

蛋白质免疫共沉淀 (CoIP) 实验方案

溶液和试剂

裂解缓冲液

这些缓冲液可在 4 °C 下保存数周，或者以分装形式在 -20 °C 下保存长达 1 年。

Nonidet-P40 (NP40) 缓冲液

150 mM NaCl

1.0% NP40 (可用 0.1% Triton X-100 替代)

50 mM Tris-HCl pH 8.0

蛋白酶抑制剂 (一定要添加, 推荐 cocktail 形式的, 货号 A10004)

RIPA 缓冲液 (放射免疫沉淀试验缓冲液)

150 mM NaCl

1.0% NP-40 或 0.1% Triton X-100

0.5% 脱氧胆酸钠

0.1% SDS (十二烷基硫酸钠)

50 mM Tris-HCl pH 8.0

蛋白酶抑制剂 (一定要添加, 推荐 cocktail 形式的, 货号 A10004)

Tris-HCl 缓冲液

20 mM Tris-HCl pH 7.5

蛋白酶抑制剂 (一定要添加, 推荐 cocktail 形式的, 货号 A10004)

电泳、转膜、封闭缓冲液

Laemmli 2× 缓冲液/上样缓冲液

4% SDS

10% 2-巯基乙醇

20% 甘油

0.004% 溴酚蓝

0.125 M Tris-HCl

测定 pH 并调节至 pH 6.8。

电泳缓冲液 (Tris-甘氨酸/SDS)

25 mM Tris 碱

190 mM 甘氨酸

0.1% SDS

测定 pH, pH 应为约 8.3。必要时进行调节。



转膜缓冲液（湿转）

25 mM Tris 碱

190 mM 甘氨酸

20% 甲醇

测定 pH, pH 应为约 8.3。必要时进行调节。

对于大于 80 kDa 的蛋白质，推荐加入最终浓度为 0.1% 的 SDS。

转膜缓冲液（半干转）

48 mM Tris

39 mM 甘氨酸

20% 甲醇

0.04% SDS

封闭缓冲液

5% 奶粉（推荐使用，也可以用 BSA 牛血清白蛋白）

加入 TBST 缓冲液中。混匀并过滤。过滤失败可能导致出现“斑点”，其中微小的黑色颗粒会在显色过程中污染印迹。

实验步骤

A. 制备细胞裂解物

1. 吸干培养基。添加含有调节分子的新鲜培养基，使其在预定的时间内对细胞进行处理。
2. 收集细胞，去除培养基后用冰预冷的 1X PBS 洗涤细胞一次。
3. 去除 PBS，并在并在细胞培养容器中加入适量的已经添加了 Cock tail 蛋白酶抑制剂的 Lysis buffer。每 107 个细胞加入 1ml 冰预冷的 Lysis buffer（相当于 100mm 的培养皿，150cm² 的培养瓶），并在冰上孵育至少 5 分钟。
4. 从板上刮下细胞，把提取物转移至微量离心管。置于冰上。
5. 在冰上进行 3 次超声破碎，每次 5 秒。如果没有超声仪，请用带注射器的针头(20G-18G-16G)冰上反复抽吸，直到裂解液澄清；
6. 在 4° C，在 14,000 x g 条件下，微量离心 10 分钟，将上清转移到新管中。上清液即为细胞裂解物。如有必要，裂解物可保存在 -80° C。

注：细胞裂解物制备好之后，可先进行蛋白免疫印迹法检测，以此来确定细胞裂解物里存在目标蛋白。

B. 抗原抗体结合

1. 在新的离心管内加入 500 μl（含总蛋白 200-1000ug）细胞裂解物。
2. 加入目标蛋白的单克隆/多克隆抗体（1-10 μg，根据抗体使用说明书）。
3. 同时采用非特异免疫的同源抗体作为对照。
4. 在 4°C 轻柔混合过夜。

C. 免疫复合物沉淀

1. 抗体孵育过夜后，加入 20 μ l Protein A/G。
2. 在 4 $^{\circ}$ C 温和地混匀 1-3 小时或过夜。
3. 12000g 离心 1min，保留沉淀。
4. 使用 0.5ml 1*Wash buffer 清洗沉淀，12000g 离心 1min，保留沉淀。
5. 重复第 4 步，共计清洗 3 次。

注：清洗，去上清的时候需要注意避免吸走填料

D. 用蛋白免疫印迹法进行分析

1. 在 20-50 μ l 1* SDS 样品缓冲液中重悬沉淀物。涡旋振荡，然后再微量离心 30 秒。
2. 将样品加热至 95 - 100 $^{\circ}$ C 并持续 2-5 分钟，然后在 14,000 x g 下瞬时离心 1 分钟。
3. 将样品 (15-30 μ l) 上样到 SDS-PAGE 凝胶上。
4. 用蛋白质印迹法分析样品。

如果抗体轻重链污染会影响结果分析，可选择 Abmart 的避重轻链二抗来解决这个问题，产品货号：M20014-M20018。

