

说明书

Pierce™ 交联磁珠式免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒

88805

2309.4

货号	描述
88805	Pierce 交联磁珠式免疫沉淀/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 试剂盒组成： 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 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 20$\times$交联缓冲液，25 mL，稀释后含 10 mM 磷酸钠，150 mM NaCl；pH 7.2 DSS（辛二酸二琥珀酰亚胺酯），No-Weigh™形式，8 $\times$ 2 mg 微型管 中和液，1.0 mL，pH 8.5 洗脱液，25 mL，pH 2.0 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 贮存条件：收到本产品后于 4℃ 贮存。冰盒运输。

目录

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.....	3
A. 将抗体结合于蛋白 A/G 磁珠上	3
B. 交联结合的抗体	4
C. 哺乳动物细胞裂解.....	4
D. 手动抗原免疫沉淀.....	5
E. 自动免疫沉淀	5
问题解决	7
网站附加信息	7
Thermo Scientific KingFisher 仪器的常见问题.....	8
Thermo Scientific 相关产品.....	8

产品简介

Thermo Scientific™ Pierce™ 交联磁珠式免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒通过共价键将抗体交联于 Thermo Scientific™ Pierce™ 蛋白 A/G 磁珠上能够高效完成抗原免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验。本试剂盒首先将抗体结合到磁珠上, 再通过使用化学交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯 (DSS) 共价交联在磁珠上。抗体交联了的磁珠, 再通过漂洗去除未共价结合的抗体。将已准备好的磁珠与抗原样品孵育, 通过漂洗去除未结合物质, 并用低 pH 的洗脱液将结合的抗原从抗体交联的磁珠上分离下来。本试剂盒包含了优化的缓冲液, 免疫沉淀可使用最少 2 µg 抗体、免疫共沉淀可使用最少 5-10 µg 抗体, 即可获得大量抗原。同时还含有为 SDS-PAGE 分析准备的样品缓冲液。抗体结合和交联通过借助磁力架的手动方式实现, 而免疫沉淀和免疫共沉淀均可通过手动或自动方式完成, 自动方式使用如 Thermo Scientific KingFisher Flex 系统的仪器实现。

流程简述

1. 用 1×改良交联缓冲液预洗磁珠两次。
2. 将抗体与磁珠结合 15 分钟。
3. 用 1×改良交联缓冲液洗磁珠三次。
4. 用 DSS 进行抗体与磁珠的交联 30 分钟。
5. 用洗脱液漂洗磁珠三次, 之后用免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液洗磁珠两次。
6. 将细胞裂解液与抗体交联的磁珠在室温下孵育 1-2 小时, 或 4 °C 过夜。
7. 用免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液洗磁珠两次, 之后用纯水洗一次。
8. 洗脱结合的抗原。

重要产品信息

- 抗体的偶联与交联步骤通过磁力架手动实现。免疫沉淀可以手动完成, 亦可使用自动化仪器平台如 KingFisher Flex 仪器。
- 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。
- 为获得最佳结果, 尽量使用亲和纯化后的抗体。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/漂洗缓冲液在多种具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。
- 为尽可能避免蛋白质的降解, 应该在细胞裂解液的制备过程中加入蛋白酶抑制剂 (例如 Thermo Scientific Halt 一次性蛋白酶抑制剂 Cocktail, 无 EDTA, 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)。
- 低 pH 洗脱的最佳孵育时间为 5 分钟。如未获得预期的抗原产量, 重复一次低 pH 洗脱有助于洗脱剩余的结合抗原。

所需额外试剂和仪器

- 1.5 mL 离心管
- 偶联/交联所需抗体
- 免疫沉淀所需抗原样品
- 磁力架（例如 Thermo Scientific™ MagnaBind™ Magnet，针对 6 × 1.5 mL 离心管，产品货号 21359）
- 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）

对于自动免疫沉淀：

- KingFisher Flex 系统，具有 96 深孔顶部（产品货号 5400630）
- Thermo Scientific™ Microtiter 96 深孔板，V 型底，聚丙烯（100-1000 μ L；产品货号 95040450）
- KingFisher Flex 96 Tip Comb for Deep Well Magnets（产品货号 97002534）

