



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

抗体交联免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法)

产品编号	产品名称	包装
P2180S	抗体交联免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法)	50次

产品简介:

- 碧云天研发生产的抗体交联免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法), 即Antibody Crosslink Immunoprecipitation Kit with Protein A+G Magnetic Beads, 也称交联磁珠式IP/Co-IP试剂盒、抗体交联免疫(共)沉淀试剂盒、Antibody Cross-linking IP/Co-IP Kit, 是一种通过化学交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS)将抗体交联到高质量的重组Protein A+G磁珠, 进行目的蛋白免疫沉淀(IP)或免疫共沉淀(Co-IP)的试剂盒。本产品的免疫沉淀产物可以用于目的蛋白或其蛋白复合物组分的检测。与常规免疫沉淀试剂盒相比, 本试剂盒由于抗体被通过共价键化学交联到磁珠上, 免疫沉淀的洗脱产物基本不会含有抗体, 特别是抗体的轻重链, 有效避免了抗体对目的蛋白的污染以及对后续分析的影响, 可以用于目的蛋白或其蛋白复合物组分的检测。
- 本试剂盒和Thermo公司的Pierce™ Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit (88805)的检测原理和使用方法基本一致。
- 本试剂盒包含高质量的Protein A+G磁珠、交联剂(DSS)及经过优化验证的免疫沉淀必要试剂, 使免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP, 也称Pull-down)或免疫共沉淀(Co-IP)实验更加简单、便捷、高效, 配合特异性抗体, 广泛用于目的蛋白或其蛋白复合物的免疫沉淀、免疫共沉淀或纯化等实验。
- 免疫沉淀或免疫共沉淀是研究蛋白或蛋白与蛋白相互作用(Protein-Protein Interactions, PPIs)的常用实验技术, 通过使用特异性抗体和可结合抗体的介质(如Protein A/G Agarose或Protein A/G磁珠), 或直接使用偶联特异性抗体的介质(如琼脂糖凝胶或磁珠), 然后通过离心或磁力从溶液中分离出抗原和抗体复合物, 从而将目标蛋白质从复杂样品中分离出来, 随后可以用于Western印迹检测或质谱分析等[1-2]。但常规免疫沉淀和免疫共沉淀的免疫沉淀产物通常含有抗体的轻重链, 会影响特定分子量蛋白的分析, 而抗体交联免疫(共)沉淀将抗体和磁珠进行交联, 有效避免了抗体轻重链的影响[3]。
- Protein A是一种发现于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细胞壁表面蛋白, 分子量为42kDa; Protein G是C型或G型链球菌(*Streptococcal bacteria*)表达的免疫球蛋白结合蛋白。Protein A和Protein G功能相似, 能特异性地与哺乳动物免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)结合, 结合的部位通常为免疫球蛋白的Fc区, 但有资料显示Protein A也会和人VH3家族的Fab区结合, 而Protein G有时与Fab区也有一定结合。同时, 两者对于不同的免疫球蛋白亚类的结合能力有所不同。适当重组改造的Protein A、G与磁珠以一定的方式结合, 可用于免疫沉淀或抗体的纯化。
- Protein A+G磁珠适合于免疫沉淀所有Protein A磁珠和Protein G磁珠单独可以免疫沉淀的抗体, 包括human IgG1、IgG2、IgG3、IgG4, mouse IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3, rat IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c, 以及rabbit、goat等多克隆抗体。下表是碧云天Protein A、Protein G、Protein A/G磁珠产品与人、小鼠、大鼠常见的免疫球蛋白亚类的结合能力及不同物种的总结合能力情况表。

Species	Ig	Protein A	Protein G	A+G
Human	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	-	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgA	++	-	++
	IgD	++	-	++
	IgE	++	-	++
	IgM	++	-	++
Mouse	IgG1	+	++++	++++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	+/-	-	+/-
Rat	IgG1	-	+	+
	IgG2a	-	++++	++++
	IgG2b	-	++	++
	IgG2c	+	++	++
	IgM	+/-	-	+/-

Total Ig	Protein A	Protein G	A+G
Human	++++	++++	++++
Mouse	+++	+++	+++
Rat	+/-	++	++
Rabbit	++++	+++	++++
Goat	-	++	++
Chicken	-	+	+
Cow	++	++++	++++
Guinea Pig	++++	++	++++
Hamster	+	++	++
Horse	++	++++	++++
Pig	+++	+++	+++
Sheep	+/-	++	++

++++, Strong Binding
 +++~++++, Medium Binding
 +, Weak Binding
 +/-, Weak or No Binding
 -, No Binding

