

## 说明书

## Protein A/G 免疫共沉淀试剂盒

货号	描述
<b>FI8707-24T</b>	Protein A/G 免疫共沉淀试剂盒，包含足够完成 24 个反应的试剂，每个反应用 40 $\mu$ L 磁珠。由于每次 IP 需要设置实验组和对照组，因此本试剂盒可以完成 12 次 IP 实验。

## 试剂盒组分

编号	名称	体积 (24 Tests)	储存条件
①	Protein A/G 磁珠	1 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
②	裂解缓冲液	14 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
③	漂洗液	50 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
④	洗脱缓冲液	1.2 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	400 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑥	10 mL 离心管	——	——

## 目录

I 产品简介 .....	1
II 重要产品信息 .....	2
III 额外所需的主要试剂和仪器 .....	2
IV 操作流程.....	2
V 问题解决.....	4
VI 使用案例.....	4

## I 产品简介

免疫共沉淀 (Co-IP) 是研究体内条件下蛋白与蛋白相互作用的技术。样本裂解后，加入诱饵蛋白的 IP 级别抗体；抗体与诱饵蛋白结合形成免疫复合物，再加入 protein A/G 磁珠捕获“抗体-诱饵蛋白-结合蛋白”复合体；去除未结合的物质后，洗脱诱饵蛋白及其结合蛋白。蛋白产物可以用于 western-blot 检测或质谱分析。

## II 重要产品信息

- 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋磁珠，这些操作会导致磁珠聚集而降低结合能力。
- 由于煮沸会导致磁珠聚集并且失去结合能力，经煮沸的磁珠不应再次使用。
- 本试剂盒采用抗体与抗原双洗脱的方式，因此在蛋白 western-blot 检测结果中，至少存在 3 个条带：抗体的重链（50 kDa），抗体的轻链（25 kDa）和目标蛋白。
- 裂解缓冲液可兼容 BCA 蛋白定量。

## III 额外所需的主要试剂和仪器

- **自备试剂：** 诱饵蛋白的 IP 级别抗体、Normal IgG、PBS。
- **所需仪器：** 磁力架、混匀仪、低温离心机、超声仪（动物组织、植物和微生物样本裂解需要）。

## IV 操作流程

### \*注意：

- 为保证磁珠均匀分布，请通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
- 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。

### 4.1 样本裂解

(1) 按如下方法收集和处理样本：

样本类型	样本量/组	收集方法
动物细胞	1×10 <sup>7</sup> ~ 2×10 <sup>7</sup> 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4 °C 500 g 离心 5 min 收集沉淀
动物组织	100~200 mg	冷 PBS 或生理盐水清洗干净，彻底去除血液等成分，液氮充分研磨
植物组织	200~300 mg	无菌双蒸水清洗干净，液氮充分研磨
微生物	50 μL 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4 °C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀

(2) 样本加入 300~500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 1:100 添加），吹打混匀。

(3) 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）。

c. 植物、微生物：冰上超声破碎至溶液基本澄清。

(4) 4 °C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；取 30 μL 作为 input，剩余用于 IP 实验，-80 °C 保存。

**\* 注意：** 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以适当增加裂解缓冲液的用量继续裂解。根据经验，样本蛋白浓度通常不低于 5 μg/μL，总量约 2~3 mg。如果样本中目标蛋白丰度较低，或两者之间结合较弱，也可以增加初始样本量。300 μL 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。

## 4.2 漂洗液准备

取出⑥10 mL 离心管（空管），加入本次实验 2 组样本（实验组+对照组）所需的 4 mL ③漂洗液、20  $\mu$ L ⑤蛋白酶抑制剂（按 1:200 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。

