

利用抗原抗体亲和结合的特性，免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP) 是一种能够将靶蛋白进行纯化分离的实验技术。该试剂盒包含免疫沉淀以及后续 Western blotting 检测全部试剂，通过对富集的靶蛋白高效快速分离，以对免疫沉淀实验提供最佳解决方案，同时该试剂盒还具有省时、高效、抗体用量少等优点。

## 关于试剂盒

- **IP lysis buffer** 能够有效提取细胞或组织总蛋白，用于后续实验使用。
- **Protein A sepharose beads slurry** 用于沉淀分离抗原抗体复合物。
- 高盐、低 pH 的 **Elution buffer** 有效用于抗原抗体复合物与 **Protein A sepharose beads** 的解离。
- **Spin columns** 的使用使操作更为方便快捷，且减少靶蛋白的损失，同时降低了非特异性蛋白的影响。
- **HRP-conjugated Protein A** 二抗用于 Western blotting 的检测，可以有效消除抗体轻链信号的影响，同时降低抗体重链信号。
- 该试剂盒可广泛用于免疫沉淀以及免疫共沉淀实验。

## 组分与保存

组分	数量/个	保存
<b>IP lysis buffer:</b> 30 ml/瓶	1 瓶	室温 6 个月
<b>Incubation buffer:</b> 20 ml/瓶	1 瓶	室温 6 个月
<b>100 × Protease inhibitor:</b> 2 ml / 份	1 份	-20 °C 6 个月
<b>20 × Washing buffer:</b> 20 ml /瓶	1 瓶	室温 6 个月
<b>Protein A sepharose beads slurry:</b> 1 ml/份	1 份	4 °C 6 个月
<b>Elution buffer :</b> 2.5 ml/份	1 份	4 °C 6 个月
<b>Alkali neutralization buffer:</b> 250 µl/份	1 份	4 °C 6 个月
<b>5 × Sample buffer:</b> 800 µl/份	1 份	室温 6 个月
<b>HRP-conjugated Protein A:</b> 200 µl/份	1 份	4 °C 6 个月
<b>Spin columns:</b> 1 ml	20 个	室温 12 个月
<b>Collection tubes:</b> 2 ml	20 个	室温 12 个月
<b>End caps</b>	20 个	室温 12 个月

\*试剂盒过期后建议不再使用

### 重要说明:

- 该试剂盒仅用于细胞或组织裂解物的免疫沉淀和免疫共沉淀实验。
- 除特别说明外，所有操作在冰上完成。
- 碱中和液避免接触皮肤以及眼睛。

## 操作步骤

### 1. 细胞或组织裂解物的制备

#### 细胞

- 将离心机预冷至 4 °C。
- 收集细胞前用血球计数板对细胞进行计数。
- 4 °C、500 × g (半径为 9.5 cm 的转头约为 2100 rpm) 离心 5 min，收集细胞。
- 用冰上预冷的 1 × PBS 洗涤细胞三次，每 10<sup>6</sup> 个细胞加入 100 μl 预冷的 **IP lysis buffer** (含有 1 × **Protease inhibitor**)。若需获得高浓度蛋白裂解物，可以适当减少 **IP lysis buffer** 的用量。
- 若靶蛋白为磷酸化蛋白质，则需额外加入适量磷酸酶蛋白抑制剂。
- 在 **IP lysis buffer** 中重悬细胞，冰上裂解 30 min，期间每 10 min 轻柔颠倒一次。
- 后续步骤见**裂解与保存**。

#### 组织

- 解剖目的组织，用预冷的 1 × PBS 洗涤组织，尽可能去除组织中存留的血液，在冰上将目的组织剪成碎块。
- 将组织碎块置于预冷的匀浆器中。
- 以每毫克目的组织 50 μl **IP lysis buffer** 的量加入相应数量的 **IP lysis buffer** (含有 1 × **Protease inhibitor**)。
- 对目的组织充分匀浆，冰上裂解 30 min，期间每 10 min 颠倒一次。
- 后续步骤见**裂解与保存**。

### 裂解与保存

- 超声波破碎细胞或组织裂解物，使得裂解更加充分，同时使 DNA 片段化。不同样品最适超声时间不同，在 180 W 功率下 (超声 10 s 停 10 s 的循环)，一般细胞超声 1 min，组织超声 2-5 min，整个超声过程在冰上进行。
- 裂解物冰上放置 60 min，期间每 10 min 颠倒一次。
- 4 °C、10,000 × g (半径为 9.5 cm 的转头约为 9700 rpm) 离心 20 min，将上清转入新的 EP 管中备用；弃沉淀或储存用于后续问题分析。
- 通过 Bradford 或 BCA 法测定裂解物的总蛋白浓度。
- 裂解物用于 IP 或 Western blotting 实验，也可以置于 -80 °C 保存。
- 若用于 Western blotting 实验，SDS-PAGE 检测前，需向裂解物中加入 25 % 样品体积的 5 × **Sample buffer**，并沸水浴加热 5 min。

