

Pierce®经典 IP（免疫沉淀）试剂盒**26146****2137.6**

货号	描述
26146	Pierce 经典 IP 试剂盒 ，包含足够进行 50 次免疫沉淀反应的试剂（每次使用 10 μ L 树脂固相化抗体） 试剂盒组分： Pierce 蛋白 A/G 加强型琼脂糖树脂 ，0.55 mL 固相树脂以 50% 的浆液形式提供（例如，100 μ L 50% 的浆液含有 50 μ L 固相树脂） IP 裂解/洗涤缓冲液 ，2 \times 50 mL，0.025M Tris，0.15M NaCl，0.001M EDTA，1% NP-40，5% 甘油；pH 7.4 100\times 条件缓冲液 ，5 mL，中性 pH 缓冲液 20\times Tris-缓冲盐溶液 ，25 mL，使用时稀释至 0.025M Tris，0.15M NaCl；pH 7.2 洗脱缓冲液 ，50 mL，pH 2.8，含有伯胺 非还原型泳道标记上样缓冲液 ，（5 \times ），5 mL，0.3M Tris•HCl，5% SDS，50% 甘油，泳道标记示踪染料；pH 6.8 Pierce 离心柱-螺旋帽 ，100 个柱子，包含相应的配件 微量离心收集管 ，2 mL，100 个 微量离心样品管 ，1.5 mL，50 个 Pierce 对照琼脂糖树脂（4% 交联琼脂糖珠） ，2 mL 固相树脂以 50% 的浆液形式提供（例如，100 μ L 50% 的浆液含有 50 μ L 固相树脂）

储存：4 $^{\circ}$ C 储存，常温运输。

产品简介

Thermo Scientific Pierce 经典 IP 试剂盒使用小于 10 μ g 的抗体即可高效地实现抗原免疫沉淀。首先将特异性抗体加入样品中形成免疫复合物，然后将其加到蛋白 A/G 加强型琼脂糖中。洗涤该复合物以除去未结合的物质，再以低 pH 洗脱缓冲液将结合的免疫复合物从蛋白 A/G 上洗脱。该试剂盒包含确保抗原高产量的优化缓冲液和高效离心柱和收集管，通过减少处理和混合时间简化实验步骤。

重要产品信息

- 除非另有说明，所有操作在 4 $^{\circ}$ C 下进行。
- 树脂的所有离心步骤需在低速（如 1000 \times g）、30-60 秒条件下操作。离心速度大于 5000 \times g 可能会导致树脂聚集，难以重悬。
- 离心柱离心过程中，使用 2 ml 收集管时流穿的液体体积应不超过 600 μ L，使用 1.5 ml 的收集管时则应不超过 300 μ L。体积超出可能导致柱内产生回压及洗涤和洗脱不完全。
- 使用此试剂盒时抗体将与免疫沉淀的抗原一起被洗脱。因此，在还原型 SDS-PAGE 凝胶或

Western blot 时至少产生三个蛋白条带：抗体重链（ 50 kDa 的）、轻链（ 25 kDa ）和抗原。如果抗体条带掩盖了免疫沉淀的抗原，则可用 Thermo Scientific Clean-Blot IP 检测试剂（货号 21230 和 21233）或使用 Thermo Scientific Pierce 直接 IP 试剂盒（货号： 26148）消除共洗脱。

