

# 免疫共沉淀实验基础操作

From Gene To Antibody

普健生物（武汉）科技有限公司  
AtaGenix Laboratories





## 蛋白重组表达

XtenCHO高密度表达系统

昆虫杆状病毒表达系统

稳定细胞株构建

## 抗体定制服务

兔单克隆抗体制备

纳米抗体制备

抗体对开发

## 重组抗体表达

嵌合抗体生产

抗体片段生产

大规模重组抗体生产

## 抗体药物开发

人源化抗体

双特异性抗体

抗独特型抗体

**普健生物（武汉）科技有限公司**

始于2012，一站式抗体发现整体解决方案

3551光谷人才计划

——2013年

高新技术企业

——2017年

光谷瞪羚企业

——2018年

武汉国家生物产业基地  
抗体发现与筛选公共服务平台

——2022年

# 目录

CONTENTS

01 定义及原理

02 操作流程

03 技术优缺点

04 注意事项

05 常见问题解析





## 免疫共沉淀定义以及原理

### 定义

免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation)也称免疫吸附或免疫拉下技术, 能够从细胞裂解物中特异性的分离并富集蛋白

CO-IP是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础的用于研究蛋白质相互作用的经典方法。是确定两种蛋白质在完整细胞内生理性相互作用的有效方法。



## 免疫共沉淀定义以及原理

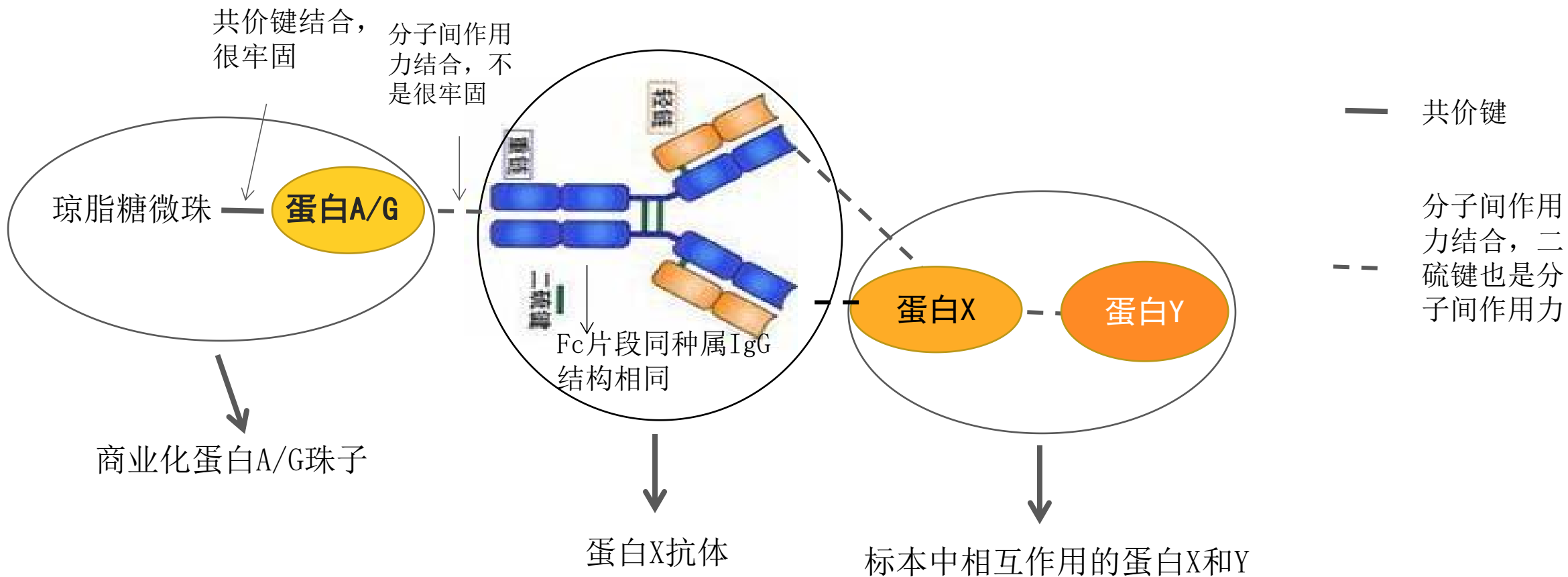
### 基本原理

当细胞在非变性条件下被裂解时，完整细胞内存在的许多蛋白质 - 蛋白质间的相互作用被保留了下来。如果用蛋白质X的抗体免疫沉淀X，那么与X在体内结合的蛋白质Y也能沉淀下来。这种方法常用于测定两种目标蛋白质是否在体内结合；也可用于确定一种特定蛋白质的新的作用搭档