Pierce 经典磁珠式免疫沉淀试剂盒流程

A. 将抗体结合于蛋白 A/G 磁珠上

注意：以下实验方案经过优化，偶联 5 μ g 抗体，而通过适当调整方案可以偶联 2-10 μ g 抗体。

1. 每个免疫沉淀反应准备 2 mL 的 1×改良的偶联缓冲液，即将 0.1 mL 的 20×偶联缓冲液和 0.1 mL 的免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液稀释于 1.8 mL 超纯水中。
2. 将 Pierce 蛋白 A/G 磁珠瓶涡旋，以获得均匀的悬液。向离心管中加入 25 μ L 磁珠。将离心管置于磁力架上 1 分钟，收集磁珠。去除存储液。
3. 向离心管中加入步骤 1 所准备好的 1×改良的偶联缓冲液 500 μ L。轻柔混匀，室温下，在旋转器上孵育 1 分钟。通过磁力架收集磁珠，去除上清。重复此步骤一次。
4. 将抗体用 20×偶联缓冲液和免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液以 1:20 稀释，使抗体的终浓度为 5 μ g 每 100 μ L。例如，为制备 100 μ L 抗体液，将抗体原液稀释于 5 μ L 的 20×偶联缓冲液，5 μ L 的免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液，再加入超纯水使终体积为 100 μ L。

注意：对非 5 μ g 抗体的反应相应调整抗体液用量。

5. 向磁珠中加入 100 μ L 已准备好的抗体液，轻柔混匀，室温下，在旋转器上孵育 15 分钟。孵育过程中，每 5-10 分钟轻微涡旋磁珠，使磁珠处于悬浮状态。
6. 用磁力架收集磁珠。去除上清。
7. 加入 100 μ L 的 1×改良偶联缓冲液，轻微涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠。去除上清。
8. 加入 300 μ L 的 1×改良偶联缓冲液，轻微涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠。去除上清。重复此步骤一次。

B. 交联结合的抗体

注意：常规免疫沉淀无需交联亦可完成；而不进行交联，洗脱过程中抗体可能与抗原一同洗脱下来。

注意：DSS 交联剂对湿度敏感。将未使用的 DSS 保存于铝袋中。使用前立即将 DSS 溶解于 DMSO 或 DMF 中。DSS 不可与含氨基酸的缓冲液（例如，Tris, glycine）同时使用。

1. 用移液枪头刺穿一管 DSS 的铝袋，加入 217 μL 的 DMSO 或 DMF，制成 10 $\times$ 的储液 (25 mM)。用枪头彻底混合溶液（即，吸入并打出溶液），直到 DSS 溶解。
2. 将 DSS 以 1:100 稀释于 DMSO 或 DMF (10 μL 的 10 $\times$ DSS 加入 990 μL 溶剂)，使 DSS 浓度为 0.25 mM。
3. 向磁珠中加入 2.5 μL 的 20 $\times$ 偶联缓冲液，4 μL 的 0.25 mM DSS 和 43.5 μL 的超纯水。溶液终体积为 50 μL 。加入的 DSS 为 10 $\times$ 过量于 Pierce 蛋白 A/G 磁珠，工作浓度为 20 μM 。
4. 室温下，用旋转器或搅拌器孵育交联反应 30 分钟。孵育过程中，每 5-10 分钟轻微涡旋磁珠，使磁珠处于悬浮状态。
5. 用磁力架收集磁珠。移出并保留液体以确证抗体交联。
6. 向磁珠中加入 100 μL 洗脱缓冲液，并室温下，在旋转器上轻柔混匀 5 分钟，以去除未交联的抗体并终止交联反应。用磁力架收集磁珠，去除上清。
7. 向磁珠中加入 100 μL 洗脱缓冲液，轻微涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠，去除上清。重复一次。
8. 向磁珠中加入 200 μL 预冷的免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液，轻微涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠，去除上清。重复一次。
9. 转到手动或自动抗原免疫沉淀实验方案。如果需要，已交联抗体的磁珠可保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

C. 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 洗细胞一次。
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 $\times$ 100 毫米	500-1000 μL
100 $\times$ 60 毫米	250-500 μL
6 孔板	每孔 200-400 μL
24 孔板	每孔 100-200 μL

4. 将裂解液转移至一个新的离心管中，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: 细胞悬液培养的裂解

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 重悬细胞团，后将细胞悬液以 1000 $\times g$ 离心 5 分钟，收集细胞，弃上清。

- 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 50 mg 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。
- 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。
- 将上清转移到一个新管中，备蛋白浓度测定及后续实验。