- 为了优化结果，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，将导致抗原产量低。
- IP 裂解/洗涤缓冲液已进行过代表性细胞类型的检测，包括但不限于下列细胞系： HeLa, JURKAT, A431, A549, MOPC, NIH 3T3 和 U2OS。通常情况下， 10^6 的 HeLa 细胞可以产生约 10 mg 的细胞团块，按照 $\sim 3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的配比使用 IP 裂解/洗涤缓冲液（即 100 μL IP 裂解/洗涤缓冲液可以裂解 $\sim 300\mu\text{g}$ 细胞团块）。
- 为了获得最佳结果，可添加 Thermo Scientific Halt 蛋白酶（货号： 78429）和磷酸酶（货号： 78420）抑制剂混合物，以尽量减少细胞裂解液中蛋白质的降解和去磷酸化。
- IP 裂解/洗涤缓冲液可兼容 Thermo Scientific Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒（货号： 23225）。
- 设置合理的对照对于鉴定相关的相互作用至关重要。试剂盒提供的 Pierce 对照用琼脂糖树脂是用作 Pierce 蛋白 A / G 琼脂糖树脂的相似载体材料，可以作为阴性对照。
- Pierce 离心柱套装包含离心柱、螺旋盖、底盖、带有 Luer-Lok™ 接头的螺旋帽、大垫片和一个大垫片推入工具。标准的 IP 不需要大垫片。当等比例扩大体积（例如树脂 $> 200\mu\text{L}$ ）时，可以加入大垫片以方便洗涤。带有 Luer-Lok™ 接头的螺旋帽有可翻盖的顶部，可以在洗涤步骤中使用。储存过程中可用螺旋盖密封离心柱（见附加信息部分）。

其它所需材料

- 磷酸盐缓冲液（PBS；货号 28372）
- 二硫苏糖醇（DTT；货号 20290 或 20291）
- 微量离心收集管，2mL

Pierce 经典 IP 试剂盒的操作流程

A. 哺乳动物细胞裂解

方案 I：裂解单层细胞（贴壁）培养物

1. 小心去除细胞中的培养基。
2. 用 PBS 清洗细胞一次。
3. 将冰上预冷的 IP 裂解/洗涤缓冲液加入细胞中（表 1）。冰上孵育 5 分钟并定期混匀。

表 1. 不同标准的细胞培养皿/板中 IP 裂解/洗涤缓冲液的建议添加量

培养皿/板的尺寸或表面积	IP 裂解/洗涤缓冲液体积
100 × 100 mm	500-1000 μL
100 × 60 mm	250-500 μL
6-孔板	200-400 μL 每孔
24-孔板	100-200 μL 每孔

4. 将细胞裂解液转移到微量离心管中， $\sim 13000 \times g$ 离心 10 分钟以沉淀细胞碎片。
5. 将上清转移到一个新的微量离心管中用于进行蛋白浓度测定和后续分析。

方案 II：裂解悬浮细胞培养物

1. 将细胞悬浮液在 $1000 \times g$ 下离心 5 分钟以沉淀细胞。弃掉上清。
2. 将细胞团块用 PBS 重悬洗涤一次。 $1000 \times g$ 离心 5 分钟再次沉淀细胞。
3. 将冰上预冷的 IP 裂解/洗涤缓冲液加到细胞团块中。每 50mg 湿重细胞团块加入 500 μL IP 裂解/洗涤缓冲液（即 10:1 体积/质量）。如果裂解大量细胞，可首先添加 10% 终体积的 IP 裂解/洗涤缓冲液到细胞团块中，用移液管/移液器上下吹打细胞团块以混匀，然后再向细胞悬浮液中添加剩余的 IP 裂解/洗涤缓冲液。
4. 将细胞裂解液在冰上孵育 5 分钟并定期混匀。 $\sim 13000 \times g$ 离心 10 分钟去除细胞碎片。
5. 将上清转移到一个新的微量离心管中用于进行蛋白浓度测定和后续分析。

B. 使用对照琼脂糖树脂预处理细胞裂解液

1. 对于 1 mg 的细胞裂解液，添加 80 μL 对照琼脂糖树脂浆液（40 μL 固相树脂）到离心柱中。
2. 将柱子离心去除贮存缓冲液。
3. 加入 100 μL 0.1M Na_3PO_4 ，0.15M NaCl; pH7.2 缓冲液至离心柱中，离心并弃掉流穿液体。
4. 加入 1 mg 细胞裂解液至含有树脂的离心柱中，并在 4°C 下孵育 30 分钟至 1 小时，同时温和地翻转柱子以混匀。
5. $1000 \times g$ 离心柱子 1 分钟，弃掉含有树脂的离心柱，保留流穿液体，以备加入到固定的抗体中。