\* **注意：**如果有多组样本，按照实际使用量配置。

## 4.3 免疫共沉淀

- (1) 向样本裂解液（4.1 制备）中加入适量抗体（按照抗体说明书添加），混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4  $^{\circ}$ C 过夜。
- (2) 每组实验取 40  $\mu$ L ①磁珠，加入 200  $\mu$ L 漂洗液（4.2 配置），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (3) 再次加入 200  $\mu$ L 漂洗液（4.2 配置），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (4) 向上步磁珠中加入步骤（1）的样本/抗体混合物，放混匀仪上室温孵育 1 h 或 4  $^{\circ}$ C 孵育 2 h，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (5) 加入 500  $\mu$ L 漂洗液（4.2 配置），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；重复该漂洗操作两次。
- (6) a. 酸性洗脱：加入 50  $\mu$ L ④洗脱缓冲液，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，收集上清（即调取产物），用于 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验；  
b. SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱：如果酸性洗脱效率低，可保留磁珠直接加入 20  $\mu$ L 2 $\times$ 上样缓冲液（125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 0.004%溴酚蓝）煮沸 3 min，放磁力架上静置 1 min，收集上清（即调取产物），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。硝酸银染色步骤参考如下：

- (1) 固定：30 min（乙醇：乙酸：水=4：1：5 体积比）；
- (2) 敏化：30 min（乙酸钠 10.2 g，硫代硫酸钠 0.471 g，乙醇 45 mL，加水至 150 mL）；
- (3) 水洗：4 次，每次 10 min；
- (4) 银染：30 min（硝酸银 0.375 g，加水至 150 mL）；
- (5) 水洗：2 次，每次 40 s；
- (6) 显色：显影至条带清楚（碳酸钠 4.5 g，72  $\mu$ L 甲醛，加水至 180 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na<sub>2</sub>EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

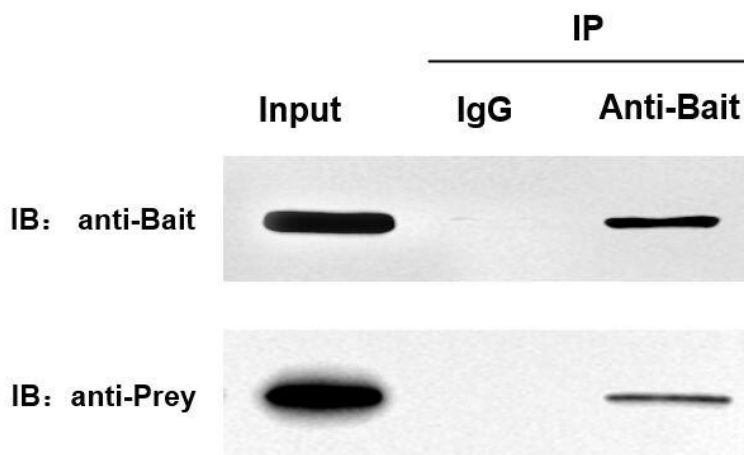
## V 问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的诱饵蛋白量低	抗体无法结合抗原	更换抗体，可以选择另一种识别不同抗原表位的抗体
	样品中的诱饵蛋白量不够	提高样本用量
洗脱下的抗体条带掩盖了目标抗原	抗原的分子量大约是 50kDa 或 25kD	Western blot 选择特异性抗重链或轻链的二抗
		Western blot 选择与 IP 实验不同种属的抗体
获得的复合产物少	样本量不够	提高样本用量
	蛋白质降解	裂解液中应加入足量的蛋白酶抑制剂
	孵育时间不够	延长孵育时间（如 4℃ 孵育过夜）
	洗脱条件过于温和	延长洗脱液孵育时间至 15 min
		洗脱液孵育后再煮 5-10 min
直接采用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱		
多条非特异条带	非特异性的蛋白结合在树脂上	增加漂洗时间和次数
		在裂解缓冲液和洗脱缓冲液中加入 50-350 mM NaCl

## VI 使用案例

实验目标：检测样本中的诱饵蛋白与猎物蛋白之间是否有相互作用。

- (1) Input: 样本裂解液；
- (2) IgG: normal IgG 的 IP 产物（对照组）；
- (3) Anti-Bait: 诱饵蛋白抗体的 IP 产物（实验组）。



诱饵蛋白和猎物蛋白的 western-blot 检测图