

说明书

Pierce®交联 IP (免疫沉淀) 试剂盒

26147

2134.8

货号 描述

26147 Pierce 交联 IP 试剂盒, 包含足够进行 50 次免疫沉淀反应的试剂 (每次使用 10 μ L 树脂用于固定化抗体)

试剂盒组分:

Pierce 蛋白 A/G 加强型琼脂糖树脂, 0.55 mL 固相树脂以 50%的浆液形式提供 (例如, 100 μ L 50%的浆液含有 50 μ L 固相树脂)。

20X交联缓冲液, 25 mL, 使用时稀释至1X, 即为: 0.01 M 磷酸钠盐缓冲液, 0.15 M NaCl; pH 7.2 溶液

DSS (辛二酸二琥珀酰亚胺酯), No-Weigh™ (免称重) 式, 8X2mg 微管包装

IP 裂解/洗涤缓冲液, 2 X 50 mL, 0.025 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, 1% NP-40, 5%甘油; pH 7.4

100X条件缓冲液, 5 mL, 中性 pH 缓冲液

20XTris-缓冲盐溶液, 25 mL, 使用时稀释至1X, 即为 0.025 M Tris, 0.15 M NaCl; pH 7.2溶液

洗脱缓冲液, 50 mL, pH 2.8, 含有伯胺

非还原型上样缓冲液, (5X), 5 mL, 0.3M Tris•HCl, 5% SDS, 50%甘油, 泳道标记示踪染料; pH 6.8

Pierce 离心柱-带螺旋盖, 100 个柱子, 且包含相应配件

微量离心收集管, 2 mL, 100 个

微量离心样品管, 1.5 mL, 50 个

Pierce 对照琼脂糖树脂 (4%交联琼脂糖珠), 2 mL 固相树脂以 50%的浆液形式提供 (例如, 100 μ L 50%的浆液含有 50 μ L 固相树脂)

储存: 收到试剂盒后将其储存于 4°C。DSS 置于 4°C 干燥保存。试剂盒于室温运输。

产品简介

Thermo Scientific Pierce 交联 IP 试剂盒通过将抗体共价交联于蛋白 A/G 树脂从而高效地实现抗原免疫沉淀反应。试剂盒融合了 DSS 可靠的化学交联作用和 Pierce 蛋白 A/G 琼脂糖树脂对多种来源抗体的高结合能力, 提供了一个出色的免疫沉淀的实验方案。试剂盒包含使用少于10 μ g抗体便能获得高抗原产量的优化缓冲液, 以及最大程度减少处理和混合时间的高效离心柱和收集管。试剂盒提供的 5X 上样缓冲液, 无需进行大量稀释, 是样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳的理想选择。完整的试剂盒可使研究人员非常容易地进行高产量的免疫沉淀实验, 同时也可避免抗体的干扰。

