



Smart Magnetic IP/Co-IP Kit

目录

1. 产品介绍	1
2. 操作步骤	1
3. 注意事项	2
4. 问题及解决方案	3
5. 订购信息及相关产品	3
6. 附表	3

1. 产品介绍

Smart Magnetic IP/Co-IP Kit 是一款能够高效完成免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验的试剂盒。其包含高性能 rProtein A/G MagPoly Beads，能够实现快速便捷的磁性分离。另外试剂盒内经过优化的缓冲液，为免疫沉淀实验提供了合适的反应条件，增强了免疫沉淀实验的稳定性。聚合物磁珠的配体是重组蛋白 A/G（约 14 kDa），同时拥有蛋白 A 和蛋白 G 的 IgG 结合结构域，具有更广的抗体亚型结合范围。试剂盒的洗脱方式多样，既可以用低 pH 的洗脱液将免疫复合物从蛋白 A/G 磁珠上洗脱，也可以使用电泳上样缓冲液以变性条件洗脱免疫复合物，直接进行后续检测分析。

本产品可广泛应用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中抗原的免疫沉淀反应，具体组分见表 1。

表 1. Smart Magnetic IP/Co-IP Kit 产品组分

组分名称	规格 (10 次)	规格 (50 次)
rProtein A/G MagPoly Beads	200 μl	1 mL
IP Lysis/Wash Buffer(5×)	10 mL	25 mL×2
IP Lysis/Wash Buffer Enhanced	100 μl	500 μl
IP Elution Buffer	500 μl	1 mL×5
Neutralization Buffer	2 mL	2 mL

2. 操作步骤

2.1 缓冲液的准备

可使用试剂盒准备的缓冲液，也可根据实际情况配制不同的缓冲液体系。IP Lysis/Wash Buffer(5×)在使用前请稀释至并标记为 1×IP Lysis/Wash Buffer，另根据需求，补加终浓度为 0.1%-1% 的 IP Lysis/Wash Buffer Enhanced，标记为 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)。所有缓冲液在使用前建议用 0.22 μm 或者 0.45 μm 滤膜过滤，稀释后的缓冲液建议 4°C 保存，若试剂浑浊，请立即丢弃。

下列可能用到的试剂及材料未提供，需额外准备：

- 1) 电泳上样缓冲液，非还原性 (5×) : 0.3 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 50% 甘油, 0.5% 溴酚蓝
- 2) 二硫苏糖醇 (DTT)
- 3) 蛋白酶抑制剂
- 4) 免疫沉淀所用抗原、抗体

2.2 样品准备

方案 I: 贴壁细胞的裂解

- 1) 小心去除单层细胞的培养基。
- 2) 用预冷 PBS 清洗细胞两次。
- 3) 根据表 2 的推荐体积中加入预冷 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)。冰上孵育 5 min，期间混匀几次。
- 4) 将上述裂解好的样品转移至一个新的离心管中，约 13000×g 离心 10 min，分离细胞碎片。
- 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，标记为细胞裂解样品。

表 2. 针对各种标准培养皿的 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)的推荐使用体积

培养皿大小/表面积	免疫沉淀裂解缓冲液体积
100×100 mm	500-1000 μl
100×60 mm	250-500 μl
6 孔板	200-400 μl/孔
24 孔板	100-200 μl/孔

方案 II: 悬浮培养细胞的裂解

- 1) 将细胞悬液以 1000×g 离心 5 min，收集细胞，弃上清。



- 2) 用预冷 PBS 将细胞团轻轻重悬，将细胞悬液以 1000×g 离心 5 min，收集细胞，弃上清。
- 3) 向细胞团块中加入预冷 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)。每 50 mg 细胞团块使用 500 μl。
- 4) 将上述裂解好的样品在冰上孵育 5 min，期间混匀几次。13000×g 离心 10 min，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，标记为细胞裂解样品。

2.3 免疫沉淀

抗原、抗体与磁珠的结合顺序可根据实际情况调整，不同的孵育顺序对最终纯度及抗原产量均有影响，以下方案为推荐常用的实验方法。

2.3.1 磁珠漂洗

- 1) 将 rProtein A/G MagPoly Beads 充分混匀，取 20 μl (0.2 mg) 加入 1.5 ml 离心管中。
- 2) 向磁珠中加入 180 μl 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)，轻微涡旋混匀。
- 3) 将离心管置于磁分离器上，待磁珠全部吸附后，吸弃上清。
- 4) 向离心管中加入 1 ml 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)，颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 min，将离心管置于磁分离器上，待磁珠全部吸附后，吸弃上清。

2.3.2 免疫沉淀

方案一

- 1) 向上述准备好的磁珠（步骤 2.3.1）中加入抗体，抗体推荐用量 2-10 μg，用抗体保存液或 1×IP Lysis/Wash Buffer 补充体积至 500 μl，室温混旋孵育 30 min，将离心管置于磁分离器上，待磁珠全部吸附后，吸取上清，留样用于检测。

注：孵育温度和时间范围推荐为：室温、30 min-2 h，或者 4°C、1 h-16 h，根据实际的结合效果进行调整。

- 2) 向离心管中加入 500 μl 1×IP Lysis/Wash Buffer，颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 min，将离心管置于磁分离器上，待磁珠全部吸附后，吸弃上清，重复至少两次。

- 3) 向离心管中加入 500 μl 细胞裂解样品（步骤 2.2），每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500-1000 μg，体积不足 500 μl 可用 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)补足，室温混旋孵育 30 min，将离心管置于磁分离器上，待磁珠全部吸附后，吸取上清，留样用于检测。