C. 免疫复合物的制备

注：样品用量和孵育时间取决于每个特定的抗体-抗原体系，并且可能需要优化实验方案以使产量最大化。以下方案是针对 2-10 μg 亲和纯化的抗体，且可以根据需要按比例放大；查看操作方案后的附加信息部分可获取抗体和树脂的建议使用量。

1. 将 2- 10 μg 亲和纯化的抗体与预处理的细胞裂解液在微量离心管中混合。每个 IP 反应总蛋白建议量是 500 – 1000 μg ，可使用 Pierce BCA 蛋白定量试剂盒测定。
2. 用 IP 裂解/洗涤缓冲液稀释抗体/细胞裂解液混合物至 300 – 600 μL 。
3. 在 4°C 孵育 1 小时至过夜，以形成免疫复合物。

D. 捕获免疫复合物

1. 轻旋 Pierce 蛋白 A / G 琼脂糖树脂的瓶子，以获得均一的悬浮液。使用大口径或截短枪头取 20 μL 树脂浆液加入 Pierce 离心柱中。将柱子置于一个微量离心管中， $1000 \times g$ 离心 1 分钟，弃

掉流穿液体。

2. 用 100 μL 预冷的 IP 裂解/洗涤缓冲液洗涤树脂两次。每次洗涤后弃掉流穿液体。
3. 在纸巾上轻拍离心柱的底部以去除剩余的液体，插入底盖。
4. 将抗体/细胞裂解液样品加入含有蛋白 A/G 加强型琼脂糖的离心柱中。盖上螺旋盖温和地上下翻转混匀或在摇床上震荡孵育 1 小时。
5. 卸下底盖，拧松螺旋帽并将离心柱置于收集管中。将柱子离心并保留流穿液体。在确定 IP 反应成功之前不要丢弃该液体。
6. 拧下螺旋帽，将柱子置于一个新的收集管中，加入 200 μL 的 IP 裂解/洗涤缓冲液并离心。

注：如果需要无去垢剂洗涤，则有另一款洗涤缓冲液（20 \times TBS 缓冲液）提供。使用前请将该缓冲液稀释至 1 \times 。

7. 用 200 μL IP 裂解/洗涤缓冲液洗涤树脂三次，并且每次洗涤后都进行离心。
8. 用 100 μL 1 \times 条件缓冲液洗涤树脂一次。

E. 免疫复合物的洗脱

注：有两种方案可以洗脱免疫复合物。样品-缓冲液洗脱适用于 Western blot 分析。低 pH 洗脱被中和后，适用于酶法或功能测定。

• **样品-缓冲液洗脱：**准备 50 μL 的 2 \times 非还原型泳道标记上样缓冲液（即，用超纯水将 5 \times 样品缓冲液稀释至 2 \times ），并添加 DTT 至终浓度为 20 mM。将含有树脂的离心柱至于一个新的收集管中，加入 2 \times 还原型上样缓冲液。保持柱子未被塞住并且处于收集管中，在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5-10 分钟。将柱子离心收集洗脱液。在进行 SDS-PAGE 电泳之前将样品冷却至室温。

注：加热含有 SDS 样品缓冲液的树脂后，该树脂将不能被重复使用且必须丢弃。

• **低 pH 洗脱：**将离心柱置于一个新的收集管中，加入 50 μL 洗脱缓冲液。在室温下孵育 10 分钟。该柱子无需盖上或者混匀。将柱子离心并收集流穿的液体。如果需要可进行额外的洗脱操作。单独分析每一份洗脱液，以确保抗原被完全洗脱。

可选步骤：为了中和低 pH 值的洗脱缓冲液（例如，为了进行下游的酶法或功能测定），向收集管中加入 5 μL 1M Tris, pH9.5，然后通过离心即可中和 pH 值。或者，直接使用中性 pH 值的洗脱缓冲液（如：温和洗脱缓冲液，货号：21027）。

