

GenSeq® Co-IP试剂盒

GS-EG-008

Instruction Manual Version 1.0

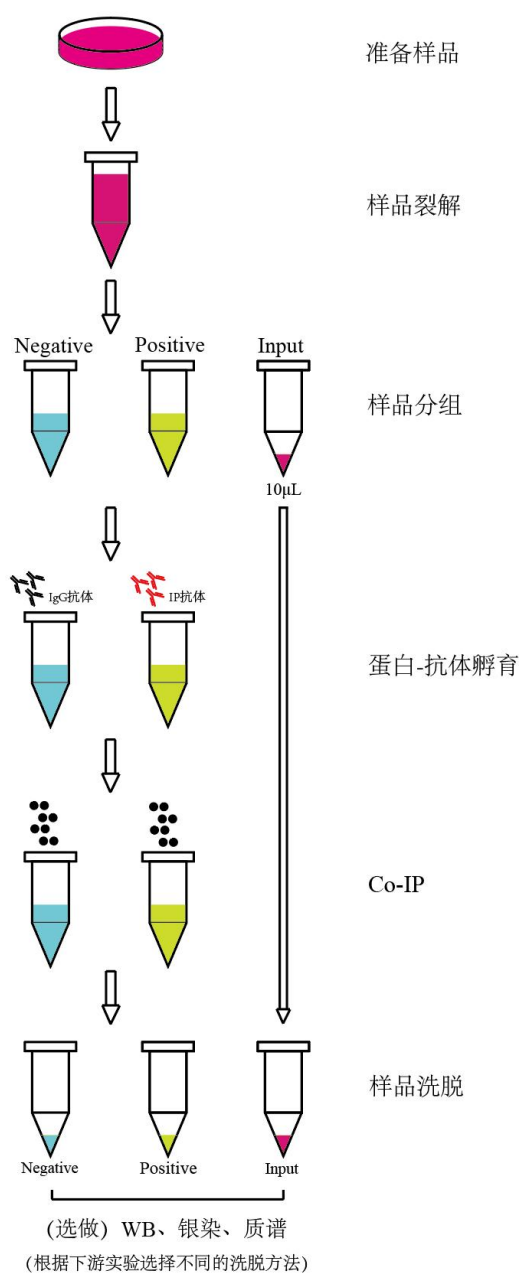
(Updated, Feb 2025)

产品简介

Co-IP（共免疫沉淀）是一种经典且关键的用于研究蛋白质-蛋白质相互作用的实验技术，在细胞信号通路、蛋白复合物组成以及蛋白质功能研究等诸多领域发挥着重要作用。通过特异性抗体与目标蛋白结合，将与之相互作用的蛋白一并“拉下来”，从而实现了对蛋白质相互作用网络的探索。

GenSeq® Co-IP 试剂盒专为 Co-IP 实验精心设计，涵盖了 Co-IP 流程中的所有核心试剂，致力于为研究人员提供高性价比的解决方案。经过特别优化的实验流程，不仅能够高效富集低丰度的目的蛋白-蛋白相互作用复合物，而且显著提高了信噪比，有效减少非特异性结合的干扰。利用 Co-IP 实验获得的产物，可以通过 Western Blot 检测特定的相互作用蛋白是否与目标蛋白结合，通过质谱实验可以鉴定与目标蛋白相互作用的其他蛋白种类。

实验流程图



试剂盒组分（12 次反应*）	体积	保存条件
RIPA Buffer	4 mL	4°C
PGM Beads	630 µL	4°C
10 × Co-IP Wash Buffer	5 mL	4°C
Protease Inhibitor	17 µL	-20°C
IgG 抗体	20 µL	-20°C
2×SDS-PAGE Loading Buffer	400 µL	-20°C

*:此规格试剂盒可用于 6 次目标抗体 Co-IP 反应+ 6 次 IgG 抗体 Co-IP 反应。

试剂盒组分 (24 次反应*)	体积	保存条件
RIPA Buffer	8 mL	4°C
PGM Beads	1.3 mL	4°C
10 × Co-IP Wash Buffer	10 mL	4°C
Protease Inhibitor	34 µL	-20°C
IgG 抗体	40 µL	-20°C
2×SDS-PAGE Loading Buffer	800 µL	-20°C