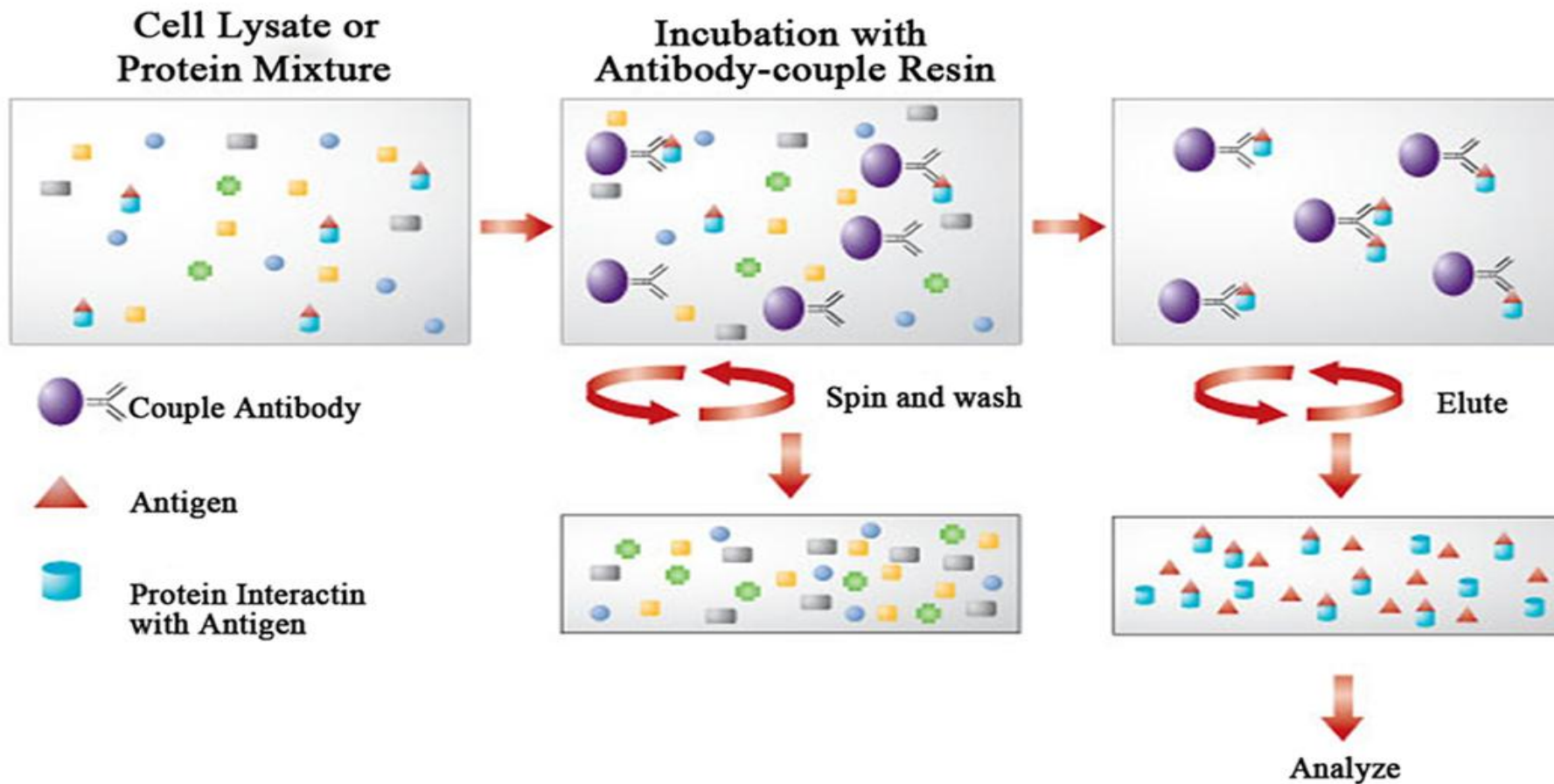
# 免疫共沉淀定义以及原理

## 原理解析图





# 操作流程





## 操作流程

### 样品制备

- 如样本是细胞加入合适的细胞裂解液（1ml/2-5\*10<sup>7</sup>），收集细胞裂解液，测定蛋白浓度。

### 免疫共沉淀

- 吸取含有1-3mg总蛋白的裂解物200-400 μl，加入EP管中，同时加入1-4 μg特异性抗体。另取等量蛋白裂解物，加入等量同型IgG孵育作为Control IgG对照组。4℃，旋转2-4h或过夜。加入抗体前需留一部分蛋白裂解物样本作为阳性对照。
- 然后加入50 μl重悬的 Protein A 琼脂糖珠，4℃ 旋转孵育1-4h。

