



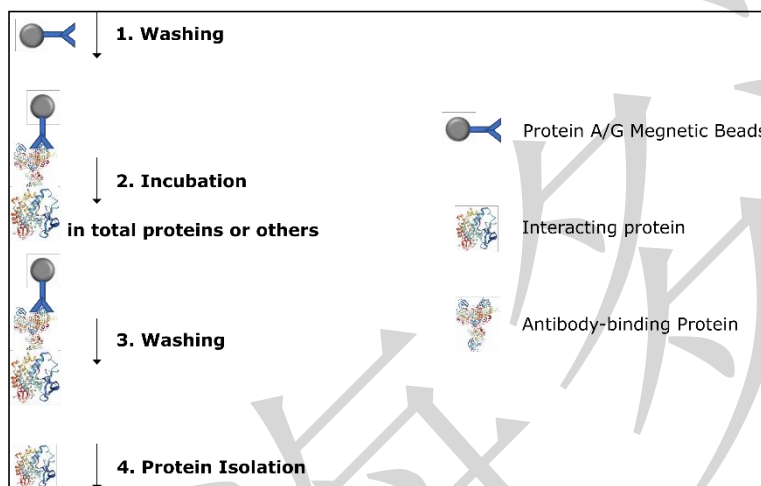
### Protein IP (Co-IP) Kit

产品货号	产品名称	包装
DW1128	Protein IP (Co-IP) Kit	20T

#### 产品简介:

细胞中存在大量蛋白-蛋白复合物，它们的相互作用发挥重要的生物学功能。Protein IP (Co-IP) Kit 提供 Protein A/G 磁珠，可稳定结合抗体及其复合物，从复杂的组分中分离与抗体特异性结合的蛋白质及其相互作用的蛋白质，后续可进行 WB、质谱等检测。

#### 操作流程:



#### 操作步骤:

##### 1. 细胞裂解及注意事项

1. 悬浮细胞: 收集细胞 (4°C, 500×g, 10 分钟), 每  $1 \times 10^7$  个细胞加入 500μL Protein IP Lysis Buffer (在使用前需加入蛋白酶抑制剂), 置于冰上 10 分钟, 期间混匀几次; 离心收集上清液 (4°C, 14000 g, 10 分钟), 置冰上备用或置 -80°C 长期保存。

2. 贴壁细胞: 弃掉培养基, PBS 洗 2 次; 每  $1.0 \times 10^7$  个细胞加入 10mL PBS, 将培养瓶或皿置于冰上, 用细胞刮刮取细胞, 离心收集细胞 (4°C, 14000 g,

10 分钟); 500μL Protein IP Lysis Buffer (在使用前需加入蛋白酶抑制剂), 离心收集上清液 (4°C, 14000 g, 10 分钟), 置冰上备用或置 -80°C 长期保存。

##### 2. 免疫复合物制备

1. 将每个样品 (细胞裂解液) 的总蛋白定量为 500-1000 μg (推荐)。

2. 用 Protein IP Lysis Buffer 将已定量的样品稀释至 500 μL, 加入 2-10 μg 抗体 (IP 级), 温和混匀。

3. 在室温旋转孵育 2 小时, 或 4°C 过夜, 以形成免疫复合物。

##### 3. 磁珠准备

1. 充分重悬 Protein A/G 磁珠, 吸取 25 μL 至 1.5 mL 离心管中。

2. 将离心管置于磁分离器上, 收集磁珠, 弃上清。

3. 加入 250 μL Wash Buffer, 充分重悬。

4. 将离心管置于磁分离器上, 收集磁珠, 弃上清。

5. 重复步骤 3 和 4 两次。



#### 4. 免疫沉淀

1. 加入 500  $\mu$ L 免疫复合物, 温和混匀, 在室温旋转孵育 1-2 小时。
2. 将离心管置于磁分离器上, 收集磁珠, 弃上清。
3. 加入 500 $\mu$ L Wash Buffer, 温和混匀。
4. 将离心管置于磁分离器上, 收集磁珠, 弃上清。
5. 重复步骤 3 和 4 两次。
6. 加入 500 $\mu$ L 无菌无酶水, 温和混匀。
7. 将离心管置于磁分离器上, 收集磁珠, 弃掉上清。【注】最后一次上清液可用于后续分析是否洗净。

#### 5. 蛋白分离

1. 【注】以下两种洗脱方案可据检测的需要选择:
2. 变性洗脱: 此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测:
3. 加入 25 $\mu$ L 1 $\times$ SDS-PAGE Loading Buffer 于离心管中, 混匀, 95 $^{\circ}$ C 加热
4. 5 分钟。
5. 将离心管置于磁分离器上, 收集上清至新的离心管, -20 $^{\circ}$ C 保存。
6. SDS-PAGE 检测。
7. 酸性洗脱: 此方法洗脱的样品可保持生物活性:
8. 加入 25 $\mu$ L 的洗脱缓冲液, 充分混匀, 室温孵育 10 分钟。
9. 将离心管置于磁分离器上, 收集上清至新的离心管, 立即加入 2.5 $\mu$ L 中和缓冲液, -80 $^{\circ}$ C 保存。

#### 本产品文章中的写法:

英文: Dowobio (Shanghai, China)

中文: 上海多沃生物科技有限公司 Dowobio, 上海