



Protein A/G 免疫沉淀试剂盒

Protein A/G Immunoprecipitation Kit

使用说明书
Instruction Manual

产品描述

TargetMol 的 Protein A/G 免疫沉淀试剂盒采用生物纳米表面技术，将 Protein A/G 高密度定向包被到超顺磁性微球表面，可以用于蛋白质、蛋白质复合物、蛋白质核酸复合物和其他抗原的免疫沉淀 (IP)。免疫沉淀磁珠试剂盒配有经过优化的预制缓冲液，为免疫沉淀实验提供了较优的反应条件，增强了实验的稳定性。本品适用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中抗原的免疫沉淀反应。

产品特点

- 1. 非特异性吸附低：**相较于当前免疫磁珠市场上同类产品，本品具有更多的抗体结合位点，使用量更少，并且非特异性结合率低，能够快速高效地进行免疫沉淀实验。
- 2. 高效率、高产量、低消耗：**每毫升免疫沉淀磁珠结合 Human IgG 的能力可达到 300 μg 以上，单个沉淀反应仅需 25 μL 磁珠即可完成检测。
- 3. 操作灵活、简便：**微米级磁珠提供了超大比表面积，显著缩短了抗体与抗原吸附所需的平衡时间，使抗体吸附过程在 15 min 内完成，抗原沉淀操作在 30 min 内完成。
- 4. 实验结果可靠、重复性高：**简短的操作时间避免了长时间操作造成目标蛋白水解的风险，保证了目标蛋白的活性及蛋白复合物的完整性。

产品组成

产品编号	产品名称	产品包装
C0104-1	Protein A/G 免疫沉淀磁珠 Protein A/G Immunomagnetic Beads	1 mL
C0104-2	结合缓冲液 Binding Buffer	30 mL
C0104-3	磷酸盐缓冲液 PBS (10 \times)	20 mL
C0104-4	洗涤缓冲液 Washing Buffer	20 mL
C0104-5	洗脱缓冲液 Elution Buffer	0.5 mL
C0104-6	中和缓冲液 Neutralization Buffer	0.2 mL

Protein A/G 免疫沉淀磁珠	特性
粒径	2 μm
Human IgG 能力 (Antibody Capacity)	0.5~0.6 mg/mL
磁珠浓度	10 mg/mL
保存溶剂	1×PBS, 含 0.1% (w/v) BSA, 0.1% (V/V) proclin-300
适用抗体种属	广谱抗体种属
应用推荐	IP, Co-IP, CHIP

操作说明

1. 抗原样品制备

建议根据抗原样品的不同来源选择适当的预处理方式, 以便将待检测抗原释放到样品溶液中。

- 1) 血清样品: 如果目标蛋白丰度较高, 建议用 Binding Buffer 将血清样品稀释至目标蛋白终浓度为 10~100 μg/mL, 置于冰上备用, 或于 -20 °C 长期保存。
- 2) 悬浮细胞样品: 在无菌条件下将 PBS (10×) 稀释为 1×。离心收集细胞 (4 °C, 500 g, 10 min), 弃上清后称重, 按每毫克细胞 50 μL 的比例用 1× PBS 洗涤两次。然后按每毫克细胞 5~10 μL 的比例加入 Binding Buffer, 同时加入蛋白酶抑制剂 (1 mM PMSF 或蛋白酶抑制剂 Cocktail C0001), 混匀后置于冰上孵育 10 min。离心收集上清液 (4 °C, 14000 g, 10 min), 置于冰上备用, 或于 -20 °C 长期保存。
- 3) 贴壁细胞样品: 吸去培养基, 按每 1.0×10^5 个细胞 150 μL 的比例用 1×PBS 洗涤两次。用细胞刮刀收集细胞, 置于 1.5 mL EP 管, 按每 1.0×10^5 个细胞 20~30 μL 的比例加入 Binding Buffer, 同时加入蛋白酶抑制剂, 混匀后置于冰上孵育 10 min。离心收集上清液 (4 °C, 14000 g, 10 min), 置于冰上备用, 或于 -20 °C 长期保存。
- 4) 大肠杆菌样品: 离心收集大肠杆菌 (4 °C, 12000 g, 2 min), 弃上清后称重, 按每克 (湿重) 菌体 10 mL 的比例用 1×PBS 洗涤两次。然后按每克 (湿重) 菌体 5~10 mL 的比例加入 Binding Buffer, 同时加入蛋白酶抑制剂, 重悬菌体, 超声裂解细胞, 离心收集上清 (4 °C, 17000 g, 10 min), 置于冰上备用, 或于 -20 °C 长期保存。

