



## COIP 免疫共沉淀实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
台式高速低温冷冻离心机	恒诺	2-16R
电泳仪电源	申花科技	SH-DDY10P
蛋白转印槽	申花科技	SH-ZYZ10T
旋转混匀仪	申花科技	SH-VM100
化学发光成像系统	申花科技	SH-COMPACT523
50mL 离心管	科兔生物	KTL-50-P
1.5mL 离心管	科兔生物	KTL-15-P

#### 2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
细胞系	ATCC	HEK293
免疫共沉淀试剂盒	beyotime	P2179M
ECL 化学发光试剂盒	Biosharp	BL520B
Tris-Glycine-SDS	雅酶	TF101
转膜缓冲液	beyotime	P0021B
TBS	beyotime	ST661-500ml
One-Step PAGE	Vazyme	E303-01
PBS	科兔生物	RG-CE-10
BCA 试剂盒	beyotime	P0012

### 二、IP 检测实验步骤

#### 1、细胞蛋白提取

- (1) 选择适当的细胞系，接种并生长至对数生长期。
- (2) 使用 PBS（无钙、镁）轻轻洗涤细胞，去除培养基。
- (3) 使用细胞裂解缓冲液收集细胞。
- (4) 用刮刀刮取细胞，转移至冷冻离心管中。
- (5) 通过冰上 30 分钟的超声波或慢速震荡处理细胞裂解液，使细胞完全裂解。
- (6) 将裂解液在 4°C 下，10000-12000g 离心 10-15 分钟，去除细胞碎片。



- (7) 12000rpm, 4°C离心 10min, 将上清转入新的 1.5ml 离心管中, 做好编号标记;
- (8) 取 50ul 上清液加入 12.5ul 的 5\*上样缓冲液, 95°C变性 10 分钟, 用于 input 实验, 即 WB 检测靶蛋白。

## 2、组织蛋白提取

- (1) 组织块用预冷的 PBS 洗涤 2~3 次, 剪成小块置于研磨管(HT-200-M)中, 加入 3 颗 4mm 的研磨珠(G0204-150G), 加入 20 倍组织体积的 IP 裂解液(使用前加入蛋白酶抑制剂, 如组织 20mg, 加入 400ul 的裂解液, 如需提高蛋白浓度, 可适量减少裂解液体积), 设置低温研磨仪(SWE-FP) 研磨程序进行研磨;
- (2) 冰上裂解 30min;
- (3) 12000rpm, 4°C, 离心 10min, 收集上清;
- (4) 取 50ul 上清液加入 12.5ul 的 5\*上样缓冲液, 95°C变性 10 分钟, 用于 input 实验, 即 WB 检测靶蛋白。

## 3、免疫共沉淀

- (1) 抗体的准备: 按抗体使用说明中推荐的稀释比例用 TBS 稀释抗体, 配制成抗体工作液; 使用抗体种属相同的正常 IgG 配制相同稀释比或终浓度的正常 IgG 工作液, 以用于去除非特异性结合或作为阴性对照。
- (2) 预结合抗体: 将准备好的 Protein A+G 磁珠进行磁性分离, 吸除上清, 加入 500μl 抗体工作液或正常 IgG 工作液, 重悬后在室温翻转混合仪上翻转孵育 15 分钟-1 小时。
- (3) 洗涤: 加入 500μl 的 TBS 轻轻吹打重悬 Protein A+G 磁珠, 置于磁力架上分离 10 秒, 去除上清。重复洗涤三次后用 TBS 重悬备用。
- (4) 免疫共沉淀: 按照每 500μl 蛋白样品加入 20μl 磁珠悬浊液的比例加入结合了抗体或正常 IgG 的 Protein A+G 磁珠, 置于侧摆摇床或旋转混合仪上, 4°C 孵育过夜。
- (5) 磁分离: 孵育完毕后, 置于磁力架上分离 10 秒, 去除上清。
- (6) 洗涤: 加入 0.5ml 的含抑制剂裂解液, 用移液器轻轻吹打重悬磁珠。置于磁力架上分离 10 秒, 去除上清。重复使用含抑制剂裂解液洗涤三次。
- (7) 洗脱: 每 20μl 原始磁珠体积的磁珠, 加入 100μl SDS-PAGE Sample Loading Buffer, 95°C 加热 5 分钟。置于磁力架上分离 10 秒, 取上清用于后续检测。

## 4、Western Blot 验证

### a. 蛋白定量

- (1) 使用 BCA 法进行蛋白定量, 确保每个样品加载等量蛋白。

### b. SDS-PAGE 电泳

- (1) 使用 One-Step PAGE 试剂盒配制 SDS-PAGE 凝胶, 固化好凝胶后, 准备电泳槽。
- (2) 将样品分子量标记物加入凝胶的泳道中。
- (3) 在 80-120V 下运行 1h。

### c. 蛋白转膜

- (1) 准备好转膜设备, 将 PVDF 膜浸泡在甲醇中激活, 然后用转膜缓冲液润湿膜。
- (2) 结束 SDS-PAGE 后, 将凝胶从电泳槽中取出, 将膜、凝胶和电极按正确顺序组装在转膜槽中。
- (3) 使用冷转膜缓冲液进行转膜。

### d. 膜封闭

- (1) 使用蛋白封闭液在室温下常封闭 20 分钟, 防止非特异性结合。

### e. 抗体孵育



- (1) 一抗孵育：用适当稀释的一抗孵育膜，4°C 过夜。
- (2) 洗涤：用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 6 分钟，以去除非特异性结合的抗体。
- (3) 二抗孵育：用适当稀释的 HRP 标记的第二抗体孵育膜，在室温下孵育 1 小时。
- (4) 再次洗涤：用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 5-10 分钟，去除未结合的二抗。

f. 化学发光检测

- (1) 将膜浸泡在 ECL 化学发光底物溶液中，轻轻摇晃均匀分布。
- (2) 立即使用化学发光成像系统曝光检测。
- (3) 调整曝光时间，确保条带的信号在适当的范围内。

5、实验信息

(1) 抗体信息

抗体名	产地	货号	分子量 (KD)	一抗来源	IP 稀释比	Wb 稀释比例
-----	----	----	-------------	------	--------	---------

(2) 上样量信息

蛋白上样量								
泳道号	1	2	3	4	5	6	7	8
样本编号								
上样量 (μl)								

6、结果图片

仅供科研用途，不可用于临床诊断！