

Animal Magnetic Co-Immunoprecipitation Kit

货号：NR3151C

目 录

1. 产品介绍	1
2. 试剂盒操作流程图	2
3. 试剂盒操作步骤	3
4. 产品注意事项	4
5. 常见问题	5

1. 产品介绍

本试剂盒专为高效完成免疫共沉淀（Co-IP）实验而设计。试剂盒采用 Protein A/G 磁珠，可快速、便捷地分离纯化目标蛋白及其相互作用的免疫复合物，且广泛兼容，Protein A/G 组合相较于单一的 Protein A 或 Protein G，具有更广泛的抗体结合谱，可兼容更多种类的免疫球蛋白（IgG）。另外提供两种洗脱方案：低 pH 缓冲液洗脱的温和洗脱方式和使用电泳上样缓冲液煮沸变性洗脱，便于直接进行后续分析。洗脱样品可直接用于 Western blot 检测或质谱（MS）分析。本产品应用范围广，可适用于细胞、细胞分泌上清、动物组织样本的免疫共沉淀实验。试剂盒组成成分如下：

表 1. Animal Magnetic Co-Immunoprecipitation Kit 组分

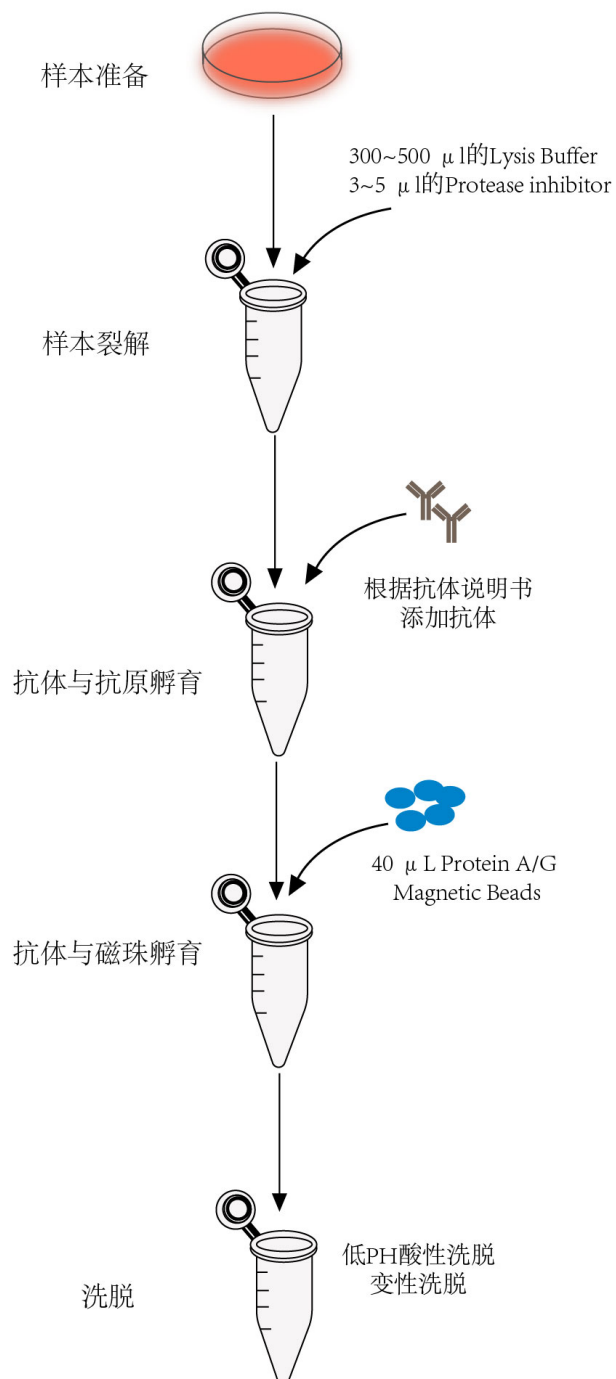
名称	20 Tests 规格	40 Tests 规格	储存条件
Protein A/G Magnetic Beads	850 μ L	1.7 mL	4°C, 1 年
Lysis Buffer	11 mL	22 mL	4°C, 1 年
Wash Buffer	40 mL	80 mL	4°C, 1 年
Elution Buffer	1.1 mL	2.2 mL	4°C, 1 年
Protease inhibitor	300 μ L	600 μ L	-20°C, 1 年

请注意，本试剂盒不包含所有必需试剂/耗材，请参照清单另行准备：

自备试剂：① 诱饵蛋白的 IP 级别抗体；② Normal IgG；③ PBS 缓冲液；④ 上样缓冲液

自备仪器：① 超声仪；② 低温离心机；③ 混匀仪；④ 磁力架

2. 试剂盒操作流程图



3. 试剂盒操作步骤

* 注意：以下样本收集量均为 1 组的建议用量，设计多组实验，样本量请按照实际使用量配置。如设计实验组和对照组，则需收集建议量的 2 倍，以此类推。

3.1 样本准备

(1) 贴壁细胞样本

每组需准备 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个细胞，吸净培养容器中的培养基，并加入 PBS 后用细胞铲将细胞刮入离心管中（或加入适量 PBS 清洗 1 次细胞后用胰酶消化细胞，加入血清终止反应后收集于离心管中），离心去掉上清，再加入 PBS 清洗细胞 2 次，离心后去除上清收集沉淀样本。

(2) 悬浮细胞样本

每组需准备 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个细胞，将细胞悬液转移至样品管中，离心弃掉上清。去除上清后用 PBS 清洗细胞 2-3 次，离心后去除上清收集沉淀样本。

