

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

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。

rProtein A/G beads slurry 用于沉淀分离抗原抗体复合物。

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。

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。

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。

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 Protein A: 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

20T

一、细胞或组织裂解物的制备

a、细胞

- 1、将离心机预冷至 4 °C。
- 2、收集细胞前用血球计数板对细胞进行计数。
- 3、4 °C、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）。若需获得高浓度蛋白裂解物，可以适当减少 IP lysis buffer 的用量。
- 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）。
- 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。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。
- 2、裂解物冰上放置 20-30 min，期间每 10 min 颠倒一次。
- 3、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。
- 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 °C 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 beads 的准备

包装规格

使用方法

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 x 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 ul，初次实验可按 30 ul 取用，可根据实验结果，适当增加或者减少 beads 的用量。

三、裂解物预处理（可选）

- 1、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 uL 重悬的 rProtein A/G beads slurry。
- 2、4 °C 旋转孵育 30-60 min（推荐用垂直旋转混合仪，低速旋转）。
- 3、4 °C、500 g 离心 1 min，将上清转入新的 EP 管中。

四、免疫沉淀

- 1、吸取含有 1-3 mg 总蛋白的裂解物（或预处理）200-350 uL，加入下端带有 End caps 的 Spin columns 中，同时加入 1-4 ug 特异性抗体以及 150-300 uL Incubation buffer，最佳抗体数量应由抗体效价决定。
- 2、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）。
- 3、4 °C 下，旋转孵育过夜或 2-4 h。
- 4、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。
- 5、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。
- 6、每次用 800 uL 1 x Washing buffer（取适量 20 x Washing buffer、用纯水稀释至 1 x，并现加 Protease inhibitor 至 1 x）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。

五、洗脱

- 1、用 End caps 堵住 Spin columns 下端出液口，向 Spin columns 中加入 80 uL 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。
- 2、向洗脱产物中加入 10 uL Alkali neutralization buffer 以及 23 uL 5 x Sample Buffer，沸水浴加热 5 min。
- 3、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 x Sample Buffer 的使用量，最低 Elution buffer 使用量不低于 40 uL。

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 °C 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 beads slurry 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

- 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
	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

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	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	兔抗	<p>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；</p> <p>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。</p>

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.