



Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit for Plant

Catalog#JKR23001P

Instruction Manual (For Two Groups)

Sufficient reagents for 6T Co-IP assays per kit.

Store at -20 & 4°C

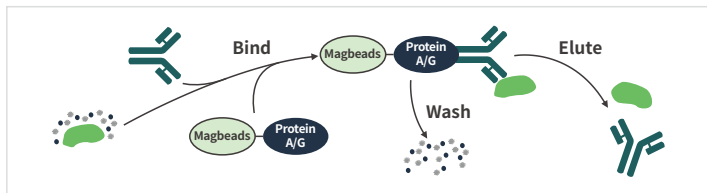
目录

1. 实验原理	02
2. 技术路线图	02
3. 试剂盒组分	04
4. 操作步骤	04
5. 常见问题	06



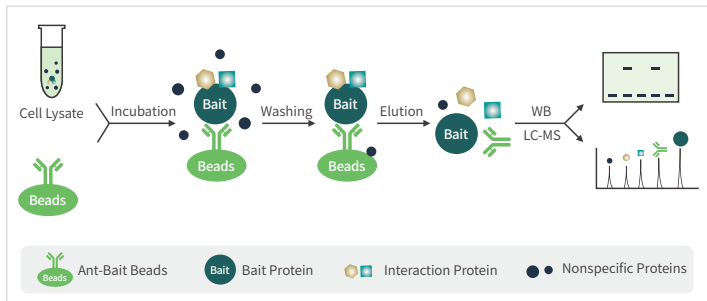
1. 实验原理

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。抗体与裂解液中相应的蛋白结合后,再与ProteinA/G偶联的Sepharose或MagneticBeads孵育,通过离心或者借助磁力架获得ProteinA/G磁珠-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,再通过Western Blot或质谱(MS)鉴定蛋白质。其原理图如下:

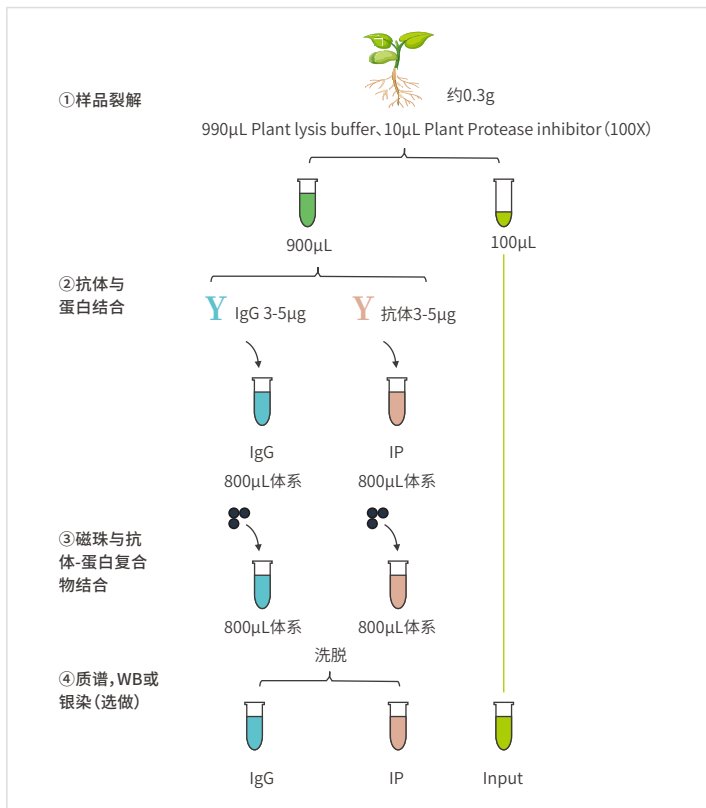


2. 技术路线图

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
Plant lysis buffer	9mL	4°C
ProteinA/G Magnetic Beads	200μL	4°C
Incubation buffer	4.5mL	4°C
Wash buffer	20mL	4°C
Elution buffer	700μL	4°C避光
Plant protease inhibitor (100 X)	35μL	-20°C
Normal Rabbit IgG (1mg/mL)	30μL	-20°C
Normal Rabbit IgG (1mg/mL)	30μL	-20°C

