

Magnetic IP/Co-IP Kit

产品规格信息

产品名称	货号	规格	价格	货期
Magnetic IP/Co-IP Kit	TW000018	10T	1138	1-2 周
	TW000018L	50T	4550	1-2 周

1. 产品介绍

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。其包含高性能 rProtein A/G Magnetic 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 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。

表 1. Magnetic IP/Co-IP Kit 产品组分

组分名称	规格 (10 次)	规格 (50 次)
rProtein A/G Magnetic Beads	200 μ l	1 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	1 ml $\times$ 5
Neutralization Buffer	2 ml	2 ml

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

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, 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: 悬浮培养细胞的裂解

- 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) 向细胞团块中加入预冷 1×IP 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。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。

2.3 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×IP 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×IP 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×IP 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, 留样用于检测。
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) 向离心管中加入 500 μl 1×IP 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, 重复至少两次。
- 3) 向离心管中加入 500 μl 细胞裂解样品 (步骤 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 μl 可用 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)补足, 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, 留样用于检测。
注: 孵育温度和时间范围推荐为: 室温、30 min-2 h, 或者 4°C、1h-16h, 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。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×IP 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。
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) 将离心管置于磁分离器上, 待磁珠全部吸附后, 吸取上清, 留样用于检测。

2.3.3 磁珠漂洗

- 1) 向离心管中加入 500 μl 1×IP 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, 重复一次。
- 2) 向离心管中加入 500 μl 1×IP 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

向离心管中加入 50 μl IP 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)

向离心管中加入 50 μl (1×)电泳上样缓冲液, 将样品置于金属浴中, 96-100°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×IP 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×IP 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) 经煮沸后的填料易聚集并且失去抗体结合能力, 经煮沸的填料不应再次使用。
- 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 Western Blot 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
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填料
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

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	+	++++	++++

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
Koala		—	+	
Llama		—	+	
Monkey(rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	variable	—	—
Pig		+++	+++	++++
Rabbit	Total IgG	++++	+++	++++
Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep	Total IgG	+/-	++	++