注：减少洗脱缓冲液的用量，可获得浓度更高的洗脱液但可能会使总体产量减少。

常见问题及解决方案

问题	可能的原因	解决方案
抗原没有被免疫沉淀	样品中抗原含量较低而无法检测	通过 SDS-PAGE 凝胶或 Western blot 检测蛋白的表达量或裂解液的裂解效率
	抗体没有与抗原结合	使用一个近源抗体或一个识别不同抗原表位的不同抗体
	IP 裂解/洗涤缓冲液组份干扰抗原-抗体的结合	用 1×Tris-缓冲盐溶液进行免疫沉淀或者洗涤操作
抗原在下游实验中没有活性	抗原对低 pH 非常敏感，在洗脱过程中失活	用高盐、中性 pH 的洗脱缓冲液重复免疫沉淀实验，比如温和洗脱缓冲液（货号：21027）
被洗脱的抗体条带覆盖了目的抗原条带	抗原的分子量大小约为 50 kDa 或 25 kDa	使用 Clean-Blot IP 检测试剂（货号：21230 或 21233）进行 Western blot 检测
		用与免疫沉淀中不同种属的抗体做 Western blot 检测(如，免疫沉淀用鼠抗的 IgG 而检测用兔抗的 IgG)
		使用 Pierce 直接 IP 试剂盒 (货号：26148) 或 Pierce 交联 IP 试剂盒(货号：26147)将抗体固定在介质上
		在进行 SDS-PAGE 电泳之前，不对样品进行还原，抗体迁移条带为 150 kDa

附加信息

A. 备选的免疫沉淀操作方案

当免疫复合物形成后被蛋白 A/G 树脂捕获，Pierce 经典 IP 操作方案可以达到理想的结果；然而，对于如何捕获免疫复合物有两种备选方案。

- 如果要求在较短的时间内进行免疫沉淀实验，将抗体和细胞裂解液一起添加至蛋白 A/G 树脂，在一步中形成和捕获免疫复合物。
- 如果使用未纯化的抗体，如血清或腹水，先将抗体固定在蛋白 A/G 树脂上，洗涤，然后再加入细胞裂解液。

B. 大规模抗体结合

Pierce 经典 IP 操作方案可根据需要按比例扩大。表 2 中列出了按比例放大所需的抗体和树脂的使用量。可根据需要调整相应的结合和洗涤试剂用量。

表 2. 大规模的 IP 实验中 Thermo Scientific Pierce 蛋白 A/G 加强型琼脂糖树脂和抗体的用量表

抗体用量	树脂浆液用量 (μL)
2-20	20
25-50	40
50-250	100

C. 关于下述事项的更多信息，请访问我们的网站：

- 技术提示#27：优化免疫亲和纯化实验中的洗脱条件
- 技术提示#43：蛋白质的稳定性和储存
- 技术提示#40：重力倍数 (×g) 和离心转子速度 (RPM) 之间的单位换算

D. Pierce 离心柱

Pierce 离心柱可容纳多达 900 μL 的液体。柱子可置于 1.5 mL 的或 2 mL 微量离心管中，或与 Luer-Lok 接头（见图 1）连用，使用注射器处理样品。当使用注射器时，样品大小和洗涤量只受限于注射器的容积。对于小体积树脂，使用小的、预先插入的垫片即可（图 2A）。需要使用超过 100 μL 的树脂时，使用大垫片，可以放在柱子的顶部或底部（图 2B 和 2C）。当树脂的用量介于大、小两种垫片之间时（图 2B），树脂可能可以被重复使用。

- 要从柱子中移除垫片，可用拉直的曲别针，从柱子底部插入，将垫片推出。
- 要插入垫片，先将其置于柱内，然后使用垫片推入工具将其推到相应的位置。
- 要从顶端和底部都装了垫片的柱子中移除顶端的垫片，可用拉直的曲别针挑起顶端的垫片，然后可用镊子将其移出。

