

# 交联磁性法IP/Co-IP试剂盒(动物)

## Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit for Mammal

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
		IPP007 (6T)	IPP007M (12T)	IPP007L (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

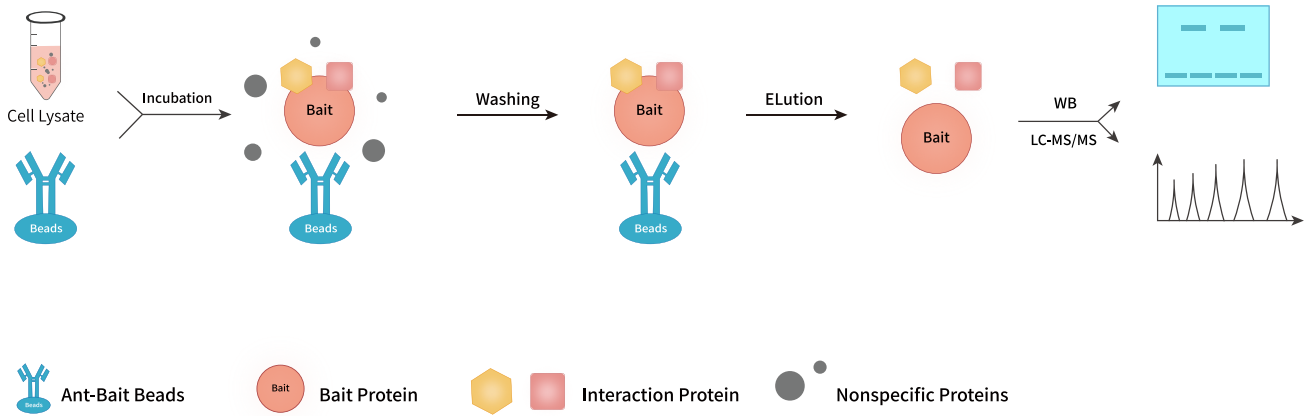
注意: 需自备 PBS、磁力架等试剂耗材。

### 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. 哺乳动物细胞裂解

#### (1) 单层培养（贴壁）细胞的裂解

- ①小心去除贴壁细胞的培养基。用 PBS 洗细胞一次。
- ②根据表 1 的推荐体积向细胞中加入冰浴预冷的 IP Lysis/Wash Buffer。
- ③冰上孵育 5 分钟，期间混匀几次。

表 1. 针对各种标准培养皿的 IP Lysis/Wash Buffer 的推荐使用体积

培养皿大小/表面积	IP Lysis/Wash Buffer体积
100X100毫米	500-1000μL
100X60毫米	250-500μL
6孔板	每孔200-400μL
24孔板	每孔100-200μL

- 4) 将裂解液转移至一个新的离心管中，约 13000 g 离心 10 分钟，沉降细胞碎片。
- 5) 将上清转移到一个新管中，进行蛋白浓度测定及后续实验。

#### (2) 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 500μL 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。

**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°C 保存。**

## 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  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 20XCoupling 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  $\mu\text{L}$  抗体溶液时，取 5  $\mu\text{L}$  20X Coupling Buffer 和 5  $\mu\text{L}$  IP Lysis/Wash Buffer 稀释抗体原液，最后用超纯水补足至 100  $\mu\text{L}$  终体积。

⑤向磁珠中加入 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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。

加入 300  $\mu\text{L}$  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. 交联结合的抗体

**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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  10X DSS 加入 990  $\mu\text{L}$  溶剂）至 DSS 的浓度为 0.25 mM。

③将 2.5  $\mu\text{L}$  20X Coupling Buffer、4  $\mu\text{L}$  0.25 mM DSS 和 43.5  $\mu\text{L}$  超纯水与磁珠孵育。溶液总体积为 50  $\mu\text{L}$ 。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  $\mu\text{M}$ 。

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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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°C 保存。

#### 4. 抗原免疫沉淀

- ①用 IP Lysis/Wash Buffer 将裂解液稀释至 500  $\mu\text{L}$ 。
- ②取 500  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  洗脱液需加入 10  $\mu\text{L}$  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。

