

Lot.20250925

Co-Immunoprecipitation(Co-IP) Kit

(适用于细胞和组织)

KT108-01 系列：无阴性对照体系

Cat.No. KT108-0101 (12 rxns)

Cat.No. KT108-0102 (24 rxns)

Cat.No. KT108-0103 (48 rxns)

KT108-02 系列：含阴性对照体系

Cat.No. KT108-0201 (12 rxns)

Cat.No. KT108-0202 (24 rxns)

Cat.No. KT108-0203 (48 rxns)

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.

产品简介:

Co-IP 技术 (Co-Immunoprecipitation Assay, 免疫共沉淀), 是一种用于研究蛋白质相互作用的实验技术, 基于抗原-抗体特异性结合的原理, 通过非共价键将存在相互作用的蛋白-蛋白结合在一起, 与 protein A/G 磁珠孵育后, 洗涤沉淀相互作用的蛋白进行后续的分析。本产品适用于大部分的动物细胞和组织的 Co-IP 实验。

试剂盒包装组分:

表 1 KT108-01 试剂盒包装组分信息

4℃保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCCo-1	Cell lysis buffer	13mL	26mL	52mL
SCCo-2	Lysis buffer	50mL	100mL	200mL
SCCo-3	proteinA/G 磁珠	360μL	720μL	1.44mL
-20℃保存试剂				
SCCo-4	蛋白酶抑制剂	420μL	840μL	1.68mL
SCCo-5	PMSF	150μL	300μL	600μL
SCCo-6	5×SDS loading buffer	135μL	270μL	540μL

表 2 KT108-02 阴性试剂盒包装组分信息

4℃保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCCo-1	Cell lysis buffer	13mL	26mL	52mL
SCCo-2	Lysis buffer	50mL	100mL	200mL
SCCo-3	proteinA/G 磁珠	360μL	720μL	1.44mL
-20℃保存试剂				
SCCo-4	蛋白酶抑制剂	420μL	840μL	1.68mL
SCCo-5	PMSF	150μL	300μL	600μL
SCCo-6	5×SDS loading buffer	135μL	270μL	540μL
SCCo-7	阴性抗体 IgG	15μL	30μL	60μL

注: 对照组与实验组消耗试剂量相同, 一次 Co-IP 实验含 Input 组、目的抗体组、阴性抗体组, 要消耗 2 rxns 试剂量。

实验前准备

细胞准备 (Time: 30min)

A 动物组织处理:

细胞量: 约 $1-2 \times 10^7$ 个

动物组织经过组织匀浆或液氮研磨后, 去除大颗粒组织后用 PBS 重悬细胞, 清洗 1-2 次, 3000rpm 离心 3min, 去除上清后-80℃保存或继续进行实验。

注: 尽量将上清液彻底吸干再保存。

B 悬浮细胞处理:

细胞量: 约 $1-2 \times 10^7$ 个

悬浮细胞培养好后连同培养液收集到离心管中, 3000rpm 离心收集细胞沉淀; 细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清, 重复清洗细胞 1-2 次, 去除上清后-80℃保存或继续进行实验。

注: 尽量将上清液彻底吸干再保存。

C 贴壁细胞处理:

细胞量: 约 $1-2 \times 10^7$ 个

贴壁细胞培养好后, 用胰酶消化或者细胞刮刮下转移到离心管中, 3000rpm 离心收集细胞沉淀; 细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清, 重复清洗细胞 1-2 次, 去除上清后-80℃保存或继续进行实验。

注: 尽量将上清液彻底吸干再保存。

需要的额外材料:

试剂:

目的抗体 (IP 级别)

PBS 溶液

BSA 溶液或粉末

仪器设备:

旋转仪

低温高速离心机

磁力架

Western blotting 试剂耗材

化学发光底物

电泳仪

银染试剂等

实验过程摘要:

