

说明书

Pierce™ 经典磁珠式免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒

88804

2287.3

货号	描述
88804	<p>Pierce 经典磁珠式免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒，包含足够完成 40 个反应的试剂，每个反应使用 25 μL 磁珠</p> <p>试剂盒组成:</p> <p>Pierce 蛋白 A/G 磁珠 1 mL，贮存于含有 0.05% NaN₃ 的水中，浓度为 10 mg/mL</p> <p>Pierce 免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液，2 \times 50 mL，pH 7.4，0.025M Tris，0.15M NaCl，0.001M EDTA，1% NP40，5% 甘油</p> <p>电泳上样电泳上样缓冲液，非还原性，（5\times），5 mL，pH 6.8，0.3M Tris•HCl，5% SDS，50% 甘油，泳道标记示踪染料</p> <p>洗脱缓冲液，5 mL，pH 2.0</p> <p>中和缓冲液，0.5 mL，pH 8.5</p> <p>贮存条件: 收到本产品后于 4 $^{\circ}$C 贮存。冰盒运输。</p>

目录列表

产品简介	2
流程简述	2
重要产品信息	2
所需额外试剂和仪器	3
Pierce 经典磁珠式免疫沉淀试剂盒流程	4
A. 免疫复合物的制备	4
B. 手动免疫沉淀	4
C. 自动免疫沉淀	5
问题解决	7
网站附加信息	8
Thermo Scientific KingFisher 仪器常见问题	8
Thermo Scientific 相关产品	9

产品简介

Thermo Scientific™ Pierce™ 经典磁珠式免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒能够高效完成抗原免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验, 抗体用量小于 10 µg 且无需离心。首先, 将特异性的抗体加入样品中与目标抗原形成免疫复合物, 然后将其结合在蛋白 A/G 磁珠上。通过漂洗去除未结合物质后, 用低 pH 的洗脱液将免疫复合物从蛋白 A/G 磁珠上洗脱下来。或者, 当样品是为十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 实验作准备时, 可以使用变性条件洗脱免疫复合物, 即用试剂盒提供的电泳上样缓冲液 (Lane Marker Sample Buffer)。试剂盒中提供 Thermo Scientific™ Pierce™ 蛋白 A/G 磁珠以实现快速便捷的抗原磁性分离, 和优化的缓冲条件高效分离目标抗原。磁珠可以通过使用磁力架而从溶液中手动分离, 也可以使用如 Thermo Scientific KingFisher Flex 的自动仪器分离。

固定化在磁珠上的重组蛋白 A/G (约 50.5 kDa; SDS-PAGE 表观分子量约 40-45K) 同时拥有蛋白 A 和蛋白 G 的 IgG 结合结构域。该蛋白 A/G 含有 6 个 Fc 段结合结构域, 4 个来自于蛋白 A, 2 个来自于蛋白 G, 使其成为一种便捷的免疫球蛋白研究和纯化的工具。

流程简述

1. 将细胞裂解液与所选抗体在室温下孵育 1-2 小时, 或 4 °C 过夜。
2. 在室温下, 将抗原/抗体复合物与蛋白 A/G 磁珠结合一小时。
3. 用免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液洗两次磁珠, 之后用纯水洗一次。
4. 洗脱抗原/抗体复合物。

重要产品信息

- 请勿离心、干燥或冷冻磁珠, 这些操作会导致磁珠聚集而降低结合能力。
- 本试剂盒采用抗体与免疫沉淀下来的抗原双洗脱的方式。因此, 在还原性 SDS-PAGE 胶或者蛋白免疫印迹呈现的结果中, 至少存在 3 个蛋白条带; 抗体的重链 (50 kDa), 抗体的轻链 (25 kDa) 和抗原。若抗体的一个条带掩盖了免疫沉淀下的抗原, 可使用 Thermo Scientific Clean-Blot IP Detection Reagent (产品货号 21230 和 21233)。
- 为达到最佳结果, 尽量使用亲和纯化过的抗体。尽管也可使用血清, 但血清样品中针对目的抗原的特异性抗体含量可能仅占 IgG 总量的 1-2%, 因此将导致抗原的产量低。
- Pierce 免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液在多种代表性的细胞类型测试过。其中包括 (但不限于) 如下细胞系: HeLa, Jurkat, A431, A549, MOPC, NIH 3T3 和 U2OS。通常情况下, 10^6 HeLa 细胞可产生约 10 mg 的细胞团块, 使用 100 µL 免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液裂解得到约 3 µg/µL (或 300 µg) 的裂解产物。
- 为尽量减少蛋白质的降解, 请在制备细胞裂解液的过程中加入蛋白酶抑制剂 (如 Thermo Scientific Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail, EDTA-free, 产品货号 78425)。
- IP 裂解/洗涤缓冲液可兼容 Thermo Scientific Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒 (产品货号 23225)。
- 在一次性的应用中可以使用低 pH 的洗脱液。低 pH 洗脱液的最佳洗脱时间为 10 分钟; 超过 10 分钟可能导致产量的降低。
- 当后续蛋白免疫印迹实验中使用到兔抗 (一抗或二抗) 且使用电泳上样缓冲液洗脱时, 切勿加热磁珠。对于其他来源抗体, 可以在电泳上样缓冲液中加热磁珠。由于煮沸会导致磁珠聚集并且失去抗体结合能力, 经煮沸的磁珠不应再次使用。

