

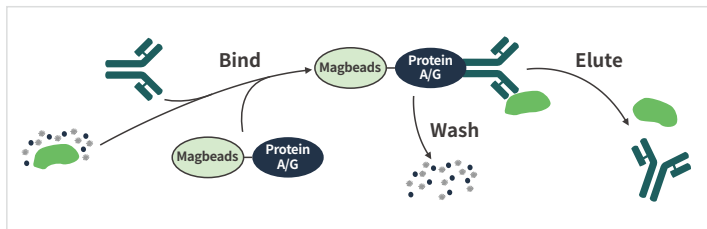


Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit For Plant

Sufficient reagents for 6 Co-IP assays per kit.
Store at -20 & 4°C

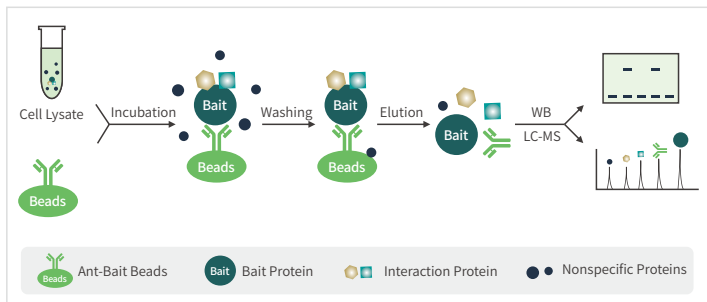
1. 实验原理

免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation)是利用抗原与抗体之间的专一性作用为基础,从而用于研究蛋白质与蛋白质之间相互作用的一种方法。抗体与细胞裂解液或表达上清中相应的蛋白结合后, 再与ProteinA/G偶联的Sepharose或Magnetic Beads孵育, 通过离心或者借助磁力架获得ProteinA/G珠子-抗体-目的蛋白复合物, 在高温及还原剂的作用下, 抗原与抗体解离, 收集上清, 上清中包括抗体、目的蛋白和少量的杂蛋白。

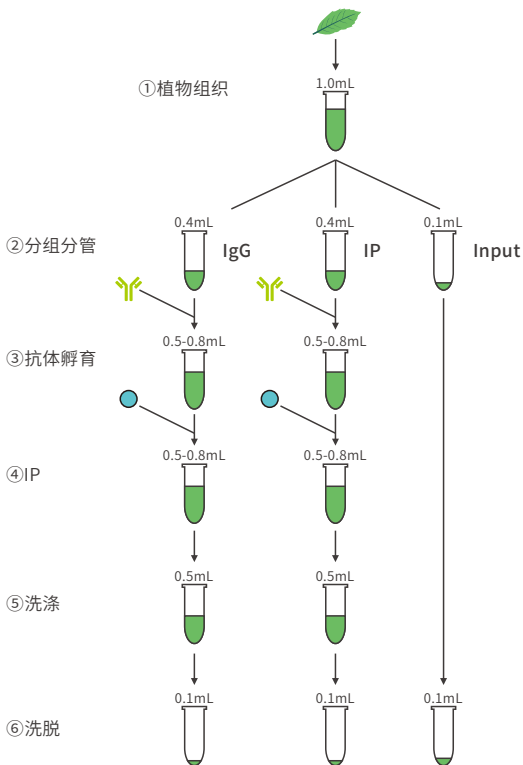


2. 技术路线图

2.1 实验流程图



2.2对照设置流程图



3. 试剂盒组分

组分	容量 (6T)	保存温度
PBS	15mL	4°C
Plant lysis buffer	10mL	4°C
ProteinA/G Magnetic Beads	200μL	4°C
Incubation buffer	10mL	4°C
Washing buffer	20mL	4°C
Elution buffer	800μL	4°C
Plant Protease inhibitor (100 X)	80μL	-20°C
Normal Rabbit IgG	35μL	-20°C
Normal Mouse IgG	35μL	-20°C

4. 操作步骤

4.1 蛋白提取

4.1.1 植物样本

- 1) 称取约0.3g洗净后的植物组织, 用消毒的剪刀尽量剪碎于灭菌后的预冷研钵中, 液氮研磨成粉末并收集到1.5mL EP管中;
- 2) 加入 1 mL Plant lysis buffer、10 μL Plant Protease inhibitor (100 X) ;
- 3) 冰浴静置20min, 每5min涡旋一次, 10s/次;

- 4) 用超声波细胞破碎仪超声8min, 功率为20%, 工作3s, 间歇3s, 冰浴超声;
- 5) 用台式高速冷冻离心机离心10min, 4°C, 12000r/min, 取上清即为总蛋白。

备注:蛋白提取整个过程都在冰上操作, 减少高温造成的蛋白降解; 超声过程中最好不要有气泡产生, 减少蛋白降解。总蛋白放在-20°C保存。

4.2 Co-IP

4.2.1 抗体结合蛋白

- 1) 准备两个洁净的1.5mL EP管记为IP、IgG, IP组加入3-5 μ g目的抗体, IgG管加入3-5 μ g (目的抗体) 同种属IgG;
- 2) 取100 μ L总蛋白标记为input, -20°C保存备用, IgG和IP管分别加入300 μ g-1mg蛋白液 (根据实际项目的样本量做调整), 加Incubation buffer将体积补至500-800 μ L, 4°C静音混合过夜 (约16h)。

