

#A10022

免疫共沉淀 (CoIP) 试剂盒

【琼脂糖介质】

□ 50 T



Order 021-34695924
orders@ab-mart.com
Support 400-6123-828
support1@ab-mart.com
Web www.abmart.cn

产品描述

免疫共沉淀 CoIP 试剂盒为准备细胞/组织提取物，抗原结合，洗脱步骤提供最优化的缓冲液. 试剂盒中提供的 ProteinA/G 琼脂糖 beads，比起传统的 protein A 或者 protein G 树脂，有更广的，更高效价的抗体亚型结合能力。可用于功能性实验，例如蛋白质或者蛋白质复合物的 IP/Co-IP。

产品储存

4° C 保存，不要-20° C 保存。

试剂盒组分

试剂名称	体积	保存条件
Lysis buffer	50ml	4 °C
10*Wash buffer	50ml	4 °C
1*SDS 样品缓冲液	3ml	4 °C
Protein A/G 琼脂糖珠	1ml	4 °C

注：Lysis buffer 使用前，立刻加入蛋白酶抑制剂(推荐购买 A10004 复合型蛋白酶抑制剂)。

使用方法

A. 制备细胞裂解物

1. 吸干培养基。添加含有调节分子的新鲜培养基，使其在预定的时间内对细胞进行处理。
2. 收集细胞，去除培养基后用冰预冷的 1X PBS 洗涤细胞一次。
3. 去除 PBS，并在并在细胞培养容器中加入适量的已经添加了 Cock tail 蛋白酶抑制剂的 Lysis buffer。每 10⁷ 个细胞加入 1ml 冰预冷的 Lysis buffer (相当于 100mm 的培养皿，150cm² 的培养瓶)，并在冰上孵育至少 5 分钟。
4. 从板上刮下细胞，把提取物转移至微量离心管。置于冰上。
5. 在冰上进行 3 次超声破碎，每次 5 秒。
6. 在 4° C，在 14,000 xg 条件下，微量离心 10 分钟，将上清转移到新管中。上清液即为细胞裂解物。如有必要，裂解物可保存在 -80° C。

注：细胞裂解物制备好之后，可先进行蛋白免疫印迹法检测，以此来确定细胞裂解物里存在目标蛋白。

B. 抗原抗体结合

1. 在新的离心管内加入 500 μl (含总蛋白 200-1000ug) 细胞裂解物。

2. 加入目标蛋白的单克隆/多克隆抗体 (1-10 μg , 根据抗体使用说明书)。
3. 同时采用非特异免疫的同源抗体作为对照。
4. 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻柔混合过夜。

C. 免疫复合物沉淀

1. 抗体孵育过夜后, 加入 20 μl Protein A/G。
2. 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 温和地混匀 1-3 小时或过夜。
3. 12000g 离心 1min, 保留沉淀。
4. 使用 0.5ml 1*Wash buffer 清洗沉淀, 12000g 离心 1min, 保留沉淀。
5. 重复第 4 步, 共计清洗 3 次。

注: 清洗, 去上清的时候需要注意避免吸走填料

D. 用蛋白免疫印迹法进行分析

1. 在 20-50 μl 1* SDS 样品缓冲液中重悬沉淀物。涡旋振荡, 然后再微量离心 30 秒。
2. 将样品加热至 95 - 100 $^{\circ}\text{C}$ 并持续 2-5 分钟, 然后在 14,000 x g 下瞬时离心 1 分钟。
3. 将样品 (15-30 μl) 上样到 SDS-PAGE 凝胶上。
4. 用蛋白质印迹法分析样品。

如果抗体轻重链污染会影响结果分析, 可选择 Abmart 的避重轻链二抗来解决这个问题, 产品货号: M20014-M20017。

注意事项

实验前: 为了获得更好的实验结果, 所有的步骤均需要根据实际情况进行优化。

例如: 根据细胞系或被捕获的抗原后续用途的不同可选择更加合适的细胞裂解条件。对于没有细胞壁结构的哺乳动物细胞, 可以直接使用去污剂进行裂解, 但其它细胞, 则需要一些机械剪切力辅助, 例如超声破碎。以下列出的 (包括裂解液、孵育时间、体积及浓度) 是作为初始尝试的条件建议, 最终的优化需要根据实际情况调整。

另外, 细胞裂解物在进行免疫(共)沉淀前, 可先进行蛋白免疫印迹法检测, 以此来确定细胞裂解物里存在目标蛋白。

其他推荐产品

- | | |
|---------|--|
| #A10004 | 200X 蛋白酶抑制剂复合物 (200X Protease Inhibitor Cocktail) 【使用简单方便】 |
| #A10006 | 彩色预染蛋白 Marker (11-180kDa) 【超级性价比】 |
| #A10008 | 膜蛋白提取试剂盒 【有效富集膜蛋白, 小白秒变高手】 |
| #A10009 | 核蛋白提取试剂盒 【有效富集核蛋白, 小白秒变高手】 |
| #A10010 | 1X 丽春红快染液 【转膜效果质控好帮手】 |
| #A10013 | SDS-PAGE 快速染色液 【2 分钟出条带, 再也不同等过夜了】 |