

植物免疫沉淀试剂盒 (Protein A/G agarose)

产品货号: M20507

产品规格: 20T

产品简介:

本免疫沉淀试剂盒适合用于无标签蛋白、内源性蛋白等的下拉富集实验。试剂盒包含实验所需各种缓冲液, Protein A/G agarose beads配合客户自配的特异性抗体便捷快速的完成免疫沉淀或者免疫共沉淀实验过程。本试剂盒适用于植物样品的免疫沉淀过程, 试剂盒中的缓冲液配方经过优化可以充分裂解植物样本, 有利于蛋白的释放和后续IP/Coip实验的进行。试剂盒提供的Normal Rabbit/mouse IgG可作为阴性对照排除beads的非特异性结合, 如IP一抗为其他来源则需选择与之来源相同的IgG作为对照。本试剂盒可借助磁力架完成免疫沉淀实验(推荐), 亦可用离心的方式进行实验。

产品组成:

产品名称	规格	保存条件
Protein A/G agarose beads	1ml	2-8°C
Protease Inhibitor Cocktail (100×)	1ml	-20°C
植物裂解缓冲液	50ml	-20°C
漂洗缓冲液	50ml	-20°C
洗脱缓冲液	2ml	-20°C
中和缓冲液	2ml	-20°C
Normal Rabbit IgG (1mg/mL)	20ul	-20°C
Normal Mouse IgG(1mg/mL)	20ul	-20°C

使用说明:

1. 蛋白提取

1.1 取适量植物组织样本(叶片等) 0.5g-1g放置于冷冻液氮中冷冻, 将冷冻后得植物组织样本放于研钵研磨成粉末, 尽可能充分研磨破坏其细胞壁。将粉末置于15ml/50ml离心管后加入1-2ml植物裂解缓冲液(需按照1:100的比例添加Protease Inhibitor Cocktail (100×))进行裂解, 可在4°C旋转混匀仪15min使裂解液和样品充分混匀;

1.2 为提高裂解效率, 可加入200ul玻璃粉按照600-800g离心力充分震荡30min(添加玻璃粉的步骤为可选方案), 裂解完成后16000g, 离心30min, 吸取上清置于新的离心管中, 弃去沉淀。

1.3 检测蛋白提取物中的蛋白浓度。并留存一部分样本作为Input对照用。

2. 免疫沉淀/共沉淀实验

2.1 琼脂糖珠清洗

琼脂糖珠存储在保护液中, 使用前需要充分清洗。重悬混匀protein A/G琼脂糖珠后取适量混悬液(如总体积100ul, beads含量为25ul, 吸取beads时建议用剪刀减去枪尖部分), 添加漂洗缓冲液或植物裂解缓冲液至500ul轻轻混悬吹打protein A/G琼脂糖珠, 6000g 4°C离心30s, 小心去除上清, 不要吸到凝胶。重复以上步骤2-3次。

2.2 protein A/G琼脂糖与抗体结合

(1) 抗体稀释: 按照抗体说明书的建议稀释抗体至工作浓度, 或者配成终浓度为5-50ug/ml的抗体工作液, 置于冰上备用。

(2) 阴性对照设置: 稀释试剂盒中带的与抗体来源相同的IgG, 如一抗来源为Rabbit, 则选Normal Rabbit IgG, 稀释为与上一步抗体同样的浓度作为正常IgG工作液, 用于阴性对照或者降低背景;



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

(3) 抗体吸附：将2.1步骤清洗完的protein A/G琼脂糖珠6000g 4°C离心30s，并吸除上清，加入100ul抗体工作液或IgG工作液（目的抗体和IgG吸附可各做一组），重悬后室温在翻转混合仪上孵育15min-1h。

(4) 洗涤：孵育完抗体后添加500ul漂洗缓冲液，移液器轻轻吹打悬浮protein A/G琼脂糖珠，冰浴并置于摇床上5min，然后6000g 4°C离心30s，小心去除上清。重复此步骤3次。

(5)（可选）将洗涤后的protein A/G琼脂糖珠与样品在4°C孵育1小时后离心分离，以去除与IgG有非特异性结合的蛋白。

(6) 取20ul吸附好抗体（目的抗体与IgG组各做一组）的protein A/G琼脂糖珠添加到100ul蛋白样品中，置于摇床或者翻转混合仪上室温孵育2-4h或者4°C过夜孵育。孵育结束后，6000g 4°C离心30s，小心去除上清。可保留部分上清用于检测实验效果。

(7) 洗涤：向（6）中去除上清的管子中添加500ul的漂洗缓冲液，吹打清洗琼脂糖珠，并重复清洗3-5次。此步骤同时可向漂洗缓冲液中按照1:100的比例添加蛋白酶抑制剂，以减少蛋白的降解。

2.3 洗脱

酸洗脱：向清洗干净的protein A/G琼脂糖珠（20ul）中添加50ul洗脱缓冲液，吹打混匀后在摇床或者翻转混匀仪上孵育5min，孵育时间不建议太长，最长不超过15min。

孵育结束后6000g 4°C离心30s，将上清转移到新的离心管中并添加5ul中和缓冲液。为提高洗脱效率，洗脱步骤可重复1-2次。洗脱后的蛋白可在-20或-80长期保存，或者借用于后续检测分析。

变性洗脱：后续不用于其他检测分析的话，可使用变性洗脱的方式，在洗涤获得的protein A/G琼脂糖珠中添加50ul 2×loading buffer，95°C加热5-10min。6000g 4°C离心30s，取上清可用于SDS-PAGE或WB检测。

注意事项：

1. 本试剂盒中提供的洗脱方式为酸洗脱，如不需回收beads也可添加loading buffer进行煮样洗脱。
2. 试剂盒提供的beads建议按照500ul样品添加20ul磁珠混悬液进行实验，具体用量可根据实验结果再进行调整。
3. 实验过程中如涉及到磷酸化修饰或乙酰化蛋白，则需要添加磷酸酶抑制剂或去乙酰化抑制剂。
4. Beads使用前应保证充分混匀，混匀方式不建议剧烈涡旋震荡。
5. 本产品仅限专业人员科学研究使用，不可用于临床诊断或者治疗，不可存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全健康，请穿戴一次性手套操作。

储存条件：

-20°C保存，有效期12个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com