ttt

**免疫共沉淀(Co-IP)实验报告**

**检测结题报告**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **客户姓名** |  | **订单编号** |  |
| **项目启动日期** |  | **项目完成日期** |  |
| **报告撰写人** |  | **报告复核人** |  |
| **报告授权人** |  | **报告生效日期** |  |

尊敬的客户：

您好！

**成都奥创生物科技有限公司**是联合多家高校、科研院所发起，由一批基础生物学、生物医药、临床医学领域杰出的科学家带队组成。主营业务包括整体课题项目服务实验（分子、蛋白、细胞、动物、病理等），全方位生物、医学研究技术服务和科研设计咨询、生物医药企业CRO外包服务等。

**成都奥创生物**联合多位来自于了中山大学、四川农业大学、华中农业大学、四川大学、中科院等著名高校以及研究机构的专家学者担任企业顾问，其中专业覆盖肿瘤学、蛋白免疫学、分子生物学、细胞生物学、形态学等诸多领域，并与国内相关领域的专家以项目合作的方式联合开展转化医学研究，组成了一个优势交叉互补、高度专业的科研团队，负责研发课题的具体实施和推进，确保各项目的高效与质量。致力于实验科研平台互联，资源共享。借助此平台为广大科研院校，生物医药企业及个人提供分子、蛋白、细胞、病理等研究技术服务。

1. **整体项目平台**

能为广大客户提供从课题咨询，课题设计，项目实施到论文撰写，润色，发表等一站 式整体课题外包服务，强大的科研团队，全面的技术平台和完善的管理体系，让您的课题进展更加高效。

1. **核酸研究平台**

服务项目：核酸抽提，常规PCR，荧光定量PCR，微滴式数字PCR，载体构建，甲基化检测等。

1. **蛋白与免疫平台**

服务项目：Western blot，无标记分子互作检测，ELISA，多因子蛋白悬液芯片检测，蛋白表达纯化，蛋白质谱等。

1. **细胞研究平台**

服务项目：细胞周期，细胞凋亡，细胞增殖，细胞共培养及趋化，细胞迁移及侵袭，细胞粘附检测，流式细胞检测，稳转细胞系构建，细胞单克隆形成检测，双荧光素酶检测，显微拍照检测等。

1. **病毒包装平台**

服务项目：慢病毒包装，逆转录病毒包装，腺病毒包装，腺相关病毒包装等。

1. **病理染色**

服务项目：各类切片及染色服务，免疫荧光，免疫组化，原位杂交染色等。

1. **动物模型平台：**

服务项目：常见疾病动物模型及肿瘤模型构建。

**我们的服务承诺：** █ 唯一 █ 真实 █ 专业 █ 效率

欢迎科研院所、医院、生物医药企业的广大用户来我公司进行科研项目订制，我们将为您提供专业高效的一站式科研服务。

## 声明

为保证独立、客观、公正地从事检验检测工作，提高服务质量。现以奥创生物名义，向社会各界和客户作如下声明，并接受有关单位和客户的监督。

1、遵守国家的各项法律、法规、政策，严格执行有关标准，规范及细则等技术文件开展检测工作，以诚实、公正的态度确保检测工作质量，并对检测结果负责。

2、公司具有固定的工作和检验检测场所，拥有与开展的检测工作相匹配的专业技术、管理人员，拥有相关检测所需的设备设施。

3、承诺对客户的技术、资料、数据和其他商业机密严格保密，切实维护客户的权益，绝不利用客户的技术和资料从事技术开发和技术服务。

4、承诺对所有委托方一视同仁，提供相同的优质、高效服务，保证检测数据和结果的真实、客观、准确。

5、承诺出具的检验检测数据、结果独立于所涉及的利益相关方，不受任何可能干扰其技术判断因素的影响，确保检验检测数据、结果的真实、客观、准确。

以上声明，本公司全体人员必须严格遵守。

成都奥创生物科技有限公司

目录

[声明 4](#_Toc29411)

[一、 样本信息 6](#_Toc25442)

[二、 实验仪器 6](#_Toc13349)

[三、 实验步骤 7](#_Toc30669)

[1. 样本的制备 7](#_Toc29934)

[组织 8](#_Toc10092)

[单层生长的细胞 8](#_Toc19394)

[细胞悬液 8](#_Toc16126)

[2. 样品、抗体、Protein A+G磁珠共孵育 8](#_Toc18821)

[1） Protein A+G磁珠的准备 8](#_Toc11888)

[2） 抗体与Protein A+G磁珠共孵育 8](#_Toc7837)

[3. 免疫沉淀（IP） 9](#_Toc11257)

[4. 结果分析 9](#_Toc31277)

# 样本信息

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样本编号 | 样本来源 | 样本类型 | 样本量 |
|  |  |  |  |

