



免疫沉淀试剂盒-免疫磁珠蛋白 A/G

Immunoprecipitation Kit-Immunomagnetic Beads Protein A/G

货号: C0951

规格: 20T / 100T

产品组成及保存条件:

编号	名称	20T	100T	储存条件
C0951-A	Immunomagnetic Beads Protein A/G	1mL	5ml	4°C保存一年
C0951-B	Elution Buffer	1.5mL	8ml	4°C保存一年
C0951-C	Neutralization Buffer	1.5mL	8ml	4°C保存一年
C1059	1×PBST (pH=7.4)	1L	1L	室温保存
C0103	1×PBS (pH=7.4)	2L	2L	室温保存
C5026	NP40 Cell Lysis Buffer	4mL	20ml	-20°C 保存一年
C05-01002	PMSF(100mM)	500ul	500ul	-20°C 保存一年

(1) C0951-A (Immunomagnetic Beads Protein A/G, 1:1)含 PBS (pH7.4) 和 0.1%NaN₃, 2 mg/mL
(2) C5026 (NP40 Cell Lysis Buffer) 用前加入 1 mM PMSF。

产品介绍:

免疫(共)沉淀(IP/CoIP)是基于抗体和蛋白的特异性亲和作用,通过捕获与蛋白或抗原特异性结合的抗体,进而从复杂的样品中捕获及富集目标蛋白、蛋白质复合物、用以测定与之相互作用的蛋白或其它生物大分子。

免疫磁珠蛋白 A/G 是由高质量的重组 Protein A/G 与纳米级氨基磁珠共价偶联而成,可特异性地结合相应抗体,并可以借助磁力架等磁分离设备非常便捷地应用于收集抗体结合的目的蛋白或其蛋白复合物,主要用于免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)、免疫共沉淀(Co-IP)或染色质免疫沉淀(Chromatin Immunoprecipitation, Ch-IP),也可以用于血清、细胞培养上清液或腹水等样品中抗体的纯化等。

Protein A 磁珠适合于免疫沉淀 human IgG1、IgG2、IgG4, mouse IgG2a、IgG2b 及 rabbit IgG 等,而 Protein G 磁珠适合于免疫沉淀 human IgG1、IgG2、IgG3、IgG4, mouse IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3, rat IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c, 以及 rabbit、goat 多克隆抗体。

操作流程:

本产品进行免疫沉淀的实验流程参考图 1。

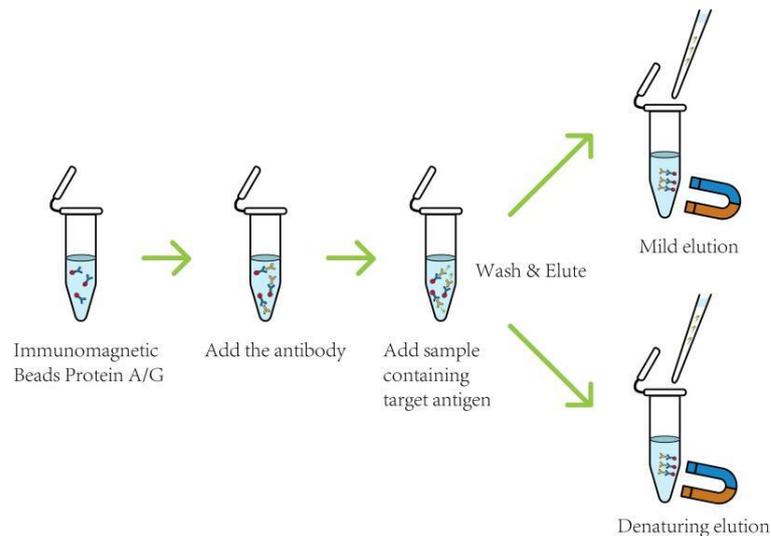


Fig. 1 Immunoprecipitation (IP) Protocol

温馨提示：

1. 为了获得更好的实验结果，实验前所有的步骤均需要根据实际情况进行优化。
2. 根据细胞系或被捕获的抗原后续用途的不同可选择更加合适的细胞裂解条件。对于没有细胞壁结构的哺乳动物细胞，可以直接使用去污剂进行裂解，但其它细胞，则需要一些机械剪切力辅助，例如超声破碎、研磨等。
3. 细胞裂解物在进行免疫(共)沉淀前，可先进行蛋白免疫印迹法检测，以此来确定细胞裂解物里存在目标蛋白。
4. 所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22µm 或 0.45µm 滤膜过滤。本试剂盒提供的试剂已经过 0.22µm 滤膜过滤。

