



版本号：202411V00

rProtein A/G Magnetic IP/Co-IP Kit

Protein A/G免疫(共)沉淀试剂盒

目录号：CW8301M

保存条件：2-8℃保存；磁珠组分禁止冻结，长期存放请保证试剂管竖立向上，磁珠浸没于保护液中。

产品内容

Component	CW8301M 50T
rProtein A/G MagPoly Beads (10 mg/mL)	1 mL
Lysis/Washing Buffer(5×)	50 mL×2
Lysis/Washing Buffer Enhanced	1 mL
Elution Buffer	1 mL×5
Neutralization Buffer	2 mL

产品简介

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。其包含高性能 rProtein A/G MagPoly Beads, 能够实现快速便捷的磁性分离。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。聚合物磁珠的配体是重组蛋白 A/G, 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。

注意事项

1. 磁珠组分禁止冻结, 长期存放请保证试剂管竖立向上, 磁珠浸没于保护液中。
2. 除非另有说明, 所有操作建议于4℃下进行。
3. Lysis/Wash Buffer Enhanced 含有去垢剂成分, 能够有效地促进细胞裂解, 并在洗脱过程中有效去除非特异性结合。需要注意的是, 使用该缓冲液进行洗杂 (3.3 磁珠漂洗步骤) 可能会影响抗体与介质、以及抗原与抗体之间的结合效果。可根据具体实验需求选择 Lysis/Wash Buffer 或含 Enhance 组分的 Lysis/Wash Buffer (Enhanced) 进行洗杂。
4. 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)。
5. 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。

6. 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。
7. 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。
8. 实验设计时, 建议加入对照组, 以备后续实验结果分析。
9. 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。
10. 本产品仅限科研使用。

操作步骤

1. 缓冲液准备

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×)在使用前请用纯化水稀释并标记为1×Lysis/Wash Buffer, 另根据需求(注意事项3), 补加终浓度为0.1%-1%的Lysis/Wash Buffer Enhanced, 标记为1×Lysis/Wash Buffer(Enhanced)。所有缓冲液在使用前建议用0.22 μm或者0.45 μm滤膜过滤, 稀释后的缓冲液建议4°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×): 0.3 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 50%甘油, 0.5%溴酚蓝。可选择本公司的SDS-PAGE上样缓冲液(非还原, 5×), 货号为CW0028S;
- 2) 二硫苏糖醇(DTT);
- 3) 蛋白酶抑制剂, 可选择本公司的蛋白酶抑制剂混合物(100×), 货号为CW2200S;
- 4) 免疫沉淀所用抗原、抗体;
- 5) 磁力架, 可选择本公司的16孔磁力架(1.5mL/2mL), 货号为CWE4001。

2. 样品准备

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) 根据下表的推荐体积向细胞中加入1×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 ×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。

不同标准培养皿的裂解缓冲液的推荐使用体积

培养皿	免疫沉淀裂解缓冲液体积
10 cm培养皿	500-1000 μL
60 mm培养皿	250-500 μL
6孔板	200-400 μL/孔
24孔板	100-200 μL/孔

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轻轻重悬细胞团, 将细胞悬液以1,000×g离心5 min, 收集细胞, 弃上清, 重复操作1次。

- 3) 向细胞团块中加入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。

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。

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，将离心管置于磁力架上，待磁珠全部吸附后，吸弃上清。

3.2 免疫沉淀

方案一

- 1) 向上述准备好的磁珠（步骤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，将离心管置于磁力架上，待磁珠全部吸附后，吸取上清留样，用于后续检测。

注意：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。

- 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) 3) 向清洗后的磁珠加入 500 μL 细胞裂解样品，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。

注意：1) 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。

2) 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，将细胞裂解样品与抗体混合孵育30 min。

注意：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3.1）中混旋孵育。

注意：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。

- 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。

3.3 磁珠漂洗

- 1) 向步骤3.2中孵育完成的磁珠加入500 μL 1 \times 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 \times 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。

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 \times)电泳上样缓冲液, 将样品置于金属浴中, 99-100 $^{\circ}\text{C}$ 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。

注意: 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。

问题	原因分析	推荐解决方案
抗原没有免疫沉淀下来	样品中原有过少	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 $^{\circ}\text{C}$ 或并于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SDS-PAGE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