

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

## 免疫(共)沉淀(IP/CoIP)试剂盒(Pro G 凝胶法)

### IP/CoIP Kit (Pro G Agarose)

产品货号: EA-IP-K009

产品规格: 50 Tests

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：techsupport@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 背景信息

本产品由高品质的 Protein G 与琼脂糖凝胶共价偶联制成,可用于免疫沉淀(IP)和免疫共沉淀 (Co-IP)。本产品具有高载量,操作迅速便捷,特异性强,非特异性吸附低,可结合范围广等特点。

## 性能指标

### 1. 应用范围：

来源于细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水样品的多个物种的 IgG 类蛋白质（包含大部分 IgG 亚型）的免疫（共）沉淀（见附件）

注：若实验对象不属于上述样本，请咨询技术是否在应用范围内。

### 2. 偶联物属性：

高纯度的重组 Protein G。

### 3. 凝胶属性：

琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 100 $\mu$ m。

### 4. 凝胶载量：

1mL Sepharose 4B 琼脂糖颗粒，共价偶联 20mg 重组 Protein G。

### 5. 主要成分：

0.5mL Protein G 琼脂糖凝胶，保存于 1.5mL 含防腐剂和 50%甘油的 PBS 中。

## 产品组分

| 组分名称  | 组分编号 | 规格    | 保存方法         |
|---|------|-------|--------------|
| 细胞裂解液<br>Lysis buffer                         | L1   | 30 mL | 4°C, 12 个月   |
| 离心柱<br>Centrifugal column                     | C    | 50 个  | 室温, 12 个月    |
| Protein G 琼脂糖凝胶<br>Protein G Affinity Agarose | G1   | 2 mL* | -20°C, 12 个月 |
| 酸性洗脱液<br>Acid elution buffer                  | E3   | 1 mL  | 4°C, 12 个月   |
| PBS Buffer, pH7.4 (10×)                       | P10  | 50 mL | 4°C, 12 个月   |
| PBST Buffer, pH7.4 (10×)                      | P10T | 50 mL | 4°C, 12 个月   |
| 说明书一份   |      |       |              |

\*注释：缓冲液为含有 50%甘油的 PBS。

## 注意事项

### 1. 运输和保存：

本试剂盒在冷藏条件下运输。

收货后请将纯化柱 C 取出，室温保存；凝胶保存于-20°C，试剂盒及其它成分保存于 4°C。

### 2. 试剂使用建议：

**P10**（PBS Buffer, pH7.4 (10×)）、**P10T**（PBST Buffer, pH7.4 (10×)）使用前需用去离子水稀释成 1×工作液。

### 3. Protein G 凝胶使用建议：

勿冷冻、干燥凝胶，勿使用超声处理凝胶，使酸处理凝胶时间勿超过 10min。

### 4. 酸性洗脱液选择：

有文献显示，与传统的 Glycine-HCL 洗脱液相比，本试剂盒提供的 pH 3.0 的 Arginine-HCL 做为洗脱液，可以减少蛋白质变性，延长亲和凝胶的使用寿命。您也可以根据实际情况自行选用酸性洗脱液。

## 5. Protein G 与各物种 IgG 结合的亲和力：

各物种的抗体（IgG, IgM, IgA, IgD）与 Protein G 结合亲和力不同，使用前请认真阅读本说明书附件。

### 试剂配制

#### 1. 1× PBS

按照 9:1 的比例用去离子水将 P10(PBS Buffer, pH7.4 (10×))稀释待用，例如：1mL P10 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1× PBS。现用现配。

#### 2. 1× PBST

按照 9:1 的比例用去离子水将 P10T(PBST Buffer, pH7.4 (10×))稀释待用，例如：1mL P10T 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1× PBST。现用现配。

#### 3. 凝胶保存液

按照 1:1 的比例用甘油与 1× PBS 混匀待用。现用现配。

**注：建议在凝胶保存液中添加一定浓度的防腐剂，防止细菌滋生。**

## 使用方法

注：所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。以下操作步骤，使用凝胶悬液用量为 40 $\mu$ L（含 10 $\mu$ L 凝胶），可从 15 $\mu$ L 血清或 100 $\mu$ L 细胞上清中结合 20 $\mu$ g IgG，请根据待结合抗体量，调节凝胶使用量。

### 1. 细胞裂解液制备

#### 1) 收集细胞

悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。

贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，连同培养基转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。

#### 2) 用预冷至 4 $^{\circ}$ C 的 1 $\times$ PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。

#### 3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液 L1，反复吹打后冰上放置 10-20min。

注：一般 1mL 细胞裂解液可以处理约 0.5~1 $\times 10^7$  个细胞。为了避免目标蛋白质降解，您可以加蛋白酶抑制剂（PMSF 工作浓度：0.1~1.0mmol/L）。

#### 4) 用超声破碎仪处理细胞裂解液，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 10min。取上清即为蛋白样本。建议立即进行下一步实验，若时间不允许，置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

注：若无超声破碎仪，也可使用削成斜口的枪头或注射器反复吹吸，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。

