通用型免疫（共）沉淀（IP/Co-IP）工具箱（磁珠）

Cat #: KTD104-CN **Size:** 20 T

	通用型免疫（共）沉淀（IP/Co-IP）工具箱（磁珠）		
REF	**货号：**KTD104-CN	LOT	**批号：**见产品标签
	适用样本：动植物组织、细胞		
	保质期：按各组分标签提示分开存储，保质期 12 个月		

原理

免疫沉淀（Immunoprecipitation, IP）是利用固定在磁珠或琼脂糖等固相支持物上的特异性抗体对抗原进行小型亲和纯化的方法。作为许多蛋白学相关研究的重要环节，IP 可用于检测蛋白质的存在、相对丰度、蛋白表达的上下调、蛋白质稳定性及相互作用等。基于传统的 IP/Co-IP 实验操作繁琐耗时、试剂用品种类繁多、实验结果稳定性可靠性差的痛点，Abbkine 开发出通用型免疫（共）沉淀（IP/Co-IP）工具箱；经精心设计钻研，该工具箱包含：①经优化的天然和变性裂解液，可同时满足样本 IP/Co-IP 或 WB 需求；②相比于单独的 Protein A 或 Protein G，Protein A/G Magnetic Beads 具有更广的结合范围，更高效的抗体结合能力和较低的蛋白非特异吸附率，让操作过程更省时、高效、节省抗体用量；③即用型 IP negative control，可排除 IgG 本身和目的蛋白或其它特定生物分子的非特异性结合，确保 IP 抗体的特异性，让实验结果数据更稳定可靠；④独特的 IPkine™ 二抗（HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 轻链二抗及 HRP 标记小鼠抗兔 IgG 轻链二抗），可完美消除重链干扰。免疫（共）沉淀（IP/Co-IP）工具箱作为 IP/Co-IP 的标准化产品，可满足大多数用户 IP/Co-IP 的需求，是 IP/Co-IP 检测实验的不二之选。此外，该工具箱内对应产品（A25012、A25022）也可单独订购。

包装清单

工具箱组分	试剂盒组分	规格（20 T）	储存条件
Universal IP/Co-IP Toolkit (Magnetic Beads) (Part 1 of 2)	Non-Denaturing Lysis Buffer	25 mL	4℃
	Denaturing Lysis Buffer	25 mL	4℃
	10×Wash Buffer	20 mL	RT
	Protein A/G Magnetic Beads	0.45 mL	4℃
	Elution Buffer	2 mL	4℃
	Neutralization Buffer	0.2 mL	4℃
Universal IP/Co-IP Toolkit (Magnetic Beads) (Part 2 of 2)	100×Proteinase Inhibitor Cocktail	0.2 mL	-20℃
	Mouse IgG (1mg/mL)	30 μL	-20℃
	Rabbit IgG (1mg/mL)	30 μL	-20℃
	IPKine™ HRP, Goat Anti-Mouse IgG LCS	30 μL	-20℃

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

	IPKine™ HRP, Mouse Anti-Rabbit IgG LCS	30 μL	-20℃

自备耗材

- 磁分离架
- 垂直旋转混合仪
- 低温离心机
- 可调节式移液枪及枪头
- 去离子水
- PBS 缓冲液
- 匀浆器（组织样本）
- SDS-PAGE Loading Buffer

试剂准备

Non-Denaturing Lysis Buffer：天然蛋白裂解液，用于 IP 样本的提取，即用型；置于冰上待用；4℃保存。

Denaturing Lysis Buffer：变性蛋白裂解液，可用于直接 WB 检测样本的提取，即用型；置于冰上待用；4℃保存。

1×Wash Buffer：临用前配制，向 10×Wash Buffer 中添加去离子水，将 10×母液稀释成 1×工作液；4℃保存。

注意：10×Wash Buffer 4℃保存会产生沉淀，使用前可在 37℃水浴中预热 10 min 溶解沉淀。

Protein A/G Magnetic Beads：即用型；4℃保存，避免冷冻。

Elution Buffer：即用型；用于非变性蛋白洗脱，4℃保存。

Neutralization Buffer：即用型；用于中和洗脱的非变性蛋白，4℃保存。

100×Proteinase Inhibitor Cocktail：临用前 Lysis Buffer 中加入终浓度 1×Proteinase Inhibitor Cocktail；-20℃保存。

