

Protein L IP/Co-IP Kit (Magnetic Beads)

Cat# PM1003

产品概述

Protein L Magnetic Beads 是粒径为 200nm 的纳米磁珠表面上共价结合 Protein L 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。重组 Protein L 蛋白是从马格努斯消化链球菌分离出来的能和免疫球蛋白特异性结合的蛋白，分子量 36 kDa，可在不影响抗原结合的情况下与免疫球蛋白 K 轻链结合。相对于 Protein A 和 Protein G 结合到抗体的 Fc 区不同的是，Protein L 是通过轻链相互作用结合抗体，Protein L 结合更宽范围的抗体类，包括 IgG, IgM, IgA, IgE 和 IgD, 单个轻链 (scFv) 或者 Fab 片段，可结合人、小鼠、大鼠、兔和鸡，但不结合牛、山羊或绵羊来源的免疫球蛋白。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 L 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

类别	组分编号	产品组成	PM1003-40T
Part I	PM1003-40T-1	Protein L Magnetic Beads	1 mL
	PM1003-40T-2	IP Lysis / Wash Buffer	100 mL
	PM1003-40T-6	Elution Buffer	5 mL
	PM1003-40T-7	Neutralization Buffer	1 mL
Part II	PM1003-40T-3	5 × SDS-PAGE Sample Loading Buffer	10 mL
	PM1003-40T-4	50 × Phosphatase Inhibitor Cocktail	2 × 1 mL
	PM1003-40T-5	100 × PMSF	1 mL

储存方式

Part I 组分于 2~8 °C 保存；
Part II 组分于 -25~-15 °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。

5. 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

- 1.1 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）。
- 1.2 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）。
- 1.3 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

- 2.1 4℃、1000 g、3min，离心收集细胞，弃上清。
- 2.2 用 PBS 洗细胞 1 次，4℃、500~1,000 g、5min，弃上清。
- 2.3 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）。
- 2.4 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。
- 1. 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。
 - 2. 用 IP Lysis / Wash Buffer 将抗体以及制备好的样品稀释至 300~500 μL。
 - 3. 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。
- 1. 将 20~50 μL 的 Protein L 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 μL 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℃ 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 μL 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 OD_{280} 来判断是否洗涤完全，若 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 μL 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 μL 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 μL 洗出液中加入 20 μL 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.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

CYTOCH