# 实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **仪器名称** | **品牌** | **型号** |
| 高速冷冻离心机 | SciloEGX | CF1524R |
| 空气摇床 |  |  |
| 微量离心机 | SciloEGX | S1010 |
| 磁力架 |  |  |
| 电泳装置 | HTJY | HT-300 |
| 转膜装置 | HTJY | HT-ZY02 |
| 恒温金属浴 | SCILOGEX | SCI-100HCM-Pro |
| 高速低温组织研磨仪 | Servicebio | KZ-IH-F |
| 酶标仪 | Betie | HBS-1096A |
| 化学发光成像系统 | 上海勤翔 | ChemiScope 6100 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640110 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 464000 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640040 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640050 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640060 |
| 手动单通道移液器 | Eppendorf | M15465K |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **试剂名称** | **品牌** | **货号** |
| RIPA裂解液（强） | Servicebio | G2002-100mL |
| Protein A+G磁珠 | Beyotime | P2108-1mL |
| SWE快速高分辨b电泳缓冲液干粉 | Servicebio | G2081 |
| 转膜缓冲液干粉 | Servicebio | G2017 |
| 脱脂牛奶 | Servicebio | GC310001-100g |
| 10×TBST | Biosharp | BL315B |
| 甲醇（AR） | KESHI | 67-56-1 |
| 2× Laemmli加样缓冲液 | Absin | ABS9237-5mL×2 |
| 凝胶准备试剂盒 | Servicebio | G2037-50T |
| PMSF | Servicebio | G2008-1ML |
| 50×Cocktail蛋白酶抑制剂 | Servicebio | G2006-250UL |
| 0.45um PVDF膜 | Immobilon | IPVH00010 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **耗材名称** | **品牌** | **货号** |
| 离心管 | LABSELECT | MCT-001-150 |
| 研磨管 | Servicebio | HT-200-M |
| 转膜滤纸（薄） | Servicebio | G6007-500 |
| 转膜滤纸（厚） | Servicebio | G6001-16 |
| 移液器吸头 | biosharp | BS-10-T |
| 移液器吸头 | LABSELECT | T-001-200 |
| 移液器吸头 | biosharp | BS-1000-T |
| 移液器吸头 | LABSELECT | T-001-1250 |

# 实验步骤

### 1. 样本的制备

Co-IP通常使用未经冻存的新鲜蛋白样品。选择合适的裂解液制备细胞或组织。制备好的裂解液上清置于冰上或4℃保存，新鲜制备好的样品，建议尽量当天完成免疫沉淀等后续操作，但如果样品不能当天使用，也可以适当分装后-80℃冻存。

组织

每50-100mg组织加1ml裂解液RIPA，用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积不应超过裂解液RIPA体积的十分之一。

单层生长的细胞

直接在培养板中加入裂解液裂解细胞，每10cm2面积加1ml RIPA。用移液枪抽打若干次至溶液透明。

细胞悬液

离心取细胞，弃上清。每5-10×106动物细胞和植物细胞加入1ml裂解液RIPA。

### 2. 样品、抗体、Protein A+G磁珠共孵育

### 1） Protein A+G磁珠的准备

用移液枪轻轻吹打重悬磁珠（每500µl样品10µl磁珠），置于磁力架上分离10秒，去除上清。重复此步骤两次后，按照初始体积的量，用TBST重悬磁珠。

### 2） 抗体与Protein A+G磁珠共孵育

A．诱饵蛋白抗体的准备。使用TBST将诱饵蛋白抗体稀释至推荐比例，置于冰上备用。使用诱饵蛋白抗体同种属IgG作为阴性对照。

B．诱饵蛋白抗体与磁珠吸附。将步骤一中准备好的磁珠进行磁性分离，去除上清，加入500µl诱饵蛋白抗体稀释液或500µl IgG翻转孵育15分钟-1小时。

C．洗涤。加入500µl TBST，轻轻重悬磁珠后，放于磁力架上进行磁分离。重复洗涤3次后，按照初始体积的量，加入TBST重悬磁珠。

### 3. 免疫沉淀（IP）

A．样品与磁珠共孵育。每500µl样品加入10µl磁珠，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育2小时或4℃孵育过夜。

B．磁分离。孵育完毕后，置于磁力架上分离10秒，去除上清。

C．洗涤。加入500μl TBST，用移液器轻轻吹打重悬磁珠。置于磁力架上分离10秒，去除上清。重复洗涤三次。

D．SDS-PAGE上样缓冲液洗脱。

(a)每10μl原始磁珠体积的磁珠，加入100μl 1×SDS-PAGE上样缓冲液，95℃加热5分钟。注：洗脱液的体积可以酌情适当调整。

(b)置于磁力架上分离10秒，取上清进行SDS-PAGE电泳或Western检测。

### 4. 结果分析

使用ImageJ打开图片，使用Photoshop排版结果图片。

**详细实验结果见附件一、附件二**