

## Protein A/G IP/Co-IP Kit (Magnetic Beads)

Cat# PM1004

### 产品概述

Protein A/G 免疫（共）沉淀试剂盒，包含足够完成 40 个反应的试剂，每个反应使用 25 $\mu$ L 磁珠。能够高效完成抗原免疫沉淀（IP）及免疫共沉淀（Co-IP）实验，抗体用量小于 10 $\mu$ g 且无需离心。Protein A/G Magnetic Beads 是粒径为 200nm 的纳米磁珠表面上共价结合 Protein A/G 蛋白，纳米级磁珠提供的超大比表面积，具有更多的结合位点，磁珠使用量更少，非特异性吸附率低。天然蛋白 A（Protein A）是一种发现于金黄色葡萄球菌的细胞壁表面蛋白，天然蛋白 G（Protein G）是一种分离自 G 型或 C 型链球菌(Streptococcal bacteria)表达的免疫球蛋白结合蛋白，二者功能相似。主要通过与免疫球蛋白（Ig）的 Fc 区相互作用，可结合大多数哺乳动物的 IgG，但在两者结合特异性上有所不同，重组 Protein A/G 蛋白包含 Protein A 的 5 个免疫球蛋白结合的结构域，可结合 human IgG1、IgG2、IgG4，mouse IgG2a、IgG2b 及 rabbit IgG，Protein G 的 2 个免疫球蛋白结合的结构域，可结合 human IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，mouse IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3，rat IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c，以及 rabbit、goat 多克隆抗体等，结合能力较单独的 Protein A 或 Protein G 有很大的提高。本产品广泛应用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中抗原的免疫沉淀（IP）或免疫共沉淀（Co-IP）。由于采用磁性分离，可以节省 40%的时间。

试剂盒中提供 Protein A/G 磁珠可以实现快速便捷的抗原磁性分离。免疫（共）沉淀试剂盒配有经过优化预制的缓冲液，为免疫沉淀实验提供了最佳的反应条件，增强了免疫沉淀实验的稳定性。本产品可广泛应用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中抗原的免疫沉淀（IP）或免疫共沉淀（Co-IP）。

### 产品/组分信息

组分编号	产品组成	PM1004-40T
PM1004-40T-1	Protein A/G Magnetic Beads	1 mL
PM1004-40T-2	IP Lysis / Wash Buffer	100 mL
PM1004-40T-3	50 $\times$ SDS-PAGE Sample Loading Buffer	10 mL
PM1004-40T-4	50 $\times$ Phosphatase Inhibitor Cocktail	2 mL
PM1004-40T-5	100 $\times$ PMSF	1 mL
PM1004-40T-6	Elution Buffer	5 mL
PM1004-40T-7	Neutralization Buffer	1 mL

### 储存方式

Protein A/G Magnetic Beads、IP Lysis / Wash Buffer、Elution Buffer、Neutralization Buffer 于 2~8  $^{\circ}$ C 保存；PMSF、Phosphatase Inhibitor Cocktail、SDS PAGE Sample Loading Buffer 于 -25~-15  $^{\circ}$ C 保存。

### 使用说明

#### 注意事项

- 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结合能力。

- IP 实验中不同类型的抗体与抗原结合的亲和性是有区别的，抗体与抗原结合还会受到 IP Lysis / Wash Buffer 的影响，因此可自行优化操作细节或者筛选及配制缓冲液进行实验。
- 磁珠使用前应充分振荡均匀。磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥。
- 本产品仅供科学研究使用。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

## 操作步骤

### 细胞样品的制备

#### 1. 贴壁细胞样品

- 移去培养基，用 PBS 洗涤细胞 2 次，按比例加入 IP Lysis / Wash Buffer（注意添加 1mM PMSF 等相应的抑制剂）裂解细胞，混匀后置于冰上静置 5~20 min（期间混匀几次），使细胞充分裂解（也可通过超声充分裂解细胞，30 s on, 10 s off, 振幅设定 35%，2-3 个循环）。
- 4℃、12,000rpm、15 min 离心收集上清液，置于冰上以备后续实验（或置于-80℃长期保存）。
- 培养皿 IP Lysis / Wash Buffer 推荐使用体积：