### 微珠清洗

- 免疫沉淀反应后，离心收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物，用PBS洗涤复合物，4℃、2500rpm离心5min重复4-5次，以游离抗原抗体和珠子
- 最后一次洗涤之后，尽可能的吸去上清液，然后，加入80 μL 1×还原型上样缓冲液，沸水煮10min，4℃，2500rpm，离心5min取上清

### 分析

- 将上清电泳WB或质谱分析





## 技术优缺点

### 优点

- 相互作用的蛋白质都是经翻译后修饰的，处于天然状态；
- 蛋白的相互作用是在自然状态下进行的，可以避免人为的影响；
- 可以分离得到天然状态的相互作用蛋白复合物。

### 缺点

- 可能检测不到低亲和力和瞬间的蛋白质-蛋白质相互作用；
- 两种蛋白质的结合可能不是直接结合，而可能有第三者在中间起桥梁作用；
- 实验对抗体要求较高，不同抗体和抗原结合能力也不同，能做WB的抗体未必能做COIP。实验之前要仔细检查抗体的说明书。



## 注意事项

1、细胞裂解采用温和的裂解条件，不能破坏细胞内存在的所有蛋白质-蛋白质相互作用，多采用非离子变性剂（NP40或Triton X-100）。为了减少对蛋白互作的破坏裂解时尽量不超声，可用移液枪吹打混匀；

2、不能用高浓度的变性剂（0.2% SDS），细胞裂解液中要加各种酶抑制剂；

3、使用对照抗体：单克隆抗体：正常小鼠的IgG或另一类单抗；兔多克隆抗体：正常兔IgG；

4、确保共沉淀的蛋白是由所加入的抗体沉淀得到的，而非外源非特异蛋白，单克隆抗体的使用有助于避免污染的发生；

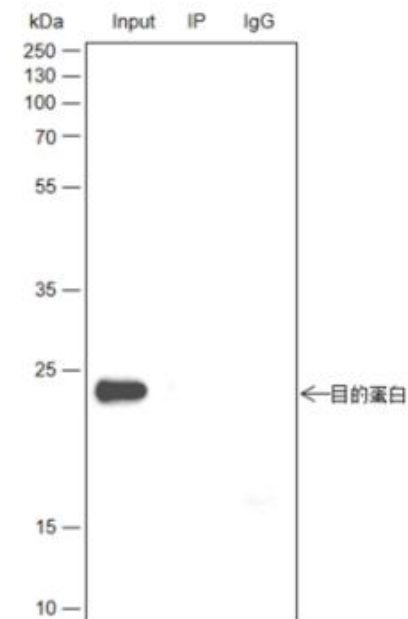
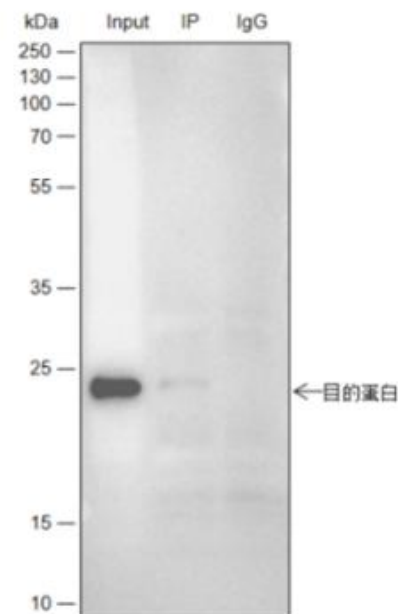
5、要确保抗体的特异性，即在不表达抗原的细胞溶解物中添加抗体后不会引起共沉淀；

