

**免疫（共）沉淀（IP/CoIP）试剂盒(凝胶法)**

Cat# : KA0134

（本品仅用于科学研究，不可用于诊断及治疗）

**1. 背景信息**

本产品由高品质的 Protein A/G 蛋白质与琼脂糖凝胶共价偶联制成，可用于免疫沉淀（IP），也可用于免疫共沉淀（Co-IP）、染色质 IP（ChIP）或 RNA IP（RIP）。本产品具有高载量（可进行 50 次常规 IP 操作）；操作迅速便捷（最短可在 40 分钟内完成一个 IP 流程）；特异性强，非特异性吸附低；可结合范围广（与常见哺乳动物的 IgG 均可以结合）等特点。

**2. 性能指标**

- 应用范围：** 来源于细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水等样品的多个物种的 IgG 类蛋白质（包含大部分 IgG 亚型）的免疫（共）沉淀（见附件）。
- 偶联物属性：** 高纯度的重组 Protein A/G 蛋白质。
- 凝胶属性：** 琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 50um。
- 成分：** 2mL PBS（含 0.02% 叠氮钠和 50%甘油）悬液中，含有 0.5mL 共价偶联 Protein A/G 的凝胶。
- 保存方法：** 在含 0.02% 叠氮钠和 50%甘油的缓冲液中，-20℃可保存 1 年。

**3. 试剂盒组成**

产品编号	组分	规格	保存
L1	细胞裂解液	30ml	4℃一年
/	纯化柱	50 个	室温
G1	ProteinA/G 凝胶	2ml	-20℃一年
E3	酸性洗脱液	1ml	4℃一年
P10	10xPBS（清洗液/储存液）	50ml	4℃一年
P10T	10xPBST（清洗液）	50ml	4℃一年

**注意事项（开箱前必读）**

- 3.1 本试剂盒冷藏条件下运输。收货后请将纯化柱取出，室温保存；凝胶保存于-20℃，试剂盒及其它成分保存于 4℃。
- 3.2 **P10**（10xPBS）及 **P10T**（10xPBST）使用之前需用蒸馏水稀释至 1x 使用。
- 3.3 本试剂盒提供的细胞裂解液 **L1** 为温和裂解液，成分见说明书 5，可根据需要自行配制或另行购买裂解液；
- 3.4 勿冷冻、干燥凝胶，勿使用超声处理凝胶。勿使酸处理凝胶时间超过 10min。
- 3.5 以下操作步骤，使用凝胶悬液用量为 40μl（含 10μl 凝胶），可从 15μl 血清或者 100μl 细胞上清中结合 20ug IgG，请根据待结合抗体量，调节凝胶使用量。
- 3.6 各物种的抗体（IgG, IgM, IgA, IgD）与 Protein A/G 结合亲和力不同，使用请认真阅读本说明书附件。

## 4. 使用方法 (所有步骤尽可能在冰上进行, 以避免目标蛋白质降解。)

### 4.1 血清及分泌表达抗原处理

如果目标蛋白质含量较高, 建议用 1xPBS 稀释样品至目标蛋白质终浓度为 10-100 $\mu$ g/mL, -20 $^{\circ}$ C 保存使用。

### 4.2 细胞裂解液制备

4.2.1 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中, 1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来, 放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。

4.2.2 预冷的 1xPBST 重悬细胞, 1000rpm 离心 3min, 弃上清。重复一次。

4.2.3 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液, (例如: T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%, 一般约 0.5-1 $\times 10^7$  细胞, 需要加入 1ml 细胞裂解液 L1)。反复吹打后冰上放置 10-20min, 让细胞充分裂解。

4.2.4 用超声破碎仪将细胞裂解液超声, 直至细胞裂解液透明, 不再粘稠。冰上放置 30min 之后, 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min。取上清, -80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

