

# Immunoprecipitation (IP)

## 标准操作规程 (SOP)

● 规格：5 IP Tests/试剂盒 或 10 IP Tests/试剂盒

● 效期：见试剂盒标签

### 试剂盒组分

Components	Quantity/ 5 Tests	Quantity/ 10 Tests	Storage Temp.
Protein G 珠	2.5 mL	5 mL	2~8°C
Protein A/G磁珠	100 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	2~8°C

\* 备注：以单次实验做一个抗体为测定用量。

\* 备注：另外部分试剂和溶液需自行准备，①可参照公开配方自行配制：细胞裂解前液、细胞裂解液、电泳缓冲液、封闭液、洗膜缓冲液、2 $\times$  蛋白上样缓冲液、PBS 等；

②自行购买或准备：蛋白酶抑制剂、蛋白 Marker、转膜滤纸（湿转滤纸建议用 VVB 专用滤纸，半干转建议用普通滤纸）、甲醇、显影发光液、1M Tris-Cl (pH6.8)、一抗溶液、阳性细胞裂解样品（适用时）、Mlbio WB Kit、BCA 试剂盒等；

③以上自行购买物料中一抗溶液、阳性细胞裂解样品（适用时）、Mlbio WB Kit 可联系酶联生物销售咨询购买。

### 试剂配制

#### 1、细胞裂解前液 (按100mL配制量)

组分	用量
Tris	0.61 g
NaCl	0.88 g
SDS	0.1 g
Triton-X-100	1 mL
去离子水	至80 mL
用HCl调整pH值至7.4，补加去离子水至100 mL	
备注：不含细胞裂解液8~9组分	

\* 备注：以上组分充分混匀，待用。

#### 2、细胞裂解液 (按100mL配制量)

组分	用量
Tris	0.61 g
NaCl	0.88 g
SDS	0.1 g
Triton-X-100	1 mL
去离子水	至80 mL
用HCl调整pH值至7.4，补加去离子水至100 mL	
蛋白酶抑制剂混合物(通用型；50 $\times$ )	2 mL
PMSF	1 mL

\* 备注：以上组分充分混匀，待用。

#### 3、电泳缓冲液(10 $\times$ ) (按1L配制量)

配制 10 $\times$  储液，使用前稀释至 1 $\times$ 。

组分	用量
Tris	30.5 g
甘氨酸	144 g
SDS	10 g
去离子水	至 1 L

\* 备注：以上组分充分混匀，待用。

#### 4、2 $\times$ 蛋白上样缓冲液 (按300mL配制量)

组分	用量
SDS	12 g
溴酚蓝	0.6 g
丙三醇	60 mL
1M Tris-Cl (pH6.8)	30 mL
去离子水定容至300 mL	
$\beta$ -巯基乙醇	6 mL

\* 备注：以上组分充分混匀，待用。

#### 5、10 $\times$ PBS (按1L配制量)

组分	用量
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	29 g
去离子水	至 1 L

\* 备注：以上组分充分混匀，待用。

#### 6、1 $\times$ PBS

取 10 $\times$  PBS 1 份，加入 9 份去离子水，充分混匀。

#### 7、洗膜缓冲液

每升 1 $\times$  PBS 加入 1 mL 的吐温 20，混匀溶解即为洗膜缓冲液。

#### 8、封闭液

每升 1 $\times$  PBS 加入 1 mL 的吐温 20 与 50 g (5%) 的脱脂奶粉，充分混匀溶解即为封闭液。

## 样本处理

### 1、试剂准备：

- 将细胞裂解液准备好备用(蛋白酶磷酸酶抑制剂需现配现加)，如需自配可参照上述配方。
- 将 1× PBS 置于冰上预冷。

### 2、细胞裂解：

#### - 悬浮细胞：

- 从培养箱中取出细胞，在冰上加入细胞裂解液(每 20-30 毫升细胞培养液加入 1 mL 细胞裂解液)，充分吹打细胞，避免产生气泡。
- 将上一步溶液倒入离心管中，2-8°C、2000 rpm、离心 5 分钟，回收细胞(沉淀)，弃去培养基(上清)。
- 用预冷后 1× PBS 洗涤细胞 3 次，弃去 PBS，用移液器彻底吸去残余 PBS。

#### - 半贴壁细胞：

- 用胶头塑料移液管吹打细胞，使其脱离培养瓶底。其余操作同悬浮细胞。

#### - 贴壁细胞：

- 倒去培养基，向细胞培养瓶中加入预冷后的 1× PBS 润洗 3 次，弃去 PBS。最后一次洗涤后彻底吸去残留 PBS。
- 向细胞培养瓶中加入细胞裂解液(100 uL/6 孔板每孔或 500 uL/10 cm 培养皿)，轻轻摇晃，使裂解缓冲液完全覆盖细胞。
- 在冰上静置 5 分钟(期间轻轻摇晃 1-2 次)，用细胞刮将细胞刮下，将包含了细胞的细胞裂解液转移至预冷离心管中。
- 用剩余裂解液润洗培养瓶，同样转移至预冷离心管中。