如图 1 所示, 首先将细胞进行裂解, 然后将细胞裂解液与目的抗体孵育, 再将细胞裂解液-抗体与 Protein A/G 磁珠孵育, 形成蛋白-抗体-Protein A/G 磁珠复合物, 经适当条件洗涤使与抗体结合的蛋白与孵育液中的其他成分分离。最后通过洗脱将相互作用的蛋白-蛋白从磁珠上洗脱下来。产物可通过 WB 检测特定的蛋白, 或通过质谱检测分析。

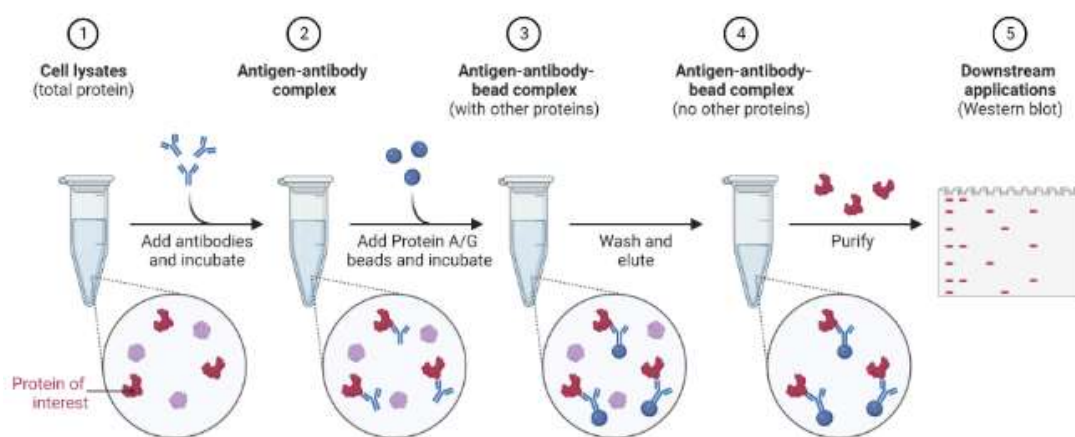


图 1 Co-IP 试剂盒实验过程示意图

Co-IP 实验步骤

A、裂解细胞 (Time: 1.5-2.5h)

细胞量: 约 $1-2 \times 10^7$ 个

1. 将细胞从 -80°C 中取出, 加入 1mL 预冷的 Cell lysis buffer (SCCo-1), 使用前每 mL 裂解液加入 $12\mu\text{L}$ PMSF (SCCo-5), $10\mu\text{L}$ 蛋白酶抑制剂 (SCCo-4), 吹打均匀后于 4°C 冰箱翻转裂解 1-2h。

注: 一次 IP 实验包括 input、目的抗体、阴性抗体 IgG 组, 只需要一份 1mL 细胞裂解液。

2. 4°C , 12000rpm 离心 15min, 将上清转移到一个新的 1.5mL EP 管中, 标识清楚。裂解液继续 IP 实验或者储存于 -80°C 冰箱。

3. (选做)将细胞裂解液上清加入 $50\mu\text{L}$ 的 protein A/G 磁珠 (SCCo-3), 4°C 旋转孵育 2h。
1000rpm 离心 1min, 将上清转移到一个新的 EP 管中, 磁珠丢弃。

注：50μL 的 protein A/G 磁珠（SCCo-3）需预先用 500μL Lysis buffer（SCCo-2）清洗 2 次，最后一次要将 Lysis buffer 去除。步骤 3 可以减少非特异性蛋白的结合，如果磁珠的非特异性背景高，可以选择增加此步骤。

