

交联磁性法IP/Co-IP试剂盒(植物)

Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit for Plant

注:本产品干冰运输;试剂按说明书保存于4°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IPP008 (6T)	IPP008M (12T)	IPP008L (40T)	
01	Protein A/G Magnetic Beads	0.15mL	0.30mL	1mL	4°C
02	IP Lysis/Wash Buffer	15.00mL	30.00mL	100mL	4°C
03	20X Coupling Buffer	3.75mL	7.50mL	25 mL	4°C
04	DSS (disuccinimidyl suberate)	2.40 mg	4.80 mg	16mg	4°C
05	Neutralization Buffer	0.15 mL	0.30 mL	1 mL	4°C
06	Elution Buffer	3.75 mL	7.50 mL	25 mL	4°C避光
07	Lane Marker Sample Buffer, Non-reducing, (5X)	0.75mL	1.50 mL	5 mL	4°C

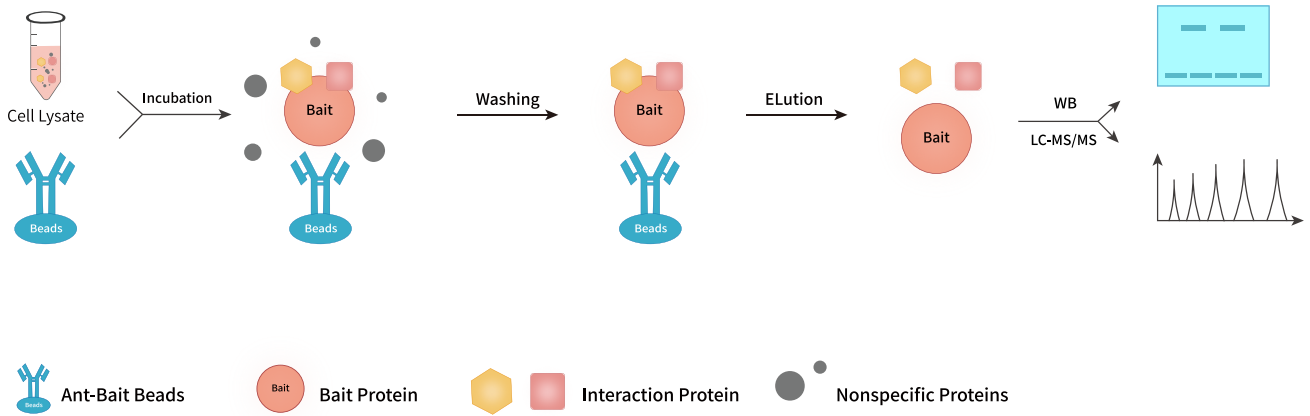
注意: 需自备 PBS、磁力架等试剂耗材。

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 Magnetic Beads 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. 细胞裂解

(1) 植物样本

- ①研磨：取新鲜幼嫩组织或低温组织（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：吸取 800 μ L IP Lysis/Wash Buffer 加入研钵，在冰上继续研磨 5-10 min 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 12-15min，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 IP Lysis/Wash Buffer 补充体积至 1mL，混匀。
- 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。**

(1) 悬浮细胞的裂解

- ①将细胞悬液以 1000 g 离心 5 分钟，收集细胞，弃上清。
- ②用 PBS 洗细胞一次，即用 PBS 将细胞团重悬。将细胞悬液以 1000 g 离心 5 分钟，收集细胞，弃上清。
- ③向细胞团块中加入冰浴预冷的 IP Lysis/Wash Buffer。
- ④每 50 mg 细胞团块使用 500 μ L IP Lysis/Wash Buffer（即 10: 1 体积 / 质量比）。
- ⑤如果细胞量很大，首先向细胞团中加入终体积 10% 的 IP Lysis/Wash Buffer，用移液器反复吹打混匀后，再将剩余的 IP Lysis/Wash Buffer 加入细胞悬液中。
- ⑥将裂解液在冰上孵育 5 分钟，期间混匀几次。约 13000 g 离心 10 分钟，沉淀并去除细胞碎片。
- ⑦将上清转移到一个新管中，以备进行蛋白浓度测定及后续实验。

2. 抗体与蛋白 A / G 磁珠结合

注意：以下操作方案是根据偶联 2-10 μ g 抗体进行优化的。

- ①为每个 IP 反应制备 2 mL 1X 改良交联缓冲液：取 0.1 mL 20XCoupling Buffer 与 0.1 mL IP Lysis/Wash Buffer，加入 1.8 mL 超纯水进行稀释。