#### - 组织或细胞块：

- 从 -80°C 冰箱中取出组织或细胞块，在冰上化冻。
- 用手术刀将组织或细胞块切碎，根据其质地选择性使用液氮速冻后研磨(适用于骨骼肌、心肌、皮肤、韧带等组织)。
- 加入适量细胞裂解液(具体加入量以将组织研碎而不太稀为标准，可少量多次加入)，在冰上用研磨器研磨，直至无明显肉眼可见残留物。

### 3、超声裂解：

- 将细胞裂解物均匀分配至 2 mL 离心管中，每管 0.8-1.2 mL。
- 设置超声功率为 60%，超声处理 5 次，每次 2 秒，间隔 20 秒。
- 超声结束后，在显微镜下观察细胞裂解情况，应大部分组织或细胞块被裂解。

### 4、离心：

- 2-8°C、15000 rpm、离心 10 分钟，将上清液(标记为 Lysate)转移至预冷离心管中。

### 5、BCA 定量(此步客户可以根据自身的具体需求进行调整)：

- 将 Lysate 用细胞裂解液稀释 10 倍。
- 参照 BCA 检测试剂盒的使用方法，测定 Lysate 浓度。
- 根据 BCA 测定的 Lysate 浓度，将其分成 1 mg/ 管的细胞 / 组织裂解物用于后续实验。

**注意：**如果无需 BCA 定量可以跳过上述的 3-5 步骤。

## 细胞/组织裂解物处理

### 1、Protein G 珠准备操作：

- 先进行将 Protein G 珠摇匀，然后依据实验用量取珠子，将取出的珠子进行离心弃掉上清，按每 mL 珠子使用 1 mL 细胞裂解前液进行洗涤，使用涡旋混匀然后离心弃掉上清，共重复三次，洗涤完成后使用 1× PBS 补至总体积。

### 2、实验操作方法：

- 以 1 个克隆为例，取 200 μg 裂解物在冰上融化，用细胞裂解液稀释至 1mg/mL，加入 20 μL Protein G 珠(含抗体较多的裂解物需加入 60 μL Protein G 珠)。
- 在 2~8°C 环境条件下混悬 1.5 h。
- 进行离心，离心机参数设置为：
  1. 转速：12000 rpm；
  2. 温度：2-8°C；
  3. 离心时间：5 min。
- 上清转移到另一干净离心管，标记为预处理的裂解物。
- 取 7.5 μL 预处理的裂解物于 0.5 mL EP 管中备用标记为(input)，加入 10 μL 2× 蛋白上样缓冲液，放置于 -80°C 进行保存。

## Protein A/G 磁珠和免疫复合物结合

- 将预处理的裂解物分成 200 μL/ 管。

### 1、磁珠准备操作：

- 按每管 10 μL 去准备 Protein A/G 磁珠，按每 mL 磁珠使用 1 mL 细胞裂解前液进行洗涤(单次细胞裂解前液洗涤量不得低于 0.8 mL)，进行涡旋混匀然后在磁力架上进行分离并弃掉上清，共重复三次，最后用 1× PBS 补至总体积。

### 2、实验操作方法：

- 每管预处理的裂解物加入 2.5 μg 提纯抗体再用细胞裂解液补至 250 μL，缠好封口膜在 2~8°C 环境下进行混悬反应过夜。
- 每管加入 10 μL 洗涤好的 Protein A/G 磁珠，缠好封口膜在 2~8°C 环境下进行混悬反应 1.5 h。
- 将管子放在磁力架上，上清转移至另一干净 EP 管，上清冻存于 -80°C(如需使用可作为对照物)。
- 洗涤磁珠：将去掉上清的 Protein A/G 磁珠加入 1 mL 细胞裂解前液，摇匀，将管子放置于磁力架上，静置至磁珠与上清完全分离，手动弃去上清，共重复六次。
- 洗涤完成后加入 20 μL 2× 蛋白上样缓冲液，与 input 一同进行金属浴。
- 金属浴参数：
  1. 温度：95°C；
  2. 时间：10 min。
- 到时间后取出冷却至室温准备进行上样。

## SDS-PAGE

### 1、凝胶准备和上样：

- 安装胶板并加入电泳缓冲液，确保底部无气泡。
- 室温平衡上样样品和蛋白 Marker 30 分钟，混匀后上样，样品推荐上样量样品总体积的一半，input 全部进行上样。
- 当电泳染料前沿接近胶板底部时停止电泳，拆出凝胶。

### 2、电泳条件：

- 电流(恒流)：60 mA
- 时间：直至染料前沿到达胶底部，时间约为 1 小时

# 凝胶转膜

转膜效率和结果与目的蛋白分子量,转膜仪器,转膜电流有密切关系。用户可根据分子量大小,采取以下两种方法进行转膜,也可根据样品情况两种方法都进行检测。针对 30KD 以下的目标蛋白检测优先推荐半干法转膜。

