

免疫（共）沉淀（IP/CoIP）试剂盒(磁珠法)

Cat# : KM0134

（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 蛋白质与磁珠共价偶联制成，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。
- 磁珠属性：** 磁珠颗粒，平均粒径 40um。
- 成分：** 1mL PBS（含 0.02% 叠氮钠）中，含有 0.25mL 共价偶联 Protein A/G 的磁珠。
- 保存方法：** 在已加入 0.02% 叠氮钠的 PBS 保存液中，4°C 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°C—一年
/	磁力架（四孔）	1 个	室温
G1	ProteinA/G 磁珠	2ml	4°C—一年
E3	酸性洗脱液	2ml	4°C—一年
P10	10xPBS（结合液/储存液）	50ml	4°C—一年
P10T	10xPBST（清洗液）	50ml	4°C—一年

注意事项（开箱前必读）

- 3.1 本试剂盒冷藏条件下运输，如果暂时不用，请将磁力架取出，室温保存；试剂盒及其它成分保存于 4°C。
- 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 混匀磁珠时，请采用柔和涡旋，上下颠倒，及摇床混匀等方法。勿离心、干燥磁珠，勿使用超声处理磁珠，勿使酸处理磁珠时间超过 10min。
- 3.5 以下操作步骤，使用磁珠悬液用量为 40μl（含 10μl 磁珠），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，调节磁珠使用量。
- 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 μ 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 抗体与磁珠孵育

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 μ L。

4.3.2 将磁珠充分混悬，取 40 μ L 磁珠悬液(含 10 μ L 磁珠)，置于 1.5 mL EP 管中，加入 500 μ L 1xPBS，充分混悬，置于磁力架上，磁性分离，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磁珠，轻柔混匀，在摇床上室温孵育 10min。

4.3.4 磁性分离，保存上清液至新的 EP 管中，以备后续继续使用。

4.3.5 加入 500 μ L 1xPBS 至磁珠，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复四次。

4.4 抗原与抗体-磁珠复合物结合

4.4.1 加入 400 μ L 准备好的抗原样品(见 4.1 及 4.2)，轻柔混匀，在摇床上室温孵育 10min(如果抗体亲和力不够，4 $^{\circ}$ C 孵育 2hr 或更长时间)。

4.4.2 磁性分离，弃上清。加入 500 μ L 1xPBST，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，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：分离磁珠，弃上清，向磁珠中加入 10 μ 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。分离磁珠，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：分离磁珠，弃上清，向磁珠中加入 50-100 μ L 酸性洗脱液，室温孵育 10 mins；分离磁珠，收集上清至新的 EP 管，并立即滴入总体积 1/10 体积的 pH8.0 的 1M Tris 缓冲液，将洗脱产物 pH 调节至中性，样品用于后期功能分析。

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% Triton X-100 (见 5.3)
酸性洗脱液 E3	0.15M Glycin-HCl 缓冲液, pH2.5-3.0
中和液 N1	1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0
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	+++++