

免疫沉淀 (IP) 实验方案

IP(Immunoprecipitation)是利用抗原蛋白质和抗体的特异性结合以及细菌蛋白质的“Prorein A”特异性地结合到免疫球蛋白的 FC 片段的现象而开发出来的方法。目前,多用精制的 Prorein A 预先结合固化在 Argarose 的 Beads 上,与含有抗原的溶液及抗体反应后, Beads 上的 ProreinA 就能吸附抗原达到精制的目的。

*该实验方案仅供参考。请优化程序,因为不同样品的实验条件可能有所不同。

样品制备

非变性:

- 1) 将细胞培养皿置于冰上,并用冰冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞。
- 2) 吸净 PBS 并添加冰冷的裂解缓冲液。
- 3) 使用细胞刮刀将细胞从培养皿上刮下,然后将细胞悬浮液轻轻转移至微量离心管中。
- 4) 4°C 振动 30 分钟。
- 5) 4°C 离心 10~15 分钟。离心的时间和力度可能因细胞类型而异。
- 6) 从离心机中取出 EP 管并置于冰上,将上清转移至冰上的新 EP 管中。

变性:

- 1) 向细胞中添加 100uL 变性裂解缓冲液。
- 2) 剧烈涡旋 2~3 秒,充分混合。
- 3) 将细胞悬液转移至微量离心管中。
- 4) 95°C 加热 5 分钟使样品变性。
- 5) 加入 0.9mL 非变性裂解缓冲液稀释悬浮液,轻轻混合。
- 6) 通过针头注射器吹打裂解后的悬浮液 5-10 次,从而打碎 DNA。
- 7) 在冰上孵育 5 分钟。

组织裂解物:

- 1) 用干净的工具快速解剖组织。如果可能,请在冰上进行,以防止降解。
- 2) 将组织放入微量离心管中,并浸入液氮中快速冷冻。
- 3) 约 5mg 组织加入 300uL 裂解缓冲液,用电动匀浆器匀浆。
- 4) 另两次加入 300uL 裂解缓冲液冲洗,并在 4°C 振动 2 小时。

注意:如果需要变性,请按照上述变性方案中的步骤 2-5 进行操作。

- 5) 4°C、12,000rpm 离心 20 分钟。将上清转移至冰上的新 EP 管中。

预清除裂解物

- 1) 将 100uL beads 添加到 1mL 裂解液中,并在 4°C 下旋转孵育 30 分钟。
- 2) 4°C、500 xg 离心 5 分钟。
- 3) 将上清转移至冰上的新 EP 管中,此上清液用于免疫沉淀。

免疫沉淀

- 1) 将细胞裂解液添加到低吸附微量离心管中, 并添加推荐量的抗体。
- 2) 将样品与抗体在 4°C 下旋转孵育几个小时。

注意: 孵育时间取决于蛋白质的量和抗体的亲和力特性。

- 3) Beads 平衡。
- 4) 取 20~50uL 上述平衡后的 beads 混合液, 加入到样品中。
- 5) 4°C 旋转孵育 1~4 小时。
- 6) 4°C、500 xg 离心 3 分钟, 加入裂解缓冲液洗涤 3 次。
- 7) 添加 25-50 uL 2x 上样缓冲液并在 100°C 下煮沸 5 分钟。
- 8) 离心并将上清液转移至新管中进行蛋白质印迹。