

磁珠法免疫沉淀试剂盒（HRP-conjugated Protein A）

Catalog Number: PK10041

产品介绍

利用抗原抗体亲和结合的特性，免疫沉淀（Immunoprecipitation, IP）是一种能够将靶蛋白进行纯化分离的实验技术。该试剂盒包含免疫沉淀以及后续 Western blotting 检测所需的二抗，通过对富集的靶蛋白高效快速分离，以对免疫沉淀实验提供最佳解决方案，同时该试剂盒还具有省时、高效、抗体用量少等优点。

关于试剂盒：

1. IP Lysis Buffer 能够有效提取细胞或组织总蛋白，用于后续IP/Co-IP实验。
2. rProtein A/G Magnetic beads用于沉淀分离抗原抗体复合物。
3. Incubation buffer为抗原抗体结合提供更加温和的孵育环境。
4. 高盐、低 pH 的 Elution buffer 有效用于抗原抗体复合物与rProtein A/G Magnetic beads的解离。
5. HRP-conjugated Protein A 二抗用于 Western blotting 的检测，可以有效消除抗体轻链信号的影响，同时降低抗体重链信号。
6. 该试剂盒可广泛用于免疫沉淀以及免疫共沉淀实验。

产品成分

组分	规格	保存
IP lysis buffer	20 mL/瓶, 1 瓶	4 ℃, 12 个月
Incubation buffer	15 mL/瓶, 1 瓶	4 ℃, 6 个月
100 × Protease inhibitor	2 mL/份, 1 份	-20 ℃, 6 个月
20 × Washing buffer	10 mL/瓶, 1 瓶	4 ℃, 6 个月
rProtein A/G Magnetic beads	1 mL/份, 1 份	4 ℃, 12 个月
Elution buffer	2.5 mL/份, 1 份	4 ℃, 6 个月
Alkali neutralization buffer	250 uL/份, 1 份	4 ℃, 6 个月
5× Sample buffer	800 uL/份, 1 份	-20 ℃, 12 个月
HRP-conjugated Protein A	200 uL/份, 1 份	4 ℃, 6 个月

*客户需要自备：
免疫沉淀所用细胞或组织、免疫沉淀所用抗体，磁力架，1x PBS，垂直旋转混合仪，低温离心机，可调节式移液枪及枪头，去离子水，匀浆器（组织样本）

*本试剂盒单次IP，磁珠使用 50 uL，Elution buffer使用 80 uL，其他试剂按说明书使用（参考步骤五洗脱），可进行 20次IP实验；单次IP磁珠使用 30 uL，Elution buffer使用 60 uL，其他试剂等比例调整(参考步骤五洗脱)，可进行 30次IP实验

*试剂盒过期后建议不再使用

包装规格 使用方法

20 T

一、细胞或组织裂解物的制备

a、细胞

- 1、将离心机预冷至 4 ℃。
- 2、收集细胞前用血球计数板对细胞进行计数。
- 3、4 ℃、500 × g 离心 5 min，收集细胞。
- 4、用冰上预冷的 1 × PBS洗涤细胞三次，每10⁶个细胞加入 100 uL 预冷的 IP lysis buffer（现加 Protease inhibitor 至 1x），建议准备IP实验组和对照组各300-500 uL，Input组50-80 uL用作阳性对照。若需获得高浓度蛋白裂解物，可以适当减少 IP lysis buffer 的用量。

*体积可根据具体实验进行调整，每个IP使用体积建议不要低于300 uL。

- 5、若靶蛋白为磷酸化蛋白质，则需额外加入适量磷酸酶蛋白抑制剂（货号：PR20015）。
- 6、在IP lysis buffer 中重悬细胞，冰上裂解 30 min，期间每 10 min 轻柔颠倒一次。
- 7、后续步骤见裂解与保存。

b、组织

- 1、解剖目的组织，用预冷的 1 × PBS洗涤组织，尽可能去除组织中存留的血液，在冰上将目的组织剪成碎块。
- 2、将组织碎块置于预冷的匀浆器中。
- 3、以每毫克目的组织 10-20 uL IP lysis buffer 的量加入相应数量的 IP lysis buffer（现加 Protease inhibitor 至 1x），建议准备实验组和对照组各300-500 uL，Input组50-80 uL用作阳性对照。

*体积可根据具体实验进行调整，每个IP使用体积建议不要低于300 uL。

- 4、对目的组织充分匀浆，冰上裂解 30 min，期间每 10 min 颠倒一次。
- 5、后续步骤见裂解与保存。

c、裂解与保存

- 1、超声波破碎细胞或组织裂解物，使得裂解更加充分，同时使 DNA 片段化，整个超声过程在冰上进行。不同的样品最适超声功率和时间不同，在180 W 功率下（超声2 s停2 s的循环），一般细胞超声 1 min，组织超声 2 min。