特别提醒1:需自备PBS、6X loading buffer、磁力架等试剂耗材。

特别提醒2:6T为6次单组 (1组IP或1组IgG) 免疫沉淀实验, 后面的操作步骤中包含了IgG和IP各1组, 需消耗2T试剂。

4. 操作步骤

4.1 总蛋白提取

4.1.1 植物样本

- 1) 研磨: 取新鲜幼嫩组织或低温组织 (约0.3g), 置于灭菌后预冷的研钵中, 用液氮研磨至粉状;
- 2) 裂解: 取 990μL Plant Lysis buffer、10 μL Plant Protease inhibitor(100X)混匀作为裂解液, 吸取800μL裂解液加入研钵, 在冰上继续研磨5-10min至样品成细腻的匀浆状, 转移至新的EP管中, 再向研钵中加入剩余的200μL裂解液收集残留的样品, 同样转移至该EP管;
- 3) 装有样品匀浆的EP管在冰上充分裂解30min, 每隔5min上下颠倒混匀1次;
- 4) 超声: 用超声波细胞破碎仪超声12-15min, 功率20%, 超声3s, 间歇3s, 冰浴超声;

5) 离心:4°C, 12000rpm, 10min, 收集上清, 再向上清中加入Plant Lysis buffer补充体积至1mL, 混匀。

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。裂解后的总蛋白放在-20°C保存。

4.2 CoIP

4.2.1 抗体结合蛋白

- 1) 准备2个的1.5mL EP记为IP、IgG, IP组加入3-5μg目的抗体, IgG管加入3-5μg目的抗体同种属IgG;
- 2) 取4.1步骤总蛋白液100μL标记为Input, -20°C保存备用, IgG和IP管分别加入450μL总蛋白液, 再加Incubation buffer将体积补至800μL, 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30μL到2个新的1.5mL EP管中, 记为IgG和IP;
- 2) IgG和IP管各加入0.5mL预冷的Wash 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, 该步骤重复3次。

4.2.3 磁珠与复合物结合

- 1) 将两组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;
- 3) IgG和IP管各加入0.5mL预冷的Wash 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, 该步骤重复3次。

4.2.4 洗脱

IgG和IP管均加入100μL Elution buffer, 沸水浴10min, 置于磁力架上静置2min, 取上清记为洗脱液, 与Input组各自加入20μL 6 x SDS Loading buffer, 沸水浴10 min,

-20°C保存备用。

4.3 WB (选做)

各取20μL步骤4.2.4得到的IgG、IP和Input组样品，开展WB检测。

4.4 银染 (选做)

- 1) 取20μL步骤4.2.4得到的IgG、IP和Input组样品，开展SDS-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 μL IgG和IP组蛋白样品开展 LC-MS 检测。

5. 常见问题

Q1: 通过CoIP后WB验证发现，没有想要的目的条带？

A: 多方面原因造成：

- 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°C以下冰上操作且避免反复冻融。

- 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。
- 5) 有的IP抗体未与磁珠结合,这种情况需选用适合IP的磁珠。
- 6) 若Tag未暴露在融合蛋白构象的表明,则需改变Tag融合表达部位。
- 7) 裂解液盐碱度太高,需用低盐碱度的裂解液。
抗体选择不当,更换抗体。

Q2:通过CoIP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) 由非特异蛋白结合导致背景高,若要避免主特异性蛋白结合,则需要无血清溶液裂解细胞,且在免疫沉淀前用protein(A/G)磁珠预洗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,使用洁净的仪器及实际。
- 3) 转移膜上的目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体,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,并设新增加洗涤液中的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以排非特异性吸附。
- 7) 抗体本身特异性不好可能致背景高,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100-500ug细胞裂解物。
- 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 GENE CREATE 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