(3) 动物组织样本

每组需准备 100~200 mg 组织，离体 15 分钟内，立即将其用消毒过的刀具切成黄豆大小（直径约 0.5cm）的小块，用 PBS 或生理盐水洗净血液、体液等影响实验结果的残留成分，于液氮中进行充分研磨，转移粉末至新的离心管中。

3.2 样本裂解

(1) 取出 300~500 μ L 预冷的 Lysis buffer，按照 100: 1 的比例加入 3~5 μ L Protease inhibitor，吹打混匀后加入样本中，根据样本类型进行以下操作：

- a. 动物细胞：置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀），为了更充分裂解，也可以冰上超声至溶液基本澄清。
- b. 动物组织：最好冰上超声破碎至溶液基本澄清，也可以置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀）。

(2) 于 4 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中，-80 $^{\circ}$ C 保存。

(3) 收集得到的样本可取 30 μ L 作为 input，进行 Western blot 蛋白免疫印迹检测，以此来确定细胞裂解物中目标蛋白的表达情况，剩余裂解液用于 IP 实验，置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

* 注意：

- (1) 当样本溶液很浑浊不能完全裂解时，可以适当增加裂解缓冲液的用量继续裂解。
- (2) 通常情况下，样本蛋白浓度通常不低于 5 μ g/ μ L，总量约 2~3 mg。
- (3) 300 μ L 为裂解缓冲液的最小使用体积，当样本增加时，裂解液缓冲液可等比例增加，但总孵育体积最大不超过离

心管体积的 2/3。超声条件因样本类型和超声设备而异，可提前摸索好合适的条件。

3.3 漂洗液准备

取出 10 mL 离心管，加入 2 mL Wash Buffer，按照 200: 1 的比例加入 10 μ L Protease inhibitor，混合均匀，冰上保存，现配现用。

3.4 磁珠漂洗

(1) 每组实验取 40 μ L 的 Protein A/G Magnetic Beads，加入**步骤 3.3** 的 200 μ L Wash Buffer，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 使磁珠全部吸附于磁力架，弃上清。

(2) 再次加入**步骤 3.3** 的 200 μ L Wash Buffer，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 使磁珠全部吸附于磁力架，弃上清。

3.5 免疫共沉淀

(1) 向**步骤 3.2** 的样本裂解液中加入适量抗体或 Normal IgG（按照抗体说明书添加，通常为 2-5 μ g），混匀仪上室温孵育 1~2 h。

(2) 向**步骤 3.3** 磁珠中加入**步骤 (1)** 的样本裂解液-抗体混合物，放混匀仪上室温孵育 1 h 或 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h

(3) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(4) 加入**步骤 3.3** 的 500 μ L Wash Buffer，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；

(5) 重复该漂洗操作两次。

3.6 洗脱

方式一：低 PH 酸性洗脱

加入 50 μ L Elution Buffer，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10 min，涡旋震荡 20 s；放磁力架上静置 1 min 待磁珠被全部吸附后，收集上清，-20 $^{\circ}$ C 保存待用。可用于 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验。

方式二：变性洗脱

如果酸性洗脱效率低，可保留磁珠直接加入 20 μ L 2 $\times$ 上样缓冲液，煮沸 5 min，放磁力架上静置 1 min，收集上清，-20 $^{\circ}$ C 保存待用。可用于 WB 检测或 SDS-PAGE，SDS-PAGE 切胶条后可进行质谱实验。

* 注意：Co-IP 捕获的蛋白量通常较少，因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色而非考马斯亮蓝染色。

4. 产品注意事项

-
- 在进行实验设计时，建议加入对照组，方便后续实验结果分析；
 - 请勿使磁珠干燥、冷冻或剧烈涡旋，会导致磁珠聚集而降低结合能力。
 - 经煮沸后会导致磁珠聚集并且失去抗体结合能力，经煮沸的磁珠不应再次使用。
 - 为保证最佳的实验结果，请选择特异性较强的抗体进行免疫沉淀反应。
 - 本试剂盒采用的两种洗脱方案均会获取到抗体与抗原，低 pH 酸性洗脱样本中抗体为完整结构，变性洗脱后产物中的抗体会解离轻链、重链，请根据后续实验需求选择洗脱方案。且在 western-blot 检测，通常会存在抗体的轻链（25 kDa）和重链（50 kDa），此为正常现象。
 - 裂解缓冲液可兼容 BCA 蛋白定量。

5. 常见问题

Q: 获得的诱饵蛋白量少，怎么解决？

- (1) 抗体无法结合诱饵蛋白，更换抗体，可以选择另一种识别不同抗原表位的抗体。
- (2) 样品中的诱饵蛋白含量低，提高样本用量。
- (3) 蛋白被降解，建议针对温度敏感的抗原，尽量在 4℃ 或冰浴条件下进行实验操作

Q: 获得的复合产物少的原因有哪些？怎么解决？

- (1) 样本量较少，可通过提高样本用量或增加样本量与抗体磁珠的比例来解决；
- (2) 孵育时间较短，可延长孵育时间，但需要注意孵育时间过长也可能会导致非特异性结合增多；
- (3) 蛋白质降解，裂解液中应加入足量的蛋白酶抑制剂；
- (4) 洗脱条件过于温和，建议延长洗脱液孵育时间至 15 min 或直接采用 SDS- PAGE 上样缓冲液洗脱。

Q: 诱饵蛋白条带大小与抗体非特异性条带重叠了，怎么解决？

诱饵蛋白的分子量大约是 50kDa 或 25Kd, Western blot 选择特异性抗重链或轻链的二抗，或 Western blot 选择与 RIP 实验不同种属的抗体。