

(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 L 凝胶法)

IP/CoIP Kit (Pro L Agarose)

产品货号: EA-IP-K010

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 L 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 L。

3. 凝胶属性:

琼脂糖凝胶颗粒, 平均粒径 100 μ m。

4. 凝胶载量:

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

5. 主要成分:

0.5mL Protein L 琼脂糖凝胶, 保存于 1.5mL 含防腐剂 and 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 Lysis buffer	L1	30 mL	4°C, 12 个月
离心柱 Centrifugal column	C	50 个	室温, 12 个月
Protein L 琼脂糖凝胶 Protein L Affinity Agarose	G1	2 mL*	-20°C, 12 个月
酸性洗脱液 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 L 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 L 与各物种 IgG 结合的亲和力：

各物种的抗体（IgG, IgM, IgA, IgD）与 Protein L 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 40μL（含 10μL 凝胶），可从 15μL 血清或 100μL 细胞上清中结合 20ug 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℃的 1×PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复 1 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 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 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: $0.1 \sim 1.0 \text{ mmol/L}$)。

- 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℃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℃ 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×PBS 稀释样品至目标蛋白质终浓度为 $10 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 。

2. 装柱及孵育

- 1) Protein L 凝胶的准备：
将凝胶 G1 充分混悬，取 40μL 凝胶悬液（含 10μL 凝胶），置于纯化柱中，加入 250μL 1×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×PBS 稀释抗体，配制成为抗体工作液。或将抗体总体积调整至 500μL。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 30min。
- 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 250μL 1×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 200μL 准备好的样本，摇床上室温孵育 30min，也可 4℃ 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 250μL 1×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 μ 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 μ 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 L 与各物种 IgG (κ) 结合的亲和力(仅轻链)

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	/

“+”表示亲和力的相对强度，“-”表示无亲和力，“/”表示此项暂无可靠数据。

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。