D. 手动抗原免疫沉淀

- 用免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液将裂解液稀释至 500 μ L。
- 将 500 μ L 稀释后的裂解液加入含有抗体交联磁珠的离心管中。室温下，在旋转仪或混合器上孵育 1 小时。孵育过程中每 10-15 分钟轻微涡旋磁珠，以保证磁珠处于悬浮状态。
- 用磁力架收集磁珠，除去未结合的样品，保存以备分析。
- 向离心管中加入 500 μ L 免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液，轻柔混匀。收集磁珠，弃上清。重复此操作一次。
- 向管中加入 500 μ L 超纯水，轻柔混匀。用磁力架收集磁珠，弃上清。
- 向离心管中加入 100 μ L 洗脱液。旋转混匀，室温下，在旋转仪或混合器上孵育离心管 5 分钟。通过磁力分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。洗脱后，在每 100 μ L 洗脱液中加入 10 μ L 中和液来中和低 pH。为获得更多的抗原，可以重复洗脱一次。

E. 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，使用仪器提供的 Thermo Scientific™ BindIt™ 软件进行修改。

- 使用外部计算机，按照表 2 将“交联免疫沉淀”实验方案输入到 BindIt™ 软件。
- 将实验方案从外部计算机导入 KingFisher Flex。实验方案的导入请参考 BindIt 软件用户手册的详细介绍。
- 根据表 2 设置样品板。

表 2. 针对使用 Microtiter 深孔 96 孔板的免疫沉淀实验方案移液指导				
样品板 #	样品板名称	内容	体积	时间/速度
1	磁珠	蛋白 A/G 磁珠	25 μ L	5 秒
		免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液	175 μ L	
2	磁珠漂洗	免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液	1000 μ L	1 分钟/慢
3	结合	抗体/抗原样品	500 μ L	1 小时/慢
4	漂洗 1	免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液	500 μ L	30 秒/慢
5	漂洗 2	免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液	500 μ L	30 秒/慢
6	漂洗 3	超纯水	500 μ L	30 秒/慢
7	低 pH 洗脱	洗脱液	100 μ L	10 分钟/中等
	变性洗脱	电泳上样缓冲液		
8	端样品板	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：

- 每 100 μL 洗出液在孵育后直接向每个孔中加入 10 μL 中和液来中和低 pH 洗脱液。
- 如果所用到的孔少于 96 个，每个样品板使用同样的孔。例如，如果使用 A1 到 A12 孔，则所有样品板均使用同样的孔。
- 联接 Tip Comb 和深孔 96 孔板。更多指导请参阅仪器用户手册。
- 为减少液体蒸发，在副标题“加热反应”下选择“混匀”和“慢”速。

问题解决

问题	可能原因	解决方
洗脱的抗原中可检测到抗体	交联过程后的洗涤未能充分去除未交联的抗体	增加交联后用洗脱液洗脱的次数
	在免疫沉淀或洗脱步骤中，抗体偶联磁珠会经过还原剂（例如，DTT）处理，从而将未与磁珠共价结合的抗体片段还原并洗脱下来。	使用不含还原剂的缓冲液
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）
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 10 分钟
		使用强度更高的洗脱液
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 50-350 mM NaCl。
重新获得的蛋白失活	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 and 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 孔板均可以在同一运行中使用。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？	仪器中设置有加热器，可以在相同过程中自动使用。 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器加热。
每孔的试剂体积严格么？	为获得最佳结果，保证指定体积在限定范围内，避免溢出。

Thermo Scientific 相关产品

88802-3	Pierce 蛋白 A/G 磁珠
88804	Pierce 经典磁珠式免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒
88816-7	Pierce 链霉素磁珠
88826-7	Pierce N-羟基琥珀酰亚胺活化磁珠
88828	Pierce 直接磁珠式免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒
24615	Imperial™ 蛋白染色液， 1L
34075	SuperSignal™ 持久性化学发光底物
78440	Halt™ 蛋白酶和磷酸酶抑制剂 Cocktail（100×）
78430	Halt 一次性蛋白酶抑制剂 Cocktail（100×）
28348	磷酸盐缓冲液（20×）
87787	Pierce 免疫沉淀裂解液
39001	电泳上样缓冲液， 非还原性
21658	DSS (辛二酸二琥珀酰亚胺酯)， 无重量形式
25200-44	Precise™ 蛋白胶， 完整列表请查阅目录或网站

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