*功率和时间需要根据裂解物体积适当调整，对于免疫共沉淀实验建议短时超声20-30 s即可。

- 2、裂解物冰上放置 20-30 min，期间每 10 min 颠倒一次。
- 3、4 ℃、10,000 × g 离心 10-15 min，将上清转入新的 EP 管中备用；弃沉淀或储存用于后续问题分析。
- 4、通过 BCA 法测定裂解物的总蛋白浓度，推荐使用商品化BCA蛋白浓度检测试剂盒（货号：PK10026）。

- 5、裂解物用于 IP 或 Western blotting 实验，也可以分装于-80℃ 保存。
- 6、若用于Western blotting 实验，SDS-PAGE检测前，需向裂解物中加入 25 % 样品体积的5 × Sample buffer，并沸水浴加热 5 min。

二、 rProtein A/G Magnetic beads 的准备

在需要加入beads前30 min开始准备即可，轻轻顺时针旋转混匀储存rProtein A/G Magnetic beads的管子，取出所需数量的 rProtein A/G Magnetic beads磁性分离弃去保存液，用 1 × PBS 洗涤 beads 三次（每次1 mL PBS，磁性分离，弃去洗涤液），最后用1 × PBS将 beads 重悬至原体积。

本试剂盒beads建议单个IP使用量50 uL，多次实验可以合并洗涤，实际使用中，可以适当调整磁珠用量，一般不建议低于30 uL。

*每次吸弃上清时，需要等待30 s-2 min保证磁珠完全被吸附，且EP管需置于磁力架上，防止吸取到磁珠。

三、裂解物预处理（可选）

1、吸取重悬的 rProtein A/G Magnetic beads，加入含有裂解物的 EP 管中。通常 1-3 mg 总蛋白裂解物需加入 30 uL 重悬的 rProtein A/G Magnetic beads。

2、4℃ 旋转孵育30-60 min（推荐用垂直旋转混合仪，低速旋转）。

3、磁性分离，将上清转入新的 EP 管中。

注意：

*仅在裂解物中含有大量IgG或初次实验出现beads的非特异性结合时需要进行预处理，其他多数时候可以省略。

*本试剂盒所提供的beads数量并不支持每一次IP均预处理，可能需要额外购买用于预处理的beads。

四、免疫沉淀

1、取含有1-3 mg 总蛋白的裂解物（或预处理）300-500 uL，加入新的1.5 mL的EP管中，同时加入80%-100%裂解物体积的Incubation buffer（现加 Protease inhibitor 至 1 ×）和1- 4 ug特异性抗体，最佳抗体量由抗体效价决定。

2、向相同数量的裂解物与Incubation buffer（现加 Protease inhibitor 至 1 ×）中加入同种属相同数量的

Control IgG 作为阴性对照（阴性对照的后续所有操作须与特异性抗体实验组完全一致）。

3、4℃ 下，旋转孵育过夜或 2-4 h。

4、向 EP管中加入准备好的重悬的 rProtein A/G Magnetic beads 以沉淀免疫复合物，4℃ 旋转孵育 1-4 h。

5、将EP管放在磁力架上，充分吸附磁珠后，弃除上清。

6、每次用 1 mL 1 × Washing buffer（取适量20 × Washing buffer、用纯水稀释至1 ×，并现加 Protease inhibitor 至 1 ×）洗涤沉淀复合物，重复洗涤 3 次。每次洗涤结束后，用磁力架吸附磁珠后，弃除上清，每次尽量弃除干净。

五、洗脱

1、取下含有磁珠的EP管，向留有沉淀复合物的EP管中加入80 uL Elution buffer，充分和磁珠混匀，室温静置 5-10 min，期间可以轻轻摇晃2-3次，重悬沉淀复合物，以达到更好的洗脱效果。用磁力架吸附磁珠后，转移上清至新的写好标记的EP管。

2、向洗脱产物中加入 10 uL Alkali neutralization buffer 以及 23 uL 5 × Sample Buffer，沸水浴加热 5 min。

* 若希望得到更高浓度的IP目的蛋白产物，可以适当减少Elution buffer，Alkali neutralization buffer和5 × Sample Buffer的使用量，最低Elution buffer使用量不建议低于50 uL。

* 如果Elution buffer用量调整为60 uL，Alkali neutralization buffer和5 × Sample Buffer的使用量等比例减少，本试剂盒共可以完30次的IP实验。

