

动物细胞免疫沉淀试剂盒 (Protein A/G agarose)

产品货号: M20506

产品规格: 20T

产品简介:

本免疫沉淀试剂盒适合用于无标签蛋白、内源性蛋白等的下拉富集实验。试剂盒包含实验所需各种缓冲液, Protein A/G agarose beads配合客户自配的特异性抗体便捷快速的完成免疫沉淀或者免疫共沉淀实验过程。本试剂盒适用于动物细胞样品的免疫沉淀过程, 试剂盒中的缓冲液配方经过优化可以充分裂解细胞样本, 有利于蛋白的释放和后续IP/Coip实验的进行。试剂盒提供的Normal Rabbit/mouse IgG可作为阴性对照排除beads的非特异性结合, 如IP一抗为其他来源则需选择与之来源相同的IgG作为对照。

产品组成:

产品名称	规格	保存条件
Protein A/G agarose beads	1ml	2-8°C
Protease Inhibitor Cocktail (100×)	1ml	-20°C
动物裂解缓冲液	50ml	-20°C
漂洗缓冲液	50ml	-20°C
洗脱缓冲液	2ml	-20°C
中和缓冲液	2ml	-20°C
Normal Rabbit IgG (1mg/mL)	20ul	-20°C
Normal Mouse IgG(1mg/mL)	20ul	-20°C

使用说明:

1. 蛋白提取

1.1 悬浮细胞样本

250-1000×g室温离心5min收集细胞。如必要可使用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。可参考每5-10×10⁵细胞加入100-200μl的比例加入的动物细胞裂解缓冲液(用之前按照1:100比例添加Protease Inhibitor Cocktail (100×))。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5-10×10⁵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。

1.2 贴壁细胞样本

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5-10×10⁵细胞(相当于6孔板的一个孔)加入100-200μl的动物细胞裂解缓冲液(用之前按照1:100比例添加Protease Inhibitor Cocktail (100×)), 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2-10min。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。

1.3 检测蛋白提物中的蛋白浓度。并留存少量样本用于Input对照。

2. 免疫沉淀/共沉淀实验



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

2.1 琼脂糖珠清洗

琼脂糖珠存储在保护液中，使用前需要充分清洗。重悬混匀protein A/G琼脂糖珠后取适量混悬液（如总体积100ul，beads含量为25ul，吸取beads时建议用剪刀减去枪尖部分），添加漂洗缓冲液或植物裂解缓冲液至500ul，轻轻混悬吹打protein A/G琼脂糖珠，6000g 4℃离心30s，小心去除上清，不要吸到凝胶。重复以上步骤2-3次。

2.2 protein A/G琼脂糖与抗体结合

（1）抗体稀释：按照抗体说明书的建议稀释抗体至工作浓度，或者配成终浓度为5-50ug/ml的抗体工作液，置于冰上备用。

（2）阴性对照设置：稀释试剂盒中带的与抗体来源相同的IgG，如一抗来源为Rabbit，则选Normal Rabbit IgG，稀释为与上一步抗体同样的浓度作为正常IgG工作液，用于阴性对照或者降低背景；

（3）抗体吸附：将2.1步骤清洗完的protein A/G琼脂糖珠 6000g 4℃离心30s，并吸除上清，加入100ul抗体工作液或IgG工作液（目的抗体和IgG吸附可各做一组），重悬后室温在翻转混合仪上孵育15min-1h。

（4）洗涤：孵育完抗体后添加500ul漂洗缓冲液，移液器轻轻吹打悬浮protein A/G琼脂糖珠，冰浴并置于摇床上5min，然后6000g 4℃离心30s，小心去除上清。重复此步骤3次。

（5）（可选）将洗涤后的protein A/G琼脂糖珠与样品在4℃孵育1小时后离心分离，以去除与IgG有非特异性结合的蛋白。

（6）取20ul吸附好抗体（目的抗体与IgG组各做一组）的protein A/G琼脂糖珠添加到100ul蛋白样品中，置于摇床或者翻转混合仪上室温孵育2-4h或者4℃过夜孵育。孵育结束后，6000g 4℃离心30s，小心去除上清。可保留部分上清用于检测实验效果。

（7）洗涤：向（6）中去除上清的管子中添加500ul的漂洗缓冲液，吹打清洗琼脂糖珠，并重复清洗3-5次。此步骤同时可向漂洗缓冲液中按照1:100的比例添加蛋白酶抑制剂，以减少蛋白的降解。

2.3 洗脱

酸洗脱：向清洗干净的protein A/G琼脂糖珠（20ul）中添加50ul洗脱缓冲液，吹打混匀后在摇床或者翻转混合仪上孵育5min，孵育时间不建议太长，最长不超过15min。

孵育结束后6000g 4℃离心30s，将上清转移到新的离心管中并添加5ul中和缓冲液。为提高洗脱效率，洗脱步骤可重复1-2次。洗脱后的蛋白可在-20℃或-80℃长期保存，或者借用于后续检测分析。

变性洗脱：后续不用于其他检测分析的话，可使用变性洗脱的方式，在洗涤获得的protein A/G琼脂糖珠中添加50ul 2×loading buffer，95℃加热5-10min。6000g 4℃离心30s，取上清可用于SDS-PAGE或WB检测。

注意事项：

1. 本试剂盒中提供的洗脱方式为酸洗脱，如不需回收beads也可添加loading buffer进行煮样洗脱。
2. 实验过程中如涉及到磷酸化修饰或乙酰化蛋白，则需要添加磷酸酶抑制剂或去乙酰化抑制剂。
3. Beads使用前应保证充分混匀，混匀方式不建议剧烈涡旋震荡。
4. 本产品仅限专业人员科学研究使用，不可用于临床诊断或者治疗，不可存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全健康，请穿戴一次性手套操作。

储存条件：

-20℃保存，有效期12个月。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com