

动物免疫沉淀试剂盒 (Protein A/G agarose)

货号: CB0234

存储条件: -20°C 保存, 一年有效。Protein A/G Agarose Beads 4°C 保存 (不可-20°C冻存)。

产品组分

产品货号	名称	规格 (20T)	规格 (100T)
P0233	Protein A/G agarose beads	1ml	5*1ml
C0101	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	1ml	5*1ml
CB0234-01	动物裂解缓冲液	50ml	250ml
CB0234-02	漂洗缓冲液	50ml	250ml
CB0234-03	洗脱缓冲液	1ml	5*1ml
CB0234-04	中和缓冲液	1ml	5*1ml
9003-02	Normal Rabbit IgG (1mg/mL)	20ul	100ul
9012-01	Normal Mouse IgG(1mg/mL)	20ul	100ul

产品简介

本免疫沉淀试剂盒适用于无标签蛋白、内源性蛋白等的下拉富集实验。试剂盒包含实验所需各种缓冲液, Protein A/G agarose beads 配合客户自配的特异性抗体便捷快速的完成免疫沉淀或者免疫共沉淀实验过程。本试剂盒适用于动物细胞样品的免疫沉淀过程, 试剂盒中的缓冲液配方经过优化可以充分裂解细胞样本, 有利于蛋白的释放和后续 IP/Coip 实验的进行。试剂盒提供的 Normal Rabbit/mouse IgG 可作为阴性对照排除 beads 的非特异性结合, 如 IP 一抗为其他来源则需选择与之来源相同的 IgG 作为对照。

使用说明:

1. 蛋白提取

1.1 悬浮细胞样本

250-1000×g 室温离心 5min 收集细胞。如必要可使用 PBS 洗涤一次, 然后吸净残留的液体。轻轻 vortex 或者弹击管底以把细胞尽量分散开。可参考每 5-10×10⁵ 细胞加入 100-200μl 的比例加入的动物细胞裂解缓冲液 (用之前按照 1:100 比例添加 Protease Inhibitor Cocktail (100X))。轻弹管底或适当吹打, 以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多, 建议分装成 5-10×10⁵ 细胞/管, 然后再裂解。大团的细胞较难裂解充分, 而少量的细胞由于裂解液容易和细胞充分接触, 相对比较容易裂解充分。充分裂解后, 10,000-14,000×g 在 4°C 离心 3-5 分钟, 取上清, 即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。

注: 裂解后会出现少量不溶性物质, 主要为基因组 DNA 等, 离心后会产生沉淀物。

1.2 贴壁细胞样本

吸除培养液。如有必要, 用 PBS 洗涤一次, 然后吸净残留的液体。按照每 5-10×10⁵ 细胞 (相当于 6 孔板的一个孔) 加入 100-200 μl 的动物细胞裂解缓冲液 (用之前按照 1:100 比例添加 Protease Inhibitor Cocktail (100X)), 适当吹打, 使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触动物细胞 1-2 秒后, 细胞就会被裂解。植物细胞宜在冰上裂解 2-10min。充分裂解后, 10,000-14,000×g 在 4°C 离心 3-5 分钟, 取上清, 即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。注: 裂解后会出现少量



不溶性物质，主要为基因组 DNA 等，离心后会产生沉淀物。

1.3 检测蛋白提物中的蛋白浓度。并留存少量样本用于 Input 对照。

2 免疫沉淀/共沉淀实验

2.1 琼脂糖珠清洗

琼脂糖珠存储在保护液中，使用前需要充分清洗。重悬混匀 protein A/G 琼脂糖珠后取适量混悬液（如总体积 100ul，beads 含量为 25ul，吸取 beads 时建议用剪刀减去枪尖部分），添加漂洗缓冲液或植物裂解缓冲液至 500ul，轻轻混悬吹打 protein A/G 琼脂糖珠，6000g 4℃离心 30s，小心去除上清，不要吸到凝胶。重复以上步骤 2-3 次。

2.2 protein A/G 琼脂糖与抗体结合

(1) 抗体稀释：按照抗体说明书的建议稀释抗体至工作浓度，或者配成终浓度为 5-50ug/ml 的抗体工作液，置于冰上备用。

(2) 阴性对照设置：稀释试剂盒中带的与抗体来源相同的 IgG，如一抗来源为 Rabbit，则选 Normal Rabbit IgG，稀释为与上一步抗体同样的浓度作为正常 IgG 工作液，用于阴性对照或者降低背景；

(3) 抗体吸附：将 2.1 步骤清洗完的 protein A/G 琼脂糖珠 6000g 4℃离心 30s，并吸除上清，加入 100ul 抗体工作液或 IgG 工作液（目的抗体和 IgG 吸附可各做一组），重悬后室温在翻转混合仪上孵育 15min-1h。

(4) 洗涤：孵育完抗体后添加 500ul 漂洗缓冲液，移液器轻轻吹打悬浮 protein A/G 琼脂糖珠，冰浴并置于摇床上 5min，然后 6000g 4℃离心 30s，小心去除上清。重复此步骤 3 次。

(5) (可选) 将洗涤后的 protein A/G 琼脂糖珠与样品在 4℃孵育 1 小时后离心分离，以去除与 IgG 有非特异性结合的蛋白。

(6) 取 20ul 吸附好抗体（目的抗体与 IgG 组各做一组）的 protein A/G 琼脂糖珠添加到 100ul 蛋白样品中，置于摇床或者翻转混合仪上室温孵育 2-4h 或者 4℃过夜孵育。孵育结束后，6000g 4℃离心 30s，小心去除上清。可保留部分上清用于检测实验效果。

(7) 洗涤：向 (6) 中去除上清的管子中添加 500ul 的漂洗缓冲液，吹打清洗琼脂糖珠，并重复清洗 3-5 次。此步骤同时可向漂洗缓冲液中按照 1:100 的比例添加 C0101 蛋白酶抑制剂，以减少蛋白的降解。

2.3 洗脱

酸洗脱：向清洗干净的 protein A/G 琼脂糖珠 (20ul) 中添加 50ul 洗脱缓冲液，吹打混匀后在摇床或者翻转混匀仪上孵育 5min，孵育时间不建议太长，最长不超过 15min。

孵育结束后 6000g 4℃离心 30s，将上清转移到新的离心管中并添加 5ul 中和缓冲液。为提高洗脱效率，洗脱步骤可重复 1-2 次。洗脱后的蛋白可在 -20 或 -80 长期保存，或者借用于后续检测分析。

变性洗脱：后续不用于其他检测分析的话，可使用变性洗脱的方式，在洗涤获得的 protein A/G 琼脂糖珠中添加 50ul 2*loading buffer，95℃加热 5-10min。6000g 4℃离心 30s，取上清可用于 SDS-PAGE 或 WB 检测。

注意事项

1. 本试剂盒中提供的洗脱方式为酸洗脱，如不需回收 beads 也可添加 loading buffer 进行煮样洗脱。
2. 实验过程中如涉及到磷酸化修饰或乙酰化蛋白，则需要添加磷酸酶抑制剂或去乙酰化抑制剂。
3. Beads 使用前应保证充分混匀，混匀方式不建议剧烈涡旋震荡。
4. 本产品仅限专业人员科学研究使用，不可用于临床诊断或者治疗，不可存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全健康，请穿戴一次性手套操作。

