

通用IP/Co-IP试剂盒(动物)

Universal IP/Co-IP Kit for Mammal

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IPP001 (6T)	IPP001M (12T)	IPP001L (40T)	
01	Lysis buffer	9mL	18mL	60mL	4°C
02	ProteinA/G Magnetic Beads	0.2mL	0.4mL	1.5mL	4°C
03	Incubation buffer	4.5mL	9mL	30mL	4°C
04	Wash buffer	20mL	40mL	135mL	4°C
05	Elution buffer	0.7mL	1.5mL	5mL	4°C避光
06	Protease inhibitor (100X)	35μL	70μL	0.24mL	-20°C
07	Normal Rabbit IgG (1mg/mL)	30μL	60μL	0.20 mL	-20°C
08	Normal Mouse IgG (1mg/mL)	30μL	60μL	0.20 mL	-20°C

注意 1: 需自备 PBS、6Xloading buffer、磁力架等试剂耗材。

注意 2: 6T 为 6 次单组 (1 组 IP 或 1 组 IgG) 免疫沉淀实验, 后面的操作步骤中包含了 IgG 和 IP 各 1 组, 需消耗 2T 试剂。

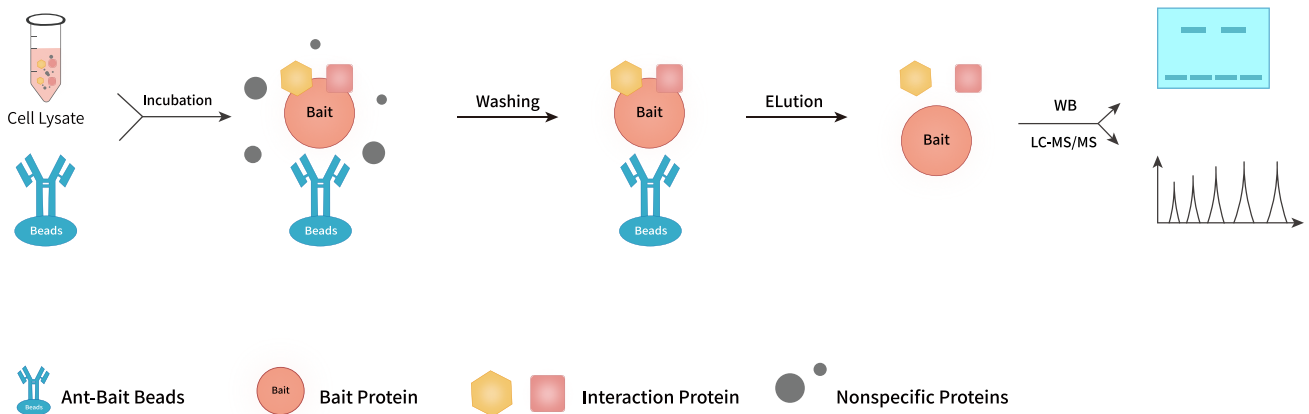
产品简介/Product Description

免疫共沉淀 (Co-Immunoprecipitation) 是利用抗原与抗体之间的专一性作用为基础, 从而用于研究蛋白质与蛋白质之间相互作用的一种方法。抗体与裂解液中相应的蛋白结合后, 再与 ProteinA/G 偶联的

Sepharose 或 MagneticBeads 孵育,通过离心或者借助磁力架获得 ProteinA/G 磁珠 - 抗体 -目的蛋白复合物,在高温及还原剂的作用下,抗原与抗体解离,收集上清,上清中包括抗体、目的蛋白和少量的杂蛋白,再通过 Western Blot 或质谱 (MS) 鉴定蛋白质。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



使用流程/Procedure

1. 总蛋白提取

(1) 组织:

- ①研磨: 取新鲜组织或低温组织 (约 0.3g), 置于灭菌后预冷的研钵中,用液氮研磨至粉状;
- ②裂解: 取 990 μ L Lysis buffer、10 μ L Protease inhibitor(100X) 混匀作为裂解液, 吸取 800 μ L 裂解液加入研钵, 在冰上继续研磨 5-10min至样品成细腻的匀浆状, 转移至新的 EP 管中, 再向研钵中加入剩余的 200 μ L 裂解液收集残留的样品, 同样转移至该 EP 管;
- ③装有样品匀浆的 EP 管在冰上充分裂解 30min, 每隔 5min 上下颠倒混匀 1 次;
- ④超声: 用超声波细胞破碎仪超声 8-10min, 功率 20%, 超声 3s, 间歇 3s, 冰浴超声;
- ⑤离心: 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 10min, 收集上清, 再向上清中加入Lysis buffer 补充体积至1mL, 混匀。