所需额外试剂和仪器

- 磷酸盐缓冲液（PBS，100 mM 磷酸钠，100 mM 氯化钠；pH 7.2；产品货号 28372）
- 二硫苏糖醇（DTT；产品货号 20290 或 20291）；可选（仅对于还原性洗脱液）
- 免疫沉淀所需抗体
- 抗原样品

对于自动免疫沉淀：

- Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex 系统并使用 96 Deep Well Head（产品货号 5400630）
- Thermo Scientific™ Microtiter 96 深孔板，V 型底，聚丙烯（100-1000 μL ；产品货号 95040450）
- KingFisher Flex 96 Tip Comb for Deep Well Magnets（产品货号 97002534）

对于手动免疫沉淀：

- 磁力架（如 Thermo Scientific MagnaBind Magnet 可容纳 6×1.5 mL 离心管，产品货号 21359）

Pierce 经典磁珠式免疫沉淀试剂盒流程

哺乳动物细胞裂解

方案 I: 单层培养（附着）细胞的裂解

1. 小心去除单层细胞的培养基。
2. 用 PBS 洗细胞两次。
3. 根据表 1 的推荐体积向细胞中加入冰浴预冷的免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液。冰上孵育 5 分钟，期间混匀几次。

表 1. 针对各种标准培养皿的免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液的推荐使用体积

培养皿大小/表面积	免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液体积
100 × 100 毫米	500-1000 μ L
100 × 60 毫米	100-200 μ L
6 孔板	每孔 200-400 μ L
24 孔板	每孔 100-200 μ L

4. 将裂解液转移至一个新的离心管中，于约 13000 \times g 离心 10 分钟，沉降细胞碎片。
5. 将上清转移到一个新管中，进行蛋白浓度测定及后续实验。

方案 II: 悬液培养细胞的裂解

1. 将细胞悬液以 1000 \times g 离心 5 分钟，收集细胞，弃上清。
2. 用 PBS 洗细胞一次，即用 PBS 将细胞团重悬。将细胞悬液以 1000 \times g 离心 5 分钟，收集细胞，弃上清。
3. 向细胞团块中加入冰浴预冷的免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液。每 50mg 细胞团块使用 500 μ L 免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液（即 10: 1 体积/质量比）。如果细胞量很大，首先向细胞团中加入终体积 10% 的免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液，用移液器反复吹打混匀后，再将剩余的免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液加入细胞悬液中。
4. 将裂解液在冰上孵育 5 分钟，期间混匀几次。以约 13000 \times g 离心 10 分钟，去除细胞碎片。
5. 将上清转移到一个新管中，备蛋白浓度测定及后续实验。

A. 免疫复合物的制备

注意：样品所需的量和孵育时间均依赖于每个特定的抗体-抗原体系，因而可能需要优化才能得到最大产量。以下实验方案针对 2-10 μ g 亲和纯化的抗体，根据需要可以按比例放大。

1. 在离心管中，将每个样品的细胞裂解液与 2-10 μ g 免疫沉淀抗体结合。每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500-1000 μ g，由 Pierce BCA Protein Assay 蛋白浓度检测试剂盒测定。
2. 用免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液将抗体/裂解液稀释至 500 μ L。
3. 在室温下孵育 1-2 小时，或 4 $^{\circ}$ C 过夜，以形成免疫复合物。

B. 手动免疫沉淀

注意：为保证磁珠均匀分布，通过反复颠倒、轻微涡旋或用旋转仪彻底混匀瓶中磁珠。

1. 将 25 μL (0.25 mg) 的 Pierce 蛋白 A/G 的磁珠加入 1.5 mL 离心管中。
2. 向磁珠中加入 175 μL 免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液，轻微涡旋混匀。
3. 将离心管放入磁力架中收集磁珠到离心管的一边。去除上清。
4. 向离心管中加入 1 mL 免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液。颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 分钟。用磁力架收集磁珠。去除上清。
5. 将抗原样品/抗体混合物（步骤 A）加入盛有磁珠的离心管中，保持混匀室温下孵育 1 小时。
6. 用磁力架收集磁珠，除去未结合的样品，保存以备分析。
7. 向离心管中加入 500 μL 免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液，轻柔混匀。收集磁珠，弃上清。再重复洗两次。
8. 向管中加入 500 μL 超纯水，轻柔混匀。用磁力架收集磁珠，弃上清。
9. 低 pH 洗脱：向离心管中加入 100 μL 洗脱液。保持混匀在室温下孵育离心管 10 分钟。

