

# 免疫共沉淀 (Co-IP) 试剂盒

20T WLA112a 50T WLA112b



仅用于科学研究,不能用于诊断

## 产品信息

### 产品名称

免疫共沉淀 (Co-IP) 试剂盒

### 产品概述

免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 是研究蛋白质间相互作用的一种常用方法,基本原理是以细胞内源性靶蛋白为诱饵,将靶蛋白抗体与细胞总蛋白进行共孵育,促进免疫复合物的形成;随后加入能够与抗体Fc段结合的 prorein A+G,形成“结合蛋白-靶蛋白-靶蛋白抗体-protein A+G小珠”复合物,纯化该复合物后凝胶电泳分离蛋白,应用Western blot或者质谱技术鉴定靶蛋白的结合蛋白。

### 包装信息

试剂名称	WLA112a (20T)	WLA112b (50T)	保存条件
裂解液	20ml	50ml	-20°C
Protein A+G	2.4ml	6ml	4°C
试剂 A	4ml	10ml	室温
试剂B	150μl	300μl	室温
蛋白标准品(5mg/ml BSA)	50μl	100μl	-20°C

### 保存日期

本试剂盒自订购之日起一年内有效。

### 注意事项

- 裂解细胞时,为防止蛋白降解,所有的操作尽量在冰上进行。
- 测定蛋白浓度时,样品中若含有EDTA、EGTA、DTT、硫酸铵和脂类会影响检测结果。
- 要确保抗体的特异性,即在不表达抗原的细胞溶解物中添加抗体后不会引起共沉淀,确保共沉淀的蛋白是由所加入的抗体沉淀得到的,而非外源非特异蛋白,单克隆抗体的使用有助于避免污染的发生。
- Protein A+G离心时,离心力不易过高,会损坏Protein A+G,离心力在3000-5000×g即可。

### 操作流程

- 除去细胞培养基,用预冷的PBS(需自备)洗涤细胞两次。
- 加入预冷的裂解液(见表1),冰育5min。

表1. 不同标准的细胞培养皿/板中裂解/洗涤缓冲液的建议添加量

培养皿/板的尺寸或表面积	裂解/洗涤缓冲液体积
100×100 mm	500-1000 μl
100×60 mm	250-500 μl
6-孔板	200-400 μl 每孔
24-孔板	100-200 μl 每孔

- 用预冷的细胞刮将细胞从培养皿或培养瓶上刮下,把悬液转到1.5ml EP管中,缓慢晃动10min。
- 4°C, 14000×g离心15min,将上清转移至新的离心管中。
- 准备Protein A+G,用1ml PBS清洗三次(3000×g离心1min)后保存备用,此步骤可提前准备。
- 每1ml总蛋白中加入60μl Protein A+G,以去除非特异性杂蛋白,降低背景。
- 4°C, 14000×g离心15min,将上清转移到一个新的离心管中,去除Protein A+G。
- 做蛋白标准曲线,测定蛋白浓度。
- ① 配制工作液:根据标准品和样品数量,按50体积试剂A加1体积试剂B(50:1)配制适量工作液,充分混匀。

# 免疫共沉淀 (Co-IP) 试剂盒

20 T WLA112a 50T WLA112b

仅用于科学研究,不能用于诊断



## 产品信息

---

- ② 稀释标准品：取10 $\mu$ l标准品稀释到100 $\mu$ l，使终浓度为0.5mg/ml。将标准品按0、1、2、4、8、12、16、20 $\mu$ l加到96孔板的蛋白标准品孔中，再用PBS补足至20 $\mu$ l。
  - ③ 加适当体积样品到96孔板的样品孔中，再用PBS溶液补足至20 $\mu$ l。
  - ④ 向各孔加入200 $\mu$ l工作液，37 $^{\circ}$ C放置30min(也可室温放置2h)。
  - ⑤ 用酶标仪测定A562，根据标准曲线计算出蛋白浓度。
9. 用PBS将总蛋白稀释到约1  $\mu$ g/ $\mu$ l，如果目的蛋白在细胞中含量较低，则总蛋白浓度应该稍高（如10  $\mu$ g/ $\mu$ l）。
  10. 加入2 $\mu$ g抗体到500 $\mu$ l总蛋白中，用摇床缓慢摇动抗原抗体混合物，4 $^{\circ}$ C过夜。
  11. 加入60 $\mu$ l Protein A+G来捕捉抗原抗体复合物，室温缓慢摇动抗原抗体混合物2h。
  12. 用预冷 PBS清洗三次（3000 $\times$ g离心1min），收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物，弃上清。
  13. 用20 $\mu$ l 5 $\times$ 上样缓冲液将琼脂糖珠-抗原抗体复合物悬起，轻轻混匀，缓冲液量依据上样多少的需要而定。
  14. 将上样样品煮沸5min，以游离抗原，抗体，珠子，3000 $\times$ g离心1min，收集上清，也可以暂时于-20 $^{\circ}$ C保存，留待以后电泳，电泳前应再次煮沸5min。