

经典磁珠法IP/Co-IP试剂盒(植物)

Classic 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
		IPP004 (6T)	IPP004M (12T)	IPP004L (40T)	
01	ProteinA/G Magnetic Beads	0.15mL	0.30mL	1mL	4°C
02	IP Lysis/Wash Buffer	15.00mL	30.00mL	100mL	4°C
03	Lane Marker Sample Buffer,Non-reducing	0.75mL	1.50mL	5mL	4°C
04	Elution Buffer	0.75mL	1.50mL	5mL	4°C避光
05	Neutralization Buffer	80μL	0.16mL	0.5mL	4°C

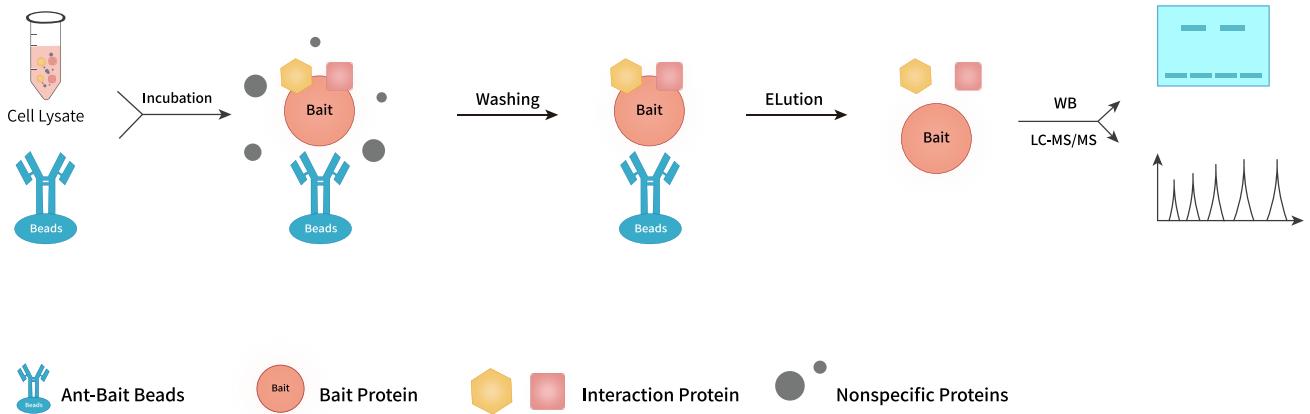
注意:需自备 PBS、6Xloading buffer、磁力架等试剂耗材。

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. 免疫复合物的制备

- ①在离心管中，将每个样品的细胞裂解液与 2-10 μ g 免疫沉淀抗体结合。由 BCA 蛋白浓度定量试剂盒测定，每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500-1000 μ g。
 - ②用 IP Lysis/Wash Buffer 将抗体 / 裂解液稀释至 500 μ L。
 - ③在室温下孵育 1-2 小时，或 4 $^{\circ}$ C 过夜，以形成免疫复合物。
- 注意：**样品所需的量和孵育时间均依赖于每个特定的抗体 - 抗原体系，因而可能需要优化才能得到最大产量。以下实验方案针对 2-10 μ g 亲和纯化的抗体，根据需要可以按比例放大。

3. 免疫沉淀

- ①将 25 μ L 的 Protein A/G 磁珠加入 1.5mL 离心管中。
- ②向磁珠中加入 175 μ L IP Lysis/Wash Buffer，轻微涡旋混匀。
- ③将离心管放入磁力架中收集磁珠到离心管的一边。去除上清。
- ④向离心管中加入 1mL IP Lysis/Wash Buffer。颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1 分钟。用磁力架收集磁珠。去除上清。

- ⑤将免疫复合物（步骤 2）加入盛有磁珠的离心管中，室温孵育 1h，注意保持混匀状态。
- ⑥用磁力架收集磁珠，除去未结合的样品，保存以备分析。
- ⑦向离心管中加入 500 μ L IP Lysis/Wash Buffer，轻柔混匀。收集磁珠，弃上清。再重复洗两次。
- ⑧向管中加入 500 μ L 超纯水，轻柔混匀。用磁力架收集磁珠，弃上清。
- ⑨低 pH 洗脱：向离心管中加入 100 μ L Elution Buffer。在室温下孵育 10 min，孵育期间注意混匀。通过磁力架分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。为了中和 pH，每 100 μ L 洗脱产物中加入 10 μ L Neutralization Buffer。备选洗脱方法：向离心管中加入 100 μ L Lane Marker Sample Buffer, Non-reducing(用水稀释 5 倍)，96-100 $^{\circ}$ C沸水浴 10 分钟。通过磁力架分离磁珠，保留含有目的抗原的上清。

注意：

1. 为保证磁珠均匀分布，通过反复颠倒、轻微涡旋或用旋转仪彻底混匀瓶中磁珠。
2. 如果后续蛋白免疫印迹中使用兔抗（一抗或二抗），切勿直接加热磁珠 - 抗原抗体复合物。在室温下孵育 10 min，并注意保持混匀。
3. 如果需要在还原条件下洗脱，向 1 X Lane Marker Sample Buffer, Non-reducing 中加入 DTT(终浓度 50 mM)。

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。

