

| 货号 | 名称 | 规格 | 存储 |
|-----------|--------------------------|-----|------|
| F1612-12T | Protein A/G 免疫共沉淀试剂盒（植物） | 20T | -20℃ |
| F1612-24T | Protein A/G 免疫共沉淀试剂盒（植物） | 40T | -20℃ |

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。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）。

试剂盒成分

| 编号 | 名称 | 20T 规格 | 40T 规格 | 储存条件 |
|----|----------------|--------|--------|---------|
| ① | Protein A/G 磁珠 | 500 μL | 1mL | 4℃，1年 |
| ② | 裂解缓冲液 | 11mL | 22mL | 4℃，1年 |
| ③ | 漂洗液 | 40mL | 80mL | 4℃，1年 |
| ④ | 洗脱缓冲液 | 1.1mL | 2.2mL | 4℃，1年 |
| ⑤ | 蛋白酶抑制剂 | 300 μL | 600 μL | -20℃，1年 |
| ⑥ | 中和液 | 110 μL | 220 μL | 4℃，1年 |
| ⑦ | 10mL 离心管 | 1个 | 1个 | —— |

***注意：**该试剂盒包含足够完成 12、24 或 40 个反应的试剂，每个反应使用 40 μL 磁珠。由于每次 pull-down 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组，因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

额外所需材料

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，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
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 操作方法

1. 总蛋白提取

- (1) 实验组和对照组一共取 0.4~0.6 g 植物组织，用无菌双蒸水清洗干净，置于研钵中，用液氮充分研磨，再转移粉末至预冷的新离心管中。
- (2) 将样本管置于冰上，每组加入 500 μL 预冷的②裂解缓冲液、5 μL⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀。
- (3) 冰上超声破碎至溶液基本澄清。
- (4) 4℃ 12000g 离心 15min，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℃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。样本蛋白浓度通常不低于 $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 $2\sim 3 \text{ mg}$ 。

iii. 如果样本中目标蛋白或 RNA 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

为了防止实验过程中的蛋白降解，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、 $19 \mu\text{L}$ 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) 将①Protein A/G 磁珠上下颠倒混匀，每组取 $25 \mu\text{L}$ 磁珠到新的离心管中。
- (2) 每组加入 $200 \mu\text{L}$ 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。
- (3) 重复上步操作一次。
- (4) 向磁珠中加入相应组别的样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上室温孵育 1h 或 4°C 孵育 4h。
- (5) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (6) 每组加入 $500 \mu\text{L}$ 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。
- (7) 重复上步操作两次，共漂洗三次，保留磁珠。

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：向磁珠中加入 $50 \mu\text{L}$ ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20s，放混匀仪上室温洗脱 $10\sim 15 \text{ min}$ ；涡旋震荡 20s， $1000g$ 离心 20s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，加入 $5 \mu\text{L}$ ⑥中和液， -80°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）：向磁珠中加入 $50 \mu\text{L}$ $1\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液， 95°C 加热 5min；磁力架上静置 1min，收集上清至新的离心管中。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. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱。

ii. 如果选择非变性洗脱法，可以暂时保留洗脱后的磁珠，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 ， $60 \mu\text{L}$ 甲醛，加水至 150 mL ）；
- (7) 终止：5 min（ Na_2EDTA 2.19 g ，加水至 150 mL ）。

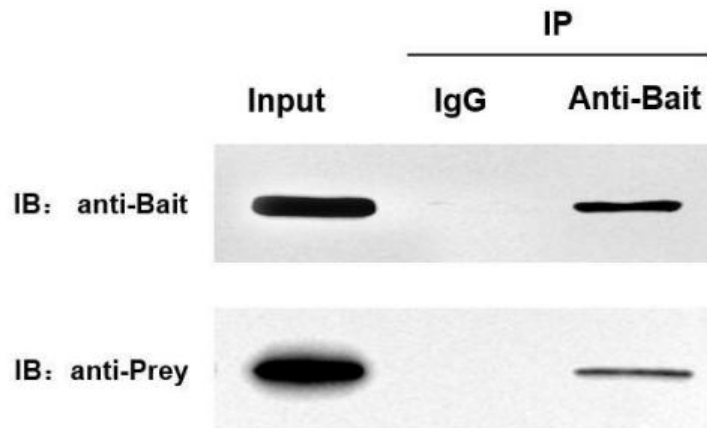
问题解决

| 问题 | 可能原因 | 解决方案 |
|------------------------|---------------|--|
| 获得的复合产物少 | 样本量不够 | 提高样本用量 |
| | 孵育时间不够 | 延长孵育时间（如孵育过夜），但需要注意孵育时间过长也可能导致非特异性结合增多 |
| | RNA 探针量不够 | 提高 RNA 探针用量 |
| SDS-PAGE 检测有很多非特异结合的条带 | 非特异性的蛋白结合在磁珠上 | 增加漂洗时间和次数，或样本预处理：先与磁珠孵育，去除非特异结合蛋白 |

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