

免疫共沉淀与 Western Blot

实验步骤:

1. 以 60mm 细胞培养皿为例，细胞转染后 24—36 小时后，吸净培养液（可用 PBS 小心漂洗一次）。
2. 加入 500 μ l 预冷的 1 \times lysis buffer, 于 4 $^{\circ}$ C 或冰上放置裂解细胞 5 分钟。
3. 将细胞裂解液转移到 1.5 ml eppendorf 管内，于冷冻离心机 4 $^{\circ}$ C，13000 g 离心 30 分钟。
4. 将离心后的上清液分为两份：一份 35 μ l，加入等体积的 2 \times SDS sample buffer, 混匀后于 100 $^{\circ}$ C 煮 10 分钟，做为总细胞裂解液（total cell lysate, TCL）于 -20 $^{\circ}$ C 保存，或取 6—10 μ l 进行 SDS—PAGE 电泳，Western blot 检测目的蛋白的表达水平（接第 5 步）。另一份用于免疫沉淀，具体操作如下：
 - 1) 分 A/G beads: 按每管（一个免疫沉淀样品）加入 5 μ l Agrose A/G beads 及 5 μ l (1 μ g) 抗体计算一次实验所用 beads 及抗体的总量，将抗体和 beads 混合，补充 lysis buffer（补充的 lysis buffer 的量能使每管能均匀分配到 50 μ l beads 及抗体的混合物），将 beads 及抗体的混合物按每管 50 μ l (含 5 μ l beads 及 5 μ l 抗体) 分配到 1.5 ml Eppendorf 管中，再加入 400 μ l 1 \times lysis buffer，备用；
 - 2) 从步骤 4 中另一份用于免疫沉淀的上清液中取 400 μ l 加入到上一步（步骤 1)）已分好的 beads 中，使终体积达到 850 μ l，将管子固定到混匀器上使混匀器匀速旋转（15 rpm）免疫沉淀 3 小时；
 - 3) 将免疫沉淀后的溶液于 4 $^{\circ}$ C 3000 rpm 离心 3 分钟，去上清，加入 500 μ l 1 \times lysis buffer 洗涤 beads，于冷冻离心机 4 $^{\circ}$ C 3000 rpm 离心 3 分钟，弃上清，共洗涤三次。
 - 4) 最后一次洗涤完毕，弃上清，管中只剩 Beads，加入 35 μ l 1 \times lysis buffer 与等体积 2 \times SDS sample buffer 混合，于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 分钟，稍离心后取 10 μ l 左右上样到 PAGE 胶，进行电泳，或 -20 $^{\circ}$ C 冻存。
5. 电泳完毕，取下 PAGE 胶，与 PVDF 膜做成"三明治"形状，用湿转法进行电转 1 小时。
6. 电转完毕，取下 PVDF 膜，加入 5% 脱脂奶粉，于脱色摇床摇荡（75 rpm）封闭 1 小时以消除非特异背景。

7. 封闭完毕，用 TBST 洗掉牛奶，加入一抗，于脱色摇床摇荡孵育（75 rpm）1 小时，使一抗与特异蛋白结合。
8. 回收一抗，用 TBST 洗 3 次（75 rpm），每次 5—10 分钟。
9. 加入二抗，于脱色摇床孵育 1 小时，使二抗与一抗结合。
10. 用 TBST 洗 3 次，每次 5—10 分钟。
11. 将 ECL A 液和 ECLB 液各 1ml，混匀，放入二抗孵育后的 PVDF 膜 30 秒，将 PVDF 膜平铺于曝光盒中，进暗房，用医学 X 光胶片曝光。
12. 经过显影、定影后的胶片，于室温下自然风干或烘干，描画蛋白 marker 便于分析。

注：如只做 Western Blot，跳过步骤 4 即可。

实验试剂：

1. PBS:

NaCl 20mM, KCL 2.68mM, Na₂HPO₄10mM, KH₂PO₄ 1.76mM (pH7.4), 室温保存。

2. 1×lysis buffer:

Tris-HCl 20 mmol/L(pH7.5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%, Sodium pyrophosphate 2.5 mM, β-Glycerophosphate 1 mM, NaVO₄ 1 mM, Leupeptin 1 ug/ml, -20℃ 保存。（稀释成 1×lysis buffer 后加入 1 mM PMSF ）

3. 2×SDS sample buffer:

Tris-Cl (pH 6.8) 125 mM, SDS 4%, 甘油 20%, DTT 100 mM, 溴酚兰 0.02%, 室温保存。

4. 分离胶（下层胶）（10% SDS-PAGE）15 ml:

30% 丙烯酰胺 5 ml, 10×lower buffer (pH 8.8) 1.5 ml, H₂O 8.5 ml, 10% AP 15 μl, TEMED 15 μl。

5. 10 × lower buffer (pH 8.8) 100 ml:

42.25 g Tris base, 10 ml 10%SDS, 室温保存。

6. 压缩胶（上层胶）（4 % SDS-PAGE）5 ml:

30% 丙烯酰胺 0.65 ml, 4×stacking buffer (pH 6.8) 1.25 ml, H₂O 3.05 ml, 10% AP 5 μl, TEMED 5 μl。

7. 4 × stacking buffer (pH 6.8) 100 ml:

6.06 Tris base, 4 ml 10%SDS, 室温保存。

8. 电泳缓冲液:

Tris base 0.125 M, 甘氨酸 0.96 mM, SDS 0.5%, 室温保存。

9. 电转缓冲液:

Tris 25 mM, 甘氨酸 0.2 mM, 甲醇 10%, 室温保存。

10. 10×TBS (pH 7.6):

Tris base 2.42%, NaCl 8%, 室温保存。

11. TBST:

1×TBS, Tween-20 0.1%, 室温保存。