## ▶▶ A. 湿转法

### 1、准备工作:

- 配制 1× 湿转转膜缓冲液:取 100 mL 的 10× 湿转转膜液浓缩液,加入 200 mL 的甲醇,使用去离子水定容至 1 L。
- 在托盘内加入一定量的湿转转膜液,及时把凝胶放入转膜液中,转膜液需没过凝胶。
- 裁剪 NC 膜,使其与凝胶大小匹配。

### 2、转膜装置组装:

- 湿转转膜液中放置好转膜夹,阴极在下,依次放入:海绵、湿转转膜滤纸、凝胶、NC 膜、湿转转膜滤纸、海绵和阳极。每层之间排除空气泡。
- 将转膜夹插入电转槽中,阴极对阴极,阳极对阳极。在电转槽的两个空位中放入冰盒,加入 1× 湿转转膜缓冲液,使液面覆盖转膜夹。

### 3、转膜条件:

- 电流(恒流): 200 mA
- 时间: 视蛋白分子量大小而定,推荐如下:

分子量范围 (kD)	建议转膜时间
34~55	40~45 分钟
55~72	50~55 分钟
72~130	1 小时
130~250	1 小时 15 分钟
>250	1 小时 30 分钟

\* 注: 分子量越大,转膜所需时间越长。建议根据自身实际情况摸索最适合的转膜时间。

## ▶▶ B. 半干转法

### 1、准备工作:

- 根据胶大小裁出 NC 膜。

### 2、转膜装置组装:

- 使用阴极转膜液润湿转膜槽阴极,依次放入 9 层半干转膜滤纸(使用阴极转膜液浸润)、凝胶(使用阴极转膜液浸泡平衡)、NC 膜(使用阳极转膜液浸泡润湿)、9 层半干转膜滤纸(使用阳极转膜液浸润)、转膜槽阳极(预先使用阳极转膜液润湿)。

### 3、转膜条件:

- 电流(恒流): 80 mA
- 时间: 3 小时
- 温度: 室温

### 注意事项:

- 转膜液必须现配现用。
- 转膜所需的转膜槽,托盘,架子,镊子等仪器必须干净,转膜过程应带干净手套操作,避免外源蛋白污染。

# 抗体检测

## 1、准备工作:

- 洗膜缓冲液配置:每升 1× PBS 加入 1 mL 的吐温 20,混匀溶解即为洗膜缓冲液。
- 显影发光液配置:A 液与 B 液 1:1 混匀配置,本溶液请在显影前现配现用。(显影发光液应该在使用前进行配置,如果提前配置可能会导致背景过高。)
- 一抗溶液:使用封闭液稀释一抗。
- 二抗溶液:使用适量封闭液或洗膜缓冲液按说明书推荐比例稀释 HRP 二抗。

## 2、封闭:

- 从转膜夹上取下 NC 膜,放入去离子水中漂洗一次。
- 将 NC 膜放入封闭液中,封闭液用量以盖过 NC 膜为准,室温封闭 1 小时或于 2~8°C 下过夜。

## 3、洗膜:

- 将洗膜缓冲液倒入容器中,放入封闭好的 NC 膜,左右摇晃后倒出洗膜缓冲液。

## 4、一抗孵育:

- 将洗涤好的 NC 膜放入一抗溶液中,使其结合蛋白的一面朝上,确保抗体溶液可完全覆盖 NC 膜。
- 室温摇动孵育 1 小时,或 2~8°C 孵育过夜。

## 5、洗膜:

- 取出 NC 膜,使用洗膜缓冲液摇动漂洗膜 5 分钟,共重复三次。

## 6、二抗孵育:

- 将洗涤好的 NC 膜放入二抗溶液中,使其上结合蛋白的一面朝上,确保抗体溶液可完全覆盖 NC 膜。
- 室温摇动孵育 1 小时。

## 7、洗膜:

- 取出 NC 膜,使用洗膜缓冲液摇动漂洗膜 5 分钟,共重复三次,以去除所有未结合的二抗。

## 8、显影:

- 使用显影发光液孵育印迹膜 30 秒,将印迹膜从底物工作液中取出,用镊子夹住一角,使膜自然垂下,以去除多余的发光液,可使用吸水纸或滤纸等纸张吸去膜上多余的发光液。
- 将印迹膜置于透明塑料膜上或方皿上,注意膜与支撑物之间不要有气泡。
- 使用成像系统进行印迹成像。

## 注意事项:

- 确保所有试剂新鲜配制,缓冲液 pH 值正确。
- 使用干净、无外源蛋白的实验用具,防止污染。
- 小心处理 NC 膜,避免撕裂和污染。
- 洗膜过程中,洗膜缓冲液不可重复使用。
- 说明书提供的稀释比为参考值,客户可根据自身需求设置不同比例的稀释比以达到最佳实验结果。
- 做 IP 实验时,建议使用与一抗相同种属来源、相同亚型、相同剂量的免疫球蛋白,用于检测该亚型的抗体是否会与蛋白产生非特异性结合。
- 根据抗原大小和一抗种类选择二抗。
- 发光液需避光保存,现用现配。
- 将发光液淋在膜上直接显影往往造成较高的背景。