

经典 Protein A/G 免疫(共)沉淀试剂盒(磁珠法)

Classic Magnetic Protein A/G IP/Co-IP Kit

本产品 4℃运输；保存于 4℃,其中 **SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)** 需 -20℃保存,保质期 12 个月,**Protein A/G 磁珠** 严禁冻结,长期存放请保证试剂管竖立向上,磁珠浸没于保存液中。

货号规格

货号	规格
YJ201	≥40次

产品简介

本产品能够高效完成抗原免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验，其核心成分 Protein A/G 磁珠采用新一代纳米表面生物技术，将 Protein A/G 高密度共价偶联在超顺磁性纳米微球表面，是纯化大多数免疫球蛋白的理想工具。与传统的 Protein A/G 免疫沉淀琼脂糖凝胶相比，Protein A/G 磁珠具有更大的特异性表面区域及更多的表面抗体结合位点，非特异性结合低，并且每次免疫（共）沉淀可以节省 40% 的时间,使用起来简便高效。

此外，本试剂盒中配有经过优化预制的各种缓冲液，为免疫（共）沉淀实验提供了合适的反应条件，增强了实验的稳定性,可应用于多种样品,细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水以及其它的免疫抗原等均可适用。

产品内容

组分名称	体积及数量
Protein A/G 磁珠	1 mL
裂解/漂洗缓冲液	125 mL
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)	10 mL
洗脱缓冲液	5 mL
中和缓冲液	1 mL

操作步骤

样本处理

- 根据样品种类选择相应的处理方法：
 - 血清样品：**若目标蛋白丰度较高，建议用 **裂解/漂洗缓冲液** 稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 50~150 µg/mL，置于冰上备用(或置于-20℃长期保存)；
 - 悬浮细胞：**离心收集细胞 (4℃, 500×g, 10 min), 弃上清后称重, 按每毫克细胞 50 µL 的比例用 1×PBS(货号: PS110) 洗涤 2 次; 按每毫克细胞 5~10 µL 的比例加入 **裂解 / 漂洗缓冲液**, 同时加入蛋白酶抑制剂 (货号: GRF101), 混匀后置于冰上孵育 5~20 min(期间混匀几次); 离心收集上清液 (4℃, 12,000~16,000×g, 10 min), 置于冰上备用 (或置于 -20℃长期保存);



- C. 贴壁细胞：移去培养基,按每 1.0×10^5 个细胞 150 μL 的比例用 1 $\times$ PBS(货号: PS110) 洗涤两次; 用细胞刮刀刮落细胞,收集至 1.5 mL 离心管内,按每 1.0×10^5 个细胞 20~30 μL 的比例加入 **裂解 / 漂洗缓冲液**,同时加入蛋白酶抑制剂(货号: GRF101),混匀后置于冰上孵育 5~20 min(期间混匀几次);离心收集上清液(4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000~16,000 $\times g$, 10 min),置于冰上备用(或置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存);
- D. 大肠杆菌：离心收集大肠杆菌(4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 $\times g$, 2 min),弃上清后称重,按每克菌体(湿重)10 mL 的比例用 1 $\times$ PBS(货号: PS110) 洗涤 2 次;按每克菌体(湿重)5~10 mL 的比例加入 **裂解 / 漂洗缓冲液**,同时加入蛋白酶抑制剂(货号: GRF101),重悬菌体,超声裂解细胞,离心收集上清(4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000~16,000 $\times g$, 10 min)。
- E. 组织样品：(1) 把组织剪切成细小的碎片;
- (2) 按照每 20 mg 组织样本 150~250 μL 的比例加入 **裂解 / 漂洗缓冲液**;
注意：如果样本裂解不充分,可以适当提高 裂解 / 漂洗缓冲液 的用量;若需要高浓度的蛋白样品,也可适当降低 裂解 / 漂洗缓冲液 的用量。
- (3) 用玻璃匀浆器匀浆,直至样本充分裂解;
注意：若组织样本非常细小,可以适当剪切后直接加入 裂解 / 漂洗缓冲液,通过强烈涡旋振荡使其裂解充分。
- (4) 充分裂解后,10,000~14,000 $\times g$ 离心 3~5 min,小心地将上清液(蛋白样品)移入新的离心管中,即可进行后续步骤。

抗原与抗体结合

2. 用移液器吸取 500 μL 步骤 1 制备好的样品加入 1.5 mL 离心管中,接着在其中加入 2~10 μg 抗体(加入体积可根据抗体浓度计算);
注意：所加入样品中的总蛋白量推荐为 500~1,000 μg 。
3. 置于翻转混合仪上孵育(常温 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 4~6 h 或过夜),形成 **抗原 - 抗体复合物**;

磁珠预处理

4. 用移液器轻柔吹打 **Protein A/G 磁珠**,使其充分混悬,取 25 μL 磁珠悬液置于 1.5 mL 离心管中;
5. 加入 500 μL **裂解 / 漂洗缓冲液**,用移液器轻柔吹打重悬磁珠,接着在磁力架上静置 1 min,待磁珠吸附到离心管侧壁上后,吸弃上清;
6. 重复步骤 5 一次;

