

货号	名称	规格	存储
F1613-20T	Protein G 免疫共沉淀试剂盒（植物）	20T	-20℃
F1613-40T	Protein 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 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）。

试剂盒成分

编号	名称	20T 规格	40T 规格	储存条件
①	Protein G 树脂	500 μ L	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 μ L	600 μ L	-20℃，1 年
⑥	中和液	110 μ L	220 μ L	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 20 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：混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

使用说明

I 注意事项

- 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。
- 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。
- 在吸取树脂前，请将移液枪枪头尖端剪掉 1~2mm。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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

- 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。
- 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。
- 冰上超声破碎至溶液基本澄清。
- 4℃ 12000g 离心 15min，收集上清至新的离心管中。
- 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. 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 2~3 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 mL③漂洗液、19 μL 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 1~2h 或 4℃过夜；

(2) 将①Protein G 树脂上下颠倒混匀，每组取 25 μL 树脂到新的离心管中。

(3) 每组加入 200 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，500g 离心 5 min，弃上清。

(4) 重复上步操作一次。

(5) 向树脂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。

(6) 4℃ 500 g 离心 5 min，弃上清。

(7) 每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，4℃ 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 μL ④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，加入 5 μL ⑥中和液，-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）：向树脂中加入 50 μL 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 μL 甲醛，加水至 150 mL）；

(7) 终止：5 min（Na₂EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

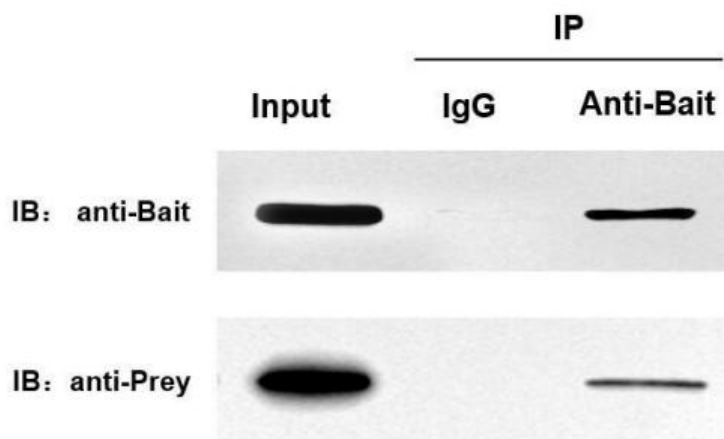
问题解决

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。

- (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