



# Smart Classic 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.....	4

## 1. 产品介绍

**Smart Classic IP/Co-IP Kit** 是一款用于免疫沉淀 (IP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验的试剂盒。产品基于高性能 rProteinA/G Beads 4FF 开发，配合离心纯化柱和收集管，能够有效减少处理时间并提高回收率。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。琼脂糖介质的配体重组蛋白 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。产品的洗脱方式多样，既可以用低 pH 的洗脱液将免疫复合物从蛋白 A/G 介质上洗脱，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 Classic IP Co-IP Kit 产品组分

组分名称	规格 (10T)	规格 (50T)
rProtein A/G Beads 4FF	200 $\mu$ l	1 ml
Smart Control Agarose Resin	800 $\mu$ l	4 ml
IP Lysis/Wash Buffer(5 $\times$ )	10 ml	25 ml $\times$ 2
IP Lysis/Wash Buffer Enhanced	100 $\mu$ l	500 $\mu$ l
IP Elution Buffer	500 $\mu$ l	5 ml
Neutralization Buffer	2 ml	2 ml
Spin Columns	20 套	100 套

## 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 $\times$ )在使用前请用纯水稀释至并标记为 1 $\times$ 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 $\times$ IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)。

所有缓冲液在使用前建议用 0.22  $\mu$ m 或者 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤,稀释后的缓冲液建议 4 $^{\circ}$ 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 $\times$ ): 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

#### 2.2.1 动物细胞裂解

##### 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 洗细胞两次。
- 3) 根据表 2 的推荐体积向细胞中加入预冷 1 $\times$ 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,于约 13000 $\times$ 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：悬液培养细胞的裂解

- 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) 向细胞团块中加入冰浴预冷的 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)。每 50 mg 细胞团块使用 500 μl。
- 4) 将裂解液在冰上孵育 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。

### 2.2.2 使用 Smart Control Agarose Resin 预处理细胞裂解样品

- 1) 以处理 1 ml 的细胞裂解样品为例，取 80 μl Smart Control Agarose Resin (40 μl 固相介质) 到 Spin Column 内管中。
- 2) 将内管与外管组合，1000×g 离心 1 min，去除外管中收集的缓冲液。
- 3) 取 200 μl 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)，加入 Spin Column 内管中，1000×g 离心 1 min，弃掉外管收集液体。
- 4) 取硅胶堵头封闭内管柱子下端，取 1 ml 细胞裂解样品，加入含有介质的 Spin Column 内管中，封闭上盖并在 4°C 下孵育 30 min 至 1 h，孵育过程温和地翻转离心柱以混匀。
- 5) 孵育结束后，取下堵头，将内管放置于一个新离心管中，1000×g 离心 1 min，弃掉含有树脂的 Spin Column 内管，保留外管流穿液体，以备后续实验。

## 2.3 免疫沉淀

抗原、抗体与介质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 介质漂洗

- 1) 将 20 μl rProtein A/G Beads 4FF (10 μl 固相介质) 加入一个新的 Spin Column 内管中，1000×g 离心 1 min，去除外管储存缓冲液。
- 2) 堵住下堵头，向介质中加入 180 μl 漂洗缓冲液，盖上下盖，轻微混匀。
- 3) 取下下堵头，将内管放入外管中，1000×g 离心 1 min，弃去外管中废液。
- 4) 堵上下堵头，将内管放回外管中，向内管中加入 0.5 ml 漂洗缓冲液，盖上下盖，轻微混匀后取下下堵头，1000×g 离心 1 min，弃去外管中废液，重复漂洗步骤至少两次。

### 2.3.2 免疫沉淀

#### 方案一

- 1) 向上述准备好的介质 (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，堵住下堵头，盖上下盖，室温混旋孵育 30 min，1000×g 离心 1 min，收集流穿液，用于后续检测。堵住下堵头后将内管放回外管中。  
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) 向内管中加入 0.5 ml 1×IP Lysis/Wash Buffer，颠倒数次或轻微涡旋混匀 1 min，1000×g 离心 1 min，去除废液，堵上下堵头后将内管放回外管中，至少重复两次。
- 3) 向内管中加入 500 μl 预处理细胞裂解样品 (步骤 2.2.2)，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，1000×g 离心 1 min，收集流穿液，用于后续检测，堵住下堵头后将内管放回内管中。