#### 5) 若目标蛋白是分泌表达的，不需要上述处理，直接收集培养基上清，浓缩后即可进行以下步骤。如果目标蛋白质含量较高，建议用 1 $\times$ PBS 稀释样品至目标蛋白质终浓度为 10-100 $\mu$ g/mL。

### 2. 装柱及孵育

#### 1) Protein G 凝胶的准备：

将凝胶 **G1** 充分混悬,用剪去或切去末端的枪头取 40 $\mu$ L 凝胶悬液(含 10 $\mu$ L 凝胶),置于纯化柱中,加入 250 $\mu$ L 1 $\times$ PBS,充分混悬,1000rpm 离心 30sec,弃离心液。重复此洗涤步骤 2 次。

- 2) 抗体准备:根据抗体说明书推荐的 IP 稀释比,用 1 $\times$ PBS 稀释抗体,配制成成抗体工作液。或将抗体总体积调整至 500 $\mu$ L。置于冰上备用。
- 3) 将稀释好的抗体加入预洗好的凝胶,轻柔混匀,在摇床上室温孵育 10min。
- 4) 1000rpm 离心 30sec,取上清液至新的离心管中,以便后续使用。
- 5) 加入 250 $\mu$ L 1 $\times$ PBS 至凝胶,温和混匀,清洗凝胶,1000rpm 离心 30sec,弃离心液。重复 4 次。得到抗体-凝胶复合物。

### 3. 目标蛋白与抗体-凝胶复合物结合

- 1) 孵育:在抗体-凝胶复合物中加入 200 $\mu$ L 准备好的样本,摇床上室温孵育 10min,也可 4 $^{\circ}$ C 孵育 2h 或更长时间。
- 2) 离心分离:孵育完毕后,1000rpm 离心 30sec,弃离心液。加入 250 $\mu$ L 1 $\times$ PBST,温和混匀,清洗凝胶,1000rpm 离心 30sec,弃离心液。重复 4 次。

### 4. 目标蛋白洗脱

本说明书提供以下两种目标蛋白洗脱方案,请根据后期检测的需要选择不同的目标蛋白洗脱方法。

- 1) 变性洗脱法:此方法的目标,适用于 SDS-PAGE 检测。  
步骤:将凝胶移至 1.5ml 离心管,离心,弃上清,向凝胶中加入 2 $\mu$ L 5 $\times$ 上样缓冲液,混合均匀,95 $^{\circ}$ C 煮样 5 min。离心分离凝胶,收集上清,进行 SDS-PAGE 检测。
- 2) 酸性洗脱法:此方法洗脱的目标蛋白,可用于后期功能分析。  
步骤:向凝胶中加入 100-200 $\mu$ L 酸性洗脱液 **E3**,室温孵育 10 min;换新的收集管,1000rpm 离心 30sec,收集离心液至新的收集管,并

立即滴入总体积 1/10 体积的 **P10** 中和, 将洗脱产物 pH 调节至中性, 样品可用于后期功能分析。



## 附件

## Protein G 与各物种 IgG 结合的亲和力

|       |           |      |
|-------|-----------|------|
| Human | Total IgG | ++++ |
|       | IgG1      | ++++ |
|       | IgG2      | ++++ |
|       | IgG3      | +++  |
|       | IgG4      | ++++ |
|       | IgM       | -    |
|       | IgD       | -    |
|       | IgA       | -    |
|       | IgE       | -    |
|       | Fab       | +    |
|       | ScFv      | -    |
| Mouse | Total IgG | +++  |
|       | IgM       | -    |
|       | IgG1      | ++++ |
|       | IgG2a     | ++++ |
|       | IgG2b     | +++  |
|       | IgG3      | +++  |
| Rat   | Total IgG | +/-  |
|       | IgG1      | +    |
|       | IgG2a     | ++++ |
|       | IgG2b     | ++   |
|       | IgG2c     | ++   |

|            |           |       |
|------------|-----------|-------|
| Cow        | Total IgG | +++   |
|            | IgG1      | +++   |
|            | IgG2      | +++   |
| Goat       | Total IgG | +++   |
|            | IgG1      | +++   |
|            | IgG2      | +++   |
| Sheep      | Total IgG | ++    |
|            | IgG1      | ++    |
|            | IgG2      | +++   |
| Horse      | Total IgG | ++++  |
|            | IgG(ab)   | ++++  |
|            | IgG(c)    | ++++  |
|            | IgG(T)    | +++++ |
| Rabbit     | Total IgG | ++++  |
| Guinea Pig | Total IgG | ++++  |
| Hamster    | Total IgG | +     |
| Pig        | Total IgG | +++   |
| Donkey     | Total IgG | +++   |
| Cat        | Total IgG | +     |
| Dog        | Total IgG | +     |
| Chicken    | Total IgY | +     |
| Monkey     | Total IgG | ++++  |

## 声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 本试剂盒提供的裂解液是经过长时间反复优化的配方，经过大量实验验证。处理细胞时，建议使用本试剂盒配套的裂解液，其他厂家提供的裂解液可能影响蛋白纯化或者后续 IP 实验结果。
4. 本说明书中推荐的条件是通用的，用户可根据不同目标蛋白的性质，优化实验条件，选择最合适的实验方案。