

磁珠法 IP/Co-IP 试剂盒
(Protein A/G IP Kit)

产品货号：SB-AG001

产品规格

产品编号	试剂名称	(25T)	(125 T)	Storage
SB-PR001	Protein A/G 磁珠	1 mL	5 mL	4℃
SB-IP011	IP buffer	200 mL	1000 mL	4℃
SB-IP012	酸性洗脱液	3 mL	3*3 mL	4℃
SB-WB016	蛋白酶抑制剂 (100X)	1 mL	3 mL	-20℃
SB-PR037	5X SDS loading buffer (reducing)	0.5 mL	2 mL	-20℃
SB-A00001	对照抗体 Mouse IgG Isotype Control	50 μl	250 μl	-20℃

产品描述

圣尔 Protein A/G IP Kit 试剂盒能够高效完成抗原的免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验。

圣尔生物 Protein A/G IP 磁珠在大小为 2 μm 的纳米磁珠上共价结合了大量的 Protein A/G 蛋白, 与传统的 Protein A/G 免疫共沉淀琼脂糖凝胶比较, 抗体结合能力相同, 背景更低的特点, 由于采用磁性分离, 使得每次 IP 可以节省 40% 的时间。

产品特性

项目	特性
磁珠大小	2 μm
磁珠浓度	10 mg/mL
IgG 结合量	0.5 mg/mL
适用范围	Co-IP/IP
稳定性	pH 6-8, 4℃ 长期稳定
适用抗体种属	广谱抗体种属

储存条件

按产品标签分类存放。

使用说明

1. 抗原样品制备

请根据不同的样品选择合适的处理方法：

样品	样品处理
血清	若目标蛋白丰度较高, 建议用 IP buffer 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)。
悬浮细胞	离心收集细胞(4℃, 500 g, 10min), 弃上清后 称重, 按每毫克细胞 50μL 的比例用 1× PBS 洗涤 2 次; 按每毫克 细胞 5~10 μL 的比例加入 IP buffer, 同时加入蛋白酶抑制剂 (如 SB-WB016), 混匀后置于冰上处理 10min; 离心收集上清液(4℃, 14000g, 10min), 置于冰上备用(或置于 -20℃ 长期保存)。
贴壁细胞	移去培养基, 按每 1.0×10 ⁵ 个细胞 150 μL 的比例用 1×PBS 洗涤两次; 用细胞刮棒刮脱细胞, 收集至 1.5 mL EP 管内, 按每 1.0×10 ⁵ 个细胞 20~30 μL 的比例加入 IP buffer , 同时加入蛋白酶抑制剂 (SB-WB016), 混匀后 置于冰上处理 10min; 离心收集上清液(4℃, 14000g, 10min), 置于冰上备用(或置于 -20℃ 长期保存)。
大肠杆菌	离心收集大肠杆菌(4℃, 12000g, 2min), 弃 上清后称重, 按每克(湿重)菌体 10 mL 的比例用 1×PBS 洗涤 2 次 ; 按每克 (湿重) 菌体 5~10 mL 的比例加入 IP buffer, 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℃, 17000g, 10min)。

2. 磁珠预处理：

将磁珠充分混悬, 取 25~50 μL 磁珠每反应, 1mL IP buffer 洗涤 3 次, 弃上清, 每反应用 100uL IP buffer 重悬磁珠。

3.抗体、抗原与磁珠结合

3.1 反应配置：

按照每反应 1mL 细胞裂解液, 25uL 磁珠(重悬于 100uL IP buffer), 1~2ug 抗体, 混合配置于 1.5mL EP 管中。

根据需要设置一组对照抗体反应管。

3.2 抗体抗原结合：

置于翻转混合仪 4 度翻转孵育过夜（8-24h）

3.3 洗涤：

弃去上清，用 1mL IP buffer 翻转洗涤磁珠，每次 5min。

*注意：结合过程中，磁珠可能会出现聚团或呈片状，属于正常现象，不会影响实验结果。)

4. 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。

4.1 变性洗脱

此方法洗脱的样品仅适用于 SDS-PAGE 检测，该方法洗涤强度大，能够尽可能收集到结合蛋白。

分离磁珠，弃上清，向磁珠中加入 25-50 μ L 1 $\times$ SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95 $^{\circ}$ C 加热 5min。离心分离磁珠，收集上清，进行 SDS-PAGE 检测。

4.2 非变性洗脱

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。

分离磁珠，弃上清，向磁珠中加入 25-50 μ L 酸性洗脱液，室温孵育 10min；分离磁珠，收集上清液至新的 EP 管，并立即加入 2.5~5 μ L 中和缓冲液(1M Tris, pH 9.5)将洗脱产物 pH 调节至中性，用于后期功能分析。

常见问题及对策

1：如何提高抗体与磁珠结合效率？

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 配基的亲合效率。如抗体所属亚型与 Protein A/G 的亲合度较低，可以通过增加抗体与磁珠的孵育时间（30-120min）等方法提高亲和效率。

2：如何提高磁珠在免疫沉淀反应中的特异性？

可以先将空白磁珠和空白 IgG 对照抗体与样品进行 pre-clear，离心弃去磁珠，再用对应抗体进行复合物捕获。

3： 如何避免磁珠在储存或使用过程中可能出现的聚集情况？

磁珠应保存在 2-8 $^{\circ}$ C，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。经过低 pH 洗脱操作的磁珠可以用 IP buffer 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 2min，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。

4： 如何解决磁珠易粘附管壁的现象？

建议使用低吸附率的耗材进行磁珠操作。

5： 磁珠在使用过程中出现结块现象？

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 2min 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。