重要产品信息

- 除非另有说明, 所有操作均在 4°C 下进行。
- 树脂的所有离心步骤需在低速 (如 1000-3000Xg)、30-60 秒条件下操作。离心速度大于 5000Xg可能会导致树脂聚集, 难以重悬。
- 使用离心柱离心时, 如搭配2mL收集管, 则流穿液体积应不超过600 μ L, 如搭配1.5mL收集管, 则流穿液体积应不超过300 μ L。体积超出可能导致柱内产生回压及洗涤和洗脱不完全。
- 在进行免疫沉淀之前, 用对照琼脂糖树脂预处理裂解液, 以降低非特异性的蛋白结合。
- 当使用血清时, 特异性识别目的抗原的抗体可能只占血清 IgG 总量的 1-2%。因此, 如果期望获得较高的抗原产量, 建议使用亲和纯化后的抗体以获得理想的实验结果。
- IP 裂解/洗涤缓冲液已进行过代表性细胞类型的检测, 包括但不限于下列细胞系: HeLa、Jurkat、A431、A549、MOPC、NIH 3T3 和 U2OS。通常情况下, 10⁶ 的 HeLa 细胞可以产生约 10 mg 的细胞团块, 当使用 100 μ L IP裂解/洗涤缓冲液裂解时, 可以得到 3 μ g/ μ L(或300 μ g)的蛋白样本。
- 为了获得最佳结果, 可分别添加Thermo Scientific Halt™ 蛋白酶抑制剂混合物 (货号: 78430) 和磷酸酶抑制剂混合物 (货号: 78428), 或者添加Halt 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物 (货号: 78440), 以尽量减少细胞裂解液中蛋白质的降解和去磷酸化。
- IP 裂解/洗涤缓冲液可兼容Thermo Scientific Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒 (货号: 23225)。
- 设置合理的对照对于鉴定相关的相互作用至关重要。试剂盒提供的 Pierce 对照琼脂糖树脂是与 Pierce 蛋白 A / G 加强型琼脂糖树脂相似的载体材料, 可以作为阴性对照。
- Pierce 离心柱套装包括离心柱、螺旋盖、底盖、带有 Luer-Lok™接头的螺旋帽、大垫片和大垫片安装工具。标准的 IP 不需要大垫片。当等比例扩大反应体系 (例如, 树脂 > 200 μ L) 时, 可以插入大垫片以方便洗涤。带有 Luer-Lok™接头的螺旋帽有可翻盖的顶部, 可以在洗涤步骤中使用。储存过程中可用螺旋盖密封离心柱 (见附加信息部分)。

其它所需材料

- 微量离心收集管, 2 mL

Pierce 交联 IP 试剂盒的操作流程

A. 抗体与 Pierce 蛋白 A / G 琼脂糖结合

注: 以下操作方案是根据固相化 10 μ g 抗体进行优化的, 但是同样适用于 2-50 μ g 抗体的固相化, 如果抗体的使用量大于 50 μ g, 须按比例放大树脂、交联剂和缓冲液的用量。

- 用超纯水稀释 20X交联缓冲液, 每个 IP 反应需 2 mL 1X交联缓冲液。
- 轻旋 Pierce 蛋白 A / G 加强型琼脂糖树脂的瓶子, 以获得均一的悬液。使用大口径或截短枪头取20 μ L 树脂浆液加入 Pierce 离心柱中。将柱子置于一个微量离心管中, 1000Xg 离心 1 分钟, 弃掉流穿液体。
- 用 200 μ L 1X交联缓冲液洗涤树脂, 离心并且弃掉流穿液体。重复上述洗涤操作一次。
- 在纸巾上轻拍离心柱的底部以去除剩余的液体, 插入底盖。
- 准备 10 μ g 抗体做交联反应。用超纯水和 20X交联缓冲液配制1X 交联缓冲液, 将抗体稀释至 100 μ L 体积。例如, 抗体浓度为 1 μ g/ μ L 时, 向体系中加入 5 μ L 20X交联缓冲液、85 μ L 超纯水和 10 μ L 抗体制成 100 μ L 抗体溶液。可以直接将超纯水、20X交联缓冲液和亲和纯化的抗体添加到含有树脂的离心柱中。
- 盖上螺旋盖, 在室温条件下于旋转器或混匀器上孵育 30-60 分钟, 确保浆液在孵育过程中处于悬浮状态。

- 卸下并保留底塞，取下螺旋帽。将离心柱放置与收集管中并离心。保存流穿液体以验证抗体结合效率。
- 用 100 μL 1X交联缓冲液洗涤树脂，离心并且弃掉流穿液体。
- 用 300 μL 1X交联缓冲液洗涤树脂，离心并且弃掉流穿液体。重复上述洗涤操作一次。