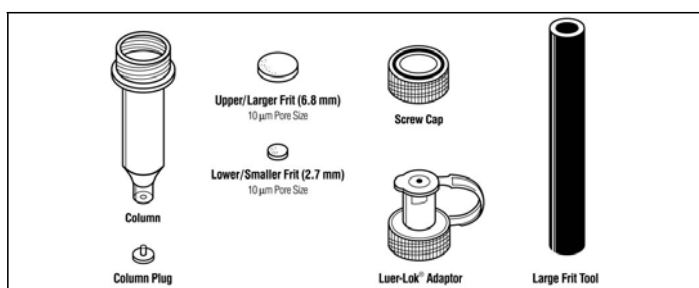


图 1. Pierce 离心柱组件图。

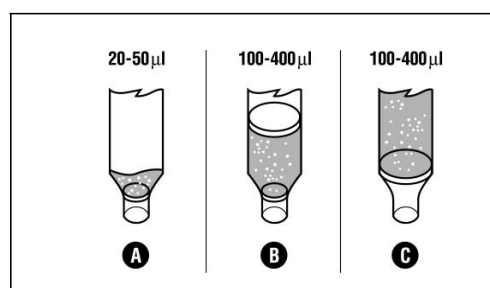


图 2. 釉料放置的三种形式。

相关 Thermo Scientific 产品

- 78428 **Halt Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail** (Halt 一次性使用磷酸酶抑制剂混合物) (100×), 100 μL×24 管
- 78440 **Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail** (Halt 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物) (100×), 1 mL
- 78430 **Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail** (Halt 一次性使用蛋白酶抑制剂混合物) (100×), 24×100 μL
- 28358 **20×TBS Buffer** (TBS 缓冲液), 500mL
- 69705 **Pierce Spin Columns – Screw Cap**(Pierce 离心柱-带有 Luer-Loc 接头的螺旋盖), 25 个/包
- 69720 **Pierce Microcentrifuge Tubes** (Pierce 微量离心管), 2 mL, 72 个/包
- 69715 **Pierce Microcentrifuge Tubes** (Pierce 微量离心管), 1.5 ml, 72 个/包

89879	Pierce Micro-Spin Columns (Pierce 微型离心柱), 50 个/包
20423	Pierce Protein A/G Plus Agarose (Pierce 蛋白 A / G 加强型琼脂糖树脂), 2 mL
39001	Lane Marker Sample Buffer, Non-Reducing (非还原型泳道标记上样缓冲液) (5×), 5mL
21027	Gentle Ag/Ab Elution Buffer (温和抗原/抗体洗脱缓冲液), pH 值 6.6 , 500 mL
28372	BupH™ Phosphate Buffered Saline (PBS) (BUPH™磷酸盐缓冲液), 40 包, 每包可配成 500 mL 缓冲液
28374	BupH Modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Packs (BUPH 修饰的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液包), 40 包, 每包可配成 500 mL 缓冲液
21004	IgG Elution Buffer (IgG 洗脱缓冲液), 用于常规蛋白质亲和纯化的低 pH 洗脱缓冲液, 1 L
89897	Pierce Centrifuge Columns (Pierce 离心柱), 5 mL (树脂床容积), 重力或离心兼容, 25 个
21230	Clean-Blot IP Detection Reagent (Clean-Blot IP 检测试剂) (HRP), 2.5 mL
21233	Clean-Blot IP Detection Reagent (Clean-Blot IP 检测试剂) (AP), 2.5 mL
26148	Pierce Direct IP Kit (Pierce 直接 IP 试剂盒)

Luer-Lok™ is a registered trademark of Becton Dickinson and Company

This product ("Product") is warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation") and to be free from defects in material and workmanship. Unless otherwise expressly authorized in writing, Products are supplied for research use only. No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than the original purchaser of the Product ("Buyer").

No other warranties, express or implied, are granted, including without limitation, implied warranties of merchantability, fitness for any particular purpose, or non infringement. Buyer's exclusive remedy for non-conforming Products during the warranty period is limited to replacement of or refund for the non-conforming Product(s).

There is no obligation to replace Products as the result of (i) accident, disaster or event of force majeure, (ii) misuse, fault or negligence of or by Buyer, (iii) use of the Products in a manner for which they were not designed, or (iv) improper storage and handling of the Products.

Current product instructions are available at www.thermoscientific.com/pierce. For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.

© 2012 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Unless otherwise indicated, all trademarks are property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.