

# 直接磁性法IP/Co-IP试剂盒(动物)

## Direct 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
		IPP005 (6T)	IPP005M (12T)	IPP005L (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

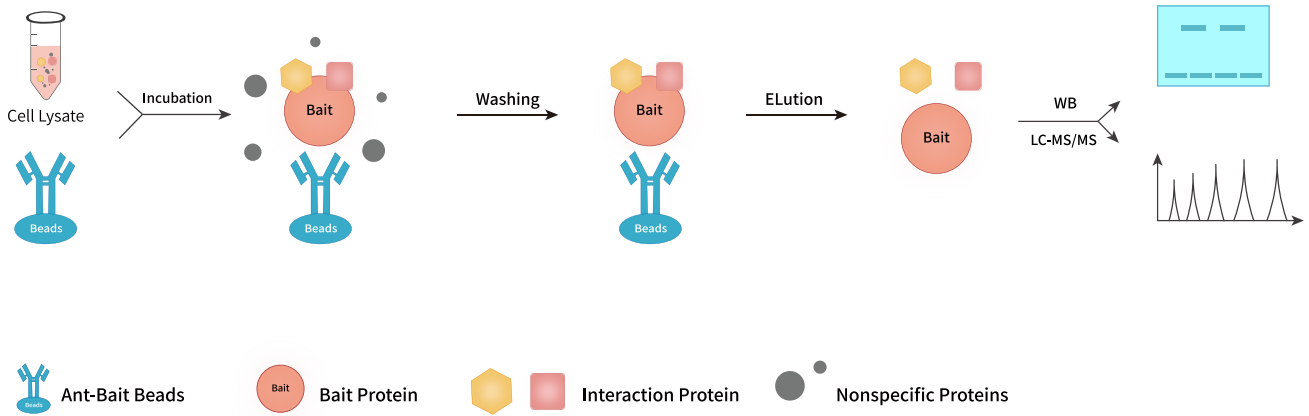
注意: 需自备 PBS、磁力架等试剂耗材。

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

**注：以下操作方案是针对 25  $\mu$ L 磁珠偶联 5  $\mu$ g 抗体进行优化的，但同样适用于 2-10  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L Borate Buffer (0.67 M)，并加入超纯水至终体积 100  $\mu$ L。抗体的终浓度为 5  $\mu$ g/100  $\mu$ 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  $\mu$ g，需调整抗体稀释缓冲液的用量。**

④向磁珠中加入 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L IP Lysis/Wash Buffer 稀释于 475  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L Elution Buffer 需加入 10  $\mu$ 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。

