



rProtein A/G Magnetic IP/Co-IP Kit

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 操作步骤.....	1
3. 注意事项.....	3
4. 问题及解决方案.....	3
5. 订购信息及相关产品.....	3
6. 附表.....	4

1. 产品介绍

rProtein A/G Magnetic IP/Co-IP Kit 是一款能够高效完成免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验的试剂盒。包含高性能 rProtein A/G MagPoly Beads, 能够实现快速便捷的磁性分离。聚合物磁珠的配体是重组蛋白 A/G (约 14 kDa), 同时拥有蛋白 A 和蛋白 G 的 IgG 结合结构域, 具有更广的抗体亚型结合范围。试剂盒内经过优化的缓冲液, 为免疫沉淀实验提供了良好的反应条件, 增强了免疫沉淀实验的稳定性。试剂盒的洗脱方式多样, 既可以用低 pH 的洗脱液将免疫复合物从蛋白 A/G 磁珠上洗脱, 也可以使用电泳上样缓冲液以变性条件洗脱免疫复合物, 直接进行后续检测分析。

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沉淀反应, 具体组分见表 1。

组分名称	规格 (10 T)	规格 (50 T)
rProtein A/G MagPoly Beads	200 μ L (10 mg/mL)	1 mL (10 mg/mL)
Lysis/Washing Buffer(5 \times)	25 mL	50 mL*2
Lysis/Washing Buffer Enhanced	250 μ L	1 mL
Elution Buffer	500 μ L	1 mL*5
Neutralization Buffer	2 mL	2 mL

表 1. rProtein A/G Magnetic IP/Co-IP Kit 产品组分

2. 操作步骤

2.1 缓冲液的准备

可使用试剂盒准备的缓冲液, 也可根据实际情况配制不同的缓冲液体系。Lysis/Wash Buffer(5 \times) 在使用前请用纯化水稀释至并标记为 1 \times Lysis/Wash Buffer, 另根据需求, 补加终浓度为 0.1%-1% 的 Lysis/Wash Buffer Enhanced, 标记为 1 \times Lysis/Wash Buffer(Enhanced)。所有缓冲液在使用前建议用 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 滤膜过滤, 稀释后的缓冲液建议 4 $^{\circ}$ C 保存, 若试剂浑浊, 请立即丢弃。

下列可能用到的试剂及材料未提供, 需额外准备:

- 1) 电泳上样缓冲液, 非还原性 (5 \times): 0.3 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 50% 甘油, 0.5% 溴酚蓝
- 2) 二硫苏糖醇 (DTT)
- 3) 蛋白酶抑制剂
- 4) 免疫沉淀所用抗原、抗体

2.2 样品准备

请根据样品来源、类型选择合适的裂解方式。如有必要, 裂解后可考虑采用电泳法、BCA 蛋白定量法等方式初步测定裂解液中总蛋白浓度及目的蛋白表达情况, 便于下一步实验中上样量的确定。

方案 I: 贴壁细胞的裂解

- 1) 小心去除单层细胞的培养基。
- 2) 用预冷 PBS 清洗细胞两次。
- 3) 根据表 2 的推荐体积向细胞中加入预冷的 1 \times Lysis/Wash Buffer(Enhanced)。冰上孵育 5 min, 期间混匀几次。
- 4) 将上述裂解好的样品转移至一个新的离心管中, 约 13,000 \times g 离心 10 min, 分离细胞碎片。
- 5) 将上清转移到一个新管中, 进行蛋白浓度测定及后续实验, 标记为细胞裂解样品。



培养皿大小/表面积	免疫沉淀裂解缓冲液体积
100×100 mm	500-1000 μL
60×60 mm	250-500 μL
6孔板	200-400 μL/孔
24孔板	100-200 μL/孔

