

IP/Co-IP 蛋白互作试剂盒（琼脂糖法）使用说明书

产品组成

IP/CoIP Kit		
产品编号	EK-6055-20T	EK-6055-50T
Protein A/G-Plus 琼脂糖珠	0.5mL	1.3mL
IP 裂解结合缓冲液	20mL	50mL
IP 洗涤缓冲液	40mL	100mL
蛋白酶抑制剂混合物(100×)	1mL	2.5mL
杂蛋白去除琼脂糖 Clean Agarose	220μL	550μL
非变性洗脱缓冲液	1.1mL	2mL
变性洗脱缓冲液	1.1mL	2mL

产品介绍

本品采用 Protein A/G PLUS 琼脂糖珠作为免疫沉淀载体, 具有广泛的抗体结合谱, 适用于小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3, 大鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c, 人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4, 以及兔、山羊来源的多克隆抗体。经优化的缓冲液体系可有效维持抗体与抗原的高亲和力结合, 并保障蛋白质复合物 (Co-IP) 的完整性与稳定性, 从而获得高质量的免疫沉淀结果。

存储条件

于 4°C 下避光密封保存, 有效期为 12 个月。注意: 严禁冷冻储存, 冻融会导致琼脂糖珠三维网状结构不可逆损坏, 造成结合性能下降。

需要额外准备的材料

PBS 缓冲液

无菌 1.5mL 离心管
 台式离心机

实验前准备:

1. **缓冲液配制:** IP 裂解结合缓冲液与 IP 洗涤缓冲液在使用前, 须按 1:100 比例补加蛋白酶抑制剂混合物 (Protease Inhibitor Cocktail), 混匀后即配即用, 全程置于冰上操作, 以防止蛋白酶降解目的蛋白。

2. **预冷器具:** 实验开始前, 提前将离心机、金属浴/冰盒、离心管及 PBS 冷却至 4°C 备用。

操作步骤:

1. 总蛋白提取

(1) 动物细胞样本:

① **细胞收集:** 收集 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 个细胞, 用预冷 PBS 清洗 2~3 次 (4°C, 1000 g, 离心 5 min 收集细胞沉淀), 以彻底去除残余培养基成分;

② **裂解:** 加入 500 μL 含抑制剂的 IP 裂解结合缓冲液。

③ **充分破碎:** 首选冰上超声破碎 (建议参数: 功率 20%, 3 s ON/5 s OFF, 循环 5~10 次) 直至裂解液澄清; 若无超声设备, 可在冰上裂解 30 min, 期间每 10 min 进行剧烈涡旋或反复吹打混匀。

④ **离心收集:** 4°C 12000×g 离心 5-10 min, 收集上清至新的离心管中;

(2) 组织样本

① **清洗:** 新鲜或冻存组织均需用预冷 PBS 充分洗净表面血迹及杂质。

② **破碎 (二选一):**

A. **(液氮研磨):** 取 0.1~0.2g 干净的组织, 用液氮在研钵中充分研磨, 转移粉末至预冷的新离心管中;

B. **(匀浆仪破碎):** 取 0.1~0.2g 干净的组织, 加入 300~500 μL 预冷的 IP 裂解结合缓冲液 (含抑制剂), 匀浆破碎 (下一步则无需再加裂解液, 直接进行步骤④),

根据不同匀浆设备进行如下操作;

珠打式匀浆仪: 5.0-6.0 m/s, 运行 30s, 冰上冷却 2 min, 重复 2-3 次。

剪切式匀浆仪: 8000-10000 rpm, 每次 10s, 重复 2-3 次, 严禁产生气泡。

③ **裂解**: 将样本管置于冰上, 每组加入 300~500 μ L 预冷的 IP 裂解结合缓冲液(含抑制剂), 吹打混匀;

④ **超声辅助裂解**: 若裂解液中仍可见明显颗粒, 可于冰上超声 (5 s ON/5 s OFF, 循环 3 次) 直至溶液基本澄清。如无超声设备, 可置于冰上静置裂解 30 min, 期间每 10 min 涡旋混匀一次, 每次 5~10 s;

⑤ **离心收集**: 4 $^{\circ}$ C 12000 \times g 离心 10 min, 收集上清至新的离心管中;