- 本产品中的重组Protein A和Protein G可与多数哺乳动物IgG的Fc端特异性结合，分子量均约为25kDa。该重组Protein A和Protein G通过改造，仅保留了与IgG Fc端结合相关的氨基酸序列，去除了结合位点以外可能导致非特异性结合的序列，从而可以有效减少非特异性结合。本产品的每个Protein A和Protein G分子分别可以结合5和3个IgG分子。
- 本试剂盒包含高质量的BeyoMag™ Protein A+G磁珠、交联剂(DSS)及优化的各种缓冲液如Lysis Buffer、20X Coupling Buffer、Protease Inhibitor Cocktail (100X)、Acid Elution Buffer、Neutralization Buffer、SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)等抗体交联免疫沉淀必要试剂，使抗体交联免疫沉淀或免疫共沉淀实验更加简单、便捷、高效。本试剂盒进行抗体交联免疫沉淀的流程参考图1。BeyoMag™ Protein A+G磁珠经适当洗涤后，加入一定量特异性抗体，Protein A+G可与抗体Fc端特异性结合，一定时间孵育后形成Protein A+G磁珠-抗体混合物(beads-Ab complex)，然后加入交联剂(DSS)进行抗体交联，交联后加入样品，样品可被抗体的Fab端特异性识别而形成Protein A+G磁珠-抗体-抗原免疫复合物(beads-Ab-Ag complex)。洗涤免疫复合物以去除未结合的蛋白，然后使用酸性洗脱液或SDS-PAGE上样缓冲液等方法从磁珠上洗脱结合的免疫复合物用于后续检测。

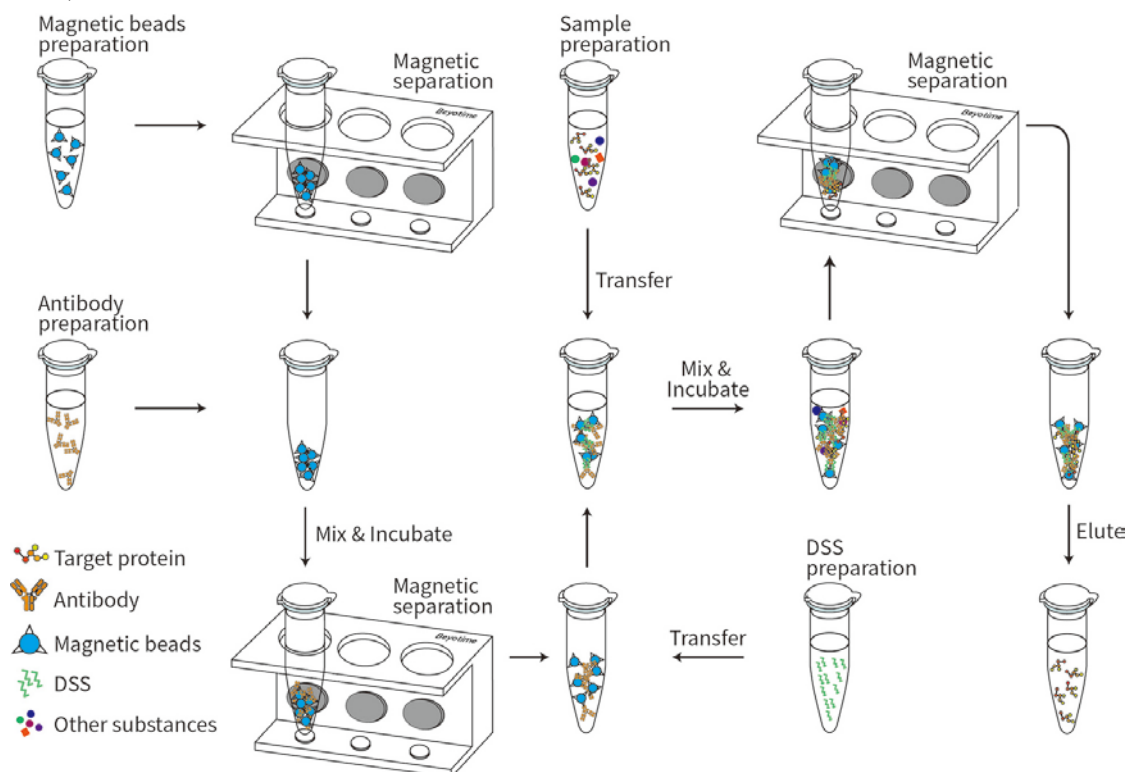


图1. 碧云天抗体交联免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法) (P2180)的免疫沉淀流程图。