### 4.3 装柱及孵育

4.3.1 处理检测抗体: 根据实验目的, 用 1xPBS 将抗体总体积调整至 500 $\mu$ L。

4.3.2 将凝胶充分混悬, 取 40 $\mu$ L 凝胶悬液 (含 10 $\mu$ L 凝胶), 置于纯化柱中, 加入 250 $\mu$ L 1xPBS, 充分混悬, 1000rpm x 30sec, 离心弃上清; 重复以上洗涤步骤 2 次。

4.3.3 将稀释好的抗体加入预洗好的凝胶, 轻柔混匀, 在摇床上室温孵育 10min。

4.3.4 1000rpm x 30sec, 离心, 保存上清液至新的 EP 管中, 以备后续继续使用。

4.3.5 加入 250 $\mu$ L 1xPBS 至凝胶, 温和混匀, 清洗凝胶, 1000rpm x 30sec, 弃上清。重复四次。

### 4.4 抗原与抗体-凝胶复合物结合

4.4.1 加入 200  $\mu$ L 准备好的抗原样品 (见 4.1 和 4.2), 摇床上室温孵育 10min (如果抗体亲和力不够, 4 $^{\circ}$ C 孵育 2hr 或更长时间)。

4.4.2 1000rpm x 30sec, 离心弃上清。加入 250 $\mu$ L 1xPBST, 温和混匀, 清洗凝胶, 1000rpm x 30sec, 离心弃上清。重复四次。

### 4.5 抗原洗脱

本说明书提供以下两种抗原洗脱方案, 请根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。

4.5.1 变性洗脱法: 此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。

步骤: 将凝胶移至 1.5ml 离心管, 离心, 弃上清, 向凝胶中加入 10 $\mu$ L 2x 上样缓冲液, 按体积调整至 1x, 混合均匀, 95 $^{\circ}$ C 煮样 5 mins。分离凝胶, 收集上清, 进行 SDS-PAGE。

4.5.2 酸性洗脱法: 此方法洗脱的抗原, 可用于后期功能分析。

步骤: 向凝胶中加入 100-200  $\mu$ L 酸性洗脱液, 室温孵育 10 mins; 换新的收集管, 1000rpm x 30sec, 收集上清至新的收集管, 并立即滴入总体积 1/10 体积的 pH8.0 的 1M Tris 缓冲液中和, 将洗脱产物 pH 调节至中性, 样品可用于后期功能分析。

注意: 酸性环境会缩短凝胶的使用寿命, 应尽量缩短凝胶与酸性洗脱液的接触时间, 不超过 10min。

注: 本步骤洗脱的抗原为抗原-抗体复合物, 如操作者需要单独洗脱目标抗原, 推荐使用交联剂, 并按相关实验说明操作。

5. 本试剂盒各试剂成分如下

组分	内容物/配方
细胞裂解液 L1	50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1%
酸性洗脱液 E3	0.15M Glycin-HCl 缓冲液, pH3.0
10xPBS (结合液/储存液) P10	1.5M PBS buffer, with 2‰ Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)
10xPBST (清洗液) P10T	1.5M PBS buffer, 1% Tween-20 pH7.5, with 2‰ Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)

附件 1 Protein A/G 与各物种 IgG 结合的亲和力



Human	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
	IgG3	+++++
	IgG4	+++++
	IgM	+
	IgD	-
	IgA	+
	IgE	+++
	Fab	+
	ScFv	+
Mouse	Total IgG	+++++
	IgM	-
	IgG1	+++
	IgG2a	+++++
	IgG2b	+++++
	IgG3	+++++
Rat	Total IgG	+++
	IgG1	+++
	IgG2a	+++++
	IgG2b	+
	IgG2c	+++++

Cow	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
Goat	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
Shhep	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
Horse	Total IgG	+++++
	IgG(ab)	+
	IgG(c)	+
	IgG(T)	+++++
Rabbit	Total IgG	+++++
Guinea Pig	Total IgG	+++++
Hamster	Total IgG	+++
Pig	Total IgG	+++++
Donkey	Total IgG	+++++
Cat	Total IgG	+++++
Dog	Total IgG	+++++
Chicken	Total IgY	-
Monkey	Total IgG	+++++