4.2.2 磁珠准备

- 1) 将ProteinA/G Magnetic Beads从4°C冰箱取出, 上下颠倒混匀数次, 使磁珠和溶液混合均匀, 分别取30 μ L到2个干净的1.5mL EP管中, 记为IgG和IP;
- 2) 加入0.5mL预冷的Washing buffer重悬磁珠, 置于磁力架上静置1min, 分离磁珠和溶液, 用移液枪小心吸弃上清;
- 3) 重复步骤2) 2次, 共洗涤3次。

4.2.3 磁珠与复合物结合

- 1) 将两组蛋白抗体孵育后的混合液分别加入到对应洗涤完成的磁珠管中, 室温静音混合孵育1.5-2h;
- 2) 将2管置于磁力架上静置1min, 分离磁珠和溶液, 用移液枪小心吸弃上清或回收 (回收的样本液放在-20°C保存);
- 3) 加入0.5mL预冷的Washing buffer, 置于磁力架上静置1min, 分离磁珠和溶液, 用移液枪小心吸弃上清;
- 4) 重复步骤3) 2次, 共洗涤3次。

4.2.4洗脱

IgG和IP管均加入100 μ L Elution buffer，沸水浴5min，置于磁力架上静置1min，取上清记为洗脱液，与input组各自加入 1/5 体积的 6 $\times$ SDS loading buffer，沸水浴 5 min，-20 $^{\circ}$ C保存备用。

4.3 WB

各取 20 μ L 步骤 4.2.4得到的IgG和IP组样品及步骤 4.2.1得到的 Input 组，开展SDS PAGE western blot 检测。

4.4银染（选做）

- 1) 取 20 μ L 步骤 4.2.4得到的 IgG和IP组样品及2-5 μ L步骤 4.2.1得到的 Input 组，开展PAGE凝胶电泳。
- 2) 固定：将电泳后的凝胶从玻璃板上剥离下来，清水冲洗干净，放入干净的直径 12cm玻璃皿中，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 5min，弃掉去离子水，加入固定液没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 30min。
- 3) 致敏：弃掉固定液，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 5min，重复水洗一次，共2次，加入致敏液没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃30min。
- 4) 染色：弃掉致敏液，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 2min，重复水洗一次，共2次，加入染色液没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃20min。
- 5) 显色：弃掉染色液，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 1min，重复水洗一次，共2次，加入显色液没过胶，在脱色摇床上室温摇晃 2min左右，溶液变浑浊，弃掉液体，加入新的显色液继续显色至目的条带清晰，拍照。

4.5质谱（选做）

取 30 μ L IgG和IP组蛋白样品开展 LC-MS 检测。

5. 常见问题

Q1: 通过Co-IP后WB验证发现，没有想要的目的条带？

- A:**
- 1) 有可能是样品被蛋白酶降解，对应的策略是需要添加蛋白酶抑制剂，所有操作保持4℃以下冰上操作并防止冻融。
 - 2) 有可能是抗体浓度太低导致条带较浅，则需要调整IP或WB抗体浓度，必要时设立浓度梯度，摸索最佳浓度。
 - 3) 抗体亲和力太低，选用适合于IP或者WB的抗体。
 - 4) 有的IP抗体未与磁珠结合，这种情况需选用适合IP的磁珠。
 - 5) 若Tag未暴露在融合蛋白构象的表面，则需改变Tag融合表达部位。
 - 6) 裂解液盐碱度太高，需用低盐碱度的裂解液。
 - 7) 抗体选择不当，更换抗体。

Q2: 通过Co-IP后WB验证发现，虽然可见目的条带，但是背景很高：

A: 多方面原因造成：

- 1) 由于非特异蛋白结合导致背景高，若要避免非特异性蛋白结合，则需要无血清溶液裂解细胞，且在免疫沉淀前将Protein A/G Magnetic Beads预洗，在免疫沉淀后增加漂洗次数和盐碱度(高盐或去垢剂)。
- 2) 实验仪器或试剂被污染，使用洁净的仪器及试剂。
- 3) 转移膜上的非特异吸附导致背景高，实验操作过程中戴手套，使用镊子来取，不要接触膜转移面。
- 4) 制备样品中可能有不完全溶解的大蛋白复合物，则在制备样品后进行短暂超声处理(3次，每次5秒钟)，然后离心，取上清后进行后续试验。
- 5) 洗涤不彻底，则需要多次洗涤，并增加洗涤液中的NaCl和去垢剂浓度。
- 6) 可能有非特异性蛋白吸附于珠子上，则须进行Preclearing以排除非特异性吸附。
- 7) 抗体本身特异性不好可能导致背景高，则须选择合适的抗体，可以考虑单抗。
- 8) 使用了过多的细胞或组织进行裂解导致背景高，则须减少样本量，推荐100-500μg细胞裂解液。
- 9) 蛋白降解也可能出现高背景的情况，尽量使用新鲜制备的样品。



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENECREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物城创新园B4栋二楼

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