### 2. Protein A sepharose beads 的准备

- 旋转储存 **Protein A sepharose beads slurry** 的管子，取出所需数量的 **Protein A sepharose beads slurry**，以其 10 倍体积的 1 × PBS 通过瞬时离心洗涤 **Protein A sepharose beads slurry** (可分 3-5 次洗涤，合计约用 10 倍体积的 PBS)，并将 **Protein A sepharose beads slurry** 重悬至原体积。

### 3. 裂解物预处理（可选）

- 以 45° 角剪掉已灭菌枪头的末端，快速吸取重悬的 **Protein A sepharose beads slurry**，加入含有裂解物的 EP 管中。通常 1-3 mg 总蛋白裂解物需加入 30  $\mu$ l 重悬的 **Protein A sepharose beads slurry**。
- 4 °C 旋转孵育 60 min（推荐用垂直旋转混合仪，低速旋转）。
- 4 °C、1000 rpm 离心 1 min，将上清转入新的 EP 管中。

### 4. 免疫沉淀

- 吸取含有 1-3 mg 总蛋白的裂解物(或预处理) 200-350  $\mu$ l，加入下端带有 **End caps** 的 **Spin columns** 中，同时加入 1-4  $\mu$ g 特异性抗体以及 150-300  $\mu$ l **Incubation buffer**，最佳抗体数量应由抗体效价决定。
- 向相同数量的裂解物与 **Incubation buffer** 中加入同种属相同数量的 Control IgG 作为阴性对照（阴性对照管的后续操作与目的样本管完全一样）。
- 4 °C 下，旋转孵育过夜或 2-4 h。
- 向 **Spin columns** 中加入 50  $\mu$ l 重悬的 **Protein A sepharose beads slurry** 以沉淀免疫复合物，4 °C 旋转孵育 1-4 h。
- 取下 **End caps**，将上清自然流出弃除，必要时，可以通过重悬 **Protein A sepharose beads slurry** 以提高上清的流速。
- 每次用 800  $\mu$ l 1  $\times$  **Washing buffer**（纯水稀释 20  $\times$  **Washing buffer**；含有 1  $\times$  **Protease inhibitor**）洗涤沉淀复合物，洗涤液自然流出弃除；重复洗涤 4-5 次。洗涤结束后，在 4 °C，500 rpm 下将 **Spin columns** 置入 **Collection tubes** 中离心 30 s，弃 **Collection tubes** 以及离心产物。

### 5. 洗脱

- 将 **Spin columns** 置入新的 1.5 ml EP 管中以收集洗脱产物，用 40  $\mu$ l **Elution buffer** 洗脱沉淀复合物，并在 4 °C、10000 rpm 下离心 1 min 收集产物，取新的 40  $\mu$ l **Elution buffer** 重复洗脱一次（2 次洗脱合并收集）。
- 向全部洗脱产物中加入 10  $\mu$ l **Alkali neutralization buffer** 以及 23  $\mu$ l 5  $\times$  **Sample Buffer**，沸水浴加热 5 min。

### 6. Western blotting 分析

- 取 20-40  $\mu$ l IP 样品加入 SDS-PAGE 对应泳道，同样可以将剩余 IP 样品置于 -80 °C 保存备用。
- 通过 SDS-PAGE 分离 IP 样品，并将蛋白质向 PVDF 膜转移。使用检测抗体杂交以及 1:1500-1:3000 稀释度的 **HRP-conjugated protein A** 二抗进行 Western blotting 分析。

### 补充信息

- 如果需要缩短 IP 实验操作时间，也可以将靶蛋白对应的特异性抗体以及 **Protein A sepharose beads slurry** 同时加入细胞或组织裂解物中进行一步孵育。
- 若 IP 抗体与 WB 一抗同为 mouse IgG1 或 IgG3 亚型，WB 检测时可降低 **HRP-conjugated protein A** 二抗的稀释度，若显影目的信号仍然较弱，可考虑使用 Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)二抗。
- 若 WB 检测时一抗为 mouse IgM 亚型，则不能使用 **HRP-conjugated protein A** 二抗。
- 必要时，该试剂盒可以按比例扩大使用。

## 问题解决

问题	可能原因	解决方法
未获得靶蛋白	高浓度去垢剂影响抗原抗体结合	制备高浓度的细胞或组织裂解物，使用前用孵育缓冲液稀释
	裂解物中靶蛋白表达丰度低或靶蛋白降解	增加使用裂解物总蛋白的数量；通过Western blotting 验证裂解物中靶蛋白表达；更换新鲜的蛋白酶抑制剂
	抗体没有与靶蛋白抗原结合	更换识别不同表位的抗体，增加抗体使用量
	抗原抗体复合物没有被 <b>Protein A sepharose beads</b> 沉淀	抗体属于 IgM 亚型，使用抗 IgM 偶联的微粒沉淀抗原抗体复合物
洗脱物的抗体信号影响靶蛋白信号	靶蛋白大小在 45-55 kDa 左右	选择使用HRP-conjugated Mouse Anti-Rabbit IgG Light Chain Specific二抗；降低 <b>HRP-conjugated protein A</b> 的用量，以及减少其孵育时间；使用两个种属不同的抗体分别用于IP过程和后续Western blotting分析