2. 磁珠预处理

- 1) 将免疫沉淀磁珠用涡涡振荡器振荡 1 min, 使磁珠重新悬浮, 取 25~50 μL 磁珠悬液放入 1.5 mL EP 管中。
- 2) 加入 200 μL Binding Buffer 进行洗涤, 将 EP 管放入磁性分离器, 静置 1 min, 进行磁性分离, 吸去上清液,

取下 EP 管。重复上述洗涤步骤一次。

3) 加入 200 μ L Binding Buffer 重悬磁珠备用。

3. 抗体结合反应

1) 抗体工作液的制备：将抗体样品用 Binding Buffer 稀释至终浓度为 5~50 μ g/mL，制备成抗体工作液，置于冰上备用。

2) 抗体吸附：将步骤 2 中预处理的磁珠悬液进行磁性分离，吸去上清液。加入 200 μ L 抗体工作液，迅速重悬磁珠，在室温下使用翻转混合仪或手工轻轻翻转 EP 管混合 15 min，然后进行磁性分离，收集上清液，置于冰上备用以供后续检测。

3) 洗涤：向 EP 管中加入 200 μ L Binding Buffer 进行洗涤，轻轻用移液器吹打使磁珠-抗体复合物均匀分散，然后进行磁性分离，吸去上清液，取下 EP 管。重复上述洗涤步骤一次。

4. 抗体交联反应(可选操作)

如需同时洗脱抗体和目标抗原复合物，请跳过本步骤，直接进行步骤 5。本步骤适用于需要单独洗脱目标抗原的实验，推荐使用 BS3 作为交联剂。具体实验操作请参照该试剂的说明书。

5. 抗原沉淀反应

1) 抗原吸附：加入 200 μ L 步骤 1 中制备的抗原样品，用移液器轻轻吹打，使抗原与磁珠-抗体复合物均匀分散。在室温下使用翻转混合仪或手工轻轻翻转 EP 管混合 10 min，以确保抗原与抗体充分结合。如结合力较弱，可在室温下孵育 1 h，或在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。

2) 洗涤与转移：将上述完成抗原吸附的磁珠-抗体-抗原复合物进行磁性分离，收集上清液，置于冰上以备后续检测。向 EP 管中加入 200 μ L Washing Buffer 进行洗涤，用移液器轻轻吹打，使磁珠-抗体-抗原复合物均匀分散，然后进行磁性分离，吸去上清液，取下 EP 管。重复洗涤两次。最后，加入 200 μ L Washing Buffer，将磁珠-抗体-抗原复合物悬液转移至新的 1.5 mL EP 管中，并进行磁性分离，吸去上清液，取下 EP 管。

注：抗原洗脱前，需将磁珠转移到新的 EP 管，以避免将管壁上非特异性吸附的蛋白一同洗脱。

6. 抗原洗脱

提供以下两种抗原洗脱方案，用户可根据后续检测的需要选择不同的洗脱方法。

1) 变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向 EP 管中加入 25 μ L 1 \times SDS-PAGE Loading Buffer (自备)，混合均匀，95 $^{\circ}$ C 加热 5 min。然后进行磁性分离或者离心(室温，13000 g，10 min)，收集上清液，进行 SDS-PAGE 检测。

TargetMoi[®]