(1) 细胞样本:

- ①洗涤: 预冷的 1mLPBS 洗涤样品 2 次, 最后一次尽量吸干PBS
- ②裂解: 根据细胞量加入990 μ L Lysis buffer、10 μ L Protease inhibitor (100X), 冰上充分裂解 30min, 每隔 5min 上下颠倒混匀 1 次;
- ③超声: 用超声波细胞破碎仪超声 5min, 功率 20%, 超声 3s, 间歇 3s, 冰浴超声;
- ④离心: 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 10min, 收集上清。

注意: 蛋白提取整个过程都在冰上操作, 减少高温造成的蛋白降解; 超声过程中最好不要有气泡产生, 减少蛋白降解。总蛋白放在 -20 $^{\circ}$ C保存。

注意: 蛋白提取整个过程都在冰上操作, 减少高温造成的蛋白降解; 超声过程中最好不要有气泡产生, 减少蛋白降解。总蛋白放在 -20 $^{\circ}$ C保存。

2.Co-IP

(1) 抗体结合蛋白:

- ①准备 2 个 1.5mL EP 管记为 IP、IgG，IP 组加入3-5 μ g目的抗体，IgG 管加入3-5 μ g目的抗体同种属 IgG；
- ②取总蛋白液 100 μ L 标记为 Input，-20 $^{\circ}$ C保存备用，IgG 和 IP 管分别加入450 μ L 蛋白液，再加 Incubation buffer 将体积补至800 μ L，4 $^{\circ}$ C静音混合过夜（约 16h）。

(2) 磁珠准备：

- ①将 ProteinA/G Magnetic Beads 从 4 $^{\circ}$ C冰箱取出，上下颠倒混匀数次，使磁珠和溶液混合均匀，分别取 30 μ L 到 2 个新的 1.5mLEP 管中，记为 IgG 和 IP；
- ②IgG 和 IP 管各加入0.5mL 预冷的 Wash buffer 重悬磁珠，置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液，用移液枪小心吸弃上清，该步骤重复 3 次。

(3) 磁珠与复合物结合：

- ①将两组孵育后的混合液分别加入到对应洗涤完成的磁珠管中，室温静音混合孵育 2h；
- ②将 2 管置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液，用移液枪小心吸弃上清；
- ③IgG 和 IP 管各加入0.5mL 预冷的 Wash buffer，置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液，用移液枪小心吸弃上清，该步骤重复 3 次。

(4) 洗脱：

IgG 和 IP 管均加入100 μ LElution buffer，沸水浴 10 min，置于磁力架上静置 2min，取上清记为洗脱液，与 Input 组各自加入20 μ L 6 x SDS loading buffer，沸水浴 10 min，20 $^{\circ}$ C保存备用。

3.WB（选做）

各取 20 μ L IgG、IP 和 Input 组样品，开展 WB 检测。

4. 银染（选做）

- ① 取 20 μ L IgG、IP 和 Input 组样品，开展 SDS-PAGE 凝胶电泳。
- ② 固定：将电泳后的凝胶从玻璃板上剥离下来，清水冲洗干净，放入干净的直径 12cm 玻璃皿中，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 5min，弃掉去离子水，加入固定液没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 30min。
- ③ 致敏：弃掉固定液，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 5min，重复水洗一次，共 2 次，加入致敏液没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 30min。
- ④ 染色：弃掉致敏液，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 2min，重复水洗一次，共 2 次，加入染色液没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 20min。
- ⑤ 显色：弃掉染色液，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 1min，重复水洗一次，共 2 次，加入显色液没过胶，在脱色摇床上室温摇晃 2min 左右，溶液变浑浊，弃掉液体，加入新的显色液继续显色至目的条带清晰，拍照。

5. 质谱（选做）

取 30 μ L IgG 和 IP 组蛋白样品开展 LC-MS 检测。

注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

