

实验步骤: 免疫沉淀(IP)

材料/试剂/缓冲液

1. 细胞裂解液 (参考“细胞裂解液制备方法”)
2. Protein A或Protein G浆液
3. 一抗
4. 裂解缓冲液
5. PBS
6. Trident 2X Tris Glycine SDS Sample Buffer (GTX16352)

仪器

离心机

摇摆平台或旋转机

方法

A. 细胞裂解液制备

参考“细胞裂解液制备方法”

B. 细胞裂解液预清洗

1. 取50 ul Protein G浆液(可购自于数家供货商)至微量离心管, 加入450 ul预冷的裂解缓冲液, 于10,000 xg离心30秒, 去除裂解缓冲液, 再用500 ul预冷的裂解缓冲液多洗一次, 最后用50 ul预冷的裂解缓冲液使Protein G beads重新悬浮
2. 将此50 ul制备好的Protein G浆液与500 ul细胞裂解液加入微量离心管, 在冰上孵育30-60分钟
3. 于4°C, 10,000 xg 离心10分钟, 将上清液取至新的微量离心管, 如果吸到Protein G beads, 再离心一次, 并小心将上清液取至新的微量离心管

C. 免疫沉淀

1. 将5-10 ug抗体加入含有预冷且预清洗过的裂解液的微量离心管
注意: 建议以此抗体浓度作为起始点, 每位研究人员需要进行预实验将抗体浓度与细胞裂解液的体积调整至最适合的条件
2. 于4°C孵育1个小时
3. 加入50 ul预冷裂解缓冲液于清洗过的Protein G浆液中 (于上述细胞裂解液预清洗中的步骤3制备完成)
4. 置于摇摆平台或旋转机, 于4°C孵育1个小时
5. 将微量离心机于4°C, 10,000 xg离心30秒
6. 小心的将上清液完全移除, 以500 ul裂解液清洗protein G beads 3-5次, 为了让背景值减至最小, 请小心的将这些清洗程序中的上清液完全移除

C. 免疫沉淀

7. 最后一次清洗步骤之后,吸除上清液,加入50 ul 1X SDS-PAGE sample buffer至bead pellet中,震荡后于90-100°C加热10分钟
8. 于10,000 xg离心5分钟,收集上清液,上样至胶体,如果稍后才要跑胶,上清液样品收集完后,可以先冰冻起来
9. 依据制造商的说明书操作SDS-PAGE,可将胶体染色来分析免疫沉淀的蛋白,如果此步骤后要做WB,请依循WB的实验步骤,建议用来做IP的抗体不要再用来做WB,如果可以请用相同专一性的不同克隆抗体。



GeneTex 简介

ABOUT

GeneTex 背景

1997年GeneTex由一群科学家成立于美国德克萨斯州,为抗体制造商,成立宗旨“专注生物相关试剂生产,加速科学研究与发展,在每一个产品里你将看到我们对质量的要求与坚持”。

成立之初,科学家致力于寻找引发癌症的分子新靶点,并开发抗体供科研使用。之后, GeneTex专注抗体开发,网罗世界各地人才,至今已开发出50,000个产品,产品线横跨癌症、病毒、遗传学、神经学、免疫学、细胞分子传递、干细胞研究、斑马鱼等多个领域,并提供完善的定制抗体制备服务。

GeneTex 承诺

在我们制造产品时,坚持我们的理念与方法,通过研究、开发与严格的测试提供最可信的试剂给研究人员,并驱动生命科学的发展。我们将持续开发多元的抗体产品,提供科学家探索有限生物医药知识所使用。

GeneTex 联系

任何跟产品相关的问题,我们技术与销售团队将竭诚为您服务; GeneTex支持中英文等多种语言并建构全球经销商网络,任何问题,您可以使用习惯的语言与我们联系。

