

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 proteinA/G Agarose 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 Agarose	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 Agarose	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 proteinA/G Agarose 孵育，形成蛋白-抗体-proteinA/G Agarose 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 proteinA/G Agarose 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。

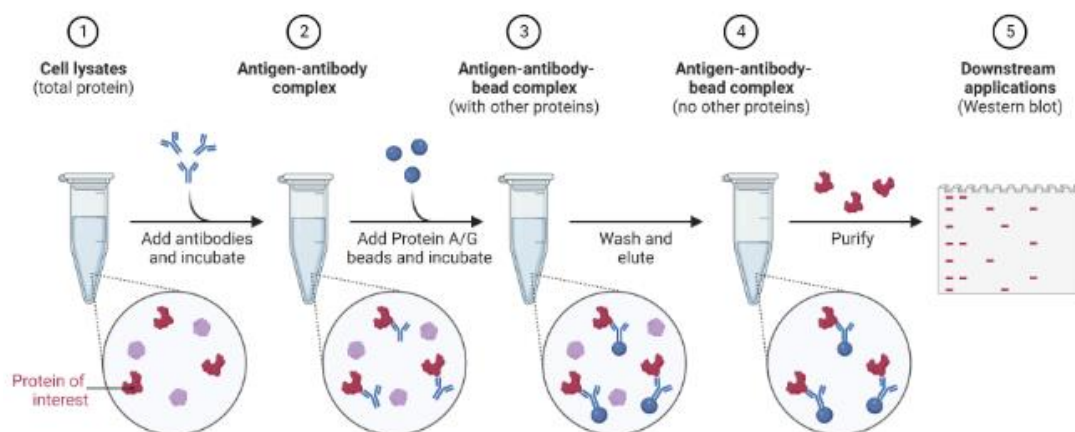


图 1 Co-IP 试剂盒实验过程示意图

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，标记清楚。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 μ L 的 proteinA/G Agarose (SCCo-3), 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 2h。1000rpm 离心 1min, 将上清转移到一个新的 EP 管中, proteinA/G Agarose 丢弃。

注: 50 μ L 的 proteinA/G Agarose (SCCo-3) 需预先用 500 μ L 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 proteinA/G Agarose 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 50 μ L 作为 input, 剩下的分为 2 份, 分别加入 2 μ g 抗体 (具体参考抗体说明书), 室温旋转孵育 1-2h 或 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。(目的组, IgG 抗体组 (SCCo-7))

2. 上下轻微颠倒重悬 proteinA/G Agarose (SCCo-3), 分别取 30 μ L 的 proteinA/G Agarose 于新的 EP 管, 加入 500 μ L Lysis buffer (SCCo-2) 上下颠倒混匀清洗 proteinA/G Agarose, 3000rpm 离心 1 min, 去上清, 重复该步骤一次, 共洗 2 次。

3. 加入 500 μ L 含 1%-3%BSA 的 PBS 室温旋转封闭 proteinA/G Agarose 0.5-1h, 3000rpm 离心 1 min, 去上清, 用预冷的 Lysis buffer (SCCo-2) 清洗 proteinA/G Agarose 1 次, 吸除上清。

4. 分别将目的组和 IgG 组加进已封闭的 proteinA/G Agarose 中, 室温旋转孵育 1-2h 或 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 4h 以上。

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

C、proteinA/G Agarose 的洗涤 (Time: 37min)

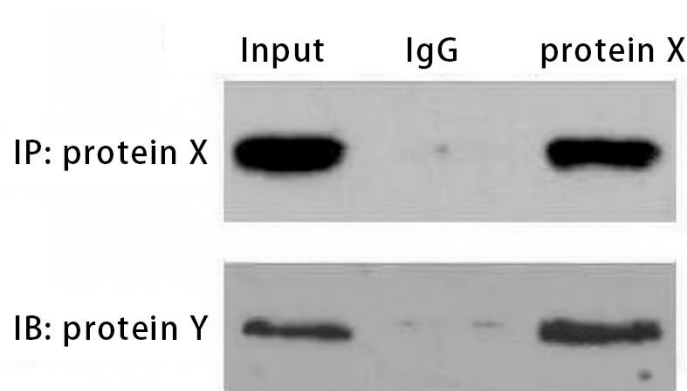
1. 将上一步含有复合物的 EP 管 3000rpm 离心 1 min, 去上清。加入 500 μ L 含有蛋白酶抑制剂 (SCCo-4) 的 Lysis buffer (SCCo-2) 上下颠倒混匀 proteinA/G Agarose, 4 $^{\circ}$ C 旋转 5min, EP 管 3000rpm 离心 1 min, 吸除上清。重复该步骤 4 次, 共洗 proteinA/G Agarose 5 次。

注: 操作过程中不要剧烈吹打 proteinA/G Agarose, 控制洗涤条件, proteinA/G Agarose 不能冷冻或者干裂。

D、蛋白的洗脱 (Time: 10min)

1. 在上一步的 proteinA/G Agarose 中, 分别加入 40 μ L 的 Lysis buffer (SCCo-2) 和 10 μ L 5 $\times$ SDS loading buffer (SCCo-6), 混匀, 100 $^{\circ}$ C 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 µg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。