

## Biolinkedin® Protein G 免疫（共）沉淀试剂盒

### 包装清单

| 名称                      | 货号      | 包装      |
|-------------------------|---------|---------|
| Protein G<br>免疫（共）沉淀试剂盒 | IK-1002 | 40T/Kit |

### 产品概述

Biolinkedin® Protein G 免疫（共）沉淀试剂盒，包含足够完成 40 个反应的试剂，每个反应使用 25μL 磁珠。能够高效完成抗原免疫沉淀（IP）及免疫共沉淀（Co-IP）实验，抗体用量小于 10μg 且无需离心。

试剂盒中提供 Biolinkedin® Protein G 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反应。

### 试剂盒组成：

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| Protein G 磁珠                           | 1 mL    |
| 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    |
| 磁力架                                    | 双排 16 孔 |

### 操作流程

#### 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 1.5mL 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 5~20min（期间混匀几次）。
3. 4℃, 12000~16000xg, 10min 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）。

#### 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 | 500~1000μL              |
| 100 mm x 60 mm  | 100~300μL               |
| 6 孔板            | 100~200μL               |

#### 悬浮细胞样品：

1. 4℃、500~1000xg、10min，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℃、500~1000xg、5min，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 5~20min（期间混匀几次）。
4. 4℃, 12000~16000xg, 10min 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）。

#### 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 50~150μg/mL，置于冰上备用（或置于-20℃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 2~10μg 免疫沉淀抗体结合。每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500~1500μg。
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 1~2h，或 4℃ 2~4h，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 25μL ( 0.25mg ) 的 Biolinkedin® Protein G 磁珠加入 1.5mL 离心管中。
2. 向磁珠中加入 500μL 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 200~500μL IP Lysis/Wash Buffer。颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1min。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 1~2h，或 4℃ 2~4h。
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 1000μL IP Lysis/Wash Buffer，轻柔混匀磁珠 5~10min。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 80~100μL SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1×)，将样品置于 100℃水浴或者金属浴中加热 10min。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 100μL Elution Buffer。保持混匀在室温下孵育离心管 5~10min。通过磁力分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。每 100μL 洗出液中加入 20μL 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**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. 低温运输，Protein G 磁珠、IP Lysis/Wash Buffer、Elution Buffer、Neutralization Buffer 于 **4℃保存**，PMSF、Phosphatase inhibitor cocktail、SDS-PAGE Sample Loading Buffer 于 **-20℃保存**。
6. 本产品仅供科学研究使用。

### 相关产品

| 货号             | 产品名称                             |
|----------------|----------------------------------|
| IK-1001        | Protein A 免疫 (共) 沉淀试剂盒           |
| <b>IK-1002</b> | <b>Protein G 免疫 (共) 沉淀试剂盒</b>    |
| IK-1004        | 经典 Protein A/G 免疫 (共) 沉淀试剂盒      |
| IK-1009        | Anti-HA 免疫 (共) 沉淀试剂盒             |
| IK-1010        | Anti-Myc 免疫 (共) 沉淀试剂盒            |
| IK-1011        | Anti-DYKDDDDK 免疫 (共) 沉淀试剂盒       |
| IK-1013        | Anti-DYKDDDDK 免疫 (共) 沉淀试剂盒 (凝胶法) |
| IK-1014        | Anti-GST 免疫 (共) 沉淀试剂盒            |
| IK-1015        | Anti-His 免疫 (共) 沉淀试剂盒            |
| IK-1016        | Anti-GFP 免疫 (共) 沉淀试剂盒            |
| IK-1018        | 基础免疫 (共) 沉淀试剂盒                   |

### 问题解决

#### 1. 抗原没有免疫沉淀下来

- ① 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
- ② 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。
- ③ 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

- ① 蛋白质被降解  
**建议**：加入蛋白酶抑制剂
- ② 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
- ③ 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 50~350mM 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。