

基础免疫(共)沉淀试剂盒(磁珠法)

Basic IP/Co-IP Kit

本产品 4℃ 运输; 保存于 4℃, 保质期 12 个月。

货号规格

YJ202 ≥40 次

产品简介

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, 细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水以及其它免疫抗原等均可适用, 同时本试剂盒兼容各种免疫磁珠, 琼脂糖凝胶及琼脂糖磁珠。

注意: 本产品不包含免疫磁珠, 需自备, 您可选购雅酶品牌磁珠系列产品。

产品内容

组分名称	体积及数量
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(以 Protein A/G 磁珠为例)

◆ 样本处理

1. 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);
- 贴壁细胞:** 移去培养基, 按每 1.0×10⁵ 个细胞 150 µL 的比例用 1×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 1.0×10⁵ 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℃, 12,000~16,000×g, 10 min), 置于冰上备用(或置于-20℃长期保存);
大肠杆菌: 离心收集大肠杆菌(4℃, 12,000×g, 2 min), 弃上清后称重, 按每克菌体(湿重) 10 mL 的比例用 1×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℃, 12,000~16,000×g, 10 min)。

◆ 抗原与抗体结合

- 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 1h, 4°C 4~6h 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 1h, 4°C 4~6h 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°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。

● **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。

常见问题及对策

◆ 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°C, 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。