B、免疫沉淀（Time: 过夜）

1. 将上清取出 50μL 作为 input，剩下的分为 2 份，分别加入 2μg 抗体（具体参考抗体说明书），室温旋转孵育 1-2h 或 4℃孵育过夜。（目的组，IgG 抗体组（SCCo-7））
2. 上下轻微颠倒重悬 protein A/G 磁珠（SCCo-3），分别取 30μL 的磁珠于新的 EP 管，加入 500μL Lysis buffer（SCCo-2）上下颠倒混匀清洗磁珠，将 EP 管置于磁力架上静置 2min，待溶液澄清后，吸除上清，重复该步骤一次，共洗 2 次。
3. 加入 500μL 含 1%-3%BSA 的 PBS 室温旋转封闭磁珠 0.5-1h，吸除上清，用预冷的 Lysis buffer（SCCo-2）清洗磁珠 1 次，吸除上清。
4. 分别将目的组和 IgG 组加进已封闭的磁珠中，室温旋转孵育 1-2h 或 4℃旋转孵育 4h 以上。

注：操作过程中不要剧烈吹打磁珠，控制孵育时间和清洗条件，磁珠不能冷冻或者干裂。

C、磁珠的洗涤（Time: 37min）

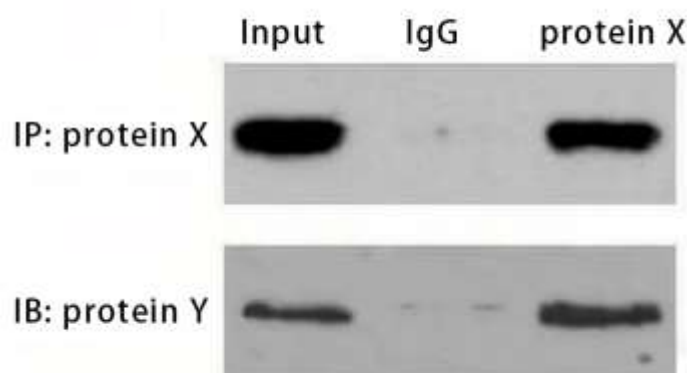
1. 将上一步含有复合物的 EP 管短暂离心后，置于磁力架上静置 2min，待溶液澄清后，吸除上清。
2. 加入 500μL 含有蛋白酶抑制剂（SCCo-4）的 Lysis buffer（SCCo-2）上下颠倒混匀磁珠，4℃旋转 5min，EP 管短暂离心后，置于磁力架上静置 2min，待溶液澄清后，吸除上清。重复该步骤 4 次，共洗磁珠 5 次。

注：操作过程中不要剧烈吹打磁珠，控制洗涤条件，磁珠不能冷冻或者干裂。

D、蛋白的洗脱（Time: 10min）

1. 在上一步的磁珠中，分别加入 40μL 的 Lysis buffer（SCCo-2）和 10μL 5×SDS loading buffer（SCCo-6），混匀，100℃煮沸 10min，上清即为洗脱的蛋白。蛋白产物可用于银染，质谱或 WB 检测。

结果展示:



结果说明：该结果表明蛋白X与蛋白Y之间存在相互作用

常见问题及解决方案:

问题	可能原因	解决方案
高背景	制备样品中可能有不完全溶解的大蛋白复合体	制备样品后进行短暂超声处理（3次，每次 5 秒钟），离心纯化，取上清进行后续实验。
	使用了太多的抗体	进行条件优化减少抗体。
	使用了过多的细胞或组织用于裂解	减少细胞或组织量，推荐使用 100-500 μ g 细胞裂解物。
	抗原降解	保证样品中加入了蛋白酶抑制剂，尽量使用新鲜制备的样品。
	抗体本身特异性不好	选择合适的 IP 级别抗体
无信号	目的蛋白在样本中表达量低或者不表达	首先对目的蛋白表达量进行检测，或者加大 IP 中加入的蛋白裂解物并进行预处理。
	目的蛋白未被洗脱	保证使用合适的洗脱液，保证洗脱液的强度和 PH 值合适。
	抗体选择不当或者失效	利用 WB 对抗体进行验证。
	样品被蛋白酶降解	添加蛋白酶抑制剂(protease inhibitor); 所有操作保持 4℃ 以下冰上操作并防止冻融。