

免疫沉淀 (IP)

溶液和试剂配制

1. PBS缓冲液：用PBS粉末和ddH₂O配成。
2. 5×SDS上样缓冲液：称取0.606 g Tris, 加5 mL ddH₂O溶解, 用1 M HCl调 pH 至 6.8。加入1 g SDS, 搅拌至完全溶解, 再加入5 mL甘油和0.025 g 溴酚蓝, 充分混匀, 用ddH₂O定容至10 mL, 分装成1 mL/管, -20°C存储。使用前每管加入100 μL β-巯基乙醇。

实验操作流程

A. 样本制备：

- 1、收集细胞, 用PBS洗涤细胞2次。
- 2、加入细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 用细胞刮将细胞刮下后, 收集至1.5 mL EP管中 (置于冰上)。每10 cm培养皿加1 mL裂解液, 六孔板每个孔加400-500 μL裂解液。
- 3、将EP管转移至垂直混匀仪上, 4°C混旋15 min, 使细胞充分裂解。

B. Beads预处理：

- 1、取适量protein A/G beads加入EP管中, 加1 mL PBS缓冲液, 轻摇混匀, 以4000 rpm、4°C离心1min, 弃上清。重复洗涤1次。
- 2、加1 mL细胞裂解液 (不含蛋白酶抑制剂), 轻摇混匀, 以4000 rpm、4°C离心1min, 将beads缓冲液置换为细胞裂解液。弃上清, 将beads置于冰上备用。

C. 样本-抗体-beads结合：

- 1、将裂解完成的细胞, 以12000 rpm、4°C离心15 min。吸取50 μL上清液到EP管, 留着后续做Western Blot分析。剩余上清液加入含有beads的EP管中。
- 2、加入针对目标蛋白的IP抗体 (抗体稀释度可参考产品网站)。
- 3、将EP管转移到垂直混匀仪上, 4°C混旋3-4 h。
- 4、以4000 rpm、4°C离心1min, 弃上清。
- 5、加1 mL细胞裂解液 (无蛋白酶抑制剂), 继续用垂直混匀仪4°C混旋10 min。以4000 rpm、4°C离心1min, 弃上清。此步骤重复3次。

D. 热变性洗脱：

- 1、每个EP管留约50 μL沉淀, 加入适量SDS上样缓冲液, 100°C金属浴煮10 min, 从而将目标蛋白从beads洗脱下来。
- 2、以4000 rpm、4°C离心1min, 吸取上清液。上清液中含目标蛋白, 用于后续实验。



实验注意事项

1. 本操作步骤中所描述的beads为琼脂糖凝胶 (Protein A/G Agarose, C0132), 可采用低速离心法分离目标蛋白和beads。若使用Protein A/G 磁珠 (C0104B) 则不适用离心法, 应采用磁力架分离目标蛋白和磁珠。具体操作为: 将磁珠和蛋白混合液置于磁力架上, 静置1-2 min, 待磁珠完全吸附于管壁后, 吸取上清液即可。
2. PBS缓冲液使用前应预先置于4°C预冷。

实验相关产品推荐

A. 免疫沉淀Beads:

- 1、Protein A/G Agarose, C0132
- 2、Protein A/G Immunomagnetic Beads, C0104B
- 3、Magrose Beads Protein A/G, C0146
- 4、Protein A/G Immunoprecipitation Kit, C0104

B. 细胞裂解液:

- 1、RIPA Lysis Buffer (Strong), C0045
- 2、RIPA Lysis Buffer (Medium), C0046
- 3、RIPA Lysis Buffer (Weak), C0047

C. 蛋白酶抑制剂:

- 1、Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-Free, 100× in DMSO), C0001
- 2、Protease Inhibitor Cocktail, MS-safe (10×), C0055
- 3、Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, MS-safe (10×), C0057

D. IP实验用抗体: <https://www.targetmol.cn/all-antibodies>

