

货号	名称	规格	存储
F1616-12T	HA-Tag Co-IP 试剂盒（植物）	12T	-20℃
F1616-24T	HA-Tag Co-IP 试剂盒（植物）	24T	-20℃

产品简介

本试剂盒采用Anti-HA磁珠来完成HA标签（YPYDVPDYA）融合蛋白的免疫共沉淀实验。Anti-HA磁珠偶联的是经过严格筛选、优化并重组表达的无轻、重链的HA抗体，所以IP洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

实验前先将HA标签与目标蛋白在植物样本中融合表达。裂解样本后，将Anti-HA磁珠加入样本中，磁珠上偶联的HA抗体与HA标签融合蛋白及其结合蛋白形成复合体，去除未结合的蛋白后，可以采用多种方法洗脱蛋白质。

试剂盒成分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	Anti-HA 磁珠	250 μ L	500 μ L	4℃，1 年
②	裂解缓冲液	7mL	14mL	4℃，1 年
③	漂洗液	25mL	50mL	4℃，1 年
④	洗脱缓冲液	650 μ L	1.3mL	-20℃，1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	190 μ L	380 μ L	-20℃，1 年
⑥	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 μ L 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

1. 自备试剂：HA 抗体（用于 Western-Blot 检测）、PBS
2. 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 μ L 预冷的②裂解缓冲液、5 μ L⑤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 μ L 作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，置于冰上备用或-80℃保存。

*** 注意：**i. 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 μ g/ μ L，总量约 2~3 mg。

ii. 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⑥10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL③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) 将①Anti-HA 磁珠上下颠倒混匀，每组取 20 μ L 磁珠到新的离心管中。
- (2) 每组加入 200 μ 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℃孵育 4h。
- (5) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (6) 每组加入 500 μ 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 μ L④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 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，-80℃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 μ L 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，95℃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 μ L 甲醛，加水至 150 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na₂EDTA 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。

- 表达 HA 空载体和猎物蛋白的样本采用 Anti-HA 磁珠进行 Co-IP；
- 对照组：表达 HA-诱饵蛋白和猎物蛋白的样本采用 Anti-HA 磁珠进行 Co-IP。

