Immuno（co）precipitation Kit with Protein A+G Magnetic Beads {Protein A/G 免疫（共）沉淀试剂盒（适用 IP/ChIP/CoIP）}

货号：BRK2915

规格：20 T

◆ 产品简介

Immuno（co）precipitation Kit with Protein A+G Magnetic Beads {Protein A/G 免疫（共）沉淀试剂盒（适用 IP/ChIP/CoIP）} 是利用纳米表面技术使 Protein A/G 高密度定向包被到超顺磁性微球表面，与同类产品相比，该产品具有更多的抗体结合位点，磁珠使用量更少，非特异性结合率低，可便捷高效地进行免疫沉淀实验。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。微米级磁珠提供的超大比表面积，大幅缩短抗体与抗原吸附所需的平衡时间，15 min 内即可完成抗体吸附过程，30 min 内完成抗原沉淀操作。简短的操作时间避免长时间操作造成目标蛋白水解，保证了目标蛋白的活性及蛋白复合物的完整性。ProteinA/G 免疫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反应。操作者可以参考本操作说明书，附表 1 的数据了解不同种属来源及亚型的抗体与 Protein A 磁珠、Protein A/G 的结合能力。

◆ 保存条件

2-8℃保存，24 个月。

◆ 产品组成

产品编号	名称	规格(20T)	保存条件
BRK2915-1	免疫沉淀磁珠 Protein A/G for IP	1 mL	Store at 2-8℃
BRK2915-2	结合缓冲液 IP Binding Buffer	30 mL	Store at 2-8℃
BRK2915-3	磷酸盐缓冲液 PBS (10×，用之前请稀释到 1×)	20 mL	Store at 2-8℃
BRK2915-4	洗涤缓冲液 IP Washing Buffer	20 mL	Store at 2-8℃
BRK2915-5	洗脱缓冲液 IP Elution Buffer	0.5 mL	Store at 2-8℃
BRK2915-6	中和缓冲液 IP Neutralization Buffer	0.2 mL	Store at 2-8℃

注：磁珠结合 Human IgG 能力（Antibody Capacity）分别为：Protein A：0.4~0.5 mg/mL; Protein A/G： 0.5~0.6 mg/mL .

◆ **使用方法**

1.抗原样品制备：本操作说明书提供以下四种样品处理方法，本产品中不含裂解液，如需裂解液，可根据您的样本选择本公司产品：RIPA Lysis Buffer (Medium)（RM02999）；Cell lysis buffer for IP (without inhibitors)（RM00022）；RIPA Lysis Buffer (Strong)（RM02998）；RIPA Lysis Buffer (Weak)（RM03000）。建议您根据不同来源的抗原样品选择适当的方式进行预处理，使待检测抗原释放至样品溶液中。

①血清样品处理： 若目标蛋白丰度较高，建议用结合缓冲液(BRK2915-2)稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 10~100 μg/mL，置于冰上备用（或置于-20℃长期保存）。②悬浮细胞样品处理：离心收集细胞（4℃, 500 g, 10 min），弃上清后称重，按每毫克细胞 50 μL 的比例用 1×PBS (BRK2915-3) 洗涤 2 次；按 6 孔板每孔添加 100~400uL IP 裂解液（货号 RM00022），同时加入蛋白酶抑制剂（如终浓度为 1 mM 的 PMSF，货号 RM70000），混匀后置于冰上处理 10 min；离心收集上清液（4℃,14000 g,10 min）；再按每毫克细胞 5~10 μL 的比例加入结合缓冲液(BRK2915-2),置于冰上备用（或置于-20℃长期保存）。③贴壁细胞样品处理：移去培养基，按每 1.0×10^5 个细胞 150 μL 的比例用 1×PBS (BRK2915-3) 洗涤两次；用细胞刮棒刮脱细胞，收集至 1.5 mL EP 管内， 按 6 孔板每孔添加 100~400uL IP 裂解液（货号 RM00022），同时加入蛋白酶抑制剂(如终浓度为 1 mM 的 PMSF,货号 RM70000)，混匀后置于冰上处理 10 min；离心收集上清液(4℃, 14000 g, 10 min)；再按每 1.0×10^5 个细胞 20~30 μL 的比例加入结合缓冲液（BRK2915-2)， 置于冰上备用（或置于-20℃长期保存）。④大肠杆菌样品处理： 离心收集大肠杆菌(4℃, 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 (BRK2915-3) 洗涤 2 次；按每克（湿重）菌体 5~10 mL 的比例加入结合缓冲液（BRK2915-2)， 同时加入蛋白酶抑制剂（如终浓度为 1 mM 的 PMSF），重悬菌体，超声裂解细胞，离心收集上清（4℃, 17000 g, 10 min）。