通过磁力分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。每 100 μL 洗出液中加入 10 μL 中和液来中和低 pH。

备选洗脱方法：向离心管中加入 100 μL 电泳上样缓冲液(用水稀释 5 倍)，将样品置于加热器中，96-100°C 加热 10 分钟。通过磁力架分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。

注意：如果蛋白免疫印迹中使用兔抗（一抗或二抗），切勿加热样品。保持混匀在室温下孵育 10 分钟。

注意：如果需要在还原条件下洗脱，向 1 \times 电泳上样缓冲液中加入 DTT (终浓度 50 mM)。

C. 自动免疫沉淀

注意：以下实验方案针对 KingFisher Flex 仪器的使用设计。实验方案可根据需要用仪器提供的 Thermo Scientific™ BindIt™ 软件进行修改。

1. 使用外部计算机，按照表 2 将“经典免疫沉淀”实验方案输入到 BindIt™ 软件。
2. 从外部计算机上转移实验方案到 KingFisher Flex。详细软件转移指南可从 BindIt 软件用户手册上查阅。
3. 根据表 2 设置样品板。

培养板 #	培养板名称	内容	体积	时间/速度
1	磁珠	蛋白 A/G 磁珠	25 μL	5 秒
		免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液	175 μL	
2	磁珠漂洗	免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液	1000 μL	1 分钟/慢
3	结合	抗体/抗原样品	500 μL	1 小时/慢
4	漂洗 1	免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液	500 μL	30 秒/慢
5	漂洗 2	免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液	500 μL	30 秒/慢
6	漂洗 3	超纯水	500 μL	30 秒/慢
7	低 pH 洗脱	洗脱液	100 μL	10 分钟/中等
	变性洗脱	电泳上样缓冲液		
8	移液头板	针对深孔磁珠式 KingFisher Flex 96 Tip Comb	-	10 秒/快

4. 通过仪器的方向键选择实验方案，点击开始。详细信息请查阅 KingFisher Flex 仪器的用户手册。
5. 打开仪器防护罩的滑动门。
6. 根据实验方案要求，将样品板放置于仪器中，各样品板放置同样的方向。确认各操作后点击开始。
7. 样品处理完成后，根据仪器显示的指导移动样品板。移出每个样品板后点击开始。移出所有样品板后点击结束。

注意：

- 如果所用到的孔少于 96 个，每个培养板使用同样的孔。例如，如果使用 A1 到 A12 孔，则所有培养板均使用同样的孔。
- 为保证磁珠均匀分布，在向培养板 1 中加入磁珠之前，通过反复颠倒、轻微涡旋或用旋转仪彻底混匀瓶中磁珠。
- 联接 Tip Comb 和深孔 96 孔板。更多指导请参阅仪器用户手册。
- 磁珠洗脱可使用被 100 μL of 0.1M 甘氨酸，pH 2.0，或者 100 μL SDS-PAGE 还原性样品缓冲液。
- 若在加热洗脱中使用 SDS-PAGE 还原性样品缓冲液，安装 KingFisher Flex 加热器 (查阅手册正确安装)，在 96-100 $^{\circ}\text{C}$ 加热样品 10 分钟。

注意： 如果选择 SDS-PAGE 还原性样品缓冲液洗脱且蛋白免疫印迹中使用兔抗（一抗或二抗），切勿加热样品，而应在室温下孵育 10 分钟。

- 若选择低 pH 洗脱液进行洗脱，操作完成后，每 100 μL 洗出液需用 10 μL 中和液中和 pH。
- 为避免液体蒸发，在副选项“加热反应”下选择“混匀”和“慢”速。
- 如果需要在还原条件下洗脱，向 1 \times 电泳上样缓冲液中包含 50 mM DTT。

