



# MagET™ IP/Co-IP Kit

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 注意事项.....	1
3. 使用流程.....	2
4. 问题及解决方案.....	3
5. 订购信息及相关产品.....	3

## 1. 产品介绍

MagET™ IP/Co-IP Kit 是一款能够配合自动化核酸提取仪，完成免疫沉淀或免疫共沉淀的试剂盒。该试剂盒已经将磁珠、洗杂液等预先分装入 Reagent Strips 中，使用前只需去除封口膜，在样品孔中加入裂解好的样品，然后放入提取仪，选择预先设置好的程序，接下来免疫沉淀的操作将由设备自动完成，大大节省了人工操作时间。

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。另外试剂盒内经过优化的缓冲液，为免疫沉淀实验提供了合适的反应条件，增强了免疫沉淀实验的稳定性。聚合物磁珠的配体是重组蛋白 A/G (约 14kDa)，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、2

表1. MagET™ IP/Co-IP Kit产品组分

组分名称	规格 (8T)	规格 (48T)
MagET™ Reagent Strips	8个	48个
Elution Buffer	1 ml	5 ml
1X Lysis/Washing Buffer(Enhanced)	1 ml	5 ml
Neutralization Buffer	200 µl	1 ml
MagET™洗脱管	8个	48个
MagET™4孔磁棒套	2个	12个

表2. MagET™ Reagent Strips组分

孔位	组分
1	20 µL rProtein A/G MagPoly Beads+ 480 µL 1X IP Lysis/Washing Buffer(Enhanced)
2	N/A
3	800µL 1X Lysis/Washing Buffer(Enhanced)
4	N/A
5	800 µL 1X Lysis/Washing Buffer(Enhanced)

## 2. 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) 如果需要在还原条件下洗脱，向 1X 电泳上样缓冲液中加入 DTT (终浓度 10-20mM)。
- 3) 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。
- 4) 为得到理想的实验结果，请选择特异性较强的抗体进行免疫沉淀反应。



- 对于免疫沉淀实验,不同类型的抗体和抗原结合的亲和性是有区别的,抗体与抗原的结合还会受到影响,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。
- 实验设计时,建议加入对照组,以备后续实验结果分析。
- 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。

### 3.使用流程

#### 3.1 样品准备

##### 方案 I: 贴壁细胞的裂解

- 小心去除单层细胞的培养基。
- 用预冷 PBS 清洗细胞两次。
- 根据表 3 的推荐体积中加入预冷的 1×Lysis/Washing Buffer (Enhanced)。冰上孵育 5 min,期间混匀几次。
- 将上述裂解好的样品转移至一个新的离心管中,13000×g 离心 10 min,分离细胞碎片。
- 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。

表3.针对各种标准培养皿的1×Lysis/Washing Buffer(Enhanced)的推荐使用体积

培养皿大小/表面积	1×Lysis/Washing Buffer (Enhanced)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

##### 方案 II: 悬浮培养细胞的裂解

- 将细胞悬液以 1,000×g 离心 5 min,收集细胞,弃上清。
- 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。
- 向细胞团块中加入预冷 1×Lysis/Washing Buffer(Enhanced)。每 50 mg 细胞团块使用 500 μL。
- 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。
- 将上清转移到一个新管中,以备蛋白浓度测定及后续实验,标记为细胞裂解样品。

#### 3.2 免疫沉淀

抗体推荐用量 2.5 μg,用 1×Lysis/Washing Buffer (Enhanced) 稀释至 500 μL 备用。

#### 3.3 自动化免疫沉淀 --MagET™ Smart 8

- 取出 MagET™ Reagent Strips,颠倒混匀数次使磁珠重悬,使用前小心撕去铝箔封口膜,防止液体溅出。
- 在 MagET™ Reagent Strips 的第 2 孔中加入 3.2 预处理的 500 μL 抗体稀释液,在第 4 孔中加入 3.1 预处理后的 500 μL 细胞裂解样品。向 MagET™ 洗脱管中加入 100 μL Elution Buffer (酸性洗脱)或 100 μL 1× 电泳上样缓冲液(变性洗脱)。
- 将 MagET™ Reagent Strips 和 MagET™ 洗脱管置于 MagET™ Smart 8 核酸提取仪底座上,然后将底座放入 MagET™ Smart 8 核酸提取仪中。
- 将 MagET™ 4 孔磁棒套插入 MagET™ Smart 8 核酸提取仪磁棒套架卡槽内。
- 选择表 4 或表 5 对应的预设程序并运行,自动化程序结束后,取下 MagET™ 4 孔磁棒套丢弃,取出 MagET™ 洗脱管。如果是酸性洗脱,立即向 MagET™ 洗脱管 Elution Buffer 中加入 10-20 μL Neutralization Buffer。
- 如果是变性洗脱,取出 MagET™ 洗脱管,100°C加热 10 min 后,离心取上清,进行电泳。

表4. MagET™ Smart 8 核酸提取仪程序设定(低pH洗脱)

步骤	工作孔位	名称	时长	振幅	频率	吸磁时间	温度	加热时间
1	1	取磁珠	1min	高	快	60s	-	0
2	2	结合	30min	中	中	60s	-	0
3	3	漂洗	1min	中	中	60s	-	0
4	4	孵育	30min	中	中	60s	-	0
5	5	漂洗	1min	中	中	60s	-	0
6	6	洗脱	10min	中	中	90s	-	0
7	1	弃磁珠	1min	高	快	60s	-	0



表5. MagET™ Smart 8核酸提取仪程序设定(变性洗脱)

步骤	工作孔位	名称	时长	振幅	频率	磁吸时间	温度	加热时间
1	1	取磁珠	1min	高	快	60s	-	0
2	2	结合	30min	中	中	60s	-	0
3	3	漂洗	1min	中	中	60s	-	0
4	4	孵育	30min	中	中	60s	-	0
5	5	漂洗	1min	中	中	60s	-	0
6	6	弃磁珠	2min	中	中	60s	-	0

## 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Westernblot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	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。
洗脱组分中没有目的抗原	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。
	表达量太低	优化表达条件。
	洗脱条件过于温和	延长洗脱孵育时间, 或使用强度更高的洗脱液。
洗脱下来的条带干扰目标抗原条带判断	抗原条带接近25kDa或者50kDa	SDS-PAGE前请勿还原样品, 抗体条带则迁移至160kDa附近。 进行蛋白免疫印迹时, 选择使用不同种属来源的抗体。
	有非特异性蛋白结合在介质上	增加漂洗时间。
非特异性条带明显	进行蛋白免疫印迹时, 清洗不充分	增加清洗次数。
	磁珠挂壁	加热托盘左右位置不对
磁珠吸取不完全	混合不完全	在程序中加大振幅和频率。
	吸磁时间短	在程序中延长吸磁时间。

## 5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
MagET™ IP/Co-IP Kit	BK0044-t	8T
	BK0044-01	48T
rProtein A/G MagPoly Beads	MP1001-02	200 µl(10 mg/ml)
	MP1001-03	1 ml(10 mg/ml)
Lysis/Washing Buffer(5×)	BR0040-01	10 ml
	BR0040-02	25 ml
Lysis/Washing Buffer Enhanced	BR0041-01	100 µl
	BR0041-02	500 µl
Elution Buffer	BR0042-01	500 µl
	BR0042-02	1 ml
Neutralization Buffer	BR0043-01	2 ml
MagET™ Smart 8 核酸提取仪	FW610	1 台