

Biolinkedin® Basic IP/Co-IP Kit

描述:

Biolinkedin®基础免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒，包含足够完成 40 个反应的试剂，能够高效完成抗原免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验。

试剂盒中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。

试剂盒组成:

IP Lysis/Wash Buffer	100 mL
SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5×)	10 mL
Phosphatase inhibitor cocktail (50×)	2 mL
PMSF (100×)	1 mL
Elution Buffer	5 mL
Neutralization Buffer	1 mL

产品优势

1. 适用 Biolinkedin®免疫沉淀系列所有磁珠
2. 兼容其他同类型免疫沉淀系列磁珠
3. 兼容其他免疫沉淀系列琼脂糖凝胶、琼脂糖磁珠。

操作流程 (以 Biolinkedin® Protein A/G Magnetic Beads 为例)

贴壁细胞样品:

1. 移去培养基，用 PBS 洗细胞两次。
2. 收集细胞至 1.5 mL EP 管内，按比例加入 IP Lysis/Wash Buffer，同时加入 PMSF 等相应的抑制剂，混匀后置于冰上静置 5-20 min (期间混匀几次)。
3. 4 °C, 12000-16000 g, 10 min 离心收集上清液，置于冰上以备后续实验 (或置于-80 °C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 x 100 mm	500-1000 µL
100 mm x 60 mm	100-300 µL
6 孔板	100-200 µL

悬浮细胞样品:

1. 4°C、500-1000 g、10 min，收集细胞，弃上清。
2. 用 PBS 洗细胞一次，即用 PBS 将细胞团重悬，4°C、500-1000 g、10 min，收集细胞，弃上清。
3. 用预冷的 IP Lysis/Wash Buffer 重悬细胞。每 50mg 细胞使用 500µL IP Lysis/Wash Buffer。同时加入 PMSF 等相应的抑制剂，混匀后置于冰上静置 5-20 min (期间混匀几次)。
4. 4 °C, 12000 -16000 g, 10 min 离心收集上清液，置于冰上以备后续实验 (或置于-80 °C长期保存)。

血清样品:

一般建议建议用 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 °C长期保存)。

免疫复合物的制备

注意: 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，因而可能需要优化才能得到最大产量。

以下实验方案针对 2-10µg 亲和纯化的抗体，根据需要可以按比例放大。

1. 在离心管中，将每个样品的细胞裂解液与 2-10 µg 免疫沉淀抗体结合。每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500-1500µg。
2. 用 IP Lysis/Wash Buffer 将抗体以及制备好的样品稀释至 300-500µL。
3. 在室温下孵育 1-2 h，或 4 °C过夜，以形成免疫复合物。

免疫沉淀:

注意: 为保证磁珠均匀分布，使用前通过反复颠倒或轻微涡旋混匀瓶中磁珠。

1. 将 25 µL (0.25 mg) Biolinkedin® Protein A/G Magnetic Beads 加入 1.5 mL 离心管中。
2. 向磁珠中加入 500 µL 预冷 PBS，轻柔混匀。
3. 将离心管放入磁力架中收集磁珠到离心管的一边。去除上清。
4. 向离心管中加入 200-500 µL IP Lysis/Wash Buffer。颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 min。用磁力架收集磁珠。去除上清。
5. 将抗原样品/抗体混合物加入装有磁珠的离心管中，保持混匀室温下孵育 1-2 h。
6. 用磁力架收集磁珠，除去未结合的样品，保存以备分析。
7. 向离心管中加入 500 µL IP Lysis/Wash Buffer，轻柔混匀。收集磁珠，弃上清。再重复洗两次。
8. **变性洗脱:** 向离心管中加入 80-100 µL SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1×)，将样品置于 100°C水浴或者金属浴中加热 10 min。通过磁力架分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。

备注:如需保持蛋白活性，也可采用以下洗脱方式。

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离心管 5-10 min。通过磁力分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。每 100 µL 洗出液中加入 20 µL Neutralization Buffer 来中和低 pH。

注意事项

1. 进行实验操作之前，请务必认真阅读本操作说明书。

2. 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。
3. 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，如使用本试剂盒不能获得最佳的实验结果，可自行优化操作细节或者筛选及配制缓冲液进行实验。
4. 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。
5. 本产品仅供研究使用。
6. **低温运输**：IP Lysis/Wash Buffer、Elution Buffer、Neutralization Buffer 于 **4 °C 保存**，PMSF、Phosphatase inhibitor cocktail、SDS-PAGE Sample Loading Buffer 于 **-20 °C 保存**。

建议：使用低吸附率的耗材进行磁珠操作。

问题解决

1. 抗原没有免疫沉淀下来

- a) 样品中所含的抗原过少，不足以被检测
建议：通过 SDS-PAGE 或蛋白免疫印迹验证裂解液中蛋白的表达和/或裂解效率； 如果需要，加大样品量
- b) 抗体无法结合抗原
建议：选择另一种特异性抗体，或者选择另一种识别不同抗原表位的抗体。
- c) IP Lysis/Wash Buffer 中的成分干扰了抗原与抗体的结合
建议：使用其它缓冲液进行免疫沉淀和漂洗（例如，含有 0.5% CHAPS 的 TBS）

2. 获得的蛋白量低

- a) 蛋白质被降解
建议：加入蛋白酶抑制剂
- b) 所使用的磁珠量不够
建议：提高捕获免疫复合物所使用的磁珠量
- c) 样品中的目标蛋白量不够
建议：提高抗原样品量

3. 多条非特异条带

有非特异性的蛋白结合在磁珠上

建议：在 IP Lysis/Wash Buffer 中加入 50-350 mM NaCl。加大洗脱力度和次数。

4. 磁珠聚集

磁珠在低 pH 的 Elution Buffer 中发生聚集属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。

建议：用 IP Lysis/Wash Buffer 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，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。也可添加终浓度为 0.1% (v/v) 的非离子型去垢剂（如 Tween-20 或 Triton X-100）可有效防止磁珠聚集。

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。

5. 磁珠易粘附管壁