*:此规格试剂盒可用于 12 次目标抗体 Co-IP 反应+ 12 次 IgG 抗体 Co-IP 反应。

自备材料

- ✓ 磁力架（适配1.5 mL EP管）
- ✓ 移液器及吸头（无核酸酶）
- ✓ 无核酸酶管（1.5 mL EP 管）
- ✓ 4℃ 离心机
- ✓ 涡旋混匀仪
- ✓ 无核酸酶水
- ✓ PBS 缓冲液

实验步骤

1. 样品预处理

✧配置 Complete Lysis Buffer

根据反应数，按下表配置合适体积的 Complete Lysis Buffer*，混匀后冰上放置备用。

	× 1	× N
RIPA Buffer	500 μ L	500 μ L × N
Protease Inhibitor	2.5 μ L	2.5 μ L × N

*：一般而言，每个样品约需 500 μ L Complete Lysis Buffer。

✧悬浮细胞：

- 1) 取约 1×10^7 细胞在 4°C 1,000g 离心 5 min，收集细胞沉淀，吸弃上清；
- 2) 用 1 mL 冰上预冷的 1 × PBS 重悬细胞沉淀，4°C，1,000g 离心 5 min，小心吸弃上清；
- 3) 重复步骤（2）一次；
- 4) 根据反应数，用合适体积的 Complete Lysis Buffer 重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解 10 min；
- 5) 14,000g，4°C 离心 10 min，吸取上清，即为蛋白裂解产物；
- 6) 可取 10 μ L 蛋白裂解产物作为 input 组放入 -80°C 保存备用，剩下蛋白裂解产物一分为二进行后续实验，一份用于目标抗体 Co-IP 反应，一份用于 IgG 抗体 Co-IP 反应。

✧单层细胞或贴壁细胞

- 1) 用 10 mL 冰上预冷的 1 × PBS 清洗培养皿或培养瓶中的细胞两次；
- 2) 加入 10 mL 预冷 PBS 后用细胞刮将细胞刮下来，收集至 EP 管中；
- 3) 4°C，1,000g 离心 5 min，小心吸弃上清，收集细胞沉淀；
- 4) 根据反应数，用合适体积的 Complete Lysis Buffer 重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解 10 min；
- 5) 14,000g，4°C 离心 10 min，吸取上清，即为蛋白裂解产物；
- 6) 可取 10 μ L 蛋白裂解产物作为 input 组放入 -80°C 保存备用，剩下蛋白裂解产物一分为二进行后续实验，一份用于目标抗体 Co-IP 反应，一份用于 IgG 抗体 Co-IP 反应。

✧组织样品

- 1) 取 100 mg 新鲜组织，在冰上预冷的 1 × PBS 中洗涤组织以去除血液等杂质；
- 2) 将清洗后的组织转移至适量预冷的 1 × PBS 中，用匀浆器或其他细胞分离设备使组织分散为单个细胞。（注意：步骤（1-2）操作须迅速，尽量 5 min 内完成，避免时间太久导致 RNA 降解）；
- 3) 4°C，1,000g 离心 5 min，弃上清，收集细胞沉淀；

- 4) 根据反应数，用合适体积的Complete Lysis Buffer重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解10 min；
- 5) 14,000g，4℃离心10 min，吸取上清，即为蛋白裂解产物；
- 6) 可取10 μL蛋白裂解产物作为 input 组放入-80℃保存备用，剩下蛋白裂解产物一分为二进行后续实验，一份用于目标抗体 Co-IP 反应，一份用于IgG抗体Co-IP 反应。

2. 蛋白-抗体孵育

- 7) 在步骤 6) 中的蛋白裂解产物中加入3 μL抗体*；
*: 目标抗体 Co-IP 反应使用目标抗体，IgG抗体Co-IP 反应使用IgG抗体。
- 8) 移液枪轻柔吹打混匀，室温旋转混匀 1 h。

3. 磁珠准备

- 9) 按反应数准备新的 1.5 mL EP 管，EP 管上做好标记；
- 10) 短暂振荡混匀 PGM Beads，分别取 50 μL 至每个准备好的 EP 管中；
- 11) 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约2 min）；
- 12) 吸弃上清，勿搅动磁珠，从磁力架上取下 EP管；
- 13) 用 1 × Co-IP Wash Buffer 洗涤 PGM Beads：
 - a. 从磁力架取下 EP 管后加入200 μL 1 × Co-IP Wash Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀；
 - b. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约2 min）；
 - c. 吸弃上清，勿搅动磁珠。
- 14) 重复步骤 13)，再次洗涤并弃上清。

