

## 说明书

## Protein A/G 免疫共沉淀试剂盒（动物）

## 产品信息

货号	产品名称	规格
FI8802-20T	Protein A/G 免疫共沉淀试剂盒（动物）	20 次
FI8802-40T	Protein A/G 免疫共沉淀试剂盒（动物）	40 次

## 产品描述

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。本试剂盒采用 Protein A/G 来结合抗体，因此最终洗脱液中也会含有抗体的重链（50 kDa）和轻链（25 kDa）。

## 试剂盒组分

编号	名称	20T 规格	40T 规格	储存条件
①	Protein A/G 磁珠	850 $\mu$ L	1.7 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
②	裂解缓冲液	11 mL	22 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
③	漂洗液	40 mL	80 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
④	洗脱缓冲液	1.1 mL	2.2 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	300 $\mu$ L	600 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑥	10 mL 离心管	1 个	1 个	—

**\*注意：**该试剂盒包含足够完成 20 或 40 个反应的试剂，每个反应使用 40  $\mu$ L 磁珠。由于每次 IP 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组，因此一次 IP 至少需要使用 2 个反应的试剂量。

## 额外所需材料

1. 自备试剂：诱饵蛋白的 IP 级别抗体、Normal IgG、PBS。
2. 所需仪器：磁力架（辉骏产品货号 FI7101）、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

## 使用说明

### I 注意事项

1. 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋磁珠，禁止长时间置于磁场，这些操作可能会引起磁珠聚团，降低结合活性。
2. 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。
3. 实验的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. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### II 操作步骤

#### 1. 总蛋白提取

##### 1.1 动物细胞

- (1) 实验组和对照组分别取  $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$  个细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞 2~3 次，每次 4°C 500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，彻底去除培养基成分；
- (2) 每组加入 300~500  $\mu\text{L}$  预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu\text{L}$  ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀；
- (3) 为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清，若无超声条件，也可以置于冰上裂解 30 min，间隔手动混匀；
- (4) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；
- (5) 取 30  $\mu\text{L}$  作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，-80°C 保存。

##### 1.2 动物组织

- (1) 采用预冷的 PBS 清洗新鲜组织 2~3 次，彻底去除血液等成分；如果样本为冷冻组织，在取样时也需要进行清洗操作；
- (2) 实验组和对照组分别取 0.1~0.2 g 干净的组织，置于研钵中，用液氮充分研磨，转移粉末至新的离心管中；
- (3) 每组加入 300~500  $\mu\text{L}$  预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu\text{L}$  ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀；
- (4) 冰上超声破碎至溶液基本澄清；
- (5) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；
- (6) 取 30  $\mu\text{L}$  作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，-80°C 保存。

#### \* 注意：

- i. 如果实验组和对照组所用样本一样，可以先一起裂解，取完 input 后再平分为两管。
- ii. 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以增加裂解缓冲液或改善超声条件继续裂解。超声条件因样本类型和超声设备而异，应提前摸索好合适的条件。根据经验，样本蛋白浓度通常不低于 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 2~3 mg。
- iii. 如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

## 2. 漂洗液准备

为了防止实验过程的蛋白降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出⑥10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL ③漂洗液、19  $\mu$ L ⑤蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

## 3. 免疫共沉淀

- (1) 向样本裂解液（步骤 1 制备）中加入相应组别的蛋白抗体（按照抗体说明书添加）或 Normal IgG，放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4  $^{\circ}$ C 过夜；
- (2) 将①Protein A/G 磁珠上下颠倒混匀，每组取 40  $\mu$ L 磁珠到新的离心管中；
- (3) 每组加入 200  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (4) 重复上步操作一次；
- (5) 向磁珠中加入步骤（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；
- (6) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (7) 每组加入 500  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (8) 重复上步操作两次，共漂洗三次；
- (9) a. 酸性洗脱：加入 50  $\mu$ L④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，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：

- i. 洗脱缓冲液可以兼容质谱，辉骏生物也可以提供蛋白的质谱检测服务。
- ii. 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）。

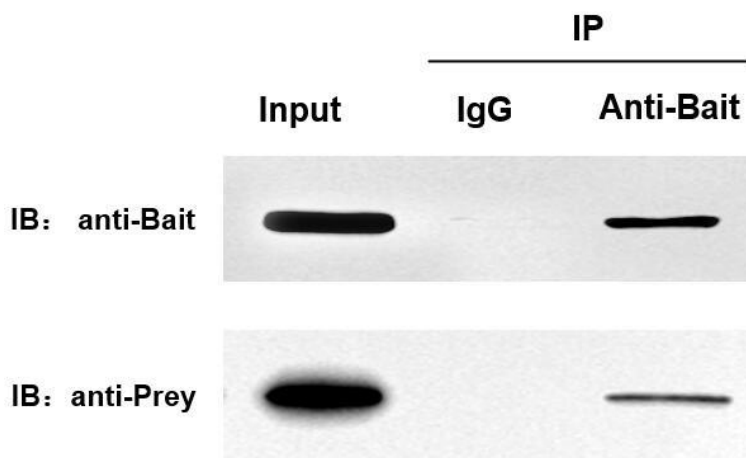
## 问题解决

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	提高样本用量或改善样本裂解条件
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 IP 专用二抗
		Western blot 选择与 IP 实验不同种属的抗体
获得的复合物少	样本量不够	提高样本用量或改善样本裂解条件
	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磁珠上	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

## 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