#### 方案二

- 1) 在新的离心管中，将预处理细胞裂解样品 (步骤 2.2.2) 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总蛋白量为 500-1000 μg，建议用 1×IP Lysis/Wash Buffer (Enhanced) 将样品体积调整至 500 μl。  
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) 将孵育后的样品加入准备好的介质 (步骤 2.3.1) 中，室温反应 30 min。  
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) 1000×g 离心 1 min，收集流穿液，用于后续检测，堵住下堵头后将内管放回外管中。

### 2.3.3 介质漂洗

- 1) 向内管中加入 500 μl 1×IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)，堵住下堵头，盖上下盖，颠倒数次或轻微涡旋混匀 1 min，1000×g 离心 1 min，去除外管中废液，堵上下堵头后将内管放回外管中，重复清洗至少两次。
- 2) 将内管取出放入一个新的离心管中。



### 2.3.4 洗脱

#### 方案一 低 pH 洗脱

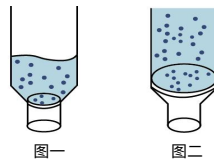
向内管中加入 50  $\mu$ l IP Elution Buffer，堵住下堵头，盖好上盖，室温混旋孵育 10 min，1000 $\times$ g 离心 1 min，丢弃外管，收集离心管中洗脱液，向洗脱液中加入 5 -10  $\mu$ l Neutralization Buffer。

#### 方案二 备选洗脱方法（变性洗脱）

向内管中加入 50  $\mu$ l (1 $\times$ )电泳上样缓冲液，100 $^{\circ}$ C 加热 10 min。1000 $\times$ g 离心 1 min，保留离心管中含有目的抗原的上样缓冲液。

## 3. 注意事项

- 1) 建议所有操作在 4 $^{\circ}$ C 进行。介质的所有离心步骤需在低速（如 1000 $\times$ g）、30-60 秒条件下操作。大于 5000 $\times$ g 可能会导致介质聚集，无法分散。
- 2) 使用 2 ml Spin Column 外管时流穿的液体体积应不超过 600  $\mu$ l，使用 1.5 ml 的离心管时则应不超过 300  $\mu$ l。
- 3) 介质应保存在储存溶液中，防止干燥，使用前请充分混匀。
- 4) 在保证洗杂效果的前提下，如果使用 1 $\times$ IP Lysis/Wash Buffer(Enhanced)洗杂，会造成抗体和介质，或者抗原和抗体质检结合效果降低，建议使用 1 $\times$ IP Lysis/Wash Buffer 进行洗杂。
- 5) 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 10-20 mM)。
- 6) 经煮沸后的介质易聚集，并且配体失去抗体结合能力，所以无法再次使用。
- 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 Lysis/Wash Buffer 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，建议保留各步骤孵育后的样品以备验证。
- 11) Smart Classic IP/Co-IP Kit 配套的 Spin Columns 附有两个规格的垫片，当使用微量介质（10-50  $\mu$ l）进行实验时，请按图一装入垫片，当使用大量介质（100-400  $\mu$ l）进行 IP 实验时，请按图二装入垫片。



## 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 WesternBolt 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 $^{\circ}$ 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	延长洗脱液孵育时间，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 25kDa 或 50kDa	SDS-PAGE 前请勿还原样品，抗体条带则迁移至 160kDa 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介质
非特异性条带明显	有非特异性的蛋白结合在介质上	优化漂洗液组分，例如补加 50-350mM 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	++	++++	++++
Koala		—	+	
Llama		—	+	
Monkey(rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	variable	—	—
Pig		+++	+++	++++
Rabbit	Total IgG	++++	+++	++++
Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep	Total IgG	+/-	++	++