

## 免疫沉淀 (IP)



### 制备样品:

- ◆ 细胞裂解液 (IP buffer): 加入裂解液悬浮细胞, 冰上充分裂解/超声裂解。
- ◆ 蛋白酶抑制剂cocktail需添加。
- ◆ 裂解后12000g、4℃、离心10min, 取上清。



### 免疫反应复合物制备:

- ◆ 将适量抗体 (2-10ug) 加入裂解液中, 4℃ 旋转混匀孵育2-4h。
- ◆ 抗体效价、特异性 ★

- ◆ 推荐 IP buffer 裂解细胞, 加入适量 IP buffer (含蛋白酶抑制剂 cocktail) 吹打悬浮细胞, 置于冰上裂解 30min。配上超声裂解效果更佳。如果是 CO-IP 实验, 建议慎用 RIPA 裂解液, 尤其是 RIPA (强) 裂解液。
- ◆ 裂解充分后, 离心收取上清。离心条件为: 4℃、12000g、10-20min。
- ◆ 加入适量的 IP 抗体, 推荐条件: 500ul 细胞裂解液上清加 2-6ug 抗体。4℃、旋转孵育、2-4h 或室温、旋转孵育、2h。
- ◆ 注: IP 抗体要求抗体本身特异性、亲和性较高, 特异性高减少后期非特异性结合。



靶蛋白

免疫反应复合物形成



靶蛋白

Beads  
BioTNT

### 免疫沉淀:

- ◆ 取适量beads (20-50ul) 加入裂解液, 4℃ 旋转孵育2-4h

- ◆ 取适量磁珠加入已经孵育完抗体的细胞裂解液上清中, 一般推荐量 (25-50 ul, protein A/G beads (BioTNT, Shanghai, China) 冠泰生物)
- ◆ 4℃、旋转孵育、2-4h 或室温、旋转孵育、2h。



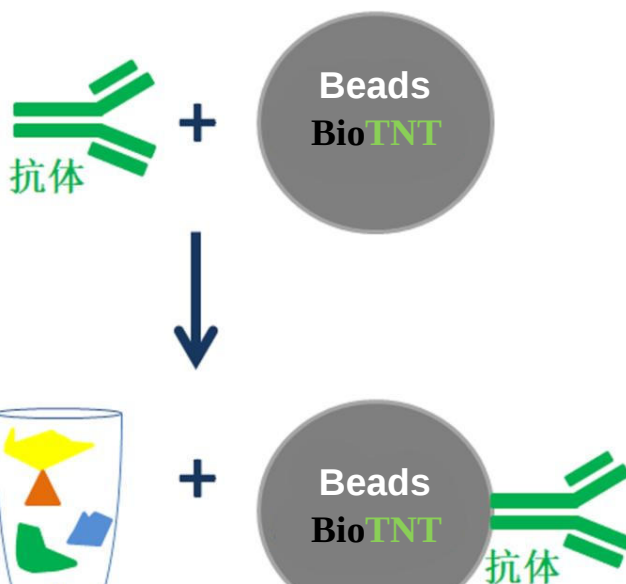
- ◆ 孵育结束后将 EP 管置于磁力架上静置 10s，待磁珠贴附关闭后弃上清，加入新的预冷 IP buffer 1ml 或者预冷 PBS 1ml。

#### Biolinkedin8孔磁力架

- 耐高温耐腐蚀
- 10秒快速吸附

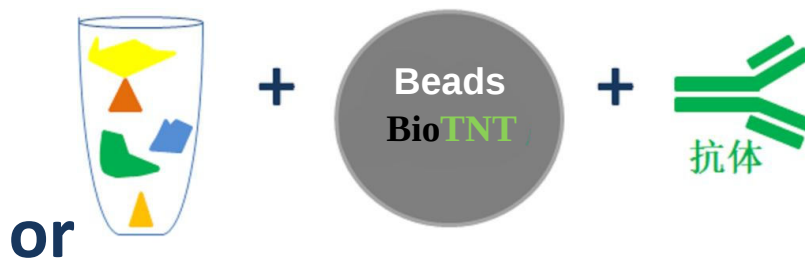


- ◆ 4°C、旋转孵育 10min。重复上一步。
- ◆ 洗三次左右。
- ◆ 弃上清，加入适量 loading buffer，100°C、10min，即可进行后续的 WB 实验。
- ◆ 注：如无磁力架，推荐低速离心：4°C、1000rpm、5min。

