



PureBinding[®] Co-Immunoprecipitation Kit

Cat.No. P0401 (12 rxns)

Cat.No. P0402 (24 rxns)

Sufficient reagent for Co-IP assays per kit

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.



目录

背景介绍	1
应用范围	1
实验原理图	1
试剂盒组分	2
自备材料	2
实验操作流程图	3
实验前准备	4
实验操作	5



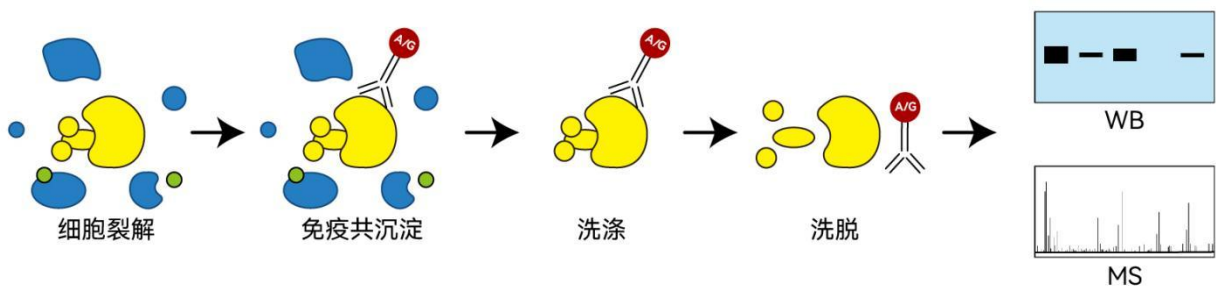
背景介绍

免疫共沉淀 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP) 是免疫结合富集蛋白质等抗原分子, 研究蛋白与蛋白结合的技术。CoIP 的技术原理是利用特异性抗体, 从复合抗原溶液中分离目标抗原, 可以根据不同的实验目的, 将分离的抗原进行 SDS-PAGE、蛋白质质银染、western blot、蛋白质质谱等蛋白质分析技术。

应用范围

- ① 捕获蛋白质结合伴侣, 分析靶蛋白与其他蛋白的相互作用;
- ② 富集靶蛋白进行分子量和数量等研究;
- ③ 研究目标蛋白质激活状态和翻译后蛋白质修饰;
- ④ 分析靶蛋白的功能结构域等。

实验原理图





试剂盒组分

组分编号	组分名称	组分规格		保存温度
		12rxns	24 rxns	
【1】	Binding buffer	50mL	100mL	2 ~ 8°C
【2】	Wash buffer	60mL	120mL	2 ~ 8°C
【3】	Elution buffer	2mL	4mL	2 ~ 8°C
【4】	Neutralization buffer	200μL	400μL	2 ~ 8°C
【5】	Protein A/G beads	700μL	1.5mL	2 ~ 8°C
【6】	Protease inhibitor	150μL	300μL	-25 ~ -18°C
【7】	5×Loading buffer	750μL	1.5mL	2 ~ 8°C