- ②涡旋振荡 Protein A/G Magnetic Beads 瓶使其成为均匀悬浮液。取 25 μL 磁珠加入微量离心管，将离心管置于磁力架上静置 1 分钟收集磁珠，弃去储存液。
- ③向离心管中加入 500 μL 步骤 1 制备的 1X 改良 Coupling Buffer。轻柔混匀后置于旋转器上室温孵育 1 分钟。用磁力架收集磁珠后弃去上清。重复此步骤一次。
- ④将抗体用 20X Coupling Buffer 和 IP Lysis/Wash Buffer 按 1:20 稀释，使抗体终浓度达到 2-10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 。例如：制备 100 μL 抗体溶液时，取 5 μL 20X Coupling Buffer 和 5 μL IP Lysis/Wash Buffer 稀释抗体原液，最后用超纯水补足至 100 μL 终体积。
- ⑤向磁珠中加入 100 μL 制备好的抗体溶液，轻柔混匀后置于旋转器上室温孵育 15 分钟。孵育期间，每 5-10 分钟轻柔涡旋磁珠以确保其保持悬浮状态。
- ⑥用磁力架收集磁珠，弃上清。
- ⑦加入 100 μL 1X 改良 Coupling Buffer，轻柔涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠后弃去上清。
- ⑧加入 300 μL 1X 改良 Coupling Buffer，轻柔涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠后弃去上清。重复此步骤一次。

3. 交联合的抗体

注意：1. 传统的 IP 实验可以省略抗体交联步骤；但是如果省略了抗体交联步骤，抗体将在洗脱步骤与抗原一起洗脱下来。

2. DSS 交联剂对湿度非常敏感，请将未使用的 DSS 用锡箔纸密封。使用前即刻将 DSS 溶于 DMSO 或 DMF。DSS 与含有氨基的缓冲液不兼容（如 Tris，甘氨酸）。

- ①用移液器枪头刺穿锡箔纸包裹的单管 DSS，加入 217 μL DMSO 或 DMF 制成 10X 溶液（25 mM）。用移液器将溶液完全混匀（如上下吹打该溶液），直到 DSS 溶解。
- ②按 1:100 的比例用 DMSO 或 DMF 稀释 DSS 溶液（10 μL 10X DSS 加入 990 μL 溶剂）至 DSS 的浓度为 0.25 mM。
- ③将 2.5 μL 20X Coupling Buffer、4 μL 0.25 mM DSS 和 43.5 μL 超纯水与磁珠孵育。溶液总体积为 50 μL 。DSS 以至少磁珠上 Protein A/G 的 10 倍摩尔数加入到磁珠中，其工作浓度为 20 μM 。
- ④将交联反应体系在室温条件下，于旋转器或混匀器上孵育 30 分钟。孵育期间，每 10-15 分钟轻柔涡旋磁珠以确保其保持悬浮状态。
- ⑤用磁力架收集磁珠。收集上清液，以备用于抗体交联验证。
- ⑥向磁珠中加入 100 μL Elution Buffer，轻柔混匀后置于旋转器上室温孵育 5 分钟，以去除未交联的抗体并淬灭交联反应。用磁力架收集磁珠后弃去上清。
- ⑦向磁珠中加 100 μL Elution Buffer，轻柔涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠后弃去上清。重复此步骤一次。
- ⑧向磁珠中加入 200 μL 预冷的 IP 裂解 / 洗涤缓冲液，轻柔涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠后弃去上清。重复此步骤一次。
- ⑨随后可继续进行免疫沉淀实验流程。如需暂停实验，可将已偶联抗体的磁珠置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4. 抗原免疫沉淀

- ①用 IP Lysis/Wash Buffer 将裂解液稀释至 500 μL 。
- ②取 500 μL 稀释后的裂解液，加入装有抗体交联磁珠的离心管中在旋转仪或混匀器上于室温孵育 1 小时。孵育期间，每 10-15 分钟轻柔涡旋磁珠一次以确保其保持悬浮状态。
- ③用磁力架收集磁珠，移除未结合的样品并保留以备分析。
- ④向管中加入 500 μL IP Lysis/Wash Buffer 并轻柔混匀。收集磁珠，弃上清。重复此步骤一次。
- ⑤向管中加入 500 μL 超纯水并轻柔混匀。用磁力架收集磁珠，弃上清。
- ⑥向管中加入 100 μL Elution Buffer，在旋转仪或混匀器上于室温孵育 5 分钟。用磁力架分离磁珠，并保留含有目标抗原的上清液。为中和低 pH 值，洗脱后每 100 μL 洗脱液需加入 10 μL Neutralization Buffer。为获得最佳抗原回收率，此洗脱步骤可重复一次。

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。