B.交联结合的抗体

- 注:** 传统的 IP 实验可以省略抗体交联步骤; 但是如果省略了抗体交联步骤, 抗体将在洗脱步骤与抗原一起洗脱。
- 注:** DSS 交联剂对湿度非常敏感, 使用后将 DSS 用锡箔纸密封。使用前将 DSS 溶于 DMSO或 DMF。DSS 与含有氨基的缓冲液不兼容 (如 Tris, 甘氨酸)。
- 用移液器枪头刺穿锡箔纸包裹的单管DSS, 加入 217 μL DMSO 或 DMF 制成 10X溶液 (25 mM)。用移液器将溶液完全混匀 (如上下吹打该溶液), 直到 DSS 溶解。
 - 按 1:10 的比例用 DMSO 或 DMF 稀释 DSS 溶液 (100 μL 10XDSS 加入 900 μL 溶剂) 至 DSS的浓度为 2.5 mM。
 - 在纸巾上轻拍离心柱的底部以去除剩余的液体, 插入底盖。
 - 将 2.5 μL 20X交联缓冲液、9 μL 2.5 mM 的 DSS 和 38.5 μL 超纯水加入离心柱。溶液总体积为 50 μL 。 DSS以至少树脂上蛋白A/G 的10倍摩尔数加入到树脂中, 其工作浓度为 450 μM 。
 - 将交联反应体系在室温条件下, 于旋转器或混匀器上孵育 30-60 分钟。
 - 卸下并保留底塞，取下螺旋帽。将离心柱放置到收集管中并离心。
 - 加 50 μL 洗脱缓冲液至离心柱中并离心。保存流穿液体以验证抗体交联程度。
 - 用 100 μL 的洗脱缓冲液洗两次, 以除去没有交联上的抗体并淬灭交联反应。
 - 用 200 μL 预冷的 IP 裂解/洗涤缓冲液洗涤两次, 并在每次洗涤后离心。
 - 继续进行免疫沉淀的操作。如果需要的话, 可以将抗体交联树脂在 IP 裂解/洗涤缓冲液中保存不超过 5 天。如果需要更长时间的储存, 可将树脂保存于 1X交联缓冲液 (PBS) 中。当保存树脂时, 插入离心柱的底塞, 加入 200 μL 储存缓冲液, 并拧上螺旋帽于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

C. 哺乳动物细胞裂解

方案 I: 裂解贴壁细胞

- 小心去除细胞中的培养基。
- 用1X交联缓冲液清洗细胞一次。
- 将冰上预冷的 IP 裂解/洗涤缓冲液加入细胞中 (表 1)。冰上孵育 5 分钟并定期混匀。

表 1.不同标准的细胞培养皿/板中 IP 裂解/洗涤缓冲液的建议添加量

培养皿/板的尺寸或表面积	IP 裂解/洗涤缓冲液体积
100 X 100 mm	500-1000 μL
100 X 60 mm	250-500 μL
6孔板	200-400 μL 每孔
24孔板	100-200 μL 每孔

4. 将细胞裂解液转移到微量离心管中, $\sim 13000 \times g$ 离心 10 分钟以沉淀细胞碎片。
5. 将上清转移到一个新的微量离心管中用于蛋白浓度测定和后续分析。

方案 II: 裂解悬浮细胞

1. 将细胞悬浮液在 $1000 \times g$ 下离心 5 分钟以沉淀细胞。弃掉上清。
2. 将细胞团块用 PBS 重悬洗涤一次。 $1000 \times g$ 离心 5 分钟再次沉淀细胞。
3. 将冰上预冷的 IP 裂解/洗涤缓冲液加到细胞团块中。每 50 mg 湿重细胞团块加入 500 μL IP 裂解/洗涤缓冲液 (即 10:1 体积 / 质量)。如果裂解大量细胞, 可首先添加 10% 终体积的 IP 裂解/洗涤缓冲液到细胞团块中, 用移液管/移液器上下吹打细胞团块以混匀, 然后再向细胞悬浮液中添加剩余的 IP 裂解/洗涤缓冲液。
4. 将细胞裂解液在冰上孵育 5 分钟并定期混匀。 $\sim 13000 \times g$ 离心 10 分钟去除细胞碎片。
5. 将上清转移到一个新的微量离心管中用于进行蛋白浓度测定和后续分析。

D. 使用对照琼脂糖树脂预处理细胞裂解液

1. 对于含有 1mg 总蛋白的细胞裂解液, 添加 80 μL 对照琼脂糖树脂浆液 (40 μL 固相树脂) 到离心柱中。
2. 离心以去除存储缓冲液。
3. 加入 100 μL 1X 交联缓冲液缓冲液至离心柱中, 离心并弃掉流穿液体。
4. 加入 1 mg 细胞裂解液至含有树脂的离心柱中, 并在 4°C 下孵育 30 分钟至 1 小时, 期间持续温和地翻转柱子进行混匀。
5. $1000 \times g$ 离心 1 分钟, 弃掉含有树脂的离心柱, 保留流穿液体, 以备加入到固定化的抗体中。

