# Waals™ Protein IP (Co-IP) Kit

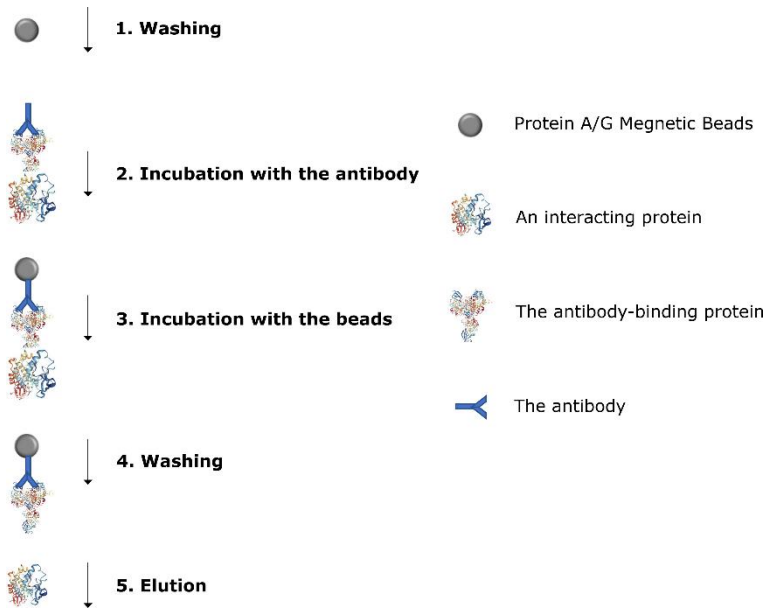


## 操作说明

- **描　述：** Waals™ Protein IP (Co-IP) Kit，包含 Protein A/G Magnetic Beads, Waals™ Protein IP Lysis Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, Neutralization Buffer。
- **试剂盒储存：** Waals™ Protein IP (Co-IP) Kit，4℃储存（勿冷冻）。
- **自备试剂：** 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂（按需）
- **介　绍**

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。Waals™ Protein IP (Co-IP) Kit 提供 Protein A/G Beads，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



Protein IP 实验流程图

## 操作步骤



### ■ 细胞裂解及注意事项

1. 悬浮细胞：收集细胞（4℃，500×g，10 分钟），每 $1\times10^7$ 个细胞加入 500μL Protein IP Lysis Buffer（在使用前需加入蛋白酶抑制剂；若检测磷酸化蛋白质还应加入磷酸酶抑制剂），置于冰上 10 分钟，期间混匀几次；离心收集上清液（4℃，14000×g，10 分钟），置冰上备用或置-80℃长期保存。
2. 贴壁细胞：弃掉培养基，PBS 洗 2 次；每 $1.0\times10^7$ 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℃，14000×g，10 分钟）；500μL Protein IP Lysis Buffer（在使用前需加入蛋白酶抑制剂；若检测磷酸化蛋白质还应加入磷酸酶抑制剂），离心收集上清液（4℃，14000×g，10 分钟），置冰上备用或置-80℃长期保存。

### ■ 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 500-1000μg（推荐）。
2. 用 Protein IP Lysis Buffer 将已定量的样品稀释至 500μL，加入 2–10μg 抗体（IP 级），温和混匀。
3. 在室温旋转孵育 2 小时，或 4℃过夜（推荐），以形成免疫复合物。

### ■ 磁珠准备

1. 充分重悬 Protein A/G 磁珠，吸取 25μL 至 1.5mL 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 500μL 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。

■ **免疫沉淀**

1. 加入 500μL 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 500μL 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 4，三次。【注】可根据情况增加或减少洗涤次数。
6. 加入 500μL 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。

■ **蛋白分离**

【注】以下两种洗脱方案可据检测的需要选择：

1. 变性洗脱：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测：

1) 加入 25μL 1×SDS-PAGE Loading Buffer 于离心管中，混匀，95℃加热 5 分钟。
2) 将离心管置于磁分离器上，收集上清至新的离心管，-20℃保存。
3) SDS-PAGE 检测。

2. 酸性洗脱：此方法洗脱的样品可保持生物活性：

1) 加入 25μL Elution Buffer，充分混匀，室温孵育 10 分钟。
2) 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 2.5μL Neutralization Buffer，-80℃保存。