Mouse IgG：即用型；用于小鼠来源 IP 抗体的阴性对照，-20℃保存。

Rabbit IgG：即用型；用于兔来源 IP 抗体的阴性对照，-20℃保存。

IPKine™ HRP, Goat Anti-Mouse IgG LCS：HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 轻链二抗，建议 WB 稀释比例 1:1,000-1:10,000（推荐 1:2,000），-20℃保存。

IPKine™ HRP, Mouse Anti-Rabbit IgG LCS：HRP 标记的小鼠抗兔 IgG 轻链二抗，建议 WB 稀释比例 1:1,000-1:10,000（推荐 1:2,000），-20℃保存。

实验步骤

一、免疫沉淀

A. 蛋白样品的准备

1. 细胞蛋白提取：

(1) 细胞收集（贴壁细胞：10 cm 细胞培养皿中单层细胞长满 80%-90%，吸除细胞培养液，PBS 洗涤一次；悬浮细胞：离心收集 5×10^6细胞，PBS 洗涤一次）。

(2) 加 0.5-1 mL 预冷的 Non-Denaturing Lysis Buffer 到细胞中（Non-Denaturing Lysis Buffer 中加入终浓度 1×Proteinase Inhibitor Cocktail），4℃裂解细胞 5 min，期间用移液器反复吹打，然后将细胞悬浮液转移到新的离心管中。

(3) 12,000 rpm，4℃，离心 10 min，收集上清，然后采用 BCA 法测定蛋白浓度（推荐使用 Abbkine 货号：KTD3001 蛋白质定量试剂盒（BCA 法））。

2. 组织蛋白提取：

(1) 植物或动物组织样品：称取 0.1 g 组织，加入 1 mL Non-Denaturing Lysis Buffer（Non-Denaturing Lysis Buffer 中加入终浓度 1×Proteinase Inhibitor Cocktail），液氮或匀浆器研磨。（若需要提高蛋白浓度，可以适量减少 Non-Denaturing Lysis Buffer 用量）。

(2) 将匀浆液转移至新的离心管中，4℃冰上裂解 5 min。

(3) 12,000 rpm，4℃，离心 10 min，收集上清，然后采用 BCA 法测定蛋白浓度（推荐使用 Abbkine 货号：KTD3001 蛋白质定量试剂盒（BCA 法））。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

注意：总蛋白浓度选择在 0.5-1 μg/μL 范围内较为合适。通常针对目标蛋白的表达量不同，需要对总蛋白浓度进行预实验调整。免疫共沉淀(Co-IP)通常必须使用未经冻存的新鲜蛋白样品。普通的免疫沉淀虽然可以使用冻存的蛋白样品，但也宜用新鲜的蛋白样品为佳。

B. 去除非特异性结合(可选做)：

(1) 取 20 μL 的 Protein A/G Magnetic Beads 加入到 1.5 mL 离心管中，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，吸弃上清。

注意：Protein A/G Magnetic Beads 使用前一定要充分重悬，即充分颠倒若干次使混合均匀。

(2) 加入 1 mL 1×Wash Buffer，重悬 Protein A/G Magnetic Beads，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，吸弃上清，重复 3 次。

(3) 加入 0.2-1 mL（0.2-1 mg）蛋白样品，4℃摇转孵育 30 min。（推荐用垂直旋转混合仪，低速旋转）

(4) 离心管置于磁分离架上，静置 10 s，取上清用于后续的免疫沉淀。

C. 免疫沉淀

(1) 取 20 μL 的 Protein A/G Magnetic Beads 加入到 1.5 mL 离心管中，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，吸弃上清。

(2) 加入 1 mL 1×Wash Buffer，重悬 Protein A/G Magnetic Beads，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，吸弃上清，重复 3 次。

(3) 加入 0.2-2 μg 抗体溶液，重悬 Protein A/G Magnetic Beads，室温下置于垂直旋转混合仪孵育 30 min，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，收集上清液，沉淀用于后续 Step (4)。**可选做，IgG 阴性对照：加入 0.2-2 μL Mouse IgG 或 Rabbit IgG，重悬 Protein A/G Magnetic Beads，室温下置于垂直旋转混合仪孵育 30 min，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，收集上清液，沉淀用于后续 Step (4)。此步可排除 IgG 本身和目的蛋白或其它特定生物分子的非特异性结合。**

