



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

免疫沉淀试剂盒(Protein A琼脂糖凝胶法)

产品编号	产品名称	包装
P2193S	免疫沉淀试剂盒(Protein A琼脂糖凝胶法)	20次
P2193M	免疫沉淀试剂盒(Protein A琼脂糖凝胶法)	100次

产品简介:

- 碧云天生产的免疫沉淀试剂盒(Protein A琼脂糖凝胶法) (Immunoprecipitation Kit with Protein A Agarose Gel)是一种通过高质量的重组Protein A琼脂糖凝胶, 配合用户自备的特异性抗体, 进行目的蛋白免疫沉淀或免疫共沉淀的试剂盒。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。
- 本试剂盒包含高质量的Protein A琼脂糖凝胶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]。
- 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与琼脂糖凝胶以一定的方式结合, 可用于免疫沉淀或抗体的纯化[3-4]。
- Protein A琼脂糖凝胶适合于免疫沉淀human IgG1、IgG2、IgG4, mouse IgG2a、IgG2b及rabbit IgG等, 而Protein G琼脂糖凝胶适合于免疫沉淀human IgG1、IgG2、IgG3、IgG4, mouse IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3, rat IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c, 以及rabbit、goat多克隆抗体。下表是碧云天Protein A、Protein G、Protein A/G琼脂糖凝胶产品与人、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	IgG ₁	+	++++	++++
	IgG _{2a}	++++	++++	++++
	IgG _{2b}	+++	+++	+++
	IgG ₃	++	+++	+++
	IgM	+/-	-	+/-
Rat	IgG ₁	-	+	+
	IgG _{2a}	-	++++	++++
	IgG _{2b}	-	++	++
	IgG _{2c}	+	++	++
	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可与多数哺乳动物IgG的Fc端特异性结合, 分子量为14kDa。该重组Protein A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分子可以结合2个IgG分子。
- 本试剂盒包含高质量的Protein A琼脂糖凝胶、Normal Mouse IgG和Normal Rabbit (正常小鼠IgG和兔IgG, 作为阴性对照)及

优化的各种缓冲液如Lysis Buffer、TBS (10X)、Protease Inhibitor Cocktail (100X)、Acid Elution Buffer、Neutralization Buffer、SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)等免疫沉淀必要试剂,使免疫沉淀或免疫共沉淀实验更加简单、便捷、高效。本试剂盒进行免疫沉淀的流程参考图1。Protein A琼脂糖凝胶经适当洗涤后,加入一定量特异性抗体,Protein A可与抗体Fc端特异性结合,一定时间孵育后形成Protein A琼脂糖凝胶-抗体混合物(beads-Ab complex),然后加入样品,样品可被抗体的Fab端特异性识别而形成Protein A琼脂糖凝胶-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琼脂糖凝胶上洗脱结合的免疫复合物用于后续检测。