YOUR TARGET MOLECULES

2) 非变性洗脱法:此方法洗脱的样品保持原有的生物活性,可用于后续功能分析。向EP管中加入20 μ L Elution Buffer,混合均匀,室温孵育10 min。然后进行磁性分离或者离心(室温,13000 g,10 min),收集上清液至新的EP管,并立即加入1.0 μ L Neutralization Buffer,将洗脱产物pH调节至中性,用于后续功能分析。

保存条件

4 °C 2年

注意事项

1. 避免冷冻磁珠。磁珠应保存在储存溶液中,防止干燥。
2. 为了减少磁珠的损失,每次磁性分离的时间不应少于1 min。
3. 在从磁珠保存管中取出磁珠之前,应充分震荡以确保均匀悬浮。操作过程中注意避免产生气泡。
4. 建议使用质量较好的移液器吸头和反应管,以避免因磁珠和溶液附着而造成损失。
5. 应在无菌条件下稀释PBS(10 \times),一旦发现溶液有污染,立即停止使用。
6. 为确保最佳实验效果,请选择特异性较强的抗体进行免疫沉淀反应。
7. 操作者可根据实际需求,利用抗体结合反应步骤和抗原结合反应步骤中收集的上清液,检测抗体、抗原与磁珠的结合情况。
8. 在IP实验中,不同类型的抗体和抗原结合的亲和力会有所不同。Binding Buffer和Washing Buffer也会影响抗体与抗原的结合效果。因此,如果使用本试剂盒提供的缓冲体系未能获得理想的实验结果,操作者可以自行筛选和配制缓冲液进行实验。
9. 虽然本磁珠表面包被的重组蛋白Protein A/G在极端条件下(如低pH、加热处理)几乎不会脱落,但仍不建议用于分子量约130 kDa目标蛋白的免疫沉淀实验。
10. 本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
11. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

附:免疫磁珠 Protein A 和 Protein A/G 与不同抗体亲和性比较

Species	Antibody Classes	Protein A/G	Protein A	Species	Antibody Classes	Protein A/G	Protein A
Human	Total IgG	++++	++++	Cow	Total IgG	++++	+
	IgG1, IgG2	++++	++++		IgG1	++++	+
	IgG3	++++	+		IgG2	++++	++++
	IgG4	++++	++++	Goat	Total IgG	++++	+
	IgM	-	-		IgG1	++++	+
	IgD	-	-		IgG2	++++	++++
	IgA	+	+	Sheep	Total IgG	++++	+
	IgA1, IgA2	+	+		IgG1	++++	+
	IgE	+++	+++		IgG2	++++	++++
	Fab	-	-	Horse	Total IgG	++++	+
ScFv	-	-	IgG(ab), IgG(c)		+	+	
			IgG(T)		++++	-	
Mouse	Total IgG	++++	++++	Rabbit	Total IgG	++++	++++
	IgM	-	-	Guinea Pig	Total IgG	++++	++++
	IgG1	+++	+	Hamster	Total IgG	+++	+++
	IgG2a	+++	+++	Pig	Total IgG	++++	++++
	IgG2b	+++	+	Donkey	Total IgG	++++	+++
	IgG3	+++	++++	Cat	Total IgG	++++	++++
Rat	Total IgG	+++	+	Dog	Total IgG	++++	++++
	IgG1	+++	+	Monkey	Total IgG	++++	++++
	IgG2a	++++	-	Chicken	Total IgY	-	-
	IgG2b	+	-				
	IgG2c	++++	+++				

注:“++++”=strong binding, “+++”=medium binding, “+”=weak binding, “-”=no binding.

TargetMol Chemicals Inc.

抑制剂&激动剂 | 化合物库 | 天然产物 | 重组蛋白 | 技术服务

www.targetmol.cn

Tel: 400 - 820 - 0310

Email: sales@targetmol.cn

TargetMol®所有产品和服务仅用于科学研究,不能被用于人体,我们不向个人提供产品和服务。



官方微信公众号



积分子商城小程序