

(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 A 凝胶法)

IP/CoIP Kit (Pro A Agarose)

产品货号: EA-IP-K006

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 A 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, 请咨询技术是否应用范围内。

2. 偶联物属性:

高纯度的重组 Protein A。

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 A。

5. 主要成分:

0.5mL Protein A 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 Lysis buffer	L1	30 mL	4°C, 12 个月
离心柱 Centrifugal column	C	50 个	室温, 12 个月
Protein A 琼脂糖凝胶 Protein A 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 A 凝胶使用建议：

勿冷冻、干燥凝胶，勿使用超声处理凝胶，使用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 A 与各物种 IgG 结合的亲和力：

各物种的抗体（IgG, IgM, IgA, IgD）与 Protein A 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 μ L（含 10 μ L 凝胶），可从 15 μ L 血清或 100 μ L 细胞上清中结合 20 μ 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 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 0.5~1 \times 10⁷ 个细胞。为了避免目标蛋白质降解，您可以加蛋白酶抑制剂。

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。

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 μ g/mL。

2. 装柱及孵育

1) Protein A 凝胶的准备：

将凝胶 G1 充分混悬，用剪去或切去末端的枪头吸取 40 μ L 凝胶悬液（含 10 μ L 凝胶），置于纯化柱中，加入 250 μ 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，

配制成为抗体工作液。或将抗体总体积调整至 500 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 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 A 与各物种 IgG 结合的亲和力

Human	Total IgG	++++	Cow	Total IgG	++	
	IgG1	++++		IgG1	+	
	IgG2	++++		IgG2	+	
	IgG3	++	Goat	Total IgG	+	
	IgG4	++++		IgG1	+	
	IgM	+		IgG2	+++	
	IgD	-	Sheep	Total IgG	++	
	IgA	++		IgG1	++	
	IgE	-		IgG2	++++	
	Mouse	Fab	++	Horse	Total IgG	++
		ScFv	++		IgG(ab)	++
Total IgG		++++	IgG(c)		++	
		IgM	-		IgG(T)	-
IgG1		++	Rabbit	Total IgG	++++	
IgG2a		++++	Guinea Pig	Total IgG	++++	
IgG2b	++++	Hamster	Total IgG	+		
Rat	IgG3	++++	Pig	Total IgG	+++	
	Total IgG	++	Donkey	Total IgG	++	
	IgG1	++	Cat	Total IgG	+++	
	IgG2a	-	Dog	Total IgG	+++	
	IgG2b	-	Chicken	Total IgY	-	
IgG2c	++++	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。