表2. 针对各种标准培养皿的1×Lysis/Wash Buffer(Enhanced)的推荐使用体积

方案 II: 悬浮培养细胞的裂解

- 1) 将细胞悬液以 1,000×g 离心 5 min, 收集细胞, 弃上清。
- 2) 用预冷 PBS 将细胞团轻轻重悬, 将细胞悬液以 1,000×g 离心 5 min, 收集细胞, 弃上清。
- 3) 向细胞团块中加入预冷 1×Lysis/Wash Buffer(Enhanced)。每 50 mg 细胞团块使用 500 μL。
- 4) 将上述裂解好的样品在冰上孵育 5 min, 期间混匀几次。13,000×g 离心 10 min, 去除细胞碎片。
- 5) 将上清转移到一个新管中, 备蛋白浓度测定及后续实验, 标记为细胞裂解样品。

2.3 免疫沉淀

抗原、抗体与磁珠的结合顺序可根据实际情况调整, 不同的孵育顺序对最终纯度及抗原产量均有影响, 以下方案为推荐常用的实验方法。

2.3.1 磁珠漂洗

- 1) 将 rProtein A/G MagPoly Beads 充分混匀, 取 20 μL (0.2 mg) 加入 1.5 mL 离心管中。
- 2) 向磁珠中加入 180 μL 1×Lysis/Wash Buffer(Enhanced), 轻微涡旋混匀。
- 3) 将离心管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清。
- 4) 向离心管中加入 1 mL 1×Lysis/Wash Buffer(Enhanced), 颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 min, 将离心管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清。

2.3.2 免疫沉淀

方案一

- 1) 向上述准备好的磁珠(步骤 2.3.1)中加入抗体, 抗体推荐用量 2-10 μg, 用抗体保存液或 1×Lysis/Wash Buffer 补充体积至 500 μL, 室温混旋孵育 30 min*, 将离心管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸取上清留样, 用于后续检测。
- 2) 向孵育后的磁珠中加入 500 μL 1×Lysis/Wash Buffer, 颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 min, 将离心管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清, 重复本步骤至少两次。
- 3) 向清洗后的磁珠加入 500 μL 细胞裂解样品 # (步骤 2.2), 室温混旋孵育 30 min*, 将离心管置于磁力架上, 待磁珠全部吸附后, 吸取上清留样, 用于后续检测。

注*: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温 0.5 h-2 h 或者 4°C、1 h-16 h, 根据实际的结合效果进行调整。

注#: 每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500-1000 μg, 裂解液体积不足 500 μL 可用 1×Lysis/Wash Buffer(Enhanced) 补足。

注*: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温 0.5 h-2 h 或者 4°C、1 h-16 h, 根据实际的结合效果进行调整。

方案二

- 1) 在离心管中, 将细胞裂解样品(步骤 2.2)与抗体混合孵育 30 min#。注#: 推荐抗体用量为 2-10 μg, 每个免疫沉淀反应推荐的细胞裂解液总蛋白量为 500-1000 μg, 体积不足建议用 1×Lysis/Wash Buffer(Enhanced) 将样品体积调整至 500 μL。
- 2) 将孵育后的样品加入准备好的磁珠(步骤 2.3.1)中混旋孵育*。
- 3) 将离心管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸取上清留样, 用于后续检测。

2.3.3 磁珠漂洗

- 1) 向步骤 2.3.2 中孵育完成的磁珠加入 500 μL 1×Lysis/Wash Buffer(Enhanced), 颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 min, 将离心管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清, 重复本步骤一次。
- 2) 向清洗后的磁珠加入 500 μL 1×Lysis/Wash Buffer(Enhanced), 连同磁珠转移至一个新 EP 管中, 颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 min, 将离心管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸弃上清。

2.3.4 洗脱

方案一 低 pH 洗脱

向漂洗后的磁珠加入 50 μL Elution Buffer, 室温混旋孵育 10 min, 将离心管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸取上清为洗脱液, 加入 5-10 μL Neutralization Buffer。

方案二 备选洗脱方法(变性洗脱)

