

IP 检测

（一）实验器材及试剂

1、实验器材

离心机：TGL：16，湘仪

干式恒温器：Block Heaters CL-150B

平板摇床：QB-210，其林贝尔

迷你离心机：LX-300，其林贝尔

磁力架：Biocanal Scientific

2、实验试剂

rProtein A/G Plus MaqPoly Beads（天地和人 SM02305）

Western 及 IP 细胞裂解液（Beyotime P0013J）

Roche EDTA-free（蛋白酶抑制剂）

NP-40 裂解液（10×PBS、SDS、NP-40）

3% BSA（质量体积比）

1×PBS 缓冲液

6×loading buffer

Gly 洗脱液（1M、PH 2.2）

磁珠储存液（1×PBS、20% 乙醇）

Control IgG（Santa H2615）

IPKine HRP（Abbkine A25022-1）

（二）操作步骤

1、蛋白质提取

IP 检测蛋白提取与 Western Blot 检测蛋白提取实验步骤相同，不同点在于裂解液的选择，Western Blot 检测蛋白提取使用 Beyotime RIPA 裂解液（P0013B），而 IP 检测蛋白提取使用 Western 及 IP 细胞裂解液（Beyotime P0013J），细胞裂解后收集上清备用。

2、样品预处理

（1）准备离心管

取 4 个 1.5 mL 的离心管，用记号笔在管盖上分别标上：Input、R-IgG、Pxxx（抗体编号），放在冰盒上备用。

（2）细胞裂解液处理

A. 用 200 μ L 的移液器分别往 Input、R-IgG、Pxxx（抗体编号）两个离心管中加入 300 μ L 的细胞裂解液上清，往 Input 离心管中加入 50 μ L 的细胞裂解液上清

B. 用 10 μ L 的移液器吸取 10 μ L 的 6 $\times$ loading buffer 加入 Input 管中混匀，待干式恒温器温度升至 98 $^{\circ}$ C 后，将 1.5mL 离心管插入加热孔中，98 $^{\circ}$ C 加热变性 10min，待液体完全冷却后置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

C. 用 2.5 μ L 的移液器吸取 0.5 μ L Control IgG（Santa H2615）加入 R-IgG 管中，查看需要检测的抗体浓度，用 2.5 μ L 的移液器吸取 1 μ g 抗体加入 Pxxx（抗体编号）离心管中。

（3）样品与抗体孵育

将平板摇床放入 4 $^{\circ}$ C 展示柜，将 R-IgG、Pxxx（抗体编号）离心管插入固定架中，打开摇床开关，将速度旋钮转到最低档，将倒计时旋钮转到 120min，孵育 2 小时。

3、磁珠预处理

（1）准备离心管

取 2 个 1.5mL 的离心管，用记号笔在管盖上分别标上：R-IgG、Pxxx（抗体编号），标记好后放在 96 孔板上备用。

（2）清洗磁珠

A. 从 4 $^{\circ}$ C 展示柜中取出 rProtein A/G Plus MaqPoly Beads（天地和人 SM02305）大包装，用手握住瓶身上下摇动混匀磁珠，翻转瓶身发现底部无黑色沉淀即可。

B. 用 20 μ L 的移液器分别往 R-IgG、Pxxx（抗体编号）离心管中吸取 20 μ L 磁珠混合液，然后用 1mL 的移液器吸取 1mL NP-40 裂解液到 R-IgG、Pxxx（抗体编号）离心管中。

C. 用 1mL 的移液器在 1.5mL 离心管中吹打 5 次磁珠混合液，一次吸液放液时间控制在 4S，防止力量过猛产生气泡，吹打完成后将离心管放入磁力架中静止 1min，离心管的尖端要与磁力架的底部圆孔契合。

D. 用 1mL 的移液器从磁珠对面的管壁将上清全部吸出丢弃，取出离心管放在 96 孔板中加入 1mL NP-40 裂解液清洗。重复上述步骤 3 次，清洗完成后吸出全部上清丢弃，将离心管放置在 96 孔板上备用。

（3）封闭磁珠

用 1 $\times$ PBS 缓冲液配置质量体积比 3% 的 BSA 溶液。用 1mL 的移液器吸取 1mL 3% 的 BSA 溶液加入到已经清洗好的两管磁珠当中，把平板摇床放入 4 $^{\circ}$ C 展示柜，将 R-IgG、Pxxx（抗体编号）离心管插入平板摇床固定架中，打开摇床开关，将速度旋钮转到最低档，将倒计时旋钮转到 60min，孵育 1 小时。

（4）清洗磁珠

将封闭好的磁珠拿出清洗三次，操作步骤与上述步骤（2）的三次相同，清洗完成后吸出全部上清丢弃，将离心管放置在 96 孔板上备用。

4、免疫沉淀

样品和抗体孵育 2 个小时后取出，用迷你离心机（LX-300，其林贝尔）离心 20S，离心完成后放在冰盒上备用，用 200 μ L 的移液器吸出离心管中的样品与抗体混合液，加入到有相同编号的磁珠离心管中。把平板摇床放入 4℃展示柜，将混有样品、抗体、磁珠的 R-IgG、Pxxx（抗体编号）离心管插入平板摇床固定架中，打开摇床开关，将速度旋钮转到最低档，将倒计时旋钮转到 120min，孵育 2 小时。