E. 抗原免疫沉淀的通用操作方案

注: 样品用量和孵育时间取决于每个特定的抗体-抗原体系, 并且可能需要优化方案使产量最大化。

1. 如果抗体-交联树脂保存于 PBS 中, 用 IP 裂解/洗涤缓冲液洗涤两次。每次洗涤后弃掉流穿液体。
2. 在纸巾上轻拍离心柱的底部以去除剩余的液体, 更换底盖。
3. 用 IP 裂解/洗涤缓冲液稀释细胞抽提物。离心柱中建议的样品体积为 300-600 μL 。每个 IP 反应总蛋白建议量是 500 – 1000 μg , 可使用 Pierce BCA 蛋白定量试剂盒测定。
4. 将预处理的细胞裂解液加入含有抗体-交联树脂的离心柱中。盖上螺旋盖温和地上下翻转混匀或震荡孵育 1-2 小时或 4°C 过夜。
5. 卸下底盖, 拧松螺旋帽并将离心柱置于收集管中。离心并保留流穿液体。在确定 IP 反应成功之前不要丢弃该液体。
6. 拧下螺旋帽, 将柱子置于一个新的收集管中, 加入 200 μL 的 IP 裂解/洗涤缓冲液并离心。

注: 如果需要无去垢剂洗涤, 则有另一款洗涤缓冲液 (20XTBS 缓冲液) 提供。使用前请将该缓冲液稀释至 1X。

7. 用 200 μL IP 裂解/洗涤缓冲液洗涤树脂两次, 并且每次洗涤后都进行离心。
8. 用 100 μL 1X 条件缓冲液洗涤树脂一次。

注: 用超纯水稀释, 将 100X 条件缓冲液配置成 1X 条件缓冲液。

F. 抗原洗脱

注: 为了中和低 pH 值的洗脱缓冲液 (例如, 为了进行下游的酶活或功能测定), 向收集管中加入 5 μ L 1M Tris, pH 9.5, 然后通过离心即可中和 pH 值(如下步骤3)。或者, 直接使用中性 pH 值的洗脱缓冲液 (如: 温和洗脱缓冲液, 货号: 21027)。

- 1. 将离心柱置于一个新的收集管中, 加入 10 μ L 洗脱缓冲液并离心。
- 2. 将离心柱处于收集管中, 加入 50 μ L 洗脱缓冲液。在室温下孵育 5 分钟。该柱子无需盖上或者混匀。

注: 减少洗脱缓冲液的用量, 可获得浓度更高的洗脱产物但可能会使总体产量减少。

- 3. 将柱子离心并收集流穿的液体。分析洗脱液以确定是否含有抗原。如果需要, 可进行补充洗脱 (即, 步骤F1-F3)。单独分析每一份洗脱液, 以确保抗原被完全洗脱。
- 4. 如需保持抗体交联树脂的活性, 立即进行 G 部分的操作, 即树脂的再生和储存。

G.树脂的再生和储存

- 1. 将 100 μ L 1X交联缓冲液加入离心柱中, 离心并弃掉流穿液体。重复此操作一次。
- 2. 更换底塞, 将 200 μ L 1X交联缓冲液加入离心柱中。更换螺旋帽。用实验室封口膜包裹离心柱底部, 防止树脂变干。对于长期储存 (如, > 2 周), 添加终浓度为 0.02%的叠氮化钠。

H.SDS-PAGE 分析的样品制备

- 1. 将 5X泳道标记上样缓冲液平衡至室温。颠倒 5-10 次将其轻柔混匀。对于还原型凝胶, 在 5X上样缓冲液中添加 1M DTT, 至终浓度为 100 mM。
- 2. 向样品中加入 5X上样缓冲液至终浓度为 1X。(如将 5 μ L 5X样品缓冲液加入 20 μ L 样品中)。
- 3. 在 95-100 $^{\circ}$ C下孵育样品约 5 分钟。在进行 SDS-PAGE 电泳之前将样品冷却至室温。

