

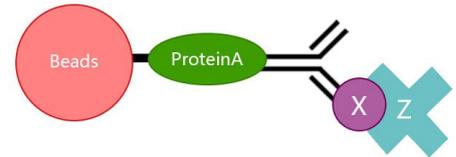
免疫共沉淀概述

相关服务：[Co-IP 蛋白互作检测服务](#)

免疫共沉淀 (Co-IP) 是利用抗原与抗体之间的专一性作用为基础，用于研究蛋白质与蛋白质之间相互作用的经典方法。利用免疫共沉淀可以检测两个已知蛋白之间的相互作用，或者利用已知蛋白寻找与之相互作用的未知蛋白。相较于其他分子间相互作用检测方法 (GST pull down 等)，免疫共沉淀实验的优势在于蛋白的结合在细胞内完成，能够反应天然状态下的蛋白质相互作用，结果更加真实可靠。

实验原理

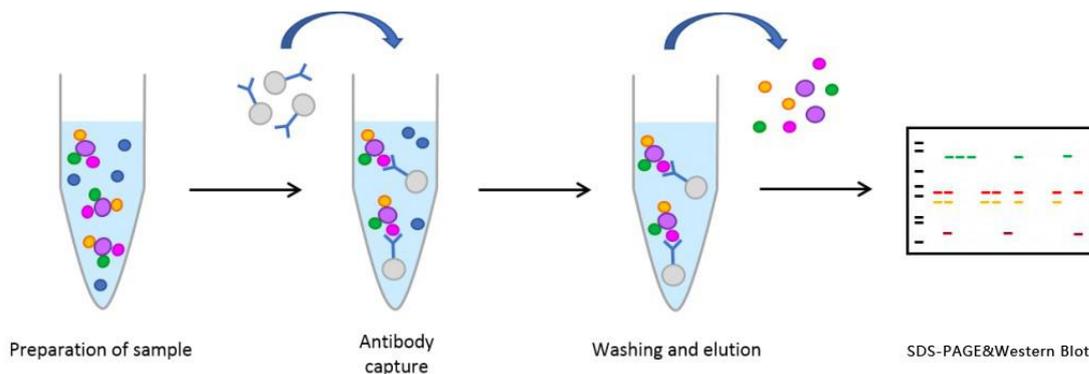
当细胞在非变性条件下被裂解时，完整细胞内存在的许多蛋白质-蛋白质相互作用被保留了下来，假如细胞内存在 XY 蛋白复合物，用 X (X 也称为诱饵蛋白) 的抗体免疫沉淀 X，那么与 X 在体内结合的蛋白质 Y (Y 也称为靶蛋白) 也被沉淀下来。因此在细胞裂解液中加入 X 的抗体



沉淀蛋白 X，随后利用[蛋白印迹 \(western blot, WB\)](#) 检测沉淀中是否存在蛋白 Y，如果存在，则说明细胞内存在 XY 蛋白复合物，即蛋白 XY 存在相互作用。

Co-IP 实验流程

免疫共沉淀实验流程为：收集蛋白样品—诱饵蛋白抗体沉淀诱饵蛋白—SDS-PAGE 分离蛋白—WB 检测是否存在靶蛋白。详细实验操作流程请至“[免疫共沉淀实验操作流程及注意事项](#)”查看。



收集蛋白样品

蛋白样品通常通过裂解细胞得到。Co-IP 实验通常有两种，一种为内源性蛋白相互作用验证，另外一种为非内源性蛋白相互作用验证，内源性相互作用是指两蛋白相互作用在细胞内发生，即通过质粒共转染的方式将两种蛋白转染至同一细胞内表达，表达完成后收集细胞进行裂解得到蛋白样品。非内源性相互作用两蛋白相互作用在细胞外发生，即将含有靶蛋白的动植物组织、器官进行预处理及细胞裂解获得细胞裂解液，随后将诱饵蛋白（通常为重组表达纯化获得）加入细胞裂解液中，得