

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 检测全部试剂，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，用于后续实验使用。
2. rProtein A/G beads slurry 用于沉淀分离抗原抗体复合物。
3. 高盐、低 pH 的 Elution buffer 有效用于抗原抗体复合物与 rProtein A/G beads 的解离。
4. Spin columns 的使用使操作更为方便快捷，且减少靶蛋白的损失，同时降低了非特异性蛋白的影响。
5. HRP-conjugated Mouse Anti-Rabbit IgG Light Chain Specific 二抗用于 Western blotting 的检测，避免了传统二抗带来抗体重链信号的影响。
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	20次	保存
IP lysis buffer : 30 mL/瓶	1 瓶	4 °C 12 个月
Incubation buffer : 20 mL/瓶	1 瓶	4 °C 6 个月
100 × Protease inhibitor : 2 mL/份	1 份	-20 °C 6 个月
20 × Washing buffer : 20 mL/瓶	1 瓶	4 °C 6 个月
rProtein A/G beads slurry : 800 uL/份	1 份	4 °C 12 个月
Elution buffer : 2.5 mL/份	1 份	4 °C 6 个月
Alkali neutralization buffer: 250 uL/份	1 份	4 °C 6 个月
5 × Sample buffer : 800 uL/份	1 份	-20 °C 12 个月
HRP-conjugated Mouse Anti-Rabbit IgG Light Chain Specific : 200 uL/份	1 份	4 °C 6 个月
Spin columns : 1 mL	20 个	室温 12 个月
Collection tubes : 2 mL	20 个	室温 12 个月
End caps	20 个	室温 12 个月

*试剂盒过期后建议不再使用

包装规格

20T

使用方法

1. 细胞或组织裂解物的制备

细胞

- 将离心机预冷至 4 °C。
- 收集细胞前用血球计数板对细胞进行计数。
- 4 °C、500 × g 离心 5 min，收集细胞。
- 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 1 ×）。若需获得高浓度蛋白裂解物，可以适当减少 IP lysis buffer 的使用。
- 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](#)）。
- 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。
- 后续步骤见裂解与保存。

组织

- 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。
- 将组织碎块置于预冷的匀浆器中。
- 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 1 ×）。
- 对目的组织充分匀浆，冰上裂解 30 min，期间每 10 min 颠倒一次。
- 后续步骤见裂解与保存。

裂解与保存

- 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。不同样品最适超声时间不同，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 2-5 min，整个超声过程在冰上进行。
- 裂解物冰上放置 20-30 min，期间每 10 min 颠倒一次。
- 4 °C、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。
- 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](#)）。
- 裂解物用于 IP 或 Western blotting 实验，也可以分装于 -80 °C 保存。

- 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。

2. rProtein A/G beads 的准备

- 上下颠倒混匀储存 rProtein A/G beads slurry 的管子, 取出所需数量的 rProtein A/G beads slurry, 用 1 × PBS 低速离心洗涤 beads 三次 (每次可 1 ml PBS, 500 g 离心 30 s), 最后用 PBS 将 beads 重悬至原体积。
- 本试剂盒 beads 建议单个 IP 使用量 20-50 μ l, 初次实验可按 30 μ l 取用, 可根据实验结果, 适当增加或者减少 beads 的用量。

3. 裂解物预处理 (可选)

- 以 45° 角剪掉已灭菌枪头的末端, 快速吸取重悬的 **rProtein A/G beads slurry**, 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 μ l 重悬的 **rProtein A/G beads slurry**。
- 4 °C 旋转孵育 30-60 min (推荐用垂直旋转混合仪, 低速旋转)。
- 4 °C、500 g 离心 1 min, 将上清转入新的 EP 管中。

4. 免疫沉淀

- 吸取含有 1-3 mg 总蛋白的裂解物(或预处理) 200-350 μ l, 加入下端带有 **End caps** 的 **Spin columns** 中, 同时加入 1-4 μ g 特异性抗体以及 150-300 μ l **Incubation buffer**, 最佳抗体数量应由抗体效价决定。
- 向相同数量的裂解物与 **Incubation buffer** 中加入同种属相同数量的 **Control IgG** 作为阴性对照 (阴性对照管的后续操作与目的样本管完全一样)。
- 4 °C 下, 旋转孵育过夜或 2-4 h。
- 向 **Spin columns** 中加入准备好的重悬的 **rProtein A/G beads slurry** 以沉淀免疫复合物, 4 °C 旋转孵育 1-4 h。
- 取下 **End caps** 保留备用, 将上清自然流出弃除, 必要时, 可以通过重悬 **rProtein A/G beads** 以提高上清的流速。
- 每次用 800 μ l 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, 洗涤液自然流出弃除; 重复洗涤 4-5 次。洗涤结束后, 在 4 °C, 500 g 下将 **Spin columns** 置入 **Collection tubes** 中离心 30 s, 弃 **Collection tubes** 以及离心产物。

5. 洗脱

- 用 **End caps** 堵住 **Spin columns** 下端出液口, 向 **Spin columns** 中加入 80 μ l **Elution buffer**, 盖上盖子, 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。洗脱完成, 取下 **End caps**, 将 **Spin columns** 置入新的 1.5 mL EP 管, 4 °C 10000 g 下离心 1 min 收集产物。
- 向洗脱产物中加入 10 μ l **Alkali neutralization buffer** 以及 23 μ l 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, 可以适当按比例减少 **Elution buffer**, **Alkali neutralization buffer** 和 5 × **Sample Buffer** 的使用量, 最低 **Elution buffer** 使用量不低于 40 μ l。

6. Western blotting 分析

- 取 20-40 μ l IP 样品加入 SDS-PAGE 对应泳道, 同样可以将剩余 IP 样品置于 -80 °C 保存备用。
- 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 1:1000-1:2000 稀释度的 **HRP-conjugated Mouse Anti-Rabbit IgG Light Chain Specific** 二抗进行 Western blotting 分析。

补充信息

- 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 beads slurry** 同时加入细胞或组织裂解物中进行一步孵育。
- 必要时, 该试剂盒可以按比例扩大使用

注意

- 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。
- 除特别说明外, 所有操作在冰上完成。
- 碱中和液避免接触皮肤以及眼睛。

问题解决

问题	可能原因	解决方法
	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
未获得靶蛋白	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

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 25-35 kDa 左
右

选择使用 HRP-conjugated protein A 二抗； 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

免疫沉淀实验如何选择检测二抗

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 Protein A，因其不结合。
兔抗	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。
	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	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。

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.