2. 磁珠预处理：将免疫沉淀磁珠（BRK2915-1）漩涡振荡 1 min，使磁珠充分振荡重悬；取 25~50 μL 磁珠悬液置于 1.5 mL EP 管中。加入 200 μL 结合缓冲液（BRK2915-2）洗涤，进行磁性分离（将 EP 管放置于磁性分离器上， 使磁珠被吸附在管壁至溶液澄清；该操作描述以下省略），弃上清液，从磁性分离器上取下 EP 管，重复洗涤一次。最后加入 200 μL 结合缓冲液（BRK2915-2）重悬磁珠以备用。

3. 抗体结合反应：①抗体工作液的制备：用结合缓冲液（BRK2915-2）稀释抗体样品，配制成终浓度为 5~50 μg/mL 抗体工作液，置于冰上备用。②抗体吸附：将步骤 2 预处理的磁珠悬液进行磁性分离，弃上清液；加入 200 μL 抗体工作液，迅速重悬后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转 EP 管，15 min 后进行磁性分离，收集上清液置于冰上以备后续检测。③洗涤：向 EP 管中加入 200 μL 结合缓冲液（BRK2915-2）洗涤，用移液器轻轻吹打使磁珠-抗体复合物均匀分散， 然后进行磁性分离，弃上清液，从磁性分离器上取下 EP 管。重复以上洗涤操作一次。

4. 抗体交联反应（备选）：如操作者需要将抗体和目标抗原复合物共同洗脱，请忽略本步骤，进行步骤 5 。本

步骤适用于操作者需要单独洗脱目标抗原的试验，推荐使用 BS3（Thermo Scientific, Cat. #21580）作为交联剂，相关实验请参照该试剂的操作说明。

5. 抗原沉淀反应：①抗原吸附：加入 200 μL 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。在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转 EP 管 10 min，使抗原与抗体充分结合，如结合力较弱则可在室温下反应 1 h 或者在 4℃下反应过夜。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 μL 洗涤缓冲液（BRK2915-4）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，弃上清液；从磁性分离器上取下 EP 管，再重复洗涤两次。最后加入 200 μL 洗涤缓冲液（BRK2915-4），用移液器将磁珠-抗体-抗原复合物悬液转移至新的 1.5 mL EP 管中*，并执行磁性分离，移弃上清。（*注：抗原洗脱前务必将磁珠转移到新的 EP 管，避免将管壁上原有的非特异性吸附蛋白一起洗脱。 ）

6. 抗原洗脱：本操作说明书提供以下两种抗原洗脱方案，操作者可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。①变性洗脱法：此法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。从磁性分离器上取下 EP 管，向其中加入 25 μL 1× SDS-PAGE Loading Buffer（自备）混合均匀，95℃加热 5 min。然后执行磁性分离{也可以使用离心的方式（室温下 13000 g, 10 min）} 收集上清液进行 SDS-PAGE 检测。②非变性洗脱法：此方法洗脱的样品保持原有的生物活性，可用于后期功能分析。从磁性分离器上取下 EP 管，向其中加入 20 μL 洗脱缓冲液（BRK2915-5）混合均匀，室温孵育 10 min。然后执行 磁性分离{也可以使用离心的方式（4℃, 13000 g, 10 min）}， 收集上清液至新的 EP 管，并立即加入 1.0 μL 中和缓冲液(BRK2915-6) 将洗脱产物 pH 调节至中性，用于后期功能分析。

◆ 注意事项

1. 进行免疫沉淀操作之前，请务必认真阅读本操作说明书。
2. 本产品须与磁性分离器配套使用。
3. 磁珠使用前应充分振荡均匀。
4. 磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥。
5. 请勿将磁珠冷冻或离心，以免引起不可逆聚集。
6. 10×PBS（BRK2915-3）应在无菌条件下稀释，一旦发现溶液有污染情况，请停止使用该溶液。
7. 为保证最佳的实验结果，请选择特异性较强的抗体进行免疫沉淀反应。
8. 操作者可根据实际需求，利用抗体结合反应步骤以及抗原结合反应步骤中收集的上清液检测抗体、抗原和磁珠的结合情况。

9. 对于IP实验，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结合缓冲液和洗涤缓冲液的影响，因此，如果操作者使用本试剂盒提供的缓冲体系不能获得很好的实验结果，可自行筛选及配制缓冲液进行实验。

10. 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）存在极低的蛋白脱落情况，但仍然不建议操作者用于分子量约130 kD目标蛋白的免疫沉淀实验。

11. 本产品仅供研究使用。

◆ 常见问题及解答(FAQ)

Q1：如何提高抗体与磁珠结合效率?