- 本试剂盒中的BeyoMag™ Protein A+G磁珠，也被称为Protein A+G Magnetic Beads，可以特异性地结合相关抗体，并可以借助磁力架等磁分离设备非常便捷地应用于目的蛋白或其蛋白复合物的免疫沉淀或纯化等实验。其特点有：(1)**特异性强、靶蛋白结合量高，磁珠含量达10mg/ml**。传统的Protein A+G琼脂糖凝胶孔径大，容易产生非特异吸附，而本产品磁珠粒径小，不易产生非特异吸附。本产品每毫升磁珠悬浊液含约10mg磁珠，由Protein A磁珠和Protein G磁珠按1:1比例混合而成，含有不少于0.6mg重组Protein A、Protein G，通常可结合不少于0.7mg人IgG(具体的最大结合量和抗体类型及目的蛋白等相关)。每500微升样品，通常仅需使用10-20微升磁珠悬浊液，就可以高效地进行免疫沉淀实验。(2)**本产品结合抗体或抗体复合物的速度快**：本产品所使用的纳米级磁珠(~200nm)具有超大比表面积，便于磁珠与抗体或抗体复合物的快速有效结合。通常10分钟内即可完成抗体或其复合物的吸附的过程，30分钟内完成目的蛋白免疫沉淀操作。缩短操作时间可以有效避免在长时间操作过程中目的蛋白的降解或变性，充分保证目的蛋白的活性。由于采用磁性分离，每次进行IP和Co-IP相比于琼脂糖凝胶可以节省40%的时间。
- 本试剂盒中BeyoMag™ Protein A+G磁珠的主要指标如下表。

Characteristics	Description
Product content	10mg/ml magnetic beads in specific protective buffer
Beads size	~200nm
Magnetization	Superparamagnetic
Coupled protein	Recombinant Protein A and Protein G
M.W. of protein	~25kDa (Protein A/Protein G)
Coupled protein concentration	≥0.6mg Protein A+G per ml beads
Binding capacity	≥ 0.7mg human IgG per ml beads
Specificity	Antibodies from many different species, including mouse, human, rabbit, cow, goat and sheep
Elution method	Elution with acid, competing peptide or SDS - PAGE loading buffer

Application	IP, Co-IP, Protein purification
-------------	---------------------------------

➤ 本试剂盒提供两种洗脱方法。根据抗体复合物中目的蛋白的结构、生物学功能及后续应用的要求等，本试剂盒提供两种洗脱方法，包括酸性溶液和SDS-PAGE上样缓冲液。如有相应的竞争性多肽，也可自行使用该竞争性多肽进行洗脱。本产品用于GFP-Flag融合蛋白的免疫沉淀效果参考图2。

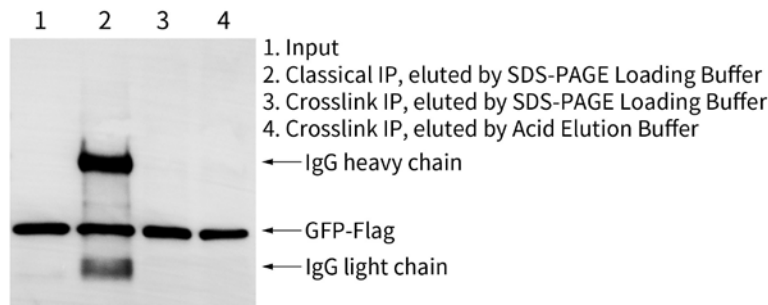


图2. 碧云天抗体交联免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法) (P2180)用于GFP-Flag融合蛋白的免疫沉淀效果图。293T细胞(人胚肾细胞)转染GFP-Flag质粒36小时后，经Lysis Buffer裂解。样品1为Input，即全细胞裂解液(total cell lysate)；样品2、3和4都为本试剂盒中Protein A+G磁珠免疫沉淀后的样品，使用的是Flag抗体(AF2852)，其中样品2中使用的是免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法) (P2179)免疫沉淀后经SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)洗脱后得到的样品。样品3使用本试剂盒经SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)洗脱，样品4使用本试剂盒经酸性洗脱液洗脱。样品2使用SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)洗脱后可以检测到Flag抗体的轻重链，而样品3和4使用SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)和酸性洗脱液仅含有GFP-Flag，整个泳道仅检测到单一的目的条带，基本没有Flag抗体的轻重链。Western印迹成像由BeyoImager™ 600化学发光成像系统(EI600)完成。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

