货号	名称	规格	存储
F1601-12T	Flag 标签 Co-IP 试剂盒（动物）	12T	-20℃
F1601-24T	Flag 标签 Co-IP 试剂盒（动物）	24T	-20℃

产品简介

本试剂盒采用 Anti-Flag 磁珠来完成 Flag 标签（DYKDDDDK）融合蛋白的免疫共沉淀实验。 Anti-Flag 磁珠偶联的是经过严格筛选、优化并重组表达的无轻、重链的 Flag 抗体，所以 IP 洗脱液中 不会有抗体轻、重链污染。

实验前先将 Flag 标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达。裂解样本后，将 Anti-Flag 磁珠加入 样本中，磁珠上偶联的 Flag 抗体与 Flag 标签融合蛋白及其结合蛋白形成复合体，去除未结合的蛋白后，可以采用 多种方法洗脱蛋白质。

试剂盒成分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	Anti-Flag 磁珠	250 μL	500 μL	4℃，1 年
②	裂解缓冲液	7mL	14mL	4℃，1 年
③	漂洗液	25mL	50mL	4℃，1 年
④	洗脱缓冲液	650 μL	1.3mL	-20℃，1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	190 μL	380 μL	-20℃，1 年
⑥	10mL 离心管	1 个	1 个	——

★注意：该试剂盒包含足够完成 12、24 或 40 个反应的试剂，每个反应使用 40 μL 磁珠。由于每次 pull-down 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组，因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

额外所需材料

1. 自备试剂：Flag 抗体、PBS。
2. 所需仪器：磁力架、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

使用说明

I 注意事项

1. 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋磁珠，禁止长时间置于磁场，这些操作可能会引起磁珠聚团，降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
3. 实验的具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

II 操作方法

1. 样本裂解

1.1 动物细胞

(1) 实验组和对照组各取 1*10⁷～2*10e⁷个细胞，用预冷的 PBS 清洗细胞 2～3 次，每次 4℃ 500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，彻底去除培养基成分；

(2) 将样本置于冰上，每组加入 300～500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3～5 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀；

(3) 为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清；如果无超声条件，可置于冰上裂解 30 min，期间每 10 min 涡旋混匀一次，每次 5s；

(4) 4℃ 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；取 30 μL 作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，置于冰上备用或-80℃保存。

1.2 动物组织

(1) 采用预冷的 PBS 清洗新鲜组织 2～3 次，彻底去除血液等成分；如果样本为冷冻组织，在取样时也需要进行清洗操作；

(2) 实验组和对照组各取 0.1～0.2 g 干净组织，用液氮在研钵中充分研磨，转移粉末至预冷的、新的离心管中；

(3) 将样本置于冰上，每组加入 300～500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3～5 μL⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀；

(4) 冰上超声破碎至溶液基本澄清；

(5) 4℃ 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；

(6) 取 30 μL 作为 input，剩余用于 Co-IP 实验，置于冰上备用或-80℃保存。

*** 注意：**

i. 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以增加裂解缓冲液或改善超声条件继续裂解。超声条件因样本类型和超声设备而异，应提前摸索好合适的条件。样本蛋白浓度通常不低于 5 μg/μL，总量约 2～3 mg。

iii. 如果样本中目标蛋白或 RNA 丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

2. 漂洗液准备

为了防止实验过程中的蛋白降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出⑥10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL③漂洗液、19 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

4. 免疫共沉淀

(1) 将①Anti-Flag 磁珠上下颠倒混匀，每组取 20 μL 磁珠到新的离心管中。

(2) 每组加入 200μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 并弃上清。

(3) 重复上步操作一次。

(4) 向磁珠中加入相应组别的样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上室温孵育 1 h 或 4 ℃孵育 4 h。

(5) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(6) 每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(7) 重复上步操作两次，共漂洗三次，保留磁珠。

4. 蛋白洗脱

本说明书提供以下两种蛋白洗脱方案，操作者可以根据后期检测的需要选择合适的洗脱方法。

(1) 非变性洗脱法：向磁珠中加入 50μL ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20s，放混匀仪上室温洗脱 10～15 min；涡旋震荡 20s，1000g 离心 20s，放磁力架上静置 1min，收集上清至新的离心管中，-80℃保存。该洗脱产物保持原有的生物活性，适用于后期各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。

(2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，95℃加热 5 min；磁力架上静置 1min，收集上清至新的离心管中。该洗脱产物适用于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检 测；如果需要进行质谱检测，则切胶条后送检。

*** 注意：** i. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱。

ii. 如果选择非变性洗脱法，可以暂时保留洗脱后的磁珠，当非变性洗脱效率较低时，则采用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法继续洗脱蛋白。

iii. Co-IP 捕获的蛋白量通常较少，因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色，染色步骤参考如下：（为了便于称量，每步配置的溶液体积较大，实际操作时取适量溶液浸泡胶即可）

(1) 固定：30 min（乙醇：乙酸：水=4：1：5 体积比）；

(2) 敏化：30 min（乙酸钠 10.2 g，硫代硫酸钠 0.471 g，乙醇 45 mL，加水至 150 mL）；

(3) 水洗：4 次，每次 10 min；

(4) 银染：30 min（硝酸银 0.375 g，加水至 150 mL）；

(5) 水洗：2 次，每次 40 s；

(6) 显色：显影至条带清楚（碳酸钠 3.75 g，60 μL 甲醛，加水至 150 mL）；

(7) 终止：5 min（Na2EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的复合产物少	样本量不够	提高样本用量
	孵育时间不够	延长孵育时间（如孵育过夜），但需要注意孵育时间过长也可能会导致非特异性结合增多
	RNA 探针量不够	提高 RNA 探针用量
SDS-PAGE 检测有很多非特异结合的条带	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数，或样本预处理：先与磁珠孵育，去除非特异结合蛋白

使用案例

实验目标：检检测样本中的诱饵蛋白与猎物蛋白之间是否有相互作用。

(1) 实验组：表达 Flag 空载体和猎物蛋白的样本采用 Anti-Flag 磁珠进行 Co-IP；

(2) 对照组：表达 Flag-诱饵蛋白和猎物蛋白的样本采用 Anti-Flag 磁珠进行 Co-IP。