注：一次标准的免疫沉淀实验（实验分组：Input、IP 组及 IgG 组），需消耗 2 rxns 试剂量。

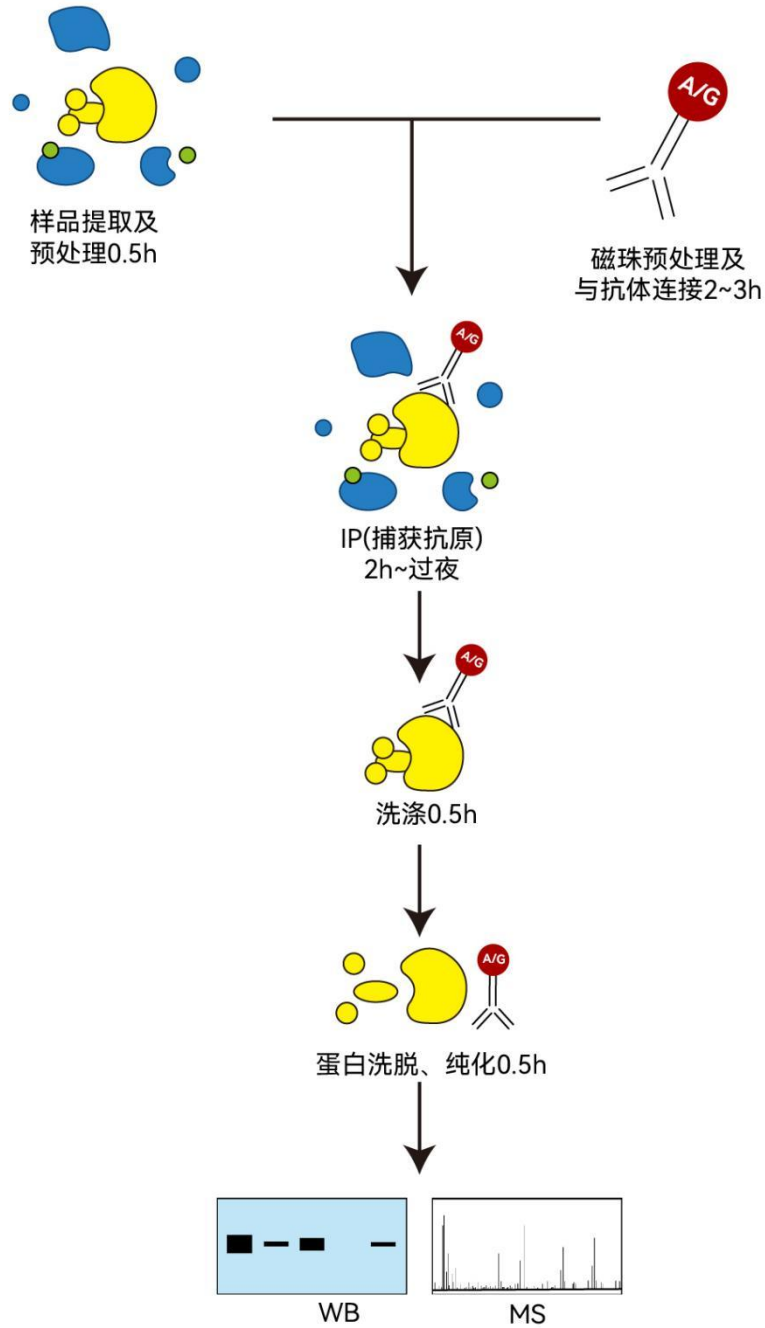
*若因实际实验分组设计改变（比如不设置阴性对照 IgG 组，或设有复数的 IP 组时），可能会导致试剂盒组分使用量增加。

自备材料

自备仪器耗材	自备试剂
匀浆器（组织样本使用）	IgG 抗体（IP 级）
低温离心机	目的蛋白抗体（IP 级）
旋转培养器	PBS 缓冲液
磁力架	/
涡旋器	/



实验操作流程图





实验前准备

1. 目的蛋白

目的蛋白抗体和 IgG 抗体应种属一致，且为 IP 级。使用量一般为 5 μ g，或参考抗体说明书中推荐的用量。

2. 细胞裂解

每个 Co-IP 使用的细胞总数必须根据结合蛋白的丰度进行优化。如目的蛋白内源表达低，就需要增加细胞用量。通常，一次 Co-IP 反应 1E7 的细胞量对应 1mL Binding buffer，但最高 3E7 的细胞量也有测试过可以成功裂解。

3. 细胞样品准备

1) 贴壁细胞

● 刮取细胞

- ① 从培养皿或培养板上刮下细胞，转移到离心管，细胞计数；
- ② 500 \times g 离心 5min 收集细胞，弃上清，用预冷的 PBS 洗涤细胞；
- ③ 4 $^{\circ}$ C，500 \times g 离心 5min 收集细胞，弃上清（可放-80 $^{\circ}$ C保存）。

● 消化液消化收取细胞

- ① 弃掉培养基，用 PBS 冲洗细胞一次；
- ② 加胰蛋白酶消化解离细胞；
- ③ 加 10 倍体积的完全细胞培养基终止消化，收集细胞计数，转移到离心管；
- ④ 500 \times g 离心 5min 收集细胞，弃上清，用预冷的 PBS 洗涤细胞；
- ⑤ 4 $^{\circ}$ C，500 \times g 离心 5min 收集细胞，弃上清（可放-80 $^{\circ}$ C保存）。

2) 悬浮细胞

- ① 将细胞收到锥形管中，细胞计数；
- ② 500 \times g 离心 5min 收集细胞，弃上清，用预冷的 PBS 洗涤细胞；
- ③ 4 $^{\circ}$ C，500 \times g 离心 5min 收集细胞，弃上清（可放-80 $^{\circ}$ C保存）。

注意事项：

样品保存时间不宜过久，新鲜的样本有利于 Co-IP 实验的成功。



实验操作

1. 样本提取

● 组织样品:

- 1) 取 100mg 新鲜组织加入 1mL 冷 PBS (自备) 进行洗涤, 去除血液等;
- 2) 将洗净组织放入匀浆器, 加入 1mL Binding buffer 【1】 和 10 μ L Protease inhibitor 【6】, 进行研磨, 其间每研磨 1 min 置于冰上冷却 30 s, 充分研磨后转置于 1.5 mL 离心管;
- 3) 4 $^{\circ}$ C, 10,000 \times g 离心, 10 min 取上清。

