说明书

【产品名称】：Protein A/G 磁珠法 免疫沉淀试剂盒

【包装规格】： 50Test ；

【保存】： 2-8 度；

【有效期】： 一年；

【货号】： BL-1004K

【试剂盒组成】：

货号	内容	英文品名	Composition	Quantity
BL-1004	Protein A/G 磁珠	Protein A/GMagnetic Bead	超顺磁，200nm，10mg/ml，共 10mg	1ml
1004K-1	细胞质蛋白质裂解液	Lysis buffer	10 mM Tris/Cl pH 7.5， 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA， 0.5 % Nonidet™ P40 Substitute，防腐剂	30 mL
A20120A0105-1	磷酸化蛋白和蛋白酶抑制剂 cocktail	cocktail（100X）	该产品主要成分有亮肽素，抑肽酶，胃蛋白酶抑制剂，EDTA-Na2，氟化钠，原矾酸钠，甘油磷酸钠，焦磷酸钠等多种抑制剂，可以有效抑制蛋白降解。	500ul
A20120A0105-2	PMSF	PMSF（200X）	250μL/支	250μL/支
1004K-2	配套洗液（5x）	binding washing buffer（5x）	10 mM Tris/Cl pH 7.5， 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA ，防腐剂	100ml
1004K-3	非还原洗脱液	Glycine-elution buffer	200 mM glycine pH 2.5	10ml
A20120A0203-2	中和液	Neutralization buffer	1 M Tris pH 8.8 用于中和非还原洗脱液；	10ml

【产品简介和预期用途】

Protein A/G磁珠通常用于从血清、细胞培养上清液或腹水中分离抗体，并用于从细胞或组织提取物中进行IP 和对抗原的COIP 实验。Protein A/G磁珠包含有一个IgG结合域,可以同时结合蛋白质A和蛋白质G。 Protein A/G包含来自protein A的五个Fc结合结构域和

来自protein G的两个Fc结合结构域，使其成为研究和纯化免疫球蛋白的更通用和方便的工具。

免疫沉淀 (IP) 和免疫共沉淀 (Co-IP) 是利用固定在固相支持物上的抗体，从复杂的混合物中，富集或纯化特定蛋白质或蛋白质组的方法。IP 是许多蛋白质组工作流程中的重要步骤，用于研究蛋白质的存在、分子量大小、相对丰度、丰度的上调或下调、蛋白稳定性、翻译后修饰及相互作用等。利用 IP 获得的纯化抗原可采用多种技术进行分析，如 ELISA 和 Western Blotting 等。分离所得的蛋白还可以在酶切后，通过质谱进行鉴定或定量分析。

固定介质：磁珠
磁珠是近几年来颇受欢迎的 IP 固相支持物，因为具有磁性，无需离心，只要配合磁力架使用，即可完成对固相和液相的分离。这种方法更快速，也更温和，适用于高通量，自动化的解决方案。不同于琼脂糖微珠，磁珠表面没有多孔结构，表面更均一，因此产生非特异结合的可能性更小，而实验重复性则更理想。由于磁珠表面积小于琼脂糖珠，单位体积的结合能力会低于琼脂糖树脂。

【使用方法】

1. 1004K-2 工作液的配制：

使用前 1004K-2 配套洗液（5x）（binding washing buffer）请稀释使用；
比例为 1:4； 例如，可以吸取 10ml 的配套洗液，加入 40ml 无菌双蒸水；作为工作液使用；
100K-2 工作液含抑制剂：
请按照 10 ul cocktail +5ul PMSF 加入 1ml 1004K-2 工作液中；

2. 配制 1004K-1 工作液(含抑制剂)：
   a.每毫升 1004K-1 Lysis buffer 中分别加入 10μL 的 cocktail 和 5μL 的 PMSF，充分混匀后备用；
   b.上述混合液根据实验情况及实验用量，即配即用；
   注意：a. PMSF 在水中不稳定，蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂混合液不可以与 PMSF 预混；
   b.蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂混合液与 PMSF 均为无色液体，颜色发生变化的时候请停止使用该产品；

注意：如果您的样本是其他细胞类型，如酵母，植物，昆虫，微生物等，请使用您自己更合适的细胞裂解液，而非使用试剂盒提供的 1004K-1 细胞质蛋白质裂解液；
如果您要提取的是动物细胞的细胞核/染色质蛋白质，请订购【其余还可能使用到的试剂】中的2, 3, 4；

