋白 G (Protein G) 是一种分离自 G 型或 C 型链球菌属的细胞表面蛋白，二者功能相似，主要通过与其免疫球蛋白 (Ig) 的 Fc 区相互作用，可结合大多数哺乳动物的 IgG，但在两者结合特异性上有所不同。rProtein A/G 免疫磁珠同时共价偶联了蛋白 A 和蛋白 G，比单独的蛋白 A 或者蛋白 G 都有更广的结合范围，实用性更高。同时，本品使用的是基因改造后的蛋白 A 和蛋白 G，不仅维持其本身的 Ig 亲和特性，同时也去除了天然蛋白本身的非主要结合域以降低非特异性结合。

产品信息

类别	编号	组分名称	36421ES40 (40T)	保存方式	翌圣货号
Part I	36421-A	Lysis Buffer for IP Assays 免疫沉淀用(IP)裂解液	100 mL	-25~-15°C	20118ES
	36421-B	蛋白酶抑制剂 Cocktail,EDTA-free,100× DMSO 储液	1 mL	-25~-15°C	20124ES
	36421-C	Mouse IgG(1mg/mL)	25 uL	-25~-15°C	36111ES
	36421-D	Rabbit IgG(1mg/mL)	25 uL	-25~-15°C	36113ES
	36421-E	5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	1 mL	-25~-15°C	20315ES
Part II	36421-F	rProtein A/G MagBeads (IP Grade)	1 mL	2~8°C	36417ES
	36421-G	1x TBS Buffer, TBS 缓冲液(粉末), PH 7.4,1L	1 L	RT	60157ES
	36421-H	洗脱缓冲液	5 mL	2~8°C	N/A
	36421-I	中和缓冲液	1 mL	2~8°C	N/A

储存条件

Part I -25~-15°C保存; Part II 2~8°C保存; 有效期 1 年。

Part II 中的 rProtein A/G MagBeads (IP Grade), 避免冷冻。

使用说明

工作液浓度应根据具体实验确定，建议进行预实验摸索最佳实验浓度。

1. 缓冲液配制

裂解缓冲液: 免疫沉淀用(IP)裂解液 (36421-A) 可解冻后直接使用。

平衡/结合/洗杂缓冲液: 1x TBS Buffer, TBS 缓冲液(粉末), PH 7.4,1L (36421-G) , 使用时用蒸馏水或超纯水溶解, 定容至 1L 即可。

洗脱缓冲液: 洗脱缓冲液 (36421-H) 可直接使用。

中和缓冲液: 中和缓冲液 (36421-I) 可直接使用。

SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)的配制: 取适量 SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X) (36421-E) 用水稀释 5 倍即为 SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)。

2. 抗原样品制备

本操作说明书提供以下四种样品处理方法, 建议您根据不同来源的抗原样品选择适当的方式进行预处理, 使待检测抗原释放至样品溶液中。

血清样品处理: 若目标蛋白丰度较高, 建议用结合缓冲液稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 置于冰上备用(或置于 -20°C 长期保存)。

悬浮细胞样品处理: 离心收集细胞 (4°C , 1000g, 5 min) , 用手指把细胞用力弹散。按照 6 孔板每孔细胞加入 150-250 μL 裂解液的比例加入含蛋白酶抑制剂的裂解液(裂解液应在使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂 Cocktail, 使蛋白酶抑制剂 Cocktail 的最终浓度为 1 \times)。混匀后置于冰上处理 10 min; 离心收集上清液 (4°C , 14000g, 10 min) , 置于冰上备用 (或置于 -20°C 长期保存)。

贴壁细胞样品处理: 移去培养基, 用 PBS 清洗细胞两遍; 用细胞刮棒刮脱细胞, 收集至 1.5mL EP 管内, 按照 6 孔板每孔加入 150-250 μL 裂解液的比例加入含蛋白酶抑制剂的裂解液(裂解液应在使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂 Cocktail, 使蛋白酶抑制剂 Cocktail 的最终浓度为 1 \times)。用枪吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触。混匀后置于冰上处理 10 min; 离心收集上清液 (4°C , 14000g, 10 min) , 置于冰上备用 (或置于 -20°C 长期保存)。

大肠杆菌样品处理: 离心收集大肠杆菌 (4°C , 12000g, 2 min) , 弃上清后称重, 按每克(湿重)菌体 10 mL 的比例用 1 \times PBS 洗涤 2 次; 按每克(湿重)菌体 5-10 mL 的比例加入结合缓冲液, 同时加入蛋白酶抑制剂 Cocktail, 重悬菌体, 超声裂解细胞, 离心收集上清 (4°C , 17000g, 10 min) 。

3. 磁珠预处理

1) 将磁珠漩涡振荡 1 min, 使其充分混悬;

2) 取 25 μL 磁珠悬液置于 1.5 mL EP 管中, 放置在磁分离器上, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃保护液。

3) 加入 200 μL 结合缓冲液洗涤, 进行磁性分离, 吸弃上清, 重复 1 次。

4. 抗体吸附

1) 加入目标抗体溶液 (2-10 μg 抗体总量) , 充分混匀。

2) 室温孵育 10 min, 可以振荡或漩涡混合均匀。

3) 将 EP 管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清液。如需要可留做进一步检测。

4) 加入 500 μL 洗杂液混合均匀, 置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清液。重复洗杂至少 3 次。

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 TBS 稀释适量的 Mouse IgG 等以用于降低背景或作为阴性对照。

5. 抗原结合反应

1) 加入含有抗原的样品 (通常 300-500 μL , 每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500 ~1500 μg), 用移液器轻轻吹打使抗原与磁珠-抗体复合物均匀分散。

2) 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。

3) 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, 以备后续检测。

4) 向离心管中加入 1 mL 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, 再重复洗涤两次。

6. 抗原洗脱

A. 变性洗脱 此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。

1) 从磁分离器上取下离心管, 向其中加入 80~100 μ L 1 \times SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀, 95°C 加热 5min。

2) 置于磁性分离器上, 进行磁性分离, 收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。

B. 非变性洗脱

1) 向磁珠-抗体-抗原复合物中加入 100 μ L 洗脱液, 混合均匀, 室温孵育 10 min。

2) 置于磁性分离器上, 进行磁性分离, 收集洗脱液至新的 EP 管中。

3) 重复步骤 1) 和 2), 收集洗脱液, 与 2) 中洗脱液混合, 加入中和液中和至 pH7.0-8.0。

注意事项

1. 请勿高速离心、干燥或冷冻磁珠, 这些操作会导致磁珠聚集而降低结合能力。

2. 本试剂盒提供的 Lysis Buffer for IP Assays 经反复测试, 适合很多情况下的免疫沉淀或免疫共沉淀时的样品裂解和后续的洗涤。但 IP 实验中不同类型的抗体与抗原结合的亲和性是有区别的, 抗体与抗原结合还会受到 Lysis/Wash Buffer 的影响, 因此可自行优化操作细节或者筛选及配制缓冲液进行实验。

3. 本产品仅作科研用途。

4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并佩戴一次性手套操作。