➤ 对于抗体交联免疫沉淀实验，按照每500μl样品使用40μl磁珠悬浊液，本试剂盒小包装可以进行50次样品的抗体交联免疫沉淀。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2180S-1	Lysis Buffer	125ml
P2180S-2	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	1.25ml
P2180S-3	BeyoMag™ Protein A+G Magnetic Beads	2ml
P2180S-4	DSS	8×2mg
P2180S-5	Coupling Buffer (20X)	15ml
P2180S-6	Acid Elution Buffer	30ml
P2180S-7	Neutralization Buffer	0.5ml
P2180S-8	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)	1ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃保存，一年有效。BeyoMag™ Protein A+G Magnetic Beads可以4℃保存。

注意事项：

- 抗体交联免疫(共)沉淀是将抗体和磁珠进行交联，有效避免了抗体轻重链的影响，须区别于细胞或组织样品进行交联的Cross-linking and immunoprecipitation (CLIP)。
- 对于需要避免抗体轻重链影响的IP或Co-IP检测，也可以使用抗非变性IgG的辣根过氧化物酶标记的二抗 (A0210/A0218)。
- 需自备磁分离架，推荐使用碧云天的1.5/2ml磁分离架(FMS004/FMS008/FMS009/FMS0012/FMS015/FMS016/FMS024/FMS025)。
- 需自备二甲基亚砜(DMSO)，推荐使用碧云天的DMSO (ST038/ST2335/ST2336)、DMSO溶剂(ST1276)。
- 如果免疫沉淀的目的蛋白涉及磷酸化修饰或者乙酰化修饰，需要自备相应的磷酸酶抑制剂和去乙酰化酶抑制剂。推荐选购碧云天的磷酸酶抑制剂混合物A (50X) (P1081/P1082)和去乙酰化酶抑制剂混合物(100X) (P1112/P1113)。
- 本试剂盒提供的Lysis Buffer经反复测试，适合很多情况下的免疫沉淀或免疫共沉淀时的样品裂解和后续的洗涤。但由于免疫沉淀或免疫共沉淀蛋白样品的复杂性和特殊性，本Lysis Buffer不一定适合所有免疫沉淀样品的裂解与洗涤。在使用本试剂盒提供的Lysis Buffer效果欠佳的情况下，需要自行对于裂解液和洗涤液进行摸索和调整。此时建议根据文献自行配制裂解液和洗涤液，或尝试碧云天的其它适当裂解液：
<https://www.beyotime.com/support/lysis-buffer.htm>。
- BeyoMag™系列磁珠经测试，反复冻融3次以上，不影响使用效果。
- BeyoMag™ Magnetic Beads需维持pH为6-8，避免高速离心、干燥或冻存；请勿长时间将磁珠置于磁场中，否则可能会引起磁珠聚团。
- BeyoMag™ Magnetic Beads使用前要适当充分重悬，即颠倒若干次使磁珠混合均匀，混匀操作须轻柔，不宜剧烈涡旋震荡等，

避免抗体变性等。

- 在免疫沉淀时，建议使用抗体种属相同的正常IgG配制相同稀释比或终浓度的正常IgG工作液，以用于去除非特异性结合或作为阴性对照。推荐订购碧云天的人IgG (A7001)、山羊IgG (A7007)、兔IgG (A7016)、小鼠IgG (A7028)、大鼠IgG (A7031)、驴IgG (A7039)。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作，并应始终放置在4°C或冰浴，以减缓蛋白降解或变性。
- 如果使用真空泵等仪器吸取上清液，须注意真空泵的吸液强度，以免吸力过大而吸取到聚集的磁珠。
- 酸性溶液洗脱时磁珠可能会发生聚集，属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。0.1%的非离子型去垢剂(如Triton X-100、Tween-20或NP-40)可有效防止磁珠聚集，并且不会影响磁珠的抗体结合效率。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 试剂盒的准备。

- a. 参考下表，按照每个样品使用100-500 μ l裂解液的比例，准备相关试剂。

Steps	Solution required	Volume per assay	Volume per assay
Cell lysis and sample preparation	Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail	100 μ l	500 μ l
Preparation of magnetic beads	Coupling Buffer (1X)	~0.5ml	~1.5ml
Immunoprecipitation	Magnetic Beads	8 μ l	40 μ l
Wash for beads-Ab complex	Coupling Buffer (1X)	100 μ l three times	500 μ l three times
Wash for beads-Ab crosslink complex	Acid Elution Buffer	40 μ l twice	200 μ l twice
	Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail	100 μ l twice	500 μ l twice
Wash for beads-Ab-Ag complex	Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail	100 μ l three times	500 μ l three times
Acid elution and neutralization (optional)	Acid Elution Buffer	20 μ l	100 μ l
	Neutralization Buffer	2 μ l	10 μ l
SDS - PAGE sample loading buffer elution (optional)	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)	20 μ l	100 μ l