向清洗后的磁珠加入 50 μL(1×) 电泳上样缓冲液, 将样品置于金属浴中, 99-100°C 加热 10 min。通过磁分离器分离磁珠, 保留含有目的抗原的上样缓冲液。

注: 两种洗脱方案均包含捕获抗体及目的抗原, 低 pH 洗脱样本中抗体为完整结构, 变性洗脱样本中抗体解离为重链、轻链, 请根据后续实验需求选择洗脱方案。



3. 注意事项

- 1) 在进行免疫沉淀操作之前,请务必认真阅读此说明书。
- 2) 除非另有说明,所有操作建议于 4°C 下进行。
- 3) 在保证洗杂效果的前提下,如果使用 1×Lysis/Wash Buffer(Enhanced) 洗杂,会造成抗体和介质,或者抗原和抗体之间结合效果降低,建议使用 1×Lysis/Wash Buffer 进行洗杂。
- 4) 磁珠应保存在储存溶液中,防止干燥,使用前请充分混匀。
- 5) 如果需要在还原条件下洗脱,向 1× 电泳上样缓冲液中加入 DTT (终浓度 10-20 mM)。
- 6) 经煮沸后的磁珠易聚集并且失去抗体结合能力,经煮沸的磁珠不应再次使用。
- 7) 为保证最佳的实验结果,请选择特异性较强的抗体进行免疫沉淀反应。
- 8) 对于免疫沉淀实验,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影响,因此,若本试剂盒提供的缓冲体系不能获得很好的实验结果,可自行优化缓冲液进行实验。
- 9) 实验设计时,建议加入对照组,以备后续实验结果分析。
- 10) 在确定实验结果前,建议保留各步骤抗原、抗体孵育后的样品以备验证。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
抗原没有免疫沉淀下来	样品中抗原量过少	通过SDS-PAGE或WesternBolt验证蛋白表达或裂解效率,将抗原量提高至推荐用量
	抗体与抗原结合力太弱或无法结合	优化Lysis/Wash Buffer 更换结合力/特异性更强的抗体,或选择另一种识别不同表位的抗体
	蛋白质被降解	加入蛋白酶抑制剂 对温度敏感的抗原,尽量在4°C或冰浴条件下进行实验操作
	蛋白可能是包涵体,没有在上清中	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白,包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式
洗脱组分中没有目的抗原	表达量太低	优化表达条件
	洗脱条件过于温和	延长洗脱液孵育时间,或使用强度更高的洗脱液
洗脱下的抗体条带干扰目标抗原条带判断	抗原条带接近25 kDa或50 kDa	SDS-PAGE前请勿还原样品,抗体条带则迁移至160 kDa附近
		进行蛋白免疫印迹时,选择使用不同种属来源的抗体(例如IP抗体为鼠源的,那么后续WB的抗体可以选择兔源的) 改用直接法将抗体直接交联至磁珠
非特异性条带明显	有非特异性的蛋白结合在磁珠上	优化漂洗液组分,例如补加50-350 mM NaCl
	进行蛋白免疫印迹时,清洗不充分	增加清洗次数

5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
rProtein A/G Magnetic IP/Co-IP Kit	BK0004-01	10 T
	BK0004-02	50 T



6. 附表

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
Human	IgA	variable	—	++
	IgD	—	—	—
	IgE	—	—	—
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	—	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	variable	—	++
Avian egg yolk	IgY	—	—	—
Cow		++	++++	++++
Dog		++++	++	++++
Goat		—	++++	++++
Guinea pig	IgG1	++++	++	++++
	IgG2	++++	++	++++
Hamster		+	++	
Horse	Total IgG	++	++++	++++
Koala		—	+	
Liama		—	+	
Monkey(rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	variable	—	—
Pig		+++	+++	++++
Rabbit	Total IgG	++++	+++	++++
Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep	Total IgG	+/-	++	++