

直接磁性法IP/Co-IP试剂盒(植物)

Direct 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 |
|----|------------------------------|----------------|------------------|------------------|-------|
| | | IPP006 (6T) | IPP006M (12T) | IPP006L (40T) | |
| 01 | NHS-Activated Magnetic Beads | 0.15mL | 0.30mL | 1mL | 4°C |
| 02 | IP Lysis/Wash Buffer | 15.00mL | 30.00mL | 100mL | 4°C |
| 03 | Elution Buffer | 3.75mL | 7.50mL | 25 mL | 4°C避光 |
| 04 | Neutralization Buffer | 80μL | 0.15mL | 0.5 mL | 4°C |
| 05 | Quenching Buffer | 3.75mL | 7.50mL | 25 mL | 4°C |
| 06 | Borate Buffer | 0.15mL | 0.30mL | 1 mL | 4°C |
| 07 | Lane Marker Sample Buffer | 0.75mL | 1.50mL | 5 mL | 4°C |

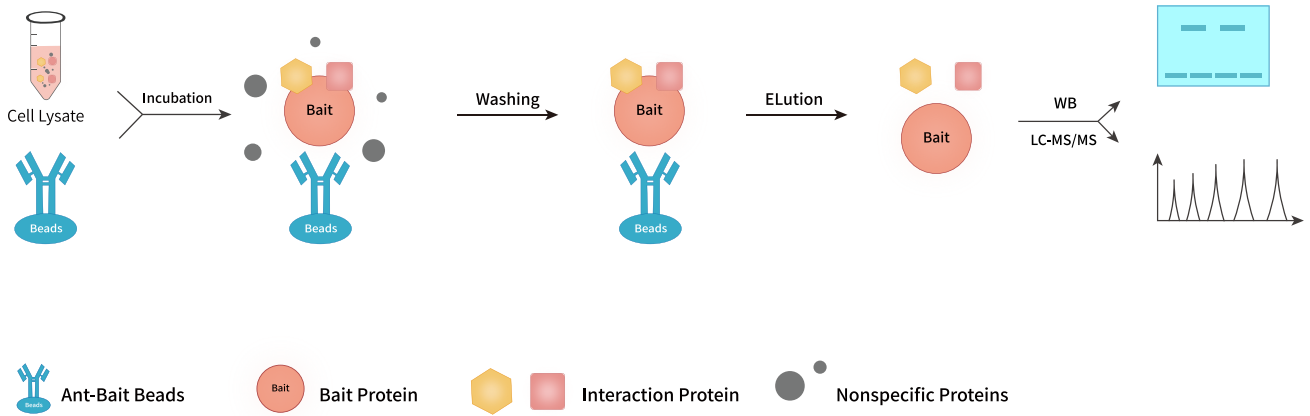
注意: 需自备 PBS、磁力架等试剂耗材。

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。

2. 将抗体偶联于 NHS-Activated Magnetic Beads

注意：以下操作方案是针对 25 μ L 磁珠偶联 5 μ g 抗体进行优化的，但同样适用于 2-10 μ g 抗体的偶联。当制备大量抗体偶联磁珠时，此方案可按比例放大。

- ①涡旋振荡 NHS-Activated Magnetic Beads 瓶使其成为均匀悬浮液。取 25 μ 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。
 - ②向离心管中加入 400 μ L 冰上预冷的 1 mM HCl，轻微涡旋混匀 5 秒钟。用磁力架收集磁珠后弃去上清。
 - ③制备抗体稀释液：向抗体储存液中加入 10 μ L Borate Buffer (0.67 M)，并加入超纯水至终体积 100 μ L。抗体的终浓度为 5 μ g/100 μ L，Borate Buffer 的终浓度为 0.067 M。
- 注意：若 IP 反应中抗体用量不足 5 μ g，需调整抗体稀释缓冲液的用量。
- ④向磁珠中加入 100 μ L 制备好的抗体稀释液，轻柔混匀后置于旋转器上室温孵育 30-60 分钟。
 - ⑤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。用磁力架收集磁珠，除去上清，保存以备分析。
 - ⑥向磁珠中加入 100 μ L Elution Buffer，轻微涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠后弃去上清。重复此步骤一次。
- 注意：Elution Buffer 去除非共价结合的抗体。
- ⑦向磁珠中加入 500 μ L Quenching Buffer。轻柔混匀后置于旋转器上室温孵育 30-60 分钟。

⑧用磁力架收集磁珠后弃去上清。为每个 IP 反应制备 0.5 mL 的改良硼酸盐缓冲液，将 25 μ L IP Lysis/Wash Buffer 稀释于 475 μ L 硼酸盐缓冲液 (由硼酸盐缓冲液溶于 500 mL 超纯水制成)。

⑨向离心管中加入 500 μ L 步骤 8 中制备的改良硼酸盐缓冲液，轻微涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠，去除上清。

⑩向磁珠中加入 500 μ L IP Lysis/Wash Buffer，轻微涡旋或颠倒混匀。用磁力架收集磁珠后弃去上清。

3. 抗原免疫沉淀

①用 IP Lysis/Wash Buffer 将裂解液 (参阅哺乳动物细胞裂解操作流程) 稀释至 1-2 mg/mL。

②取 500 μ 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 2 小时。孵育期间，每 15-30 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 μ L IP Lysis/Wash Buffer，轻微涡旋或颠倒混匀。收集磁珠，弃上清。重复此步骤一次。

⑤向管中加入 500 μ 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 μ 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 μ L Elution Buffer 需加入 10 μ L Neutralization Buffer。

注意：如未获得预期的抗原产量，重复一次低 pH 洗脱有助于洗脱剩余的结合抗原。

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。

