

Classic IP/Co-IP Kit

产品信息

产品名称	货号	规格	价格	货期
Classic IP/Co-IP Kit	TW000017	10T	875	1-2 周
	TW000017L	50T	3500	1-2 周

1. 产品介绍

Classic IP/Co-IP Kit 是一款用于免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验的试剂盒。产品基于高性能 rProteinA/G Beads 开发, 配合离心纯化柱和收集管, 能够有效减少处理时间并提高回收率。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。琼脂糖介质的配体重组蛋白 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。产品的洗脱方式多样, 既可以用低 pH 的洗脱液将免疫复合物从蛋白 A/G 介质上洗脱, 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。

表 1. Classic IP Co-IP Kit 产品组分

组分名称	规格 (10T)	规格 (50T)
rProtein A/G Beads	200 μ l	1 ml
Control Agarose Resin	800 μ l	4 ml
IP Lysis/Wash Buffer(5 \times)	10 ml	25 ml \times 2
IP Lysis/Wash Buffer Enhanced	100 μ l	500 μ l
IP Elution Buffer	500 μ l	5 ml
Neutralization Buffer	2 ml	2 ml
Spin Columns	20 套	100 套

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。IP Lysis/Wash Buffer(5 \times)在使用前请稀释至并标记为 1 \times IP Lysis/Wash Buffer, 另根据需求, 补加终浓度为 0.1%-1%的 IP Lysis/Wash Buffer Enhanced, 标记为 1 \times IP 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

2.2.1 动物细胞裂解

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 洗细胞两次。
- 3) 根据表 2 的推荐体积向细胞中加入预冷 1 \times IP 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, 于约 13000 \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。

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

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

方案 II: 悬液培养细胞的裂解

- 1) 将细胞悬液以 1000 \times 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 1000×g 离心 5 min, 收集细胞, 弃上清。
- 3) 向细胞团块中加入冰浴预冷的 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)。每 50 mg 细胞团块使用 500 μl。
- 4) 将裂解液在冰上孵育 5 min, 期间混匀几次。13000×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。

2.2.2 使用 Control Agarose Resin 预处理细胞裂解样品

- 1) 以处理 1 ml 的细胞裂解样品为例, 取 80 μl Smart 对照琼脂糖介质浆液 (40 μl 固相介质) 到 Spin Column 内管中。
- 2) 1000×g 离心 1 min, 去除外管储存缓冲液。
- 3) 取 200 μl 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced), 加入 Spin Column 内管中, 1000×g 离心 1 min 并弃掉外管流穿液体。
- 4) 取 1 ml 细胞裂解样品, 加入含有介质的 Spin Column 内管中, 堵住两端并在 4°C 下孵育 30 min 至 1 h, 同时温和地翻转离心柱以混匀。
- 5) 取下下堵头, 放置于一个新离心管中, 1000×g 离心 1 min, 弃掉含有树脂的 Spin Column 内管, 保留外管流穿液体, 以备后续实验。

2.3 免疫沉淀

抗原、抗体与介质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 介质漂洗

- 1) 将 20 μl rProtein A/G Beads (10 μl 固相介质) 加入一个新的 Spin Column 内管中, 1000×g 离心 1 min, 去除外管储存缓冲液。
- 2) 堵住下堵头, 向介质中加入 180 μl 漂洗缓冲液, 盖上下盖, 轻微混匀。
- 3) 取下下堵头, 将内管放入外管中, 1000×g 离心 1 min, 弃去外管中废液。
- 4) 堵上下堵头, 将内管放回外管中, 向内管中加入 0.5 ml 漂洗缓冲液, 盖上下盖, 轻微混匀, 1000×g 离心 1 min, 弃去外管中废液, 重复至少两次。

2.3.2 免疫沉淀

方案一

- 1) 向上述准备好的介质 (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×IP Lysis/Wash Buffer 补充体积至 500 μl, 堵住下堵头, 盖好上盖, 室温混旋孵育 30 min, 1000×g 离心 1 min, 收集流穿液, 用于后续检测。堵住下堵头后将内管放回外管中。

注: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温、30 min-2 h, 或者 4°C、1 h-16 h, 根据实际的结合效果进行调整。