- b. **含抑制剂裂解液的配制。**参考上表，按照每50-100万细胞使用100-200 μ l含抑制剂裂解液用于裂解以及300-600 μ l含抑制剂裂解液用于洗涤的比例，配制适量的含抑制剂裂解液。将Lysis Buffer与Protease Inhibitor Cocktail (100X)按照100:1的比例混合，例如在1ml的Lysis Buffer中加入10 μ l Protease Inhibitor Cocktail (100X)，即得1ml含抑制剂裂解液(Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail)。配制好的含抑制剂裂解液宜放置在冰浴或4°C。

注1：如果免疫沉淀的目的蛋白涉及磷酸化修饰或者乙酰化修饰，需要添加磷酸酶抑制剂或去乙酰化酶抑制剂。推荐使用碧云天的磷酸酶抑制剂混合物A (50X) (P1081/P1082)和去乙酰化酶抑制剂混合物(100X) (P1112/P1113)。如果有特殊需求，可考虑选择其它适当的抑制剂混合物：<https://www.beyotime.com/support/lysis-inhibitor-cocktail.htm>。

注2：本试剂盒提供的Lysis Buffer不仅用于样品裂解，也用于后续的洗涤步骤，请特别注意“注意事项”中的相关描述。

注3：含抑制剂裂解液宜现用现配，不宜配制后冻存并留作后续使用。如果有特殊需求，可以尝试碧云天的其它多种蛋白酶、磷酸酶和去乙酰化酶抑制剂混合物：<https://www.beyotime.com/support/lysis-inhibitor-cocktail.htm>。

- c. **Coupling Buffer (1X)的配制。**将Coupling Buffer (20X)用超纯水稀释至1X，即为Coupling Buffer (1X)。例如1ml Coupling Buffer (20X)加入19ml超纯水，混匀后即为Coupling Buffer (1X)。

- d. **磁珠的准备。**由于磁珠储存在特殊保护液中，所以需要在加入样品前适当洗涤。

(a) 用移液器轻轻吹打重悬磁珠，按照每500 μ l样品使用40 μ l磁珠悬浊液比例，取适量磁珠至一洁净离心管中(FTUB306)，加入Coupling Buffer (1X)至最终体积为约0.5ml。说明：如果初始磁珠体积大于0.2ml，可以考虑先直接置于磁力架上分离10秒，去除上清，然后再加入Coupling Buffer (1X)至最终体积为约0.5ml。

(b) 用移液器轻轻吹打重悬磁珠。置于磁力架上分离10秒，去除上清。重复上述步骤两次。

(c) 按照初始体积的量，用Coupling Buffer (1X)重悬磁珠。

- e. **SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)的配制。**取适量SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)用水稀释5倍即为SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)。例如0.2ml SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)加入0.8ml超纯水，混匀后即为SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)。

2. **细胞或组织样品的裂解和准备。**样品裂解后宜立即进行后续的抗体交联免疫沉淀或抗体交联免疫共沉淀，如果不能立即进行后续的实验，可以-20°C或-80°C冻存，但冻融可能会影响蛋白与蛋白的相互作用。所有的样品裂解步骤宜在冰浴或4°C操作，以尽量减

少蛋白降解的可能性。样品准备好后，注意取一定量作为Input或Total，以用于后续的Western等检测。

a. 悬浮细胞的样品裂解和准备。250-1000×g室温离心5分钟收集细胞。如有必要，可以使用PBS洗涤一次，然后吸净残留的液体。轻轻vortex或者弹击管底以把细胞尽量分散开。按照每50-100万细胞加入100-200μl的比例加入含抑制剂裂解液。轻弹管底或适当吹打，以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多，建议分装成50-100万细胞/管，然后再裂解。大团的细胞较难裂解充分，而少量的细胞由于裂解液容易和细胞充分接触，相对比较容易裂解充分。充分裂解后，10,000-14,000×g在4°C离心3-5分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。**注：**裂解后会出现少量不溶性物质，主要为基因组DNA等，离心后会产生沉淀物。