注意：Protein A/G Magnetic Beads 置于垂直旋转混合仪混匀时，要保证有一定的流动性，若不流动，加入一定量的 1×Wash Buffer。

(4) 加入 1 mL 1×Wash Buffer，重悬 Protein A/G Magnetic Beads，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，吸弃上清，重复 3 次。

(5) 加入 0.2-1 mL（0.2-1 mg）蛋白样品或上清(去除非特异性结合蛋白的上清)，在室温下置于垂直旋转混合仪孵育 1 h 或 4℃过夜。

(6) 离心管置于磁分离架上，静置 10 s，收集上清液，沉淀用于后续 Step (7)。

(7) 加入 1 mL 1×Wash Buffer，重悬 Protein A/G Magnetic Beads，离心管置于磁分离架上，静置 10 s，吸弃上清，重复 3 次。

(8) 洗脱

a）变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检测。向离心管中加入 20-50 μL 1×SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，100℃加热 5 min，然后进行离心，800 rpm 离心 1 min，收集上清液，进行 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检测分析。

b）非变性洗脱法：此方法洗脱的样品保持原有的生物活性，可用于后期功能分析。向离心管中加入 20-50 μL Elution Buffer 混匀，然后在室温下孵育 10 min，800 rpm，4℃，离心 2 min，收集上清液至新的离心管中，并立即加入 1/10 Elution Buffer 体积的 Neutralization Buffer，将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0，用于后续功能分析。

二、免疫共沉淀：

参考免疫沉淀的方法进行。

草莓时刻：通用型免疫（共）沉淀（IP/Co-IP）工具箱可以方便地获得纯化的蛋白，也可用多种标签小鼠单克隆抗体（Cat #: A02010MGB，A02040MGB，A02050MGB）免疫（共）沉淀的方法获得目的蛋白。扫描右侧二维码，关注 Abbkine 公众号，了解更多 Abbkine 产品信息。

FAQ

1. 试剂盒中有变性蛋白裂解液和非变性蛋白裂解液，IP 实验中该如何运用？

A: 在 IP 实验验证中，Input 样本直接用于 SDS-PAGE 和 WB 实验，可用变性裂解液处理；而运用到 IP/Co-IP 实验操作中的样品，需要保持蛋白的活性，建议用非变性裂解液处理。

2. 说明书免疫沉淀部分，步骤（3）（6）中，为何要收集上清，不是只需要沉淀用于后续步骤吗？

A: 为了更好的分析实验结果，我们建议保留 IP 过程中的上清，并对其进行 WB 上样，以检验 IP 过程中磁珠与捕获抗体，样本与捕获抗体的结合情况，进而指导后续实验。

3. IP/Co-IP 实验中 IgG 阴性对照的意义是什么？

A: 理论上 IgG 并不能特异性的与任何蛋白结合，用 IP 捕获抗体相同物种来源的同型 IgG 作为抗体的阴性对照，可以用于排除样本中非特异性与 IgG 结合的蛋白，消除样本背景。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

相关产品

货号	品名	推荐原因
KTP2070	PurKine™ 抗体纯化试剂盒（蛋白 A/G）	高通量、高性能、高稳定性
A25012	IPKine™ HRP, Goat Anti-Mouse IgG LCS	特异性的识别 IgG 的轻链，避免重链的干扰
A25022	IPKine™ HRP, Mouse Anti-Rabbit IgG LCS	特异性的识别 IgG 的轻链，避免重链的干扰
A25112	IPKine™ HRP, Goat Anti-Mouse IgG HCS	特异性的识别 IgG 的重链，避免轻链的干扰
A25122	IPKine™ HRP, Mouse Anti-Rabbit IgG HCS	特异性的识别 IgG 的重链，避免轻链的干扰
ABT2014	Flag 标签小鼠单克隆抗体（1B10），磁珠偶联	特色的 Flag 标签小鼠单克隆抗体，专为靶蛋白的免疫沉淀设计
ABT2044	HA 标签小鼠单克隆抗体（4F6），磁珠偶联	特色的 HA 标签小鼠单克隆抗体，专为靶蛋白的免疫沉淀设计
ABT2064	Myc 标签小鼠单克隆抗体（2D5），磁珠偶联	特色的 Myc 标签小鼠单克隆抗体，专为靶蛋白的免疫沉淀设计
ATB2054	His 标签小鼠单克隆抗体（5C3），磁珠偶联	特色的 His 标签小鼠单克隆抗体，专为靶蛋白的免疫沉淀设计

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.