- 2) 向内管中加入 0.5 ml 1×IP Lysis/Wash Buffer, 颠倒数次或轻微涡旋混匀 1 min, 1000×g 离心 1 min, 去除废液, 堵上下堵头后将内管放回外管中, 至少重复两次。
- 3) 向内管中加入 500 μl 预处理细胞裂解样品 (步骤 2.2.2), 每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500-1000 μg, 体积不足 500 ul 可用 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)补足, 室温混旋孵育 30 min, 1000×g 离心 1 min, 收集流穿液, 用于后续检测, 堵住下堵头后将内管放回内管中。

方案二

- 1) 在新的离心管中, 将预处理细胞裂解样品 (步骤 2.2.2) 与抗体混合孵育 30 min。推荐抗体用量为 2-10 μg, 每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500-1000 μg, 建议用 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)将样品体积调整至 500 μl。

注: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温、30 min-2 h, 或者 4°C、1 h-16 h, 根据实际的结合效果进行调整。

- 2) 将孵育后的样品加入准备好的介质 (步骤 2.3.1) 中, 室温反应 30 min。
注: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温、30 min-2 h, 或者 4°C、1 h-16 h, 根据实际的结合效果进行调整。
- 3) 1000×g 离心 1 min, 收集流穿液, 用于后续检测, 堵住下堵头后将内管放回外管中。

2.3.3 介质漂洗

- 1) 向内管中加入 500 μl 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced), 堵住下堵头, 盖好上盖, 颠倒数次或轻微涡旋混匀 1 min, 1000×g 离心 1 min, 去除外管中废液, 堵上下堵头后将内管放回外管中, 重复清洗至少两次。
- 2) 将内管取出放入一个新的离心管中。

2.3.4 洗脱

方案一 低 pH 洗脱

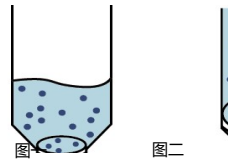
向内管中加入 50 μl IP Elution Buffer, 堵住下堵头, 盖好上盖, 室温混旋孵育 10 min, 1000×g 离心 1 min, 丢弃外管, 收集离心管中洗脱液, 向洗脱液中加入 5-10 μl Neutralization Buffer。

方案二 备选洗脱方法 (变性洗脱)

向内管中加入 50 μ l (1 \times)电泳上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C加热 10 min。1000 \times g 离心 1 min, 保留离心管中含有目的抗原的上样缓冲液。

3. 注意事项

- 1) 建议所有操作在 4 $^{\circ}$ C进行。介质的所有离心步骤需在低速 (如 1000 \times g)、30-60 秒条件下操作。大于 5000 \times g 可能会导致介质聚集, 无法分散。
- 2) 使用 2ml Spin Column 外管时流穿的液体体积应不超过 600 μ l, 使用 1.5 ml 的离心管时则应不超过 300 μ l。
- 3) 介质应保存在储存溶液中, 防止干燥, 使用前请充分混匀。
- 4) 在保证洗杂效果的前提下, 如果使用 1 \times IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)洗杂, 会造成抗体和介质, 或者抗原和抗体质检结合效果降低, 建议可以使用 1 \times IP Lysis/Wash Buffer 进行洗杂。
- 5) 如果需要在还原条件下洗脱, 向 1 \times 电泳上样缓冲液中加入 DTT (终浓度 10-20 mM)。
- 6) 经煮沸后的介质易聚集, 并且配体失去抗体结合能力, 所以无法再次使用。
- 7) 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。
- 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 Lysis/Wash Buffer 的影响, 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, 建议保留各步骤孵育后的样品以备验证。
- 11) Smart Classic IP/Co-IP Kit 配套的 Spin Columns 附有两个规格的垫片, 当使用微量介质 (10-50 μ l) 进行实验时, 请按图一装入垫片, 当使用大量介质 (100-400 μ l) 进行 IP 实验时, 请按图二装入垫片。



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 $^{\circ}$ C或冰浴条件下进行实验操作
洗脱组分中没有目的抗原	蛋白可能是包涵体, 没有在在上清中	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 25kDa 或 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 (例如一抗为鼠 IgG 时, 二抗选用兔 IgG) 改用直接法将抗体直接交联至介质
非特异性条带明显	有非特异性的蛋白结合在介质上	优化漂洗液组分, 例如补加 50-350mM NaCl
	进行蛋白免疫印迹时,清洗不充分	增加清洗次数

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		—	+	
Llama		—	+	
Monkey(rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	variable	—	—
Pig		+++	+++	++++
Rabbit	Total IgG	++++	+++	++++
Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep	Total IgG	+/-	++	++