b. 贴壁细胞样品的裂解和准备。吸除培养液。如有必要，用PBS洗涤一次，然后吸净残留的液体。按照每50-100万细胞(相当于6孔板的一个孔)加入100-200μl的含抑制剂裂解液，适当吹打，使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触动物细胞1-2秒后，细胞就会被裂解。植物细胞宜在冰上裂解2-10分钟。充分裂解后，10,000-14,000×g在4°C离心3-5分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。**注：**裂解后会出现少量不溶性物质，主要为基因组DNA等，离心后会产生沉淀物。

c. 细菌或酵母样品的裂解和准备。对于1ml菌液或酵母液，离心去上清，如果有必要，可以使用PBS洗涤一次，然后吸净残留的液体。轻轻vortex或者弹击管底以把细菌或酵母尽量分散开。加入100-200μl含抑制剂裂解液，轻轻vortex或者弹击管底以混匀，冰上裂解2-10分钟。如果希望获得更好的裂解效果，细菌和酵母可以分别使用溶菌酶(lysozyme)和破壁酶(lyticase)消化，然后再使用含抑制剂裂解液进行裂解。充分裂解后，10,000-14,000×g在4°C离心3-5分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。**注：**裂解后很可能会出现少量不溶性物质，主要为基因组DNA等，离心后会产生沉淀物。

d. 组织样品的裂解和准备。

(a) 把组织剪切成细小的碎片。如果组织样品本身非常细小，也可以不再进行剪切。

(b) 按照每10-20毫克组织使用100-200μl的比例加入含抑制剂裂解液。如果裂解不充分可以使用更多的含抑制剂裂解液，如果需要高浓度的蛋白样品，可以适当减少裂解液的用量。

(c) 用玻璃匀浆器匀浆，或使用碧云天生产的Tissue Master™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)研磨，直至充分裂解。也可以把组织样品冷冻后液氮研磨，研磨充分后加入裂解与洗涤液进行裂解。

(d) 充分裂解后，10,000-14,000×g在4°C离心3-5分钟，取上清，即可进行后续的免疫沉淀和免疫共沉淀等。每20mg冻存的小鼠肝脏组织用200μl含抑制剂裂解液裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为15-25mg/ml，不同状态的不同组织有所不同。**注：**裂解后很可能会出现少量不溶性物质，主要为基因组DNA等，离心后会产生沉淀物。

3. 抗体与Protein A+G磁珠的结合。

a. 抗体的准备。按抗体使用说明中推荐的稀释比例用Coupling Buffer (1X)稀释抗体，配制成抗体工作液；或将抗体配制成终浓度5-50μg/ml的抗体工作液。置于冰上备用。**可选做：**使用抗体种属相同的正常IgG配制相同稀释比或终浓度的正常IgG工作液，以用于去除非特异性结合或作为阴性对照。所谓种属相同的正常IgG是指，例如后续免疫沉淀时用的抗体是小鼠IgG，则在本步骤中可以用Coupling Buffer (1X)稀释适量的Normal Mouse IgG等以用于降低背景或作为阴性对照。

b. 抗体吸附。将步骤1d准备好的Protein A+G磁珠进行磁性分离，吸除上清，加入500μl抗体工作液，重悬后在室温翻转混合仪上翻转孵育15分钟-1小时。**注：**也可以直接在步骤1d的Protein A+G磁珠中加入适量抗体进行孵育。

c. 洗涤。加入500μl的Coupling Buffer (1X)，用移液器轻轻吹打重悬Protein A+G磁珠。置于磁力架上分离10秒，去除上清。重复洗涤三次。最后一次洗涤去除上清后，即可用于步骤4b的抗体交联。**注：**孵育和洗涤过程中，如果磁珠发生聚团或呈片状属正常现象，不会影响实验结果。

4. 抗体与Protein A+G磁珠的交联。

a. 交联剂(DSS)的准备。取一管DSS，高速离心数秒，使DSS聚集于管底。每2mg DSS使用217μl DMSO溶解，得到DSS储存液(25mM)待用。可通过涡旋或者使用移液器上下吹打溶液使DSS完全溶解。将DSS储存液(25mM)以1:25稀释于DMSO(例如4μl DSS储存液加入96μl DMSO)，使DSS浓度为1mM。

注：DSS交联剂对湿度敏感，每次实验最好现配现用，每次使用一管新的DSS。DSS不可与含氨基的缓冲液(如Tris、glycine)同时使用。

b. 抗体交联。向步骤3c磁珠中加入174μl超纯水，10μl Coupling Buffer (20X)和16μl 1mM DSS，总体积约为200μl。室温下可置于侧摆摇床或旋转混合仪上30-60分钟进行交联反应。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)或BeyoVortex™基础型旋转混匀仪(E6800)。

c. 洗涤。交联结束后，把磁珠置于磁力架上分离10秒，去除上清。向磁珠中加入200μl Acid Elution Buffer，室温于侧摆摇床或旋转混合仪上洗涤5分钟，以去除未交联的抗体并终止交联反应。置于磁力架上分离10秒，去除上清。重复洗涤一次。最后用500μl Lysis Buffer洗涤磁珠，轻轻涡旋或者颠倒混匀，置于磁力架上分离10秒，去除上清。重复洗涤一次。

5. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)。

a. 去除非特异性结合(可选做)。步骤3中准备的结合了正常IgG的Protein A+G磁珠与样品4°C孵育1小时后磁性分离，上清样品用于后续实验。本实验步骤的目的是去除与正常IgG产生非特异性结合的蛋白。

b. 样品与抗体或正常IgG交联的Protein A+G磁珠孵育。按照每500μl蛋白样品加入40μl磁珠悬浊液的比例加入交联了抗体或正常IgG的Protein A+G磁珠，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育2小时或4°C孵育过夜。

注：孵育过程中，如果磁珠发生聚团或呈片状属正常现象，不会影响实验结果。

c. 磁分离。孵育完毕后，置于磁力架上分离10秒，去除上清。**注：**可保留部分上清液，用于检测免疫沉淀的效果。

d. 洗涤。加入0.5ml的含抑制剂裂解液，用移液器轻轻吹打重悬磁珠。置于磁力架上分离10秒，去除上清。重复使用含抑制剂裂解液洗涤三次。**注：**也可以通过检测洗涤得到的液体的OD₂₈₀来判断是否洗涤完全，若OD₂₈₀大于0.05，应适当增加洗涤次数。

6. 洗脱。

根据标签蛋白的特点及后续实验要求，可以选择如下3种方法之一进行洗脱。

- a. **酸性洗脱法。**本方法为非变性的方法，比较快速高效。洗脱后的蛋白很多情况下能保持原有的生物活性，便于后续分析检测。
- (a) 每40 μ l原始磁珠体积，加入100 μ l Acid Elution Buffer，混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育5分钟。**注：**孵育时间不宜超过15分钟。
- (b) 孵育完毕后，置于磁力架上分离10秒，将上清转移到新的离心管中，并立刻加入10 μ l Neutralization Buffer，适当混匀。
注：须立刻加入中和液并混匀，否则长时间处于酸性洗脱液中会导致一些蛋白失去活性。
- (c) 为了获得最大的洗脱效率，可重复步骤(a)和(b)，并将相同样品合并。
- (d) 洗脱并中和的蛋白及其复合物置于4 $^{\circ}$ C待用，或者-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C长期保存。
注1：酸性洗脱法虽然高效，但仍可能低于竞争洗脱法或SDS-PAGE上样缓冲液洗脱法。
注2：由于目的蛋白的差异可能对酸性洗脱法的洗脱效率有一定的影响，如果对洗脱效率的要求比较高，可对酸性洗脱液的pH在2.5-3.1之间进行一定的调整，相应的中和液的pH值或量也要进行一定的调整，具体需要自行优化相关实验条件。也可以考虑采用效率可能更高的多肽竞争洗脱法或效率预期最高的SDS-PAGE上样缓冲液洗脱法，后者的缺点是在变性条件下进行洗脱，可能会对后续的对蛋白活性有要求的实验产生影响。
- b. **SDS-PAGE上样缓冲液洗脱法。**本方法为变性的方法，得到的蛋白样品适合SDS-PAGE电泳或Western检测。
- (a) 每40 μ l原始磁珠体积的磁珠，加入100 μ l SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)，95 $^{\circ}$ C加热5分钟。
- (b) 置于磁力架上分离10秒，取上清即可用于SDS-PAGE电泳或Western检测。
注1：通常SDS-PAGE蛋白上样缓冲液含有DTT等还原剂，其洗脱得到的蛋白样品中因进行了抗体交联，所以基本不会含有抗体的轻链和重链。
注2：其它SDS-PAGE上样缓冲液可以考虑选择碧云天的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(2X) (P0015B)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X) (P0015)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6X) (P0015F)。
- c. **多肽竞争洗脱法：**如果目的蛋白是标签蛋白，并使用相应的标签抗体进行免疫沉淀，则可使用相应的多肽进行竞争洗脱。本方法为非变性的方法，洗脱效率高，且洗脱后的蛋白保持原有的生物活性，便于后续分析检测。以下以Flag标签蛋白为例：
- (a) 3X Flag多肽洗脱液的配制：取适量3X Flag多肽(P9801)溶解于TBS (ST661/ST663)中，使其浓度为150 μ g/ml，或稀释5mg/ml的3X Flag多肽溶液(P9801)至150 μ g/ml。
- (b) 每40 μ l原始磁珠体积，加入100 μ l 3X Flag多肽洗脱液(150 μ g/ml)，混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温摇晃孵育30-60分钟，或4 $^{\circ}$ C孵育1-2小时。为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复洗脱。
- (c) 孵育完毕后，置于磁力架上分离10秒，将上清转移到新的离心管中。上清即为洗脱的Flag标签蛋白。
- (d) 洗脱的Flag标签蛋白置于4 $^{\circ}$ C待用，或者-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C长期保存。