常见问题及解决方案

问题	可能的原因	解决方案
在洗脱的抗原中检测出抗体	交联步骤后的洗涤没有将未结合的抗体去除干净	交联后增加洗脱缓冲液的洗涤次数
	使用还原剂(如, DTT 或 β -ME)处理抗体交联的树脂, 还原剂将抗体还原, 并将未与树脂共价结合的抗体片段或亚基洗脱	使用不含有还原剂的缓冲液
抗原没有被免疫沉淀	样品中抗原含量较低而无法检测	通过 SDS-PAGE 凝胶或 Western blot 检测蛋白的表达量或裂解液的裂解效率
	抗体没有与抗原结合	使用一个近源抗体或一个识别不同抗原表位的不同抗体
	DSS 过度修饰了抗体	核对反应中的 DSS 溶液的添加量, 如果需要, 降低 DSS 的用量
	IP 裂解/洗涤缓冲液组份干扰抗原-抗体的结合	用 1XTris-缓冲盐溶液进行免疫沉淀或者洗涤操作
抗原没有被洗脱	洗脱缓冲液没有破坏抗体-抗原的相互作用	优化洗脱条件 (见我们网站上的Tech Tip#27)
		用下列方法洗脱抗原: 将 100 μ L 1X还原型SDS 上样缓冲液加入离心柱中, 于 100 $^{\circ}$ C 孵育 5-10 分钟, 加热过程中保持离心柱处于收集管中, 并且不带底塞和盖子
抗原在下游实验中没有活性	抗原对低 PH 非常敏感, 在洗脱过程中失活	用一个高盐、中性 PH 的洗脱缓冲液重复免疫沉淀实验, 比如温和洗脱缓冲液(货号: 21027)

注意: 用SDS样品缓冲液加热抗体偶联树脂后, 该树脂不能重复使用, 必须丢弃

附件信息

A. Pierce 离心柱

Pierce 离心柱可容纳多达 900 μ L 的液体。柱子可置于 1.5mL 的或 2mL 微量离心管中, 或与 Luer-Lok 接头 (见图 1) 联用, 使用注射器处理样品。当使用注射器时, 样品大小和洗涤量只受限于注射器的容积。对于小体积树脂, 使用小的、预先插入的垫片即可 (图 2A)。需要使用超过 100 μ L 的树脂时, 使用大垫片, 可以放在柱子的顶部或底部 (图 2B 和 2C)。当树脂介于大、小两种垫片之间时 (图 2B), 树脂可能可以被重复使用。

- 要从柱子中移除垫片, 可用拉直的曲别针, 从柱子底部插入, 将垫片推出。
- 要插入垫片, 先将其置于柱内, 然后使用垫片推入工具将其推到相应的位置。
- 要从顶端和底部都装了垫片的柱子中移除顶端的垫片, 可用拉直的曲别针挑起顶端的垫片, 然后可用镊子将其移出。

