

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 检测所需要使用的二抗，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

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: 20 mL/瓶	1 瓶	4 °C 12 个月
Incubation buffer: 15 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 : 10 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

*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，1x PBS缓冲液，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）。

*试剂盒过期后建议不再使用

包装规格

使用方法

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 1x PBS 洗涤细胞三次，每 10^6 个细胞加入 100 uL 预冷的 IP lysis buffer（现加 Protease inhibitor 至 1x），建议准备实验组和对照组各 200-350 uL，Input 组 50-100 uL 用作阳性对照。若需获得高浓度蛋白裂解物，可以适量减少 IP lysis buffer 的用量。

*可根据具体实验灵活调整，每个 IP 总体积建议不要低于 200 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 1x 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 200-350 uL，Input 组 50-100 uL 用作阳性对照。

*裂解物可根据具体实验进行调整，每个 IP 使用体积建议不要低于 200 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 °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%样晶体积的5×Sample buffer，并沸水浴加热5 min。

二、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 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，beads准备在需要加入beads前30 min准备即可。

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。

注意：

- *仅在裂解物中明确含有大量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量并不支持每一次IP的预处理，根据实验需要可能需要额外购买用于预处理的beads。

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（现加Protease inhibitor至1x），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（现加Protease inhibitor至1x）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×Washing buffer（取适量20 x Washing buffer、用纯水稀释至1x，并现加Protease inhibitor至1x）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×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×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
	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

未获得靶蛋白	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		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；
小鼠单抗/多抗	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。
	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。
兔抗	小鼠多抗		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。
	兔抗	1、HRP-标记 Protein A 2、HRP-标记抗兔 IgG 轻链特异性抗体	

说明书发布时间和修订时间

发布时间：2013年12月
修订时间：2025年12月