

Protein G 免疫共沉淀试剂盒（动物）**Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit, Protein G Agarose****产品信息**

货号	产品名称	规格
FI8803-20T	Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit, Protein G Agarose	20 次
FI8803-40T	Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit, Protein G Agarose	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 G 树脂捕获“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 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 G 树脂	500 μ L	1 mL	4℃，1 年
②	裂解缓冲液	11 mL	22 mL	4℃，1 年
③	漂洗液	40 mL	80 mL	4℃，1 年
④	洗脱缓冲液	1.1 mL	2.2 mL	-20℃，1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	300 μ L	600 μ L	-20℃，1 年
⑥	中和液	110 μ L	220 μ L	4℃，1 年
⑦	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 25 μ L 树脂。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：混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

I 注意事项

1. 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋树脂，这些操作会导致树脂聚集而降低结合能力。
2. 为保证树脂均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀树脂。
3. 在吸取树脂前，请将移液枪枪头尖部剪掉 1~2mm。
4. 吸取树脂后，剩余树脂请用封口膜封好再存放，防止保存液蒸发。
5. 树脂的离心步骤需在低速条件下操作，离心速度大于 $5000 \times g$ 可能会导致树脂聚集和再悬浮困难。
6. 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。
7. 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) 将样本管置于冰上，每组加入 300~500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%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，可置于冰上裂解 30 min，期间每 10 min 涡旋混匀一次，每次 5 s；
- (4) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；
- (5) 取 30 μL 作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，置于冰上备用或 -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，用液氮在研钵中充分研磨，转移粉末至预冷的新离心管中；
- (3) 将样本管置于冰上，每组加入 300~500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%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 μL 作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，置于冰上备用或 -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⑦10 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 μ 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 G 树脂上下颠倒混匀，每组取 25 μ L 树脂到新的离心管中；
- (3) 每组加入 200 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，500 g 离心 5 min，弃上清；
- (4) 重复上步操作一次；
- (5) 向树脂中加入步骤（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) 4 $^{\circ}$ C 500 g 离心 5 min，弃上清；
- (7) 每组加入 500 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，4 $^{\circ}$ C 500 g 离心 5 min，弃上清；
- (8) 重复上步操作两次，共漂洗三次，保留树脂。

4. 蛋白洗脱

本说明书提供以下两种蛋白洗脱方案，操作者可以根据后期检测的需要选择合适的洗脱方法。

- (1) 非变性洗脱法：向树脂中加入 50 μ L ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，4 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 5 min；收集上清至新的离心管中，加入 5 μ L ⑥中和液，-80 $^{\circ}$ C 保存。该洗脱产物保持原有的生物活性，适用于后期各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。
- (2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向树脂中加入 50 μ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液，95 $^{\circ}$ C 加热 5 min；12000 g 离心 30 s，收集上清至新的离心管中，-20 $^{\circ}$ C 保存。该洗脱产物适用于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测；如果需要进行质谱检测，则切胶条后送检。

*** 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. 如果选择非变性洗脱法，可以暂时保留洗脱后的树脂，当非变性洗脱效率较低时，则采用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法继续洗脱蛋白。

iii. Co-IP 捕获的蛋白量通常较少，因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色。染色步骤参考如下：

（为了便于称量，每步配置的溶液体积较大，实际操作时取适量溶液浸泡胶即可）

- (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 3.75 g, 60 μ L 甲醛, 加水至 150 mL) ;
- (7) 终止: 5 min (Na_2EDTA 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
获得的复合产物少	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; 或洗脱液孵育后再煮 5-10 min
		直接采用 SDS- PAGE 上样缓冲液洗脱
SDS-PAGE 检测有很多非特异条带	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

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) 。