A1：磁珠与抗体的结合效率与抗体的种属来源及所属亚型有关，请确认抗体的类型与 Protein A/G 配基的亲和效率（附表 1）。如抗体所属亚型与Protein A/G的亲和度较低，可以通过增加抗体与磁珠的孵育时间（30～120 min）、提高结合缓冲液的pH值（8～9）及降低离子强度（25～100 mM NaCl）等方法提高亲和效率。

Q2：如何提高磁珠在免疫沉淀反应中的特异性?

A2：可以先将抗体与样品进行孵育，形成抗体-抗原复合物， 再用 Protein A/G 磁珠捕获复合物。这种方法可以提高抗体与抗原的结合效率，并降低磁珠与样品接触的时间，从而提高沉淀产物的特异性。对于蛋白质/核酸共沉淀或染色质免疫共沉淀也推荐使用此法。

Q3：如何避免磁珠在储存或使用过程中可能出现的聚集情况?

A3：磁珠应保存在2～8℃，使用时应避免由于污染而导致的不可逆聚集，或因干燥而导致的聚集。磁珠在低pH 的洗脱缓冲液中发生聚集属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。在 Binding buffer 和 Elution buffer 中添加终浓度为0.1%（V/V）的非离子型去垢剂（如NP-40、Tween-20 或Triton X-100）可有效防止磁珠聚集。经过低pH洗脱操作的磁珠可以用结合缓冲液洗涤至中性，然后用含有 0.1% （V/V）Tween-20 的 Tris buffer（pH7.5）振荡重悬磁珠，并用超声波水浴处理 2 min，即可使磁珠恢复均匀状态，以上处理均不影响磁珠的抗体结合效率。

Q4：如何解决磁珠易粘附管壁的现象?

A4：建议使用低吸附率的耗材进行磁珠操作。另外，在缓冲液中添加 0.01%～0.1%（V/V） 的非离子型去垢剂（如NP-40 、Tween-20 或 Triton X-100)可以有效降低磁珠对耗材的粘附。

Q5：磁珠在使用过程中出现结块现象?

A5：磁珠在使用时如果出现结块现象一般较难振荡打散，容易导致分布不均， 出现该问题的原因是磁珠在磁场中放置太久而使磁珠牢固的结合在一起。用超声波水浴处理 2 min 即可打散磁珠使其重新分散，但应注意超声处理也会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落，所以磁珠在加样后洗脱前不宜使用该方法。

附表 1：免疫磁珠 Protein A 和 Protein A/G 与不同来源及类型的抗体亲和性比较

Pecies	Antibody Classs	Protein A/G	Protein A
Human	Total IgG	+++++	+++++
	IgG1 ，IgG2	+++++	+++++
	IgG3	+++++	+
	IgG4	+++++	+++++
	IgM	-	-
	IgD	-	-
	IgA	+	+
	IgA1 ，IgA2	+	+
	IgE	+++	+++
	Fab	-	-
	ScFv	-	-
Mouse	Total IgG	+++++	+++++
	IgM	-	-
	IgG1	+++	+
	IgG2a	+++	+++
	IgG2b	+++	+
	IgG3	+++	+++++
Rat	Total IgG	+++	+
	IgG1	+++	+
	IgG2a	+++++	-
	IgG2b	+	-
	IgG2c	+++++	+++
Cow	Total IgG	+++++	+
	IgG1	+++++	+
	IgG2	+++++	+++++
Goat	Total IgG	+++++	+
	IgG1	+++++	+
	IgG2	+++++	+++++
Sheep	Total IgG	+++++	+
	IgG1	+++++	+
	IgG2	+++++	+++++
Horse	Total IgG	+++++	+
	IgG(ab) ，IgG(c)	+	+
	IgG(T)	+++++	-
Rabbit	Total IgG	+++++	+++++
Guinea Pig	Total IgG	+++++	+++++

400-999-6126 cn.market@abclonal.com www.abclonal.com.cn

Hamster	Total IgG	+++	+++
Pig	Total IgG	+++++	+++++
Donkey	Total IgG	+++++	+++
Cat	Total IgG	+++++	+++++
Dog	Total IgG	+++++	+++++
Monkey	Total IgG	+++++	+++++
Chicken	Total IgY	-	-

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