六、Western blotting 分析

1、取 20-40 uL IP 样品加入 SDS-PAGE对应泳道，同样可以将剩余 IP 样品置于-80℃ 保存备用。

2、通过SDS-PAGE分离IP样品，并将蛋白质向PVDF膜转移。使用检测抗体杂交以及 1:1500-1:3000 稀释度的 HRP-conjugated Protein A 二抗进行 Western blotting 分析。

七、补充信息

1、如果需要缩短 IP 实验操作时间，也可以将靶蛋白对应的特异性抗体以及 rProtein A/G Magnetic beads 同时加入细胞或组织裂解物中进行一步孵育。

2、若 IP 抗体与 WB 一抗同为 mouse IgG1 或 IgG3 亚型，WB 检测时可降低 HRP-conjugated Protein A 二抗的稀释度，若显影目的信号仍然较弱，可考虑使用 Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)二抗。

3、若 WB 检测时一抗为 mouse IgM 亚型，则不能使用 HRP-conjugated Protein A 二抗。

4、必要时，该试剂盒可以按比例扩大使用。

注意事项

- 1. 该试剂盒仅用于细胞或组织裂解物的免疫沉淀和免疫共沉淀实验。
- 2. 除特别说明外，所有操作在冰上完成。
- 3. 碱中和液避免接触皮肤以及眼睛。

问题解答

问题	可能原因	解决方法
未获得靶蛋白	高浓度去垢剂影响抗原抗体结合	制备高浓度的细胞或组织裂解物，使用前用孵育缓冲液稀释
	裂解物中靶蛋白表达丰度低或靶蛋白降解	增加使用裂解物总蛋白的数量；通过 Western blotting 验证裂解物中靶蛋白表达；更换新鲜的蛋白酶抑制剂
	抗体没有与靶蛋白抗原结合	更换识别不同表位的抗体，增加抗体使用量

免疫沉淀实验如何选择检测二抗

抗原抗体复合物没有被 rProtein A /G beads 沉淀		抗体属于 IgM 亚型，使用抗 IgM 偶联的微粒沉淀抗原抗体复合物	
洗脱物的抗体信号 影响靶蛋白信号	靶蛋白大小在 45-55 kDa 左右	选择使用 HRP-conjugated Mouse Anti- Rabbit IgG Light Chain Specific 二抗（捕获及检测抗体都为兔抗时）；使用两个 种属不同的抗体分别用于 IP 过程和后续Western blotting 分析	
IP捕获抗体类型	WB检测时一抗类型	WB检测时二抗类型	备注说明
小鼠单抗/多抗	小鼠单抗		WB 检测时一般的 HRP-标记抗小鼠 IgG 二抗可产生严重的重链轻链干扰信号；HRP-标记 Protein A 可以有效降低重链信号强度，消减轻链信号；
	小鼠多抗	HRP-标记Protein A 或HRP-标记抗小鼠IgG二抗	WB 一抗若为 mouse IgG1/IgG3 亚型，HRP-标记 Protein A 亲和力较低，可适当降低其稀释度（也可先尝试HRP-标记抗小鼠IgG二抗）；WB 一抗若为小鼠 IgM/IgA 亚型，则避免选择 HRP-标记 ProteinA，因其不结合。
	兔抗	HRP-标记抗兔IgG二抗	由于 IP 捕获抗体与 WB 检测一抗属于不同种属来源抗体，故 WB 检测时使用 HRP-标记抗兔 IgG 二抗可以有效避免重链轻链信号的影响。
兔抗	小鼠单抗	HRP-标记抗小鼠IgG二抗	由于 IP 捕获抗体与 WB 检测一抗属于不同种属来源抗体，故 WB 检测时使用 HRP-标记抗小鼠IgG 二抗可以有效避免重链轻链信号的影响。
	小鼠多抗		
	兔抗	1、HRP-标记Protein A 2、HRP-标记抗兔IgG轻链特异性抗体	1、WB 检测时 HRP-标记抗兔IgG 二抗会产生很强的重链轻链信号，以及背景信号，对结果分析有一定影响； 2、HRP-标记 Protein A 可以有效降低重链信号以及消减轻链信号的影响，背景干净，适用于检测目的蛋白大小除45-55 kDa 之外的所有目的蛋白，而目的蛋白大小在45-55 kDa 之间时，推荐使用 HRP-标记抗兔 IgG 轻链特异性二抗。

说明书发布时间和修订时间

发布时间：2025年12月

For technical support and original validation data for this product please contact

T: 027-87531629

E: Proteintech-CN@ptglab.com

W: ptgcn.com

This product is exclusively available under Proteintech Group brand and is not available to purchase from any other manufacturer.