

抗体磁珠免疫沉淀 (IP) 标准操作规程 (SOP)

产品信息

组分内容	规格：66 Tests	规格：333 Tests	储存温度
抗体磁珠	1000 μ L	5000 μ L	2~8 $^{\circ}$ C

* 抗体磁珠：磁珠与特定的抗体(例如：标签抗体等)偶联后得到的磁珠抗体结合物。

* 备注：另外部分试剂和溶液需自行准备，如下：

①可参照公开配方自行配制：IP 裂解 / 洗涤缓冲液、上样缓冲 A 液、洗脱液、中和液、PBS。

②实验中用到，需要自行购买或准备的物料：磁力架、 β - 巯基乙醇。

试剂配制

1. IP 裂解/洗涤缓冲液(按100 mL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：以上组分充分混匀，待用。

2. 上样缓冲A液(按300 mL配制量)

组分	用量
SDS	12 g
溴酚蓝	0.6 g
丙三醇	60 mL
1M Tris-HCl (pH6.8)	30 mL
去离子水定容至 300 mL	

* 备注：以上组分充分混匀，待用。

3. 中和液(按100 mL配制量)

组分	用量
Tris	24.23 g
去离子水	至 90 mL
用 HCl 调整 pH 值至 8.2，补加去离子水至 100mL	

* 备注：以上组分充分混匀，待用。

4. 洗脱液(按1 L配制量)

组分	用量
甘氨酸	7.5 g
去离子水	至 900 mL
用 HCl 调整 pH 值至 2.5，补加去离子水至 1 L	

* 备注：以上组分充分混匀，待用。

5. PBS(按1 L配制量)

组分	用量
NaCl	8 g
KCL	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9 g
去离子水	至 1 L

* 备注：以上组分充分混匀，待用。

样本处理

* 备注：如希望获得更好的结果，可以在裂解细胞或组织前酌情在 IP 裂解 / 洗涤缓冲液中加入适量的蛋白酶抑制剂与 PMSF。

1、试剂准备：

- 上样缓冲 B 液的制备：按每 50 μL 上样缓冲 A 液中加入 1 μL β - 巯基乙醇的比例，请根据需用量进行配制，需混匀后使用，现配现用。

2、细胞裂解：

- 悬浮细胞：

- 从培养箱中取出细胞，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 rpm、离心 5 分钟，回收细胞（沉淀）。
- 弃去培养基（上清），使用预冷后 PBS 洗涤细胞 3 次，弃去 PBS，用移液器彻底吸去残余 PBS。
- 在冰上向细胞沉淀中加入 IP 裂解 / 洗涤缓冲液（每 20-30 mL 细胞培养液加入 1 mL IP 裂解 / 洗涤缓冲液），充分吹打细胞，避免产生气泡，如有实验需求可选择超声裂解细胞总蛋白。

- 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，用细胞刮将瓶中细胞刮下。
- 向细胞培养瓶中加入预冷后的 PBS 润洗 3 次，其余操作同悬浮细胞。

- 组织或细胞块：

- 从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 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 IP 裂解 / 洗涤缓冲液（具体加入量以将组织研碎而不太稀为标准，可小量多次加入），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 $^{\circ}\text{C}$ 、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（此步可以根据自身的具体需求进行调整）：

- 将 Lysate 用 IP 裂解 / 洗涤缓冲液稀释 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，将其分装成浓度为 1 mg/mL 的细胞 / 组织裂解物用于后续实验。

* 备注：如果无需 BCA 定量可以跳过上述的 3-5 步骤，直接将 2 步骤收获的产物作为细胞 / 组织裂解物，用于后续检测。

抗体磁珠与免疫复合物结合

1、磁珠准备操作：

- 取 15 μL 的抗体磁珠，加入 1 mL 的 IP 裂解 / 洗涤缓冲液进行涡旋混匀，然后在磁力架上进行分离并弃掉上清，共重复三次。

2、实验操作方法：

- 将准备好的抗体磁珠，加入 200 μL 的细胞 / 组织裂解物，在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 环境下进行混悬反应过夜。
- 样品过夜后在磁力架上进行磁珠分离并弃掉上清，只保留磁珠。（此处得到磁珠结合物）
- 将磁珠结合物加入 1 mL 的 IP 裂解 / 洗涤缓冲液，涡旋混匀，将管子放置于磁力架上，静置至磁珠与上清完全分离，弃去上清，共重复六次。
- 洗脱

* 备注：洗脱方法 1-3 具有不同的洗脱效率，请根据自身需求进行选择和优化。

- 洗脱方法1：

- 分离磁珠弃去上清，向抗体磁珠中加入 30 μL 上样缓冲 B 液吹打均匀。
- 金属浴：95 $^{\circ}\text{C}$ ，加热 10 min。

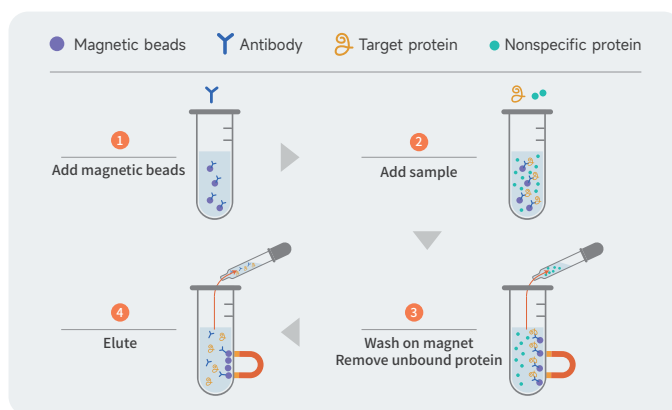
- 洗脱方法2：

- 分离磁珠弃去上清，向抗体磁珠中加入 40 μL 洗脱液，金属浴震荡 10 min（室温下，1000 rpm）。
- 分离磁珠，收集上清至新的 EP 管中，加入 4 μL 中和液至 pH 为 7.4。
- 重复以上洗脱步骤，将两次洗脱液混合。

* 备注：如需要进行电泳分析，则向洗脱液中加入等体积上样缓冲 B 液吹打均匀，金属浴 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min（如有需要，可将样品浓缩至适当体积后进行电泳）

- 洗脱方法3：

- 分离磁珠弃去上清，向抗体磁珠中加入 30 μL 上样缓冲 A 液吹打均匀。
- 金属浴：95 $^{\circ}\text{C}$ ，加热 10 min。



注意事项：

- 为达到最佳实验结果，可根据自身需求设置不同比例的稀释比。
- 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。
- 在使用移液器吸取磁珠前，为了便于操作，可将枪头剪掉，使用酒精灯或打火机将枪头烧圆进行使用。
- 磁珠在保存和操作过程中应避免干燥，同时也应避免冷冻保存。
- 使用干净、无外源蛋白的实验用具，防止污染。