问题解决

问题	可能原因	解决方案
抗原没有免疫沉淀下来	样品中所含的抗原过少，不足以被检测	通过 SDS-PAGE 或蛋白免疫印迹验证裂解液中蛋白的表达和/或裂解效率；如果需要，加大样品量
	抗体无法结合抗原	使用新生产的特异性抗体，或者选择另一种识别不同抗原表位的抗体
	免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液中的成分干扰了抗原与抗体的结合	使用其它缓冲液进行免疫沉淀和漂洗（例如，含有 0.5% CHAPS 的 TBS）
洗脱下的抗体条带掩盖了目标抗原	抗原的分子量大约是 50kDa 或 25kDa	进行蛋白免疫印迹时，使用 Thermo Scientific™ Clean-Blot™ I 免疫沉淀检测试剂 (产品货号 21230 或 21233)
		进行蛋白免疫印迹时，选择使用和免疫沉淀时不同种属的抗体（例如，免疫沉淀使用鼠 IgG，检测使用兔 IgG）
		使用 Pierce 直接法免疫沉淀试剂盒（产品货号 26148）或 Pierce 交联法免疫沉淀试剂盒（产品货号 26147）将抗体共价固定于树脂
		SDS-PAGE 之前请勿还原样品，则抗体条带会迁移至 150kDa
获得的蛋白量低	蛋白质被降解	加入蛋白酶抑制剂
	所使用的磁珠量不够	提高捕获免疫复合物所使用的磁珠量
	样品中的目标蛋白量不够	提高抗原样品量
蛋白未洗脱下来	洗脱条件过于温和	延长洗脱液的孵育时间至 15 分钟，或使用强度更高的洗脱液
免疫印迹出现约 50kDa 的条带	使用电泳上样缓冲液洗脱时的温度高于室温，并且在免疫印迹中使用兔抗	使用兔抗时在室温下洗脱
多条非特异条带	有非特异性的蛋白结合在磁珠上	在结合/漂洗和洗脱缓冲液中加入 50-350mM NaCl。或者，在形成免疫复合物之前，将样品与 Pierce 蛋白 A/G 磁珠混合孵育（不加抗体），从而从样品中移除非
获得的蛋白失活	洗脱条件过于剧烈	使用相对温和的洗脱液（例如 Thermo Scientific™ 温和洗脱液, 产品货号 21034）
磁珠聚集	磁珠被冷冻或离心过	依据使用说明指导正确处理磁珠
	缓冲液和磁珠不兼容	

网站附加信息

- 常见问题
- 技术提示 #43: 蛋白质稳定性及贮存
- 技术提示 #34: 免疫球蛋白与蛋白 A, G, A/G 和 L 磁珠之间的结合特性
- 有关 KingFisher 的产品信息请访问网站 www.thermoscientific.com/kingfisher
- 在美国, 从 Fisher Scientific 购买 KingFisher 用品。美国以外购买 KingFisher 用品, 请联系当地的 Thermo Fisher Scientific 办公室

Thermo Scientific KingFisher 仪器的常见问题

问题	解答
哪些样品板是与 KingFisher Flex 仪器匹配的?	KingFisher Flex 与 KingFisher 24 深孔样品板, Microtiter 深孔 96 孔板, KingFisher 96 和 96 PCR 板相匹配。
运行过程中可以浓缩样品么?	深孔样品板和 KingFisher 96 孔板均可以在同一操作流程中使用。因此, 使用较大体积 (在深孔样品板中) 开始进程, 之后将纯化的样品洗脱至一个较小体积 (在 KingFisher 96 孔板中) 是可能的。
运行过程中可以加热样品么?	仪器中配有加热器, 可以在相同运行时自动使用。 所有与 KingFisher Flex 仪器匹配的样品板均可以使用特殊设计且可更换的加热块加热。
每孔的试剂体积要严格控制吗?	为获得最佳结果, 保证溶液体积在仪器限定的范围内, 避免运行时溢出。

Thermo Scientific 相关产品

88802-3	Pierce 蛋白 A/G 磁珠
88805	Pierce 交联法磁珠式免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒
88845-6	Pierce 蛋白 A 磁珠
88847-8	Pierce 蛋白 G 磁珠
88849-50	Pierce 蛋白 L 磁珠
88826-7	Pierce N-羟基琥珀酰亚胺活化磁珠
88828	Pierce 直接法磁珠式免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒
88816-7	Pierce 链亲和素磁珠
24615	Imperial™ 蛋白染色液
34075	SuperSignal™ West Dura 持久性化学发光底物
25200-44	Precise™ 蛋白胶，完整列表请查阅目录或网站
78440	Halt™ 蛋白酶和磷酸酶抑制剂 Cocktail (100X)
78430	Halt 一次性蛋白酶抑制剂 Cocktail (100X)

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。

如果需要传真的复印件，请拨打 800-810-5118 或与当地经销商联系。

© 2011 Thermo Fisher Scientific Inc. 版权所有。除非另有说明，所有商标均归 Thermo Fisher Scientific Inc. 及其子公司所有。

Thermo
SCIENTIFIC