培养皿大小/表面积	IP Lysis / Wash Buffer 体积
100 mm × 100 mm	500~1,000 μL
100 mm × 60 mm	100~300 μL
6 孔板	100~200 μL

#### 2. 悬浮细胞样品

- 4℃、1000 g、3min，离心收集细胞，弃上清。
- 用 PBS 洗细胞 1 次，4℃、500~1,000 g、5min，弃上清。
- 用预冷的 IP Lysis / Wash Buffer 重悬细胞，每 50mg 细胞使用 500μL IP Lysis / Wash Buffer（注意添加 1mM PMSF 等相应的抑制剂）裂解细胞，混匀后置于冰上静置 5~20 min（期间混匀 2~3 次），使细胞充分裂解（可通过超声充分裂解细胞，30 s on, 10 s off, 振幅设定 35%，2-3 个循环）。
- 4℃、12000rpm、15min 离心收集上清液，置于冰上以备后续实验（或置于-80℃长期保存）。

#### 3. 血清样品

一般建议用 IP Lysis / Wash Buffer 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）。

### 免疫复合物的制备

【注】：样品所需的量和孵育时间均依赖于每个特定的抗体-抗原体系，可能需要优化才能得到最大产量。

以下实验方案针对 2~10 μg 亲和纯化的抗体，根据实验需要可以按比例放大。

- 在 1.5mL 离心管中，将每个样品的细胞裂解液与 2~10μg 免疫沉淀抗体结合。每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500~1,500 μg。
- 用 IP Lysis / Wash Buffer 将抗体以及制备好的样品稀释至 300~500 μL。
- 在室温下置于翻转混合仪翻转孵育 10min，使抗原和抗体充分结合，如结合能力较弱则可在室温反应 1h~2h 或 4℃ 反应过夜，以形成免疫复合物。

### 免疫沉淀

【注】：为保证磁珠均匀分布，使用前涡旋振荡 1 min，使其充分混匀。

- 将 20~50 μL 的 Protein A/G Magnetic Beads 加入 1.5 mL 离心管中，加入 500 μL 预冷的 PBS，轻柔混匀，将离心管放入磁力架中，使磁珠吸附到离心管的一侧，用移液器吸取并弃上清。

2. 向离心管中加入 200~500  $\mu\text{L}$  IP Lysis / Wash Buffer, 轻微涡旋混匀 1 min, 用磁力架收集磁珠, 弃上清, 重复一次。
3. 将抗原样品/抗体混合物加入装有磁珠的离心管中, 漩涡振荡均匀, 在室温下置于翻转混合仪翻转孵育 10min, 如结合能力较弱则可在室温反应 1~2h 或  $4^{\circ}\text{C}$  2-4h, 以形成免疫复合物。
4. 孵育完毕后, 用磁力架收集磁珠, 弃上清 (可保留部分上清, 用于检测免疫沉淀的效果)。向离心管中加入 1000  $\mu\text{L}$  IP Lysis / Wash Buffer, 轻柔混匀磁珠 5~10min。将离心管放入磁力架中 15 sec, 收集磁珠, 弃上清, 重复洗涤 3 次。可通过检测洗涤得到的洗涤液的  $\text{OD}_{280}$  来判断是否洗涤完全, 若  $\text{OD}_{280}$  大于 0.05, 需要适当增加洗涤次数。
5. 变性洗脱: 向离心管中加入 80~100  $\mu\text{L}$  SDS-PAGE Loading Buffer (1 $\times$ ) 混合均匀, 煮沸 10 min。将离心管放入磁力架中去除磁珠, 保留含有目的抗原的上清, Western blotting 检测沉淀及共沉淀蛋白质。

【注】: 如需保持蛋白活性, 也可采用低 pH 洗脱: 向离心管中加入 100  $\mu\text{L}$  Elution Buffer。保持混匀在室温下孵育 10min。用磁力架吸附磁珠, 收集洗脱液至新的 EP 管中。每 100  $\mu\text{L}$  洗出液中加入 20  $\mu\text{L}$  Neutralization Buffer 来中和低 pH 至 7.0-8.0。

## Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: [www.cytoch.com](http://www.cytoch.com).

Or contact us by:

E-mail: [support@cytoch.com](mailto:support@cytoch.com)

Tel: 400-969-8881

For research use only.

# CYTOCH