注：孵育温度和时间范围推荐为：室温、30 min-2 h，或者 4°C、1 h-16 h，根据实际的结合效果进行调整。

方案二

- 1) 在离心管中，将细胞裂解样品（步骤 2.2）与抗体混合孵育 30 min。推荐抗体用量为 2-10 μg，每个免疫沉淀反应推荐的细胞裂解液总蛋白量为 500-1000 μg，体积不足建议用 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)将样品体积调整至 500 μl。

- 2) 将孵育后的样品加入准备好的磁珠（步骤 2.3.1）中混旋孵育。

注：孵育温度和时间范围推荐为：室温、30 min-2 h，或者 4°C、1 h-16 h，根据实际的结合效果进行调整。

- 3) 将离心管置于磁分离器上，待磁珠全部吸附后，吸取上清，留样用于检测。

2.3.3 磁珠漂洗

- 1) 向离心管中加入 500 μl 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)，颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 min，将离心管置于磁分离器上，待磁珠全部吸附后，吸弃上清，重复一次。

- 2) 向离心管中加入 500 μl 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)，连同磁珠转移至一个新 EP 管中，颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 min，将离心管置于磁分离器上，待磁珠全部吸附后，吸弃上清。

2.3.4 洗脱

方案一 低 pH 洗脱

向离心管中加入 50 μl IP Elution Buffer，室温混旋孵育 10 min，将离心管置于磁分离器上，待磁珠全部吸附后，吸取上清为洗脱液，加入 5 -10 μl Neutralization Buffer。

方案二 备选洗脱方法（变性洗脱）

向离心管中加入 50 μl (1×)电泳上样缓冲液，将样品置于金属浴中，96-100°C 加热 10 min。通过磁分离器分离磁珠，保留含有目的抗原的上样缓冲液。

注：两种洗脱方案均包含捕获抗体及目的抗原，低 pH 洗脱样本中抗体为完整结构，变性洗脱样本中抗体解离为重链、轻链，请根据后续实验需求选择洗脱方案。

3. 注意事项

- 1) 在进行免疫沉淀操作之前，请务必认真阅读此说明书。
- 2) 除非另有说明，所有操作建议于 4°C 下进行。
- 3) 在保证洗杂效果的前提下，如果使用 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)洗杂，会造成抗体和介质，或者抗原和抗体之间结合效果降低，建议可以使用 1×IP Lysis/Wash Buffer 进行洗杂。
- 4) 磁珠应保存在储存溶液中，防止干燥，使用前请充分混匀。
- 5) 如果需要在还原条件下洗脱，向 1×电泳上样缓冲液中加入 DTT (终浓度 10-20 mM)。
- 6) 经煮沸后的填料易聚集并且失去抗体结合能力，经煮沸的填料不应再次使用。



- 7) 为得到理想的实验结果,请选择特异性较强的抗体进行免疫沉淀反应。
- 8) 对于免疫沉淀实验,不同类型的抗体与抗原结合的亲和性是有区别的,抗体与抗原结合还会受到的影响,因此,若本试剂盒提供的缓冲体系不能获得很好的实验结果,可自行优化缓冲液进行实验。
- 9) 实验设计时,建议加入对照组,以备后续实验结果分析。
- 10) 在确定实验结果前,建议保留各步骤抗原、抗体孵育后的样品以备验证。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
抗原没有免疫沉淀下来	样品中抗原量过少	通过 SDS-PAGE 或 Western Blot 验证蛋白表达或裂解效率, 将抗原量提高至推荐用量
	抗体与抗原结合力太弱或无法结合	优化 Lysis/Wash Buffer 更换结合力/特异性更强的抗体, 或选择另一种识别不同表位的抗体
	蛋白质被降解	加入蛋白酶抑制剂 对温度敏感的抗原, 尽量在 4°C 或冰浴条件下进行实验操作
洗脱组分中没有目的抗原	蛋白可能是包涵体, 没有在上清中	可以通过电泳检测裂解液分析上清中是否含有目的蛋白, 包涵体蛋白需要按照包涵体蛋白的纯化方式。
	表达量太低	优化表达条件。
	洗脱条件过于温和	延长洗脱孵育时间, 或使用强度更高的洗脱液
洗脱下的抗体条带干扰 目标抗原条带判断	抗原条带接近 25 kDa 或 50 kDa	SDS-PAGE 前请勿还原样品, 抗体条带则迁移至 160 kDa 附近 进行蛋白免疫印迹时, 选择使用不同种属来源的抗体 (例如一抗为鼠 IgG 时, 二抗选用兔 IgG) 改用直接法将抗体直接交联至填料
非特异性条带明显	有非特异性的蛋白结合在磁珠上	优化漂洗液组分, 例如补加 50-350 mM NaCl
	进行蛋白免疫印迹时, 清洗不充分	增加清洗次数

5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Smart Magnetic IP/Co-IP Kit	SM015K01	10T
	SM015K02	50T
Smart Classic IP/Co-IP Kit	SA032K01	10T
	SA032K02	50T

6. 附表

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
Human	IgA	variable	—	++
	IgD	—	—	—
	IgE	—	—	—
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	—	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	variable	—	++
Avian egg yolk	IgY	—	—	—
Cow		++	++++	++++
Dog		++++	++	++++
Goat		—	++++	++++
Guinea pig	IgG1	++++	++	++++
	IgG2	++++	++	++++
Hamster		+	++	
Horse	Total IgG	++	++++	++++



(续表)

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
Koala		—	+	
Llama		—	+	
Monkey(rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	++	++
	IgM	variable	—	—
Pig		+++	++	++++
Rabbit	Total IgG	++++	++	++++
Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep	Total IgG	+/-	++	++