常见问题：

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，如抗体所属亚型与Protein A、G或A/G的亲合力较低，可以通过增加抗体与磁珠的孵育时间、降低离子强度(25-100mM NaCl)等方法提高亲和力。

2. 如何提高磁珠在免疫沉淀或免疫共沉淀反应中的特异性？

设置正常IgG作为抗体的对照，可以确定免疫沉淀或免疫共沉淀产物的特异性。

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？

磁珠通常应保存在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。在Coupling Buffer和洗脱缓冲液中添加浓度为0.1% (v/v)的非离子型去垢剂，如Triton X-100、Tween-20或NP-40，可有效防止磁珠聚集。经过低pH洗脱操作的磁珠可以用Coupling Buffer洗涤至中性，然后用Coupling Buffer振荡重悬磁珠，并用超声波水浴处理2分钟，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在离心管等耗材表面的现象？

建议使用低吸附率的耗材进行磁珠操作。另外，在缓冲液中添加0.1% (v/v)的非离子型去垢剂(如Triton X-100、Tween-20或NP-40)可以有效降低磁珠在耗材表面的粘附。

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，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2分钟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处理磁珠的结块问题。

6. 其它常见问题、原因及解决方法：

Problem	Possible Causes	Solution
Very few or no target protein exists in the eluate.	Protein is not completely eluted.	Change elution methods.
	No target protein expressed.	Make sure the protein of interest contains the target protein by Western blot or dot blot analyses.
	Very low protein expression level.	1. Use larger volume of cell lysate. 2. Optimize expression conditions to raise the protein expression level.
	Washes are too stringent.	Reduce the time and number of washes.

	Incubation times are inadequate.	Increase the incubation time.
	Interfering substance is present in sample.	Lysates containing high concentration of DTT, 2-mercaptoethanol, or other reducing agents may destroy antibody function, and must be avoided.
	Detection system is inadequate.	If Western blot detection is used: 1. Check primary and secondary antibodies using proper controls to confirm binding and reactivity. 2. Verify that the transfer was adequate by using prestained protein marker or staining the membrane with Ponceau S. 3. Use fresh detection substrate or try a different detection system.
Background is too high.	Proteins bind nonspecifically to the antibody, insufficient washing on magnetic beads, or the microcentrifuge tubes.	1. Pre-clear lysate with Normal IgG to remove nonspecific binding proteins. 2. After suspending beads for the final wash, transfer entire sample to a clean microcentrifuge tube before separation.
	Washes are insufficient.	1. Increase the number of washes. 2. Prolong duration of the washes, incubating each wash for at least 15 minutes. 3. Increase the salt and/or detergent concentrations in the wash solutions. 4. Centrifuge at lower speed to avoid nonspecific trapping of denatured proteins.
Multiple protein bands found in the eluate.	The protein is not stable at room temperature.	Purify the target protein at lower temperature, such as 4°C.
	Protein degradation due to proteases activity during purification process.	Add protease inhibitors to cell lysate.
	Non - specific binding.	1. Prepare cell lysate again. 2. Add additional wash steps.

参考文献:

1. Lee C. Methods Mol Biol. 2007. 362:401-406.
2. Gevaert K, Vandekerckhove J. Electrophoresis. 2000. 21:1145-1154.
3. Sousa MM, Steen KW, Hagen L, Slupphaug G. Proteome Sci. 2011. 9:45.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P2175	免疫沉淀试剂盒(Protein A磁珠)	20-100/100-500次
P2176S	抗体交联免疫沉淀试剂盒(Protein A磁珠)	50次
P2177	免疫沉淀试剂盒(Protein G磁珠)	20-100/100-500次
P2178S	抗体交联免疫沉淀试剂盒(Protein G磁珠)	50次
P2179	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法)	20-100/100-500次
P2180S	抗体交联免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠)	50次

Version 2024.09.22