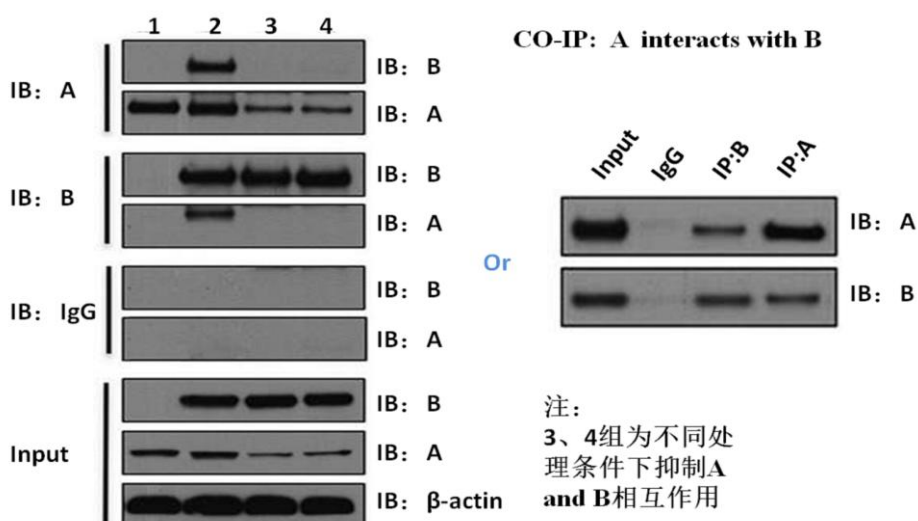
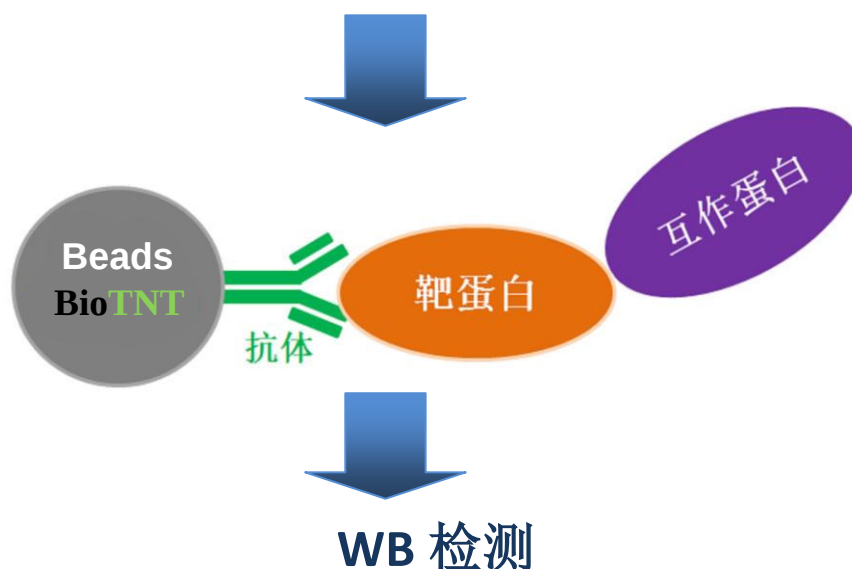


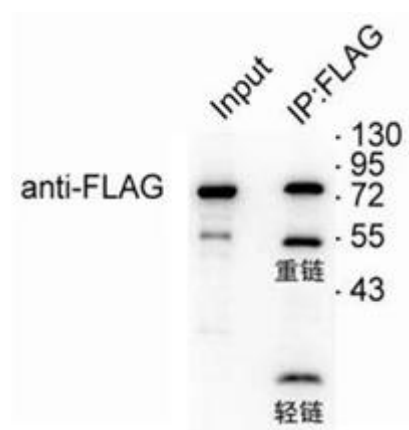
or:

- ◆ 也可以先进行抗体与磁珠的孵育，再加入细胞裂解液上清



- ◆ 或者同时将磁珠、抗体与细胞裂解液上清 4°C、旋转孵育、6h 或室温、旋转孵育、4h
- ◆ 注：第三种相对省去一些步骤、但是效果未必最佳。





Anti-Flag Magnetic beads (BioTNT,shanghai,china) 冠泰生物)