磁珠与抗原-抗体复合物结合

7. 结合：将步骤 3 所得的 **抗原 - 抗体复合物** 加入预处理后的磁珠中,置于翻转混合仪上孵育(常温 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 4~6 h 或过夜)。接着在磁力架上静置 1 min,待磁珠吸附到离心管侧壁上后,吸弃上清,离心管中剩余的即为 **抗原 - 抗体 - 磁珠复合物**;
8. 洗涤：在上一步得到的 **抗原 - 抗体 - 磁珠复合物** 中加入 500 μL **裂解 / 漂洗缓冲液**,用移液器轻柔吹打重悬磁珠,接着在磁力架上静置 1 min,待磁珠吸附到离心管侧壁上后,吸弃上清。再重复此步骤两次;
注意：如后续做非变性洗脱,建议再向洗涤后的 抗原 - 抗体 - 磁珠复合物 中加入 500 μL 超纯水,轻柔重悬磁珠,在磁力架上静置 1 min,待磁珠吸附到离心管侧壁上后,吸弃上清;
9. 洗脱：本操作说明书提供以下两种抗原洗脱方案,操作者可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。
变性洗脱：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向步骤 8 洗涤后的 **抗原 - 抗体 - 磁珠复合物** 中加入 80~100 μL 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液(由 5 $\times$ 稀释为 1 $\times$)混合均匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min。待冷却后,将离心管在磁力架上静置 1 min,待磁珠吸附到离心管侧壁上后,收集上清,进行 SDS-PAGE 检测。

常见问题 及对策

非变性洗脱：此方法洗脱的样品保持原有的生物活性，可用于后期功能分析。向步骤 8 洗涤后的 **抗原 - 抗体 - 磁珠复合物** 中加入 50~100 μL **洗脱缓冲液**，室温孵育 5~10 min；将离心管在磁力架上静置 1 min，待磁珠吸附到离心管侧壁上后，收集上清液至新的离心管，每 100 μL 洗出液中加入 10 μL **中和缓冲液** 将洗脱产物 pH 调节至中性，用于后期功能分析。

如何避免磁珠在储存或使用过程中可能出现的聚集情况？

答：磁珠应保存在 2~8℃，使用时应避免由于污染或干燥而导致的聚集。不过，磁珠在低 pH 值的缓冲液中发生聚集属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。在 **裂解 / 漂洗缓冲液** 中添加终浓度为 0.1%(V/V) 的非离子型去垢剂（如 Triton X-100、Tween-20 或 NP-40）可有效防止磁珠聚集。经过低 pH 值洗脱操作的磁珠可以用 **裂解 / 漂洗缓冲液** 洗涤至中性，然后用含有 0.1%(V/V) Tween-20 的 Tris 缓冲液（pH 7.5）振荡重悬磁珠，并用超声波水浴处理 2 min，即可使磁珠恢复均匀状态，以上处理均不影响磁珠的抗体结合效率。

磁珠在使用过程中出现结块现象？

答：磁珠在极少数情况下会出现结块现象，一般较难振荡打散，从而导致分布不均匀，这主要是因为磁珠在磁场中放置太久而牢固地结合在一起。用超声波水浴处理 2 min 即可打散磁珠，但要注意超声处理也会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落，因此磁珠在加样后洗脱前不宜使用该方法。

如何解决磁珠易粘附管壁的现象？

答：建议使用低吸附率的耗材进行磁珠操作。另外，在缓冲液中添加 0.01%~0.1%(V/V) 的非离子型去垢剂（如 Triton X-100、Tween-20 或 NP-40）可以有效降低耗材对磁珠的粘附。

抗原为何没有免疫沉淀下来？

答：

- ① 样品中抗原含量过少，不足以被检测到
建议：通过 SDS-PAGE 或 Western Blot 验证裂解液中蛋白的表达和裂解效率；如有必要，可加大样品用量；
- ② 抗体无法结合抗原
建议：改用另一种特异性抗体，尤其可以选择另一种识别不同抗原表位的抗体；
- ③ **裂解 / 漂洗缓冲液** 中的成分干扰了抗原与抗体的结合
建议：使用其它缓冲液进行免疫沉淀和漂洗（比如可选用含有 0.5% CHAPS 的 TBS 缓冲液）。

为何获得的蛋白量过低？

答：

- ① 蛋白质被降解
建议：加入蛋白酶抑制剂；
- ② 所用的 **Protein A/G 磁珠** 量不够
建议：提高 **Protein A/G 磁珠** 用量；
- ③ 样品中的目标蛋白量不够
建议：提高抗原样品量。

为何有多条非特异条带？

答：有非特异性的蛋白结合在磁珠上
建议：在 **裂解 / 漂洗缓冲液** 中加入 50~350 mM NaCl，并加大洗脱力度和次数。

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其结合力；
2. 免疫（共）沉淀实验中不同类型的抗体与抗原间的亲和力是有区别的，抗体与抗原结合还会受到 **裂解 / 漂洗缓冲液** 的影响，因此，如使用本试剂盒不能获得最佳的实验结果，可自行优化操作细节或者筛选及配制合适缓冲液进行实验；
3. 磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥，使用前应充分振荡混匀；
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
5. 本产品仅限科研使用。