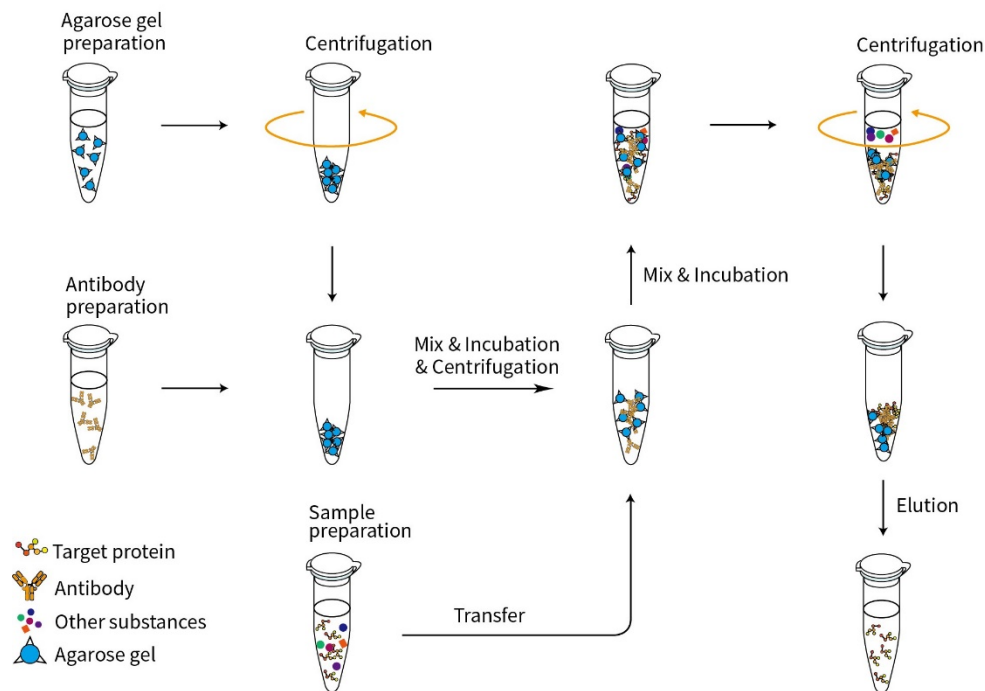


图1. 碧云天免疫沉淀试剂盒(Protein A琼脂糖凝胶法)的免疫沉淀流程图。

- 本试剂盒中的Protein A Agarose Gel (即 Protein A Affinity Gel, 中文名称为Protein A琼脂糖凝胶或Protein A亲和凝胶)可以特异性地结合相关抗体,并可以借助离心机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**。本试剂盒提供的Protein A Agarose Gel为25%的凝胶悬浊液,每毫升Protein A agarose beads (沉淀物)中偶联有约20mg的重组Protein A,可结合超过30mg human IgG,且特异性强,非特异性杂蛋白结合少。(2)**可重复使用多次,性价比高**。在正常情况下,本产品用于相同抗体的纯化时可回收使用3-5次。如果用于免疫共沉淀检测蛋白与蛋白的相互作用,不推荐重复使用。
- 本试剂盒中Protein A琼脂糖凝胶的主要指标如下表:

Characteristics	Description
Product content	25% settled gel in proper buffer
Beads structure	4% cross-linked agarose
Average beads size	90µm
Coupled protein	Recombinant Protein A
M.W. of protein	14kDa Protein A
Ligand concentration	20mg Protein A per ml settled gel
Binding capacity	≥30mg human IgG per ml settled gel
Elution method	Elution with acid, competing peptide or SDS-PAGE loading buffer
Application	Suitable for IP, Co-IP, Protein purification
Storage	-20°C

- **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。
- 本试剂盒提供的Protein A Agarose Gel为25%凝胶悬浊液,包装体积为总体积,每毫升中含有0.25ml纯凝胶(沉淀物)。对于常规的免疫沉淀实验,按照每100µl样品使用20µl凝胶悬浊液,本试剂盒小包装P2193S和中包装P2193M分别可以进行20次和100次样品的免疫沉淀,同时分别可以进行4次和20次阴性对照的免疫沉淀。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2193S-1	Lysis Buffer	50ml
P2193S-2	TBS (10X)	10ml

P2193S-3	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	0.5ml
P2193S-4	Protein A Agarose Gel	0.4ml
P2193S-5	Normal Mouse IgG (1mg/ml)	10µl
P2193S-6	Normal Rabbit IgG (1mg/ml)	10µl
P2193S-7	Acid Elution Buffer	2ml
P2193S-8	Neutralization Buffer	0.2ml
P2193S-9	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)	0.6ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2193M-1	Lysis Buffer	250ml
P2193M-2	TBS (10X)	30ml
P2193M-3	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	2.5ml
P2193M-4	Protein A Agarose Gel	2ml
P2193M-5	Normal Mouse IgG (1mg/ml)	50µl
P2193M-6	Normal Rabbit IgG (1mg/ml)	50µl
P2193M-7	Acid Elution Buffer	10ml
P2193M-8	Neutralization Buffer	1ml
P2193M-9	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)	3ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。

注意事项：

- 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>。
- Agarose Gel使用前一定要充分重悬，即充分颠倒若干次使混合均匀。
- Agarose Gel含有50%的甘油及微量的防腐剂，使用前宜先用TBS等适当溶液洗涤凝胶3次，以充分消除甘油和防腐剂产生的干扰。
- 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。本试剂盒中提供适量Normal Mouse IgG和Normal Rabbit IgG，更多需求，可以订购碧云天的人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。
- 如果离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物，可以将样品溶液用0.45µm的滤膜过滤。
- 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100µl裂解液的比例，准备相关试剂。