【其余还可能使用到的试剂和仪器】

1. 货号：A20120A0210 ，还原型 5XSDS 上样缓冲液 loading buffer（0.25mol/L Tris/HCl pH6.8，50％甘油，0.5mol/L 二硫叔糖醇，10％ SDS，0.5％溴酚蓝）；用于碱性洗脱；见 biotnt western blot 产品；
2. 货号：IPK-Rb，细胞核/染色质蛋白质裂解液，RIPA buffer：10 mM Tris/Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % Triton™ X-100, 1 % deoxycholate, 防腐剂；30ml；用于抽提核蛋白/染色质蛋白 时加入；
3. DNaseI；用于抽提核蛋白/染色质蛋白 时加入；
4. MgCl2；用于抽提核蛋白/染色质蛋白 时加入；
5. 磁力架：（如 BioTNT 8 孔磁力架， 可容纳 8×1.5 mL 离心管， 产品货号 BMB08-1.5-2）

【实验步骤】：
下面操作仅供参考，实验步骤应该根据实验的目的物进行调节和优化：
步骤 1：处理细胞：

细胞材料：
以下方案描述了哺乳动物细胞裂解物的制备！

对于其他类型的细胞，我们建议使用 500 ug 的细胞提取物，并从磁珠平衡这一步骤开始进行。
哺乳动物细胞裂解：
注意：:细胞收获和细胞裂解应使用冰冷的缓冲液。我们强烈建议在**裂解缓冲液**中加入**蛋白酶抑制剂**，以防止目标蛋白及其结合蛋白的降解。
对于一个免疫沉淀反应，我们建议使用约 10^6 - 10^7 个细胞。

1.1 裂解缓冲液的选择:
对于**细胞质蛋白**，通过上下吹打将细胞沉淀重悬于 200ul 冰冷的 1004K-1 工作液中（已经加入蛋白酶抑制剂（inhibitor cocktail）和 1mM PMSF）。

对于**核蛋白/染色质蛋白**，将细胞沉淀重悬于 200ul 冰冷的细胞核/染色质蛋白质裂解液中，该缓冲液还应添加 DNaseI (f.c. 75-150 Kunitz U/mL), MgCl 2(f.c. 2.5 mM), 1xprotease inhibitor cocktail 和 PMSF (f.c. 1 mM)(试剂盒不包括，需另购)。

1.2 将 ep 管放在冰上 30 分钟，每隔 10 分钟吹打悬浮液。
1.3 在+4℃下以 17，000g 离心细胞裂解物 10 分钟。将澄清的裂解物(上清液)转移至预冷管中，并添加 300ul 1004K-2 工作液含抑制剂（注：工作液中需加入 PMSF 和 cocktail）。如果需要，保存 50ul 稀释的溶胞产物用于进一步分析(input)）。共计 500ul 裂解液。

步骤 2.磁珠的制备和清洗：
2.1 将磁珠重悬在小瓶中(倾斜并旋转 2 分钟或轻轻吸移 10 次)，以便磁珠混合均匀。
2.2 将 20ul 磁珠转移到 1.5 毫升试管中(转移量可根据使用需要进行调整，部分情况可以少至 10ul，多至 50ul)。
2.3 向珠子中加入 400 μL 配套洗液工作液，轻轻用移液枪混合。将试管放入磁性支架中，靠着管的侧面收集珠子(以下称为磁分离)。移除并丢弃上清液。重复此步骤两次。

步骤 3.抗体吸附免疫沉淀：
3.1 稀释抗体，用配套洗液工作液稀释抗体；请自行调节最适抗体浓度；备注：抗体使用量请根据抗体说明书来确认；
抗体在溶液中的免疫沉淀反应：
向置于冰上的微量离心管中 400ul 推荐量的抗体（预稀释）。在预试验中，不断增加抗体量，直到沉淀的蛋白质的量不再变化。
查看抗体数据表中推荐的抗体浓度。根据参考使用：
1–5 μL 多克隆抗血清
1 μg 亲和纯化的多克隆抗体
0.2–1 μL 腹水液（单克隆抗体）
20–100 μL 培养物上清液（单克隆抗体）

3.2 上述磁珠在室温下旋转混合孵育半小时或在 4℃下 2 小时（旋转混合更好）。
3.3 用磁力架收集磁珠，向试管中加入 400ul 1004K-2 工作液，轻轻混合。在磁力架上收集磁珠，弃去上清液。（上清液为 non-binding fraction）。重复洗四次。
3.4 **加入 400ul** 1004K-2 工作液**重悬 protein A/G 抗体复合物；**建议避免与管壁结合的蛋白质共洗脱；

步骤 4.抗原吸附（加入细胞裂解液）：

4.1 移弃上清，加入第一步制备好的裂解液（5-50ug）400ul；

4.2 上述磁珠在室温下旋转混合孵育半小时或在 4℃下 2 小时（旋转混合更好）。

4.3 用磁力架收集磁珠，上清液为未结合的样品(flow-through/non-bound fraction) 并保存以供分析，弃去上清液。

4.4 向试管中加入 400ul 1004K-2 工作液，轻轻混合。在磁力架上收集磁珠，弃去上清液。重复洗四次。

3.5 **加入 400ul** 1004K-2 工作液**重悬 protein A/G 抗体复合物；**建议避免与管壁结合的蛋白质共洗脱；

步骤 5. 洗脱：

洗脱条件很重要。

将蛋白质从微珠中洗脱出来的方法有三种。SDS 缓冲液的洗脱性最强，还可将非共价结合抗体和抗体片段连同目标蛋白质一起洗脱。另一方面，甘氨酸缓冲液可轻度洗脱蛋白质和少量抗体。