细胞裂解

根据您的起始材料，可以使用任何标准细胞裂解方案裂解细胞。我们建议使用 NP40 细胞裂解缓冲液（随试剂盒提供）。

准备磁珠

1. 将免疫磁珠重新悬浮在小瓶中（涡流>30 秒或倾斜并旋转 5 分钟）。
2. 将 50µL 免疫磁珠转移到试管中（可以根据需要量放大或缩小）。
3. 将试管置于磁力架上，将免疫磁珠从溶液中分离出来，并除去上清液。
4. 从磁力架上取下试管。

结合抗体

1. 在 200µL PBST 中稀释抗体（通常为 1–10µg），并添加到免疫磁珠中。抗体的用量需要优化。
2. 37°C 下 20-30 分钟（或室温下 2 小时）。
3. 将试管置于磁力架上，除去上清液。
4. 从磁力架中取出试管，用 200µL PBST 轻轻移液清洗免疫磁珠。对于抗体结合免疫磁珠的储存，我们建议使用 PBST 来防止聚集。

免疫沉淀靶抗原

1. 将试管（步骤 4）放在磁力架上，除去上清液。
2. 将样品（通常为 100–1000µL）加入试管中，通过轻轻移液轻轻混合免疫磁珠抗体复合物
3. 在室温下旋转孵育 10 分钟，使抗原与免疫磁珠抗体复合物结合（增加孵育时间以获得最佳结合）。
4. 将试管放在磁力架上，去除上清液或将上清液转移到干净的试管中进行进一步分析（如果需要）。
5. 每次洗涤用 200µL PBS 洗涤免疫磁珠抗体-抗原复合物 3 次。在每次洗涤之间用磁力架分离，去除上清液并通过温和移液管重新悬浮复合物。
6. 将上述复合物重新悬浮于 100µL PBS 中，并将免疫磁珠悬浮液转移至干净的试管中。建议这样做是为了避免与管壁结合的蛋白质的共同洗脱。

洗脱靶抗原

A. 变性洗脱

1. 将试管（靶抗原免疫沉淀步骤 6）置于磁力架上，去除上清液。
2. 加入 20µL 洗脱缓冲液和 5µL 5×SDS-PAGE 上样缓冲液，轻轻移液，使免疫磁珠复合物复悬。
3. 95-100°C 加热 5-10 分钟。
4. 将试管置于磁力架上，收集上清液作进一步分析。

B. 温和洗脱

1. 将试管（靶抗原免疫沉淀步骤 6）置于磁力架上，去除上清液。
2. 加入 20µL 洗脱缓冲液，用移液管轻轻移液，使复合物重新悬浮。避免起泡。
3. 在室温下旋转孵育 2 分钟，使复合物离解。
4. 将试管置于磁力架上，将含有洗脱抗体和抗原的上清液转移到干净的试管中。如果将洗脱蛋白质用于功能分析或储存，则可通过添加中和缓冲液（每 100µL 洗脱缓冲液约 50µL 中和缓冲液）来调节洗脱液的 pH 值。

靶抗原检测

洗脱方法	靶蛋白检测用途
A. 变性洗脱	1. SDS-PAGE 用于染色和蛋白质鉴定 2. SDS-PAGE 用于蛋白质印迹 3. 荧光照相用 SDS-PAGE
B. 温和洗脱	1. 蛋白质特性；2. 免疫；3. 酶研究；4. 序列测定；5. 结晶

C. 无洗脱	1. 蛋白质相互作用; 2. 酶研究; 3. 生物测定; 4. 免疫分析
--------	--------------------------------------

蛋白质 A/G/L 的结合特性 Binding Characteristics of Protein A/G/L

Species	Protein A	Protein G	Protein L
Human	IgG	+++	+++
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	-	+++
	IgG4	++++	++++
Rabbit	IgG	+++	+
Mouse	IgG	++	+++
	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	+++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
	IgM	-	-
Rat	IgG	+	+++
	IgG1	-	+
	IgG2a	-	++++
	IgG2b	-	++
	IgG2c	++	+++
	IgG3	+	?
Guinea pig	IgG1	++	?
	IgG2	++	?
Cow	IgG	+	-
	IgG1	+	-
	IgG2	+++	-
Goat / Sheep	IgG	+	-
	IgG1	+	-
	IgG2	+++	-
Horse	IgG	++	?
Dog	total Ig	++	?
Pig	total Ig	+++	+++
Cat	IgG	+++	?
Chicken	IgY	-	-
Monkey(rhesus)	IgG	++++	?
Hamster		+	+++
Koala		-	?
Llama		-	?
++++, Strong Binding ++~++++, Medium Binding +, Weak Binding +/-, Weak or No Binding -, No Binding			