Steps	Solution required	Volume per assay
Cell lysis and sample preparation	Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail	100µl
Preparation of Agarose gel	TBS	~1.5ml
Immunoprecipitation	Agarose gel	20µl
Wash for beads-Ab complex (3 times)	TBS	500µl each time
Wash for beads-Ab-Ag complex (3 times)	Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail	500µl each time
Acid elution and neutralization (optional)	Acid Elution Buffer	100µl
	Neutralization Buffer	10µl

SDS-PAGE sample loading buffer elution (optional)	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)	20μl
---	-------------------------------------	------

- 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100-200μl含抑制剂裂解液用于裂解以及300-600μl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10μl 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. TBS的配制。**将TBS (10X)用超纯水稀释至1X，即为TBS。例如1ml TBS (10X)加入9ml超纯水，混匀后即为TBS。
- d. 琼脂糖凝胶的准备。**本Agarose Gel储存在含50%甘油的保护液中，所以需要在加入样品前适当洗涤。
- (a) 轻轻重悬Protein A Agarose Gel，尽量形成均匀的凝胶悬浊液，按照通常每100μl中加入20μl混合均匀的凝胶悬浊液（以下免疫沉淀步骤中都以每样加入20μl凝胶悬浊液为例），取适量Protein A Agarose Gel至一洁净离心管中 (FTUB306/FTUB065/FTUB015)，加入1X TBS至最终体积为约0.5ml。**注：**使用大孔径吸头(如用剪刀剪去部分吸头)吸取凝胶悬浊液会比较方便。
- (b) 轻轻重悬Protein A Agarose Gel，6000×g在4°C离心30秒，小心去除上清，不要吸到凝胶。重复上述步骤两次。
- (c) 按照初始的凝胶悬浊液的体积，用1X TBS重悬Protein A Agarose Gel。
- e. (选做) SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)的配制。**取适量SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)用水稀等体积释即为SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)。例如0.2ml SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)加入0.2ml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免疫沉淀或免疫共沉淀，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5min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2-10min。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。
- 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2-10min。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TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)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 Agarose Gel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TBS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TBS稀释适量的Normal Mouse IgG或Normal Rabbit 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 Agarose Gel进行离心分离, 6000×g在4°C离心30秒, 小心去除上清, 不要吸到凝胶。加入100μl抗体工作液或正常IgG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 Agarose Gel中加入适量抗体或正常IgG进行孵育。
 - c. **洗涤。**加入500μl TBS, 重悬Protein A Agarose Gel。冰浴并置于摇床上5分钟, 然后6000×g在4°C离心30秒, 小心去除上清, 不要吸到凝胶。重复洗涤三次。按照初始体积的量, 用TBS重悬Protein A Agarose Gel。
- 4. 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 Agarose Gel与样品4°C孵育1小时后离心分离, 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. **样品与结合了抗体或正常IgG的Protein A Agarose Gel孵育。**按照每100μl蛋白样品加入20μl凝胶悬浊液的比例加入结合了抗体或正常IgG的Protein A Agarose Gel, 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:** 也可先将适量抗体或正常IgG与样品室温孵育1-2小时或4°C孵育过夜后, 再加入10-20μl凝胶悬浊液室温孵育1小时。
 - c. **离心分离。**孵育完毕后, 6000×g在4°C离心30秒, 小心去除上清, 不要吸到凝胶。**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含抑制剂裂解液, 重悬凝胶。冰浴并置于摇床上5分钟, 然后6000×g在4°C离心30秒, 小心去除上清, 不要吸到凝胶。**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。
- 5. 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20μl原始凝胶悬浊液体积, 加入100μl Acid Elution Buffer (酸性洗脱液), 混匀后置于侧摆摇床或旋转混合仪上, 室温孵育5分钟。酸性洗脱液体积一般为凝胶悬浊液的5倍。**注:** 孵育时间不宜超过15分钟。
 - (b) 孵育完毕后, 6000×g在4°C离心30秒, 将上清转移到新的离心管中, 并立刻加入10μl Neutralization Buffer (中和液), 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容易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) 洗脱并中和的标签蛋白及其复合物置于4°C待用, 或者-20°C或-80°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, 可能会对后续对于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。**本方法为变性法, 得到的蛋白样品适合SDS-PAGE电泳或Western检测。
 - (a) 每20μl原始凝胶悬浊液体积, 加入20μl SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X), 95°C加热5分钟。
 - (b) 6000×g在4°C或室温离心30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会含有抗体的轻链和重链。**注2:** 如果希望获得更大的样品体积, 也可以在加入20μl SDS-PAGE Sample Loading Buffer (2X)后再补充加入适量的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X)。
 - 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中, 使其终浓度为150μg/ml, 或稀释5mg/ml的3X Flag多肽溶液(P9801)至150μg/ml。
 - (b) 每20μl原始凝胶悬浊液体积, 加入100μl 3X Flag多肽洗脱液(150μg/ml), 室温摇床孵育30-60分钟, 或4°C摇床孵育1-2小时。为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱。3X Flag多肽洗脱液体积一般为凝胶悬浊液的5倍。
 - (c) 孵育完毕后, 6000×g在4°C离心30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°C待用, 或者-20°C或-80°C长期保存。

