

IP 检测

一、 实验试剂:

- (1) Protein A/G Magnetic beads
- (2) 裂解液&洗杂液: Cell lysis buffer for IP (without inhibitors) (RM00022)
- (3) 蛋白酶抑制剂(RM02916)
- (4) 封闭液: 含 3%BSA 的 1X PBS
- (5) 1×PBS 缓冲液(RM00012)
- (6) 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)
- (7) 洗脱液: 0.1-0.2M 甘氨酸, pH:2.5-3.1
- (8) 中和液: 1M Tris-base pH:10.4
- (9) Control IgG (AC005/ AC011/AC034)

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, 300g 离心 5min, 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. 300g, 5min 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 30W 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 30W 超声 2min。

e. 14000g, 4℃ 离心 10min, 小心吸取上清

2、磁珠预处理

（1）将 Protein A/G Magnetic beads 颠倒或漩涡混匀，翻转瓶身发现底部无黑色沉淀即可。

（2）取 10-15 μ l Protein A/G beads 至新的 EP 管中，放在磁力架上，待溶液澄清后，用移液器吸弃保护液。

（3）将 EP 管从磁分离器上取下来，加入 1ml Cell lysis buffer for IP 混匀，瞬时离心后，放置在磁力架上收集磁珠，弃上清，重复 2 次。

（4）将 EP 管从磁分离器上取下来，加入 1mL 的 3% BSA，置于翻转混合仪 4℃ 封闭 1h。

（5）将 EP 管从磁分离器上取下来，加入 1ml Cell lysis buffer for IP 混匀，瞬时离心后，放置在磁力架上收集磁珠，弃上清，重复 2 次，备用。

3、磁珠、抗原-抗体复合物结合

（1）将含有抗原的 300ul 样品（总蛋白量 200-1000 μ g，剩余体积用提前预混的含有蛋白酶抑制剂的 Cell lysis buffer for IP 补至 300ul）中加入目标抗体（0.5-5 μ g），置于翻转混合仪上 4℃ 下反应 2h 或过夜。

（2）将上述完成抗体-抗原结合的复合物与备用好的磁珠进行混合，置于 4℃ 下反应 2h，根据磁珠与抗体结合的能力可适当延长孵育时间，建议不超过 3h，若抗体稀缺可先将抗体与磁珠 4℃ 过夜孵育后，清洗后进行样本孵育。

（3）将上述磁珠-抗体-抗原复合物放在磁力架上进行分离，收集上清液，以备后续检测。

（4）向离心管中加入 1ml Cell lysis buffer for IP，置于翻转混合仪上旋转 5min，瞬时离心后置于磁力架上分离磁珠，弃上清液；从磁力架上取下离心管，重复洗涤 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. 去除上清后，向其中加入 35 μ l 1X SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95 $^{\circ}$ C 加热 10min
- b. 磁力架上进行磁性分离，收集上清液进行 SDS-PAGE 检测

（该步骤也可改用

a.从磁力架上取下离心管，向其中加入 35 μ l 非还原性 1X SDS sample Buffer 混合均匀，室温静置 10min，置于磁力架上进行磁性分离，收集上清液。

b.加入 3.8 μ l 10X DTT，95 $^{\circ}$ C 加热 10min，进行 SDS-PAGE 检测。）

（2）非变性洗脱

- a.向磁珠-抗体-抗原复合物中加入 50 μ l 洗脱液，混合均匀，室温孵育 10min。
- b.置于磁力架上进行磁性分离，收集洗脱液至新的 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。