6、确定蛋白间的相互作用是发生在细胞中，而不是由于细胞的溶解才发生的，这需要进行蛋白质的定位来确定。



# 常见问题解析

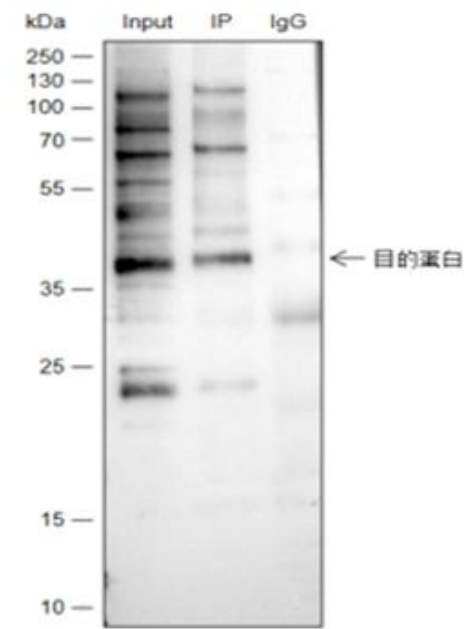
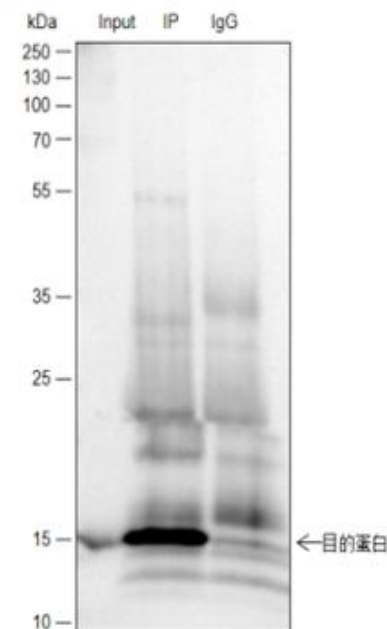
结果	原因	解析
IP泳道无信号, 信号弱	目的蛋白在样品中不表达, 低表达, 作用力弱	查阅蛋白表达谱, 上样量
	蛋白提取不充分或降解, 作用力破坏	选择合适的裂解液
	抗体和珠子没有发生很好的结合	选择合适的微珠
	抗体选择不当	选择IP级别的抗体
	抗体用量太少	增加抗体使用量
	目的蛋白没有被洗脱下来	使用合适的洗脱液保证洗脱液的强度和PH值





# 常见问题分析

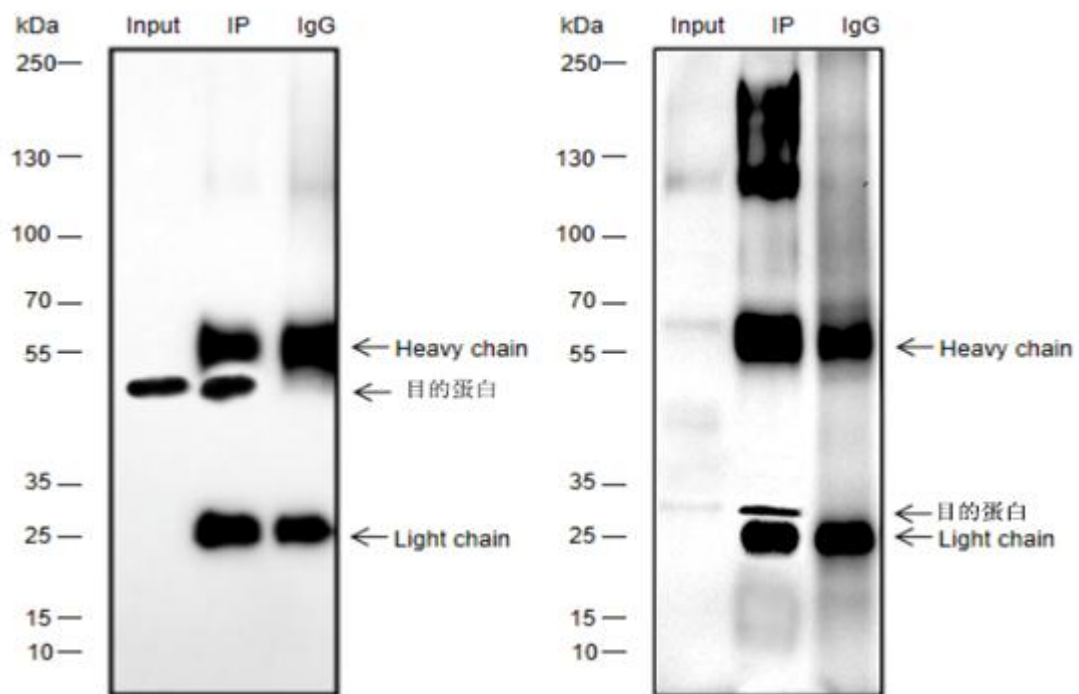
结果	原因	解析
IP泳道高背景, 非特异性信号	样品中有不完全溶解的大的蛋白复合物	制备样品后短暂的超声处理, 然后离心, 取上清进行后续实验
	样品发生降解	裂解液中加入蛋白酶抑制剂或新鲜制备样本
	珠子非特异性结合蛋白	减少珠子的用量
	抗体特异性不好	更换抗体
	抗体用量太多	使用适量抗体, 进行梯度实验





# 常见问题分析

结果	原因	解析
轻重链干扰	目的蛋白接近55KDa或25KDa	选择只和轻链或重链反应的二抗，或者选择不同种属的二抗





# 谢 谢 观 看!

网址: [www.atagenix.cn](http://www.atagenix.cn)

邮箱: [Sales@atagenix.com](mailto:Sales@atagenix.com)

武汉市东湖新技术开发区神墩四路666号C栋

