

IP-Protocol

1. 弃培养液，PBS 清洗细胞一遍。收获细胞，加入适量细胞裂解缓冲液（含蛋白酶抑制剂），冰上或者 4°C 裂解 30min，4 °C 离心，12,000g，15 min 后取上清备用（如果是冰箱取出的备用细胞或组织裂解液，需要按比例加入 cocktail，做磷酸化蛋白的刺激样本需要加入磷酸酶抑制剂）。

2. 细胞裂解缓冲液与对应检测的抗体进行预实验，预实验结果为阳性时可进行后续操作，否则需更换细胞裂解缓冲液至预实验结果为阳性。

3. 加入一定体积的一抗到总蛋白裂解液（如果这个裂解液不是新鲜刚做的，加入 Cocktail，裂解液的蛋白量为 Input 样的 10-20 倍）中，抗体的稀释比例因目标蛋白在不同细胞系中的多少而异。

4. 放置于静音混合仪上，4°C 缓慢摇动抗原抗体混合物过夜。

5. 准备 Protein A/G agarose（一般吹匀之后吸取 50 微升），加 1mL PBS 洗珠子 3000r/min 离心 3min，弃上清，重复以上步骤 2~3 次（注意：减掉枪尖部分，避免在涉及琼脂糖珠的操作中破坏琼脂糖珠，如果一次做的 IP 样本比较多，Protein A/G agarose 的洗涤可以放在一起，适当多加 PBS）。

6. 每 300ul 总蛋白中加入 50μl Protein A/G 琼脂糖珠，室温摇晃 1.5h。

7. 3000rpm 离心 3min，收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物，去上清（此时的上清取 50 微升，加 50 微升 2*Loading 煮样备用，如有需要，可以-20 保存未煮的上清样本，留待以后电泳，电泳

前应加 2*loading 沸水煮 5min) , 用预冷的 PBS 洗 5 遍(琼脂糖珠-抗原抗体复合物沉淀中加 1mL PBS, 3000rpm,3min,弃掉 PBS).

8. 将上述样品(琼脂糖珠-抗原抗体复合物)加 50 微升 PBS 加 50 微升 2*loading)沸水煮 5min, 3000r/min 离心 1min, 将上清收集电泳。

9. 当用 IP 样本进行 WB 检测时, 上样的顺序一般: Input, 抗体 (IP, 上清) , 抗体 (IP, 沉淀) , IgG (IP, 沉淀) , IgG (IP, 上清) 。