注意： 酸性洗脱可以保持原有结构；碱性洗脱破坏结构，如仅需进行 western blot，可以采用碱性洗脱。

推荐洗脱方案：酸性洗脱（甘氨酸缓冲液洗脱）；

在此过程中，使用含 甘氨酸的缓冲液 (pH 2.5) 进行酸化使复合物从微珠中洗脱出来。pH 值较低的甘氨酸可减弱抗体和微珠之间的相互作用。此方法的优点在于去除甘氨酸缓冲液之后，微珠还可重复使用。但是，应立即使用 Tris (pH 8.0–8.5) 对洗脱样品进行中和。

5.1 酸性洗脱：（试剂盒提供的洗脱液，货号是 1004K-3，为 200 mM glycine pH 2.5，**甘氨酸洗脱液）**

1. 磁力分离 1 分钟，去除上清液。
2. 加入 20ul-40ul 非还原洗脱液（1004K-3）到磁珠中（磁珠量为 20ul）， 轻轻涡旋混合，室温下在旋转器上孵育样品 5-10 分钟（4 度更好）。 （洗脱液可以根据磁珠量进行缩减到 25ul）
3. 进行磁分离，收集上清液。
4. 最终溶液可用作变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的样品。或者可以立即用中和缓冲液将洗脱液调至中性，用于进一步分析。加入中和剂--Neutralization buffer：1 M Tris pH 10.4，中和到 PH=7.0。用于进一步分析。
5. 可以重复洗脱这一步(1 到两次)，增加洗脱效率（2-4）。
6. 利用蛋白质印迹方法运行样品，检查蛋白质的沉淀情况。

5.2 备选洗脱方案：SDS 碱性洗脱：

通过加入含变性剂 SDS 的上样缓冲液中并加热或煮沸，将 Ag-Ab 复合物从微珠中洗脱出来。此方法的优点在于提取方法十分高效且所得样品的浓度更高。

1.移取剩余液体，向试管中添加 80 微升 2x SDS-PAGE -sample buffer 液体（5x 的 SDS-PAGE -sample 加入 32ul，另加 48ul 的双蒸水，就可得 2X 的 SDS-PAGE -sample buffer 液体）。

2.在金属浴上煮 5 分钟（95 度），以便免疫复合物与磁珠分离。

3.磁力架分离磁珠并**保存含有目标抗原的上清液**。

实验操作步骤：

步骤	需要准备的试剂	每个反应需要的体积	50 个反应需要的体积
1.1 细胞裂解和样本准备	1004K-1 lysis buffer	200ul-600ul	根据样本量来确定 10ml-30ml
	A20120A0105-1	5-7.5ul	250-375ul
	A20120A0105-2	2.5-4ul	125-200ul
	1004K-2	300ul	15ml
2. 磁珠清洗	BL-1004	20ul（可以缩减到 10ul）	1ml
清洗三次	1004K-2	1.2ml	60ml
3. 抗体吸附	客户自己准备的抗体	400ul，稀释浓度	
清洗五次	1004K-2	2ml	100ml
重悬	1004K-2	0.4ml	20ml
4. 抗原吸附	裂解液	400ul，5-50ug 蛋白	
清洗五次	1004K-2	2ml	100ml
重悬	1004K-2	0.4ml	20ml
5. 洗脱	1004K-3	25ul-50ul	2.5ml
中和	A20120A0203-2	25ul-50ul	2.5ml

【缓冲液相容性表】：

可选:为了提高洗涤缓冲液的严格性，测试各种盐浓度，例如 150mM- 500mM，和/或添加非离子洗涤剂，例如 Triton X-100(最大浓度见缓冲液相容性表)。

Buffer ingredients	Max. concentration
DTT	1 mM
Glycerol	30 %
Guanidine HCl	4 M
NaCl	2 M
Nonidet™ P40 Substitute	tested up to 2 %
SDS	1 %
TCEP	0.2 mM
Triton™ X-100	tested up to 1 %
Urea	8 M

电话: 4008801880 或 0086 21 51692391 传真： 0086 21 51692391
Email: lab@biotnt.com 主页： www.biotnt.com
微信公众平台：搜索“冠泰生物订阅号"可加入
在线支持 QQ 群： 47468567
联系地址： 上海市徐汇区银都路 398 号 1 号楼 501 楼 邮编:200237