● 细胞样品:

- 1) 1 \times 10⁷ 个细胞加入 1 mL PBS (自备) 进行洗涤, 室温 800-1000 g 离心 5 min 收集细胞;
- 2) 细胞加入 1 mL Binding buffer 【1】 和 10 μ L Protease inhibitor 【6】, 吹打混匀, 置于冰上裂解 10 min, 其间涡旋重悬 2 次, 每次 5 s;
- 3) 4 $^{\circ}$ C, 10,000 \times g 离心 10 min 取上清。

2. 样品预处理

- 1) 取 100 μ L 上清液至新的离心管中标记为 Input 组, -25 ~ -18 $^{\circ}$ C 保存, 用于后续下游实验。
- 2) * 剩余上清液中加入 10 μ L Protein A/G beads 【5】, 于 4 $^{\circ}$ C、10 转/min 旋转反应 10 min;
- 3) * 置于磁力架, 取上清, 弃磁珠;

注意事项:

2)* 3)* 步骤为可选择步骤, 使用 Protein A+G beads 【5】 对样品进行预处理, 对改善磁珠非特异结合有一定的帮助。

3. 磁珠预处理

- 1) 取 100 μ L Protein A/G beads 【5】, 加入 1mL Binding buffer 【1】, 涡旋洗涤 5 s, 置于磁力架, 弃上清;
- 2) 重复洗涤 1 次后, 置于磁力架, 弃上清;
- 3) 加入 1mL Binding buffer 【1】, 充分混匀后分为 2 份, 各 500 μ L, 分别标记为 IP 组和 IgG 组;



4. 抗体与磁珠连接

- 1) 经预处理的两管磁珠，IP 组加入 5 μ g 的 IP 抗体，IgG 组加入 5 μ g 的 IgG，于 4 $^{\circ}$ C、10 转/min 旋转反应 1~2 h；
- 2) 反应完成后，置于磁力架，弃上清；
- 3) 使用 1mL Binding buffer 【1】 涡旋洗涤 5 s，置于磁力架，弃上清；
- 4) 重复洗涤 1 次，置于磁力架，弃上清。

5. 捕获抗原

- 1) 分别在结合了 IP 抗体 (IP 组) 或 IgG (IgG 组) 的磁珠中加入 350 μ L Binding buffer 【1】 和 400 μ L 组织或细胞裂解上清，于 4 $^{\circ}$ C、10 转/min 旋转反应 2h ~ 过夜。
- 2) 反应完成后，置于磁力架，弃上清。

注意事项:

- a) 长时间的反应会增加背景；
- b) 适当地增加反应时间或按以下操作代替步骤 4、步骤 5 的孵育条件或许对目标的捕获有利；
 - ① 2.5 μ g 抗体与磁珠、2.5 μ g 抗体与裂解上清分别进行 4 $^{\circ}$ C、10 转/min 旋转反应 1h ~ 过夜孵育。
 - ② 反应完成后将抗体-磁珠复合物、抗体-裂解上清复合物进行混合，继续进行 4 $^{\circ}$ C、10 转/min 旋转反应 2h。
- c) 如果抗原的丰度较低，可适当减少 Binding Buffer 【1】 的加入量，更好的选择是在提取的时候使用更大的组织或细胞量。

6. 洗涤

- 1) 在磁珠复合物 (IP 组、IgG 组) 中各加入 1mL Wash buffer 【2】，涡旋洗涤 2min，置于磁力架，弃上清；
- 2) 重复步骤 6. 1) 洗涤 3 ~ 5 次。

注意事项:

- a) 多次洗涤对改善背景有一定的帮助；
- b) 涡旋转速推荐 2500 \times g；

7. 提取蛋白

- 1) 非变性洗脱: 加入 50~100 μ L Elution buffer 【3】，混匀后静置 10 分钟，置于磁力架收集



上清至新离心管中，加入 1/10 体积 Neutralization buffer 【4】混匀，得到产物可直接用于下游质谱分析。

2) 变性洗脱：加入 50~100 μ L 1 \times Loading buffer 沸水浴 5 分钟，置于磁力架收集上清至新离心管中，得到产物可用于下游的 SDS-PAGE 实验。

注意事项：

步骤 2) 中 1 \times Loading buffer 可由试剂盒中 5 \times Loading buffer 【7】稀释得到。



扫一扫，了解更多

广州吉赛生物科技股份有限公司

Guangzhou Geneseed Biotech Co.,Ltd.

Tel: 400-8989-400 E-mail: geneseed@geneseed.com.cn