常见问题:

1. 如何提高抗体与琼脂糖凝胶结合效率?

琼脂糖凝胶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琼脂糖凝胶的孵育时间、提高TBS的pH值(8-9)或降低离子强度(25-100mM NaCl)等方法提高亲和力。

2. 如何提高琼脂糖凝胶在免疫沉淀或免疫共沉淀反应中的特异性?

- a. 参考步骤4b中的备注, 可以先将适量抗体与样品进行孵育, 形成抗体-抗原复合物, 再用Protein A、G或A/G琼脂糖凝胶捕获复合物, 这样可以提高抗体与抗原的结合效率, 并降低琼脂糖凝胶与样品接触的时间, 从而提高沉淀产物的特异性。对于蛋白质/核酸共沉淀或染色质免疫共沉淀也推荐使用此方法。
- b. 参考步骤4a, 使用结合了正常IgG的琼脂糖凝胶与蛋白样品预孵育, 可以减少抗体的非特异性结合。类似地, 也可以在蛋白样品中先加入正常IgG预孵育, 然后再加入抗体进行孵育, 随后再加入琼脂糖凝胶进行抗体的免疫沉淀。

c. 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. 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 agarose gel, or the microcentrifuge tubes.	1. Pre-clear lysate with Mouse IgG Agarose (P2265) or Rabbit IgG Agarose (P2267) 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. Fishman J B, Berg E A. Cold Spring Harb Protoc. 2019. 2019(1).
4. Lin J S, Lai E M. Methods Mol Biol. 2017. 1615:211-219.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P2175S	免疫沉淀试剂盒(Protein A磁珠法)	20-100次
P2175M	免疫沉淀试剂盒(Protein A磁珠法)	100-500次
P2177S	免疫沉淀试剂盒(Protein G磁珠法)	20-100次
P2177M	免疫沉淀试剂盒(Protein G磁珠法)	100-500次
P2179S	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法)	20-100次
P2179M	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G磁珠法)	100-500次
P2181S	Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100次
P2181M	Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500次
P2183S	Myc标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100次
P2183M	Myc标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500次
P2185S	HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100次
P2185M	HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500次
P2187S	V5标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	20-100次
P2187M	V5标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法)	100-500次
P2193S	免疫沉淀试剂盒(Protein A琼脂糖凝胶法)	20次

P2193M	免疫沉淀试剂盒(Protein A琼脂糖凝胶法)	100次
P2195S	免疫沉淀试剂盒(Protein G琼脂糖凝胶法)	20次
P2195M	免疫沉淀试剂盒(Protein G琼脂糖凝胶法)	100次
P2197S	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G琼脂糖凝胶法)	20次
P2197M	免疫沉淀试剂盒(Protein A+G琼脂糖凝胶法)	100次
P2202S	Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20次
P2202M	Flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100次
P2204S	Myc标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20次
P2204M	Myc标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100次
P2206S	HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20次
P2206M	HA标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100次
P2208S	V5标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	20次
P2208M	V5标签蛋白免疫沉淀试剂盒(琼脂糖凝胶法)	100次

Version 2022.05.25