

## 产品概述:

本试剂盒是基于抗体和蛋白的特异性亲和作用,通过 Protein A+G Agarose捕获与蛋白或抗原特异性结合的抗体,进而从复杂的样品中捕获及富集目标蛋白,同时可以测定与之相互作用的蛋白或其它生物大分子,也可用于抗体蛋白的纯化等实验。

## 产品组分及储存条件:

名称	规格	储存条件
Cell lysis buffer	120 mL	-20 °C
Protein A/G Agarose	800 μL	4 °C
Protease inhibitor	200 μL	-20 C

## 操作流程:

### 1. 蛋白提取

#### 细胞样本

- 1)洗涤: 用预冷的 1mL 1×PBS 洗涤样品(约  $1 \times 10^7$  个细胞)2次,最后一次吸干 1×PBS。
- 2)裂解: 根据细胞量加入 1mL Cell lysis buffer、10μL Protease inhibitors,冰上充分裂解 20-30 min,期间颠倒混匀 3 次。
- 3)离心: 4°C、13,000 g、15 min,收集上清。

#### 组织样本

- 1)研磨: 取新鲜组织或深低温组织(不少于 0.3 g),置于研钵中,用液氮进行研磨,转移组织粉末至新的 EP 管中。
- 2)裂解: 加入 1mL Cell lysis buffer、10μL Protease inhibitors,冰上充分裂解 20-30 min,期间颠倒混匀 3 次。
- 3)离心: 4°C、13,000 g、15 min,收集上清。

### 2.Pre-clearing

(注: 每个 IP 样本需 200-500μL 细胞裂解物,浓度在 1μg/μL 左右,以下步骤以 200μL 细胞裂解物进行 IP 为例)

- 1)将提取蛋白样品，用 Cell lysis buffer 稀释到  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，取  $100\mu\text{L}$  作为 Input 组，剩下的样品 作为 IP 组，Input 组  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。
- 2)将  $200\mu\text{L}$  细胞裂解物加入  $20\mu\text{L}$  Protein G 珠浆中， $4^{\circ}\text{C}$ 旋转混合 30-60 min。(注意：吸取珠子时将枪头剪成粗口，防止损伤珠子。)
- 3) $4^{\circ}\text{C}$ ，离心 10 min。
- 4)取上清，进行后续步骤。

### 3. 蛋白与抗体孵育

- 1)IP 组管加入 2-5  $\mu\text{g}$  目的抗体，推荐根据抗体说明书添加抗体含量。
- 2) $4^{\circ}\text{C}$ ，垂直混匀器摇动孵育过夜。

### 4. Protein A/G Agarose Beads 悬液准备

- 1)取  $20\mu\text{L}$  Protein A/G Agarose Beads， $4^{\circ}\text{C}$ ，瞬离弃上清。
- 2)加入  $500\mu\text{L}$  预冷的 Cell lysis buffer，混匀，瞬离弃上清，再重复洗涤 1 次。
- 3)用  $100\mu\text{L}$  预冷的 Cell lysis buffer 将 Protein A/G Agarose Beads 配成悬液。

### 5. Protein A/G Agarose Beads 与抗体结合

- 1)取步骤 4 得到的  $100\mu\text{L}$  Protein G Agarose Beads 悬浮液加入到 IP 组 EP 管中， $4^{\circ}\text{C}$ ，垂直混匀器摇动 2-3 h。
- 2) $4^{\circ}\text{C}$ ，离心 30 sec，弃掉上清，使用预冷的  $500\mu\text{L}$  Cell lysis buffer 洗珠子 5 次，弃掉洗涤 buffer。

(注：下游检测可根据自身实验需求二选一)

#### 质谱检测(选择一)

若进行质谱检测，可将步骤 5 得到的珠子样品重悬在  $500\mu\text{L}$   $1\times\text{PBS}$  中，寄至本公司进行质谱检测服务。

#### Western blot (选择二)

- 1)用  $20-40\mu\text{L}$   $1\times\text{SDS sample buffer}$  重悬沉淀(即珠子及连接其上的抗体、蛋白)，震荡，离心 30 sec。
- 2) $95-100^{\circ}\text{C}$ 煮样 2-5 min， $14,000\text{g}$  离心 1 min。
- 3)上样  $15-30\mu\text{L}$ ，进行 Western Blot。

#### 注意事项和免责声明

- 1.Cell lysis buffer 要  $10\text{mL}/$ 管分装， $-20^{\circ}\text{C}$ 储存。
- 2.从蛋白样品收集开始，所有步骤中蛋白样品都必须在  $4^{\circ}\text{C}$ 或冰上操作。
- 3.本产品 Protease inhibitor 有毒，建议在通风橱操作。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。