5、收样

（1）准备离心管

取 2 个 1.5mL 的离心管，用记号笔在管盖上分别标上： R-IgG、Pxxx（抗体编号）、Sup，标记好后放在 96 孔板上备用。

（2）收集 Sup

A. 样品、抗体、磁珠孵育 2 个小时之后，从平板摇床上取出标有 R-IgG、Pxxx（抗体编号）的两个离心管，用迷你离心机（LX-300，其林贝尔）离心 20S，放入磁力架当中静置 1min，离心管的尖端要与磁力架的底部圆孔契合。

B. 用 100 μ L 的移液器吸出 50 μ L 上清放入标有 Sup 的 1.5mL 离心管，用 10 μ L 的移液器吸取 10 μ L 的 6 $\times$ loading buffer 加入 Sup 管中混匀，待干式恒温器温度升至 98℃后，将 1.5mL 离心管插入加热孔中，98℃加热变性 10min，待液体完全冷却后置于-20℃保存。

（3）清洗磁珠复合物

A. 用 1mL 的移液器吸取 1mL NP-40 裂解液到 R-IgG、Pxxx（抗体编号）离心管中，用 1mL 的移液器在 1.5mL 离心管中吹打 5 次磁珠混合液，一次吸液放液时间控制在 4S，防止力量过猛产生气泡，吹打完成后将离心管放入磁力架中静止 1min，离心管的尖端要与磁力架的底部圆孔契合。

B. 用 1mL 的移液器从磁珠对面的管壁将上清全部吸出丢弃，取出离心管放在 96 孔板中加入 1mL NP-40 裂解液清洗。重复上述步骤 6 次。清洗完成后吸出全部上清丢弃，将离心管放置在 96 孔板上备用。

（4）收集样品

A. 将清洗好的磁珠复合物放在 96 孔板上，用 100 μ L 的移液器吸取 30 μ L 的 2 $\times$ loading buffer 分别加入到标有 R-IgG、Pxxx（抗体编号）的两个离心管中，待干式恒温器温度升至 98℃后，将 1.5mL 离心管插入加热孔中，98℃加热变性 15min。

B. 待液体完全冷却后放置在磁力架上 1min，用 100 μ L 的移液器吸出 30 μ L 上清到标有 R-IgG、Pxxx（抗体编号）的两个离心管中，置于-20℃保存。R-IgG、Pxxx（抗体编号）的两个离心管在吸取中要一一对应，将收完样的两管磁珠放置在 96 孔板上备用。

6、回收磁珠

（1）PBS 清洗

A. 用 1mL 的移液器分别吸取 1mL 的 1×PBS 缓冲液到收完样的两管磁珠中，用 1mL 的移液器在 1.5mL 离心管中吹打 5 次磁珠混合液，一次吸液放液时间控制在 4S，防止力量过猛产生气泡，吹打完成后将离心管放入磁力架中静止 1min，离心管的尖端要与磁力架的底部圆孔契合。

B. 用 1mL 的移液器从磁珠对面的管壁将上清全部吸出丢弃，取出离心管放在 96 孔板中加入 1mL NP-40 裂解液清洗。重复上述步骤 3 次。清洗完成后吸出全部上清丢弃，将离心管放置在 96 孔板上备用。

(2) Gly 洗脱液清洗

A. 用 1mL 的移液器分别吸取 1mL 的 Gly 洗脱液（1M、PH 2.2）到收完样的两管磁珠中，用 1mL 的移液器在 1.5mL 离心管中吹打 5 次磁珠混合液，一次吸液放液时间控制在 4S，防止力量过猛产生气泡，吹打完成后将离心管放入磁力架中静止 1min，离心管的尖端要与磁力架的底部圆孔契合。

B. 用 1mL 的移液器从磁珠对面的管壁将上清全部吸出丢弃，取出离心管放在 96 孔板中加入 1mL Gly 洗脱液（1M、PH 2.2）清洗。重复上述步骤 3 次。清洗完成后吸出全部上清丢弃，将离心管放置在 96 孔板上备用。

(3) PBS 清洗

A. 用 1mL 的移液器分别吸取 1mL 的 1×PBS 缓冲液到收完样的两管磁珠中，用 1mL 的移液器在 1.5mL 离心管中吹打 5 次磁珠混合液，一次吸液放液时间控制在 4S，防止力量过猛产生气泡，吹打完成后将离心管放入磁力架中静止 1min，离心管的尖端要与磁力架的底部圆孔契合。

B. 用 1mL 的移液器从磁珠对面的管壁将上清全部吸出丢弃，取出离心管放在 96 孔板中加入 1mL 1×PBS 缓冲液清洗。重复上述步骤 3 次。清洗完成后吸出全部上清丢弃，将离心管放置在 96 孔板上备用。

(4) 收集磁珠

磁珠完成上述清洗步骤之后，用 100 μ L 的移液器吸取 30 μ L 磁珠储存液（1×PBS、20% 乙醇）到装有磁珠的离心管中，混匀后放入 4℃ 展示柜备用。

7、Western Blot 检测

所得到的四管样品用 Western Blot 检测。实验步骤参照 Western Blot 检测实验步骤，注意上样顺序：Input、R-IgG、Pxxx（抗体编号）、Sup，上样体积为 3 μ L。二抗使用 IPKine HRP（Abbkine A25022-1），稀释比例为 1:20000。

ABclonal provides rabbit recombinant mAb using proprietary B cell cloning technology. This unique technology employs innovative cell sorting, enriching, bioinformatics and advanced cloning. It does not take the traditional approach of using the hybridoma method, hence avoiding the stability issue associated with hybridomas.