

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 1×10^7 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°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°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°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 μg 目的抗体，推荐根据抗体说明书添加抗体含量。
- 2) 4°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°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°C ，垂直混匀器摇动 2-3 h。
- 2) 4°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 $10\text{mL}/\text{管}$ 分装， -20°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°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。