注: 取 30~50 μ L 上清作为 Input 对照, 余下裂解液用于后续 IP 实验。

2. 非特异性蛋白预处理 (强烈推荐, 可选做)

① 取上述裂解液, 加入 10 μ L 杂蛋白去除琼脂糖 (Clean Agarose), 充分混匀。

② 4 $^{\circ}$ C 缓慢旋转孵育 30~60 min, 使非特异性蛋白充分吸附至琼脂糖珠上。

③ 4 $^{\circ}$ C, 1000 \times g 离心 5 min, 将上清液小心转移至新管, 即为预处理后的裂解液, 用于后续实验。

3. 抗原-抗体-琼脂糖珠结合

① **抗体孵育**: 将 1 mL 蛋白上清 (含总蛋白量约 100~500 μ g) 转移至 1.5 mL 微量离心管中, 加入 1~10 μ L (即 0.2~2 μ g) 目标抗体 (具体用量可参考抗体说明书), 于 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 1 小时至过夜, 使抗体与目标蛋白充分结合。

② **珠子捕获**: 加入 15~20 μ L 悬浮体积的 Protein A/G-Plus 琼脂糖珠 (使用前颠倒充分混匀), 盖紧管盖, 置于摇杆平台或旋转混匀仪上于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时至过夜, 使珠子充分捕获抗体-抗原复合物。

③ **收集复合物**: 4 $^{\circ}$ C, 1000 \times g 离心 5 min, 收集免疫沉淀复合物 (琼脂糖珠沉淀)。小心吸除并丢弃上清液, 避免扰动珠子。

④ **洗涤**: 向离心管中加入 500 μ L 含蛋白酶抑制剂的 IP 裂解结合缓冲液, 轻柔颠倒混匀 30 次使琼脂糖珠充分分散, 于 4 $^{\circ}$ C 以 1,000 \times g 离心 5 min 后弃上清。重复上述

洗涤操作 3~4 次, 末次洗涤后用移液器尽量吸净残余液体, 以降低背景干扰。

4. 洗脱

本说明书提供以下两种洗脱方案, 操作者可根据后续检测方法的需要选择适合的洗脱方式。

① **SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法 (变性洗脱法)**: 向琼脂糖珠中加入 50 μ L 变性洗脱缓冲液, 充分混匀后于 95 $^{\circ}$ C 加热 5~10 min 使蛋白变性解离; 12,000 \times g 离心 2~5 min, 将上清液转移至新的离心管中即为洗脱产物。该产物已含 SDS 上样缓冲液成分, 可直接用于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测, 无需额外添加蛋白上样缓冲液; 如需进行质谱分析, 可在电泳后切取目的胶条送检。

② **非变性洗脱法**: 向琼脂糖珠中加入 50 μ L 非变性洗脱缓冲液, 涡旋振荡 20 s 后于 4 $^{\circ}$ C 振荡孵育 10~15 min; 再次涡旋振荡 20 s, 以 1,000 \times g 离心 20 s 后静置 1 min, 将上清液小心转移至新的离心管中, 于 -80 $^{\circ}$ C 长期保存。该洗脱产物保留蛋白的天然构象及生物活性, 适用于后续质谱、SDS-PAGE、Western Blot 及功能活性检测等多种下游分析。

注: 若选择非变性洗脱法, 建议暂时保留洗脱后的琼脂糖珠。当非变性洗脱效率不理想时, 可进一步采用变性洗脱法 (SDS-PAGE 上样缓冲液) 对残余结合蛋白进行二次洗脱回收。

注意事项:

1. **温控**: 实验全程须在冰上或 4 $^{\circ}$ C 低温环境中操作, 以抑制蛋白酶活性, 防止目的蛋白降解及蛋白质复合体解离。

2. **转速**: 琼脂糖珠结构脆弱, 所有涉及珠子的离心步骤, 离心力均不得超过 1,000 \times g, 超速离心易导致琼脂糖珠物理破碎, 产生细小碎片干扰后续检测结果。

3. **洗涤**: 末次洗涤结束后, 须用移液器尽量吸净管底残余液体, 避免残留缓冲液稀释洗脱产物, 影响后续检测的灵敏度。