

## IP 检测（琼脂糖偶联抗体、亲和凝胶偶联抗体）

### 一、实验试剂

- (1) Agarose Beads, or Affinity Gel
- (2) 裂解液&洗杂液: Cell lysis buffer for IP (without inhibitors) (RM00022)
- (3) 蛋白酶抑制剂(RM02916)
- (4) 1×PBS 缓冲液(RM00012)
- (5) 5×loading buffer (RM00001) 或 非还原性 5× SDS sample buffer (使用时用去离子水稀释至工作浓度即可)
- (6) 洗脱液: 0.1-0.2M 甘氨酸, pH:2.5-3.1
- (7) 中和液: 1M Tris-base pH:10.4

### 二、实验步骤

#### 1、样本处理

- (1) 贴壁培养细胞
  - a. 去除贴壁细胞的培养液, 用 PBS 或无血清培养基清洗 1 次, 低速离心, 弃上清, 留取沉淀。
  - b.  $10^7$  细胞加入 1ml 提前预混含有蛋白酶抑制剂的 Cell lysis buffer for IP, 移液器轻轻吹打, 使裂解液和细胞充分接触。2-8℃ 旋转 15min, 20 转/min。
  - c. 低温下 30W 超声 1min。
  - d. 14000g, 4℃ 离心 10min, 小心吸取上清。
- (2) 悬浮培养细胞
  - a. 低速离心悬浮细胞, 弃上清, 收集沉淀。
  - b.  $10^7$  细胞加入 1ml 提前预混含有蛋白酶抑制剂的 Cell lysis buffer for IP, 移液器轻轻吹打, 使裂解液和细胞充分接触。2-8℃ 旋转 15min, 20 转/min, 充分裂解后应无明显沉淀。
  - c. 低温下超声 1min。
  - d. 14000g, 4℃ 离心 10min, 小心吸取上清。
- (3) 组织样本
  - a. 把组织剪切成细小的碎片。
  - b. 取液氮或超低温冰箱中冷冻 30min 以上的组织, 迅速用液氮研磨, 研磨过程尽量控制在 1~2min 之内, 以减少蛋白的降解, 按照每 100-200mg 组织加入 1ml 提前预混含有蛋白酶抑

制剂的 Cell lysis buffer for IP。

c. 4℃ 旋转混匀裂解 15min。

(步骤 b, c 也可采用以下过程: 每 100-200mg 组织加入 1ml 提前预混含有蛋白酶抑制剂的 Cell lysis buffer for IP。低温下用玻璃匀浆器或组织研磨器匀浆, 直至充分裂解, 过程尽量控制在 1~2min 之内, 以减少蛋白的降解。)

d. 低温下超声 2min。

e. 14000g, 4℃ 离心 10min, 小心吸取上清

## 2、琼脂糖、亲和凝胶预处理

(1) 将 Agarose Beads, or Affinity Gel 颠倒或漩涡混匀 (溶液无分层)。

(2) 取 30-40μl Agarose Beads, or Affinity Gel 至新的 EP 管中, 加入 500ul 预冷的 Cell lysis buffer for IP, 4℃、1200g 离心 2 分钟, 去掉上清, 重复 2 次, 共洗涤 3 次。

## 3、结合蛋白

(1) 将含有抗原的样品 (通常 300μl, 总蛋白 200-500μg 或者纯化后蛋白 20μg 左右) 加入已处理好的 Agarose Beads, or Affinity Gel 中, 置于翻转混合仪 4℃ 下反应 2h 或过夜。

(2) 将上述完成孵育的复合物, 4℃、1200g 离心 2 分钟, 弃上清。

(3) 向离心管中加入 1ml Cell lysis buffer for IP, 置于翻转混合仪上旋转 5min, 4℃、1200g 离心 2 分钟, 去掉上清, 重复 3 次, 共洗涤 4 次。

## 4、抗原洗脱

(1) 变性洗脱

此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。

a. 4℃、1200g 离心 2 分钟, 去除上清后, 向其中加入 35μl 1X SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀, 95℃ 加热 10min

b. 室温 1200g 离心 2 分钟, 收集 30ul 上清液。进行后续 SDS-PAGE 检测

(2) 非变性洗脱

a. Agarose Beads, or Affinity Gel 除上清后, 加入 50μl 洗脱液, 混合均匀, 室温孵育 5min。

b. 1200g 离心 2 分钟, 收集上清液至新的 EP 管中。

c. 加入 5-10ul 中和液中和至 pH7.0-8.0。用于后期功能分析。