4. Co-IP

- 15) 加入步骤8) 中蛋白-抗体复合物到磁珠中，移液枪轻柔吹打混匀；
- 16) 4℃旋转孵育2 h*；
*孵育时间若过度延长，会增加产物的非特异性，影响实验结果准确性。
- 17) 短暂离心，将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min）；
- 18) 吸弃上清，勿搅动磁珠；
- 19) 用 500 μL冰上预冷的 1 × Co-IP Wash Buffer 洗涤 PGM Beads：
 - a. 从磁力架取下 EP 管后加入 500 μL 冰上预冷的 1 × Co-IP Wash Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀；
 - b. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min）；
 - c. 吸弃上清，勿搅动磁珠。
- 20) 重复步骤19) 五次（即：用 冰上预冷的 1 × Co-IP Wash Buffer清洗磁珠共计 6 次）。

5. (选做) 蛋白洗脱

21) 后续实验为质谱:

- a. 加入 200 μ L 冰上预冷的 1 $\times$ PBS 到磁珠中, 移液枪轻柔吹打混匀;
- b. 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清 (约 2 min);
- c. 吸弃上清, 勿扰动磁珠;
- d. -80 $^{\circ}$ C 保存磁珠用于后续实验。

22) 后续实验为银染或 WB:

- a. 加入 30 μ L 2 $\times$ SDS-PAGE Loading Buffer 到磁珠中, 移液枪轻柔吹打混匀;
- b. 95 $^{\circ}$ C 孵育 5-10 min;
- c. 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清 (约 2 min);
- d. 吸取上清至新的 EP 管中, 勿扰动磁珠;
- e. -80 $^{\circ}$ C 保存上清用于后续实验。

FAQ

.....

1. 为什么WB检测结果显示条带不符？

Re: WB检测结果显示条带不符的原因主要有以下几种情况：

- 1) 样本投入量过多或过少，导致裂解不充分，或目标蛋白含量太低，提取核蛋白可适当增加细胞或组织的用量，以获得足够实验所需的蛋白量，具体使用量还需要根据实际操作来摸索。
- 2) 探针使用量较低，结合的目标蛋白太少。
- 3) 非特异结合过多，可以调整孵育时间、洗涤次数、探针用量等，提高结合效率。
- 4) 蛋白样本降解，可通过添加蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、样本分装减少冻融次数等方法防止降解。
- 5) RNA探针降解，需要保持操作环境无核酸酶污染，可通过电泳检测探针完整性。

2. 为什么银染后没有目的条带？

Re: 银染实验的灵敏度有限，可能会存在无法显示目的条带的情况，以质谱结果为准。

相关产品:

试剂盒	货号	规格
GenSeq® m6A MeRIP Kit	GS-ET-001	12T、24T、48T
GenSeq® m1A MeRIP Kit	GS-ET-002	12T、24T、48T
GenSeq® m5C MeRIP Kit	GS-ET-003	12T、24T、48T
GenSeq® m7G MeRIP Kit	GS-ET-004	12T、24T、48T
GenSeq® ac4C IP Kit	GS-ET-005	12T、24T、48T
GenSeq® RIP Kit	GS-ET-006	12T、24T、48T
GenSeq® O8G IP Kit	GS-ET-007	12T、24T、48T
GenSeq® Ψ IP Kit	GS-ET-008	12T、24T、48T
GenSeq Hi-C Kit	GS-EG-003	6T
GenSeq® Co-Immunoprecipitation (CoIP) Kit	GS-EG-008	6T、12T、24T
GenSeq® CHIRP Kit	GS-EG-009	6T、12T、24T
GenSeq® RNA Pull Down Kit	GS-EG-010	6T、12T、24T
GenSeq® RCA DNA Amplification Kit	GS-MB-002	25T、100T

上海云序生物科技有限公司

服务电话：021-64878766

网址：<http://www.cloud-seq.com.cn>

地址：上海市松江区漕河泾莘砖公路518号24号楼4楼