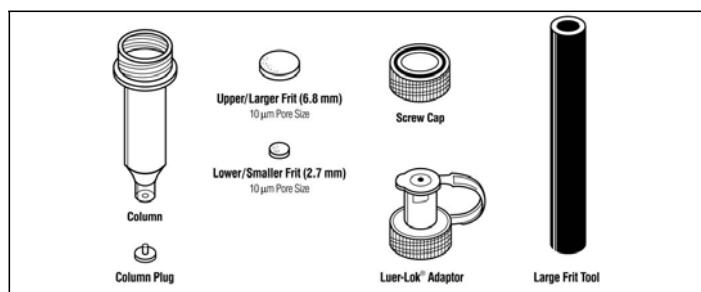


图 1. Pierce 离心柱组件图。

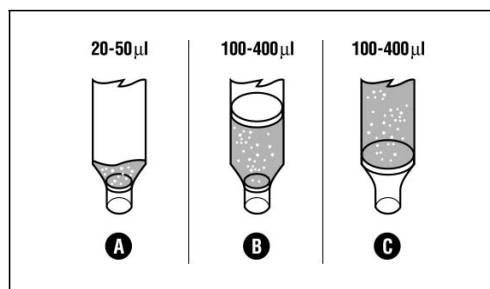


图 2. 垫片放置的三种形式。

B. 请访问我们的网站, 了解关于下述事项的更多信息:

- [Tech Tip #27: Optimize elution conditions for immunoaffinity purification\(优化免疫亲和纯化实验中的洗脱条件\)](#)
- [Tech Tip #43: Protein Stability and Storage \(蛋白质的稳定性和储存\)](#)
- [Tech Tip #40: Convert between times gravity \(X g\) and centrifuge rotor speed \(RPM\) \(重力倍数 \(Xg\) 和离心转子速度 \(RPM\) 之间的单位转换\)](#)

相关的赛默飞产品

78430	Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (Halt 一次性使用蛋白酶抑制剂混合物) (100X), 100 μ LX 24管
78428	Halt Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (Halt 一次性使用磷酸酶抑制剂混合物) (100X), 100 μ LX24 管
78440	Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Halt 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物) (100X), 1 mL
28358	20X TBS Buffer (TBS 缓冲液), 500 mL
69705	Pierce Spin Columns – Screw Cap (Pierce 离心柱-带有螺旋盖), 25 个/包
69720	Pierce Microcentrifuge Tubes (Pierce 微量离心管), 2 mL, 72 个/包
69715	Pierce Microcentrifuge Tubes (Pierce 微量离心管), 1.5 mL, 72 个/包
89879	Pierce Micro-Spin Columns (Pierce 微型离心柱), 50 个/包
20423	Pierce Protein A/G Plus Agarose (Pierce 蛋白 A / G 加强型琼脂糖树脂), 2 mL
28348	20XPBS Buffer (PBS 缓冲液), 500 mL
28372	BupH™ Phosphate Buffered Saline (PBS) (BUPH™磷酸盐缓冲液), 40 包, 每包可配成 500 mL 缓冲液
39001	Lane Marker Sample Buffer, Non-Reducing (非还原型泳道标记上样缓冲液) (5X), 5 mL
21027	Gentle Ag/Ab Elution Buffer (温和抗原/抗体洗脱缓冲液), pH 值 6.6, 500 mL
21004	IgG Elution Buffer (IgG 洗脱缓冲液), 用于常规蛋白质亲和纯化的低-pH 洗脱缓冲液, 1 L
26146	Pierce Classic IP Kit (Pierce 经典 IP 试剂盒)
26148	Pierce Direct IP Kit (Pierce 直接 IP 试剂盒)
26150	Pierce Control Agarose Resin (Pierce 对照琼脂糖树脂), 10 mL

自产品文件、说明书和/或产品包装内所附文件(“文件”)中所说明的销售之日起, 本公司担保本产品(“产品”)的运行或性能完全符合已公布的产品说明书, 并且担保产品在材料和工艺上没有缺陷。除非另外以书面形式进行明确授权, 本产品仅可用于研究目的。本产品不适合应用于 FDA 监管的领域。只有当本产品由经过适当培训的人员使用时, 此处所提供的担保才有效。除非在“文件”中另有说明, 否则本担保只限于从产品装运之日起一年。本担保不会扩展至除了本产品的原始购买方(“买方”)之外的任何一方。

公司不提供其它任何明示或暗示的保证条款, 包括但不限于商业适售性、特定目的之适用性、或者非侵权证明等暗示性保证。在质保期间, 买方对于不合格产品的唯一赔偿仅限于更换不合格的产品或者退回货款。

如果由于下述原因之一造成产品故障, 本公司没有义务对产品进行更换: (i) 事故、灾难或不可抗力事件; (ii) 买主的错误使用、过错或疏忽; (iii) 将该产品以其设计范围之外的方式使用; 或者 (iv) 不正确储存和操作该产品。

产品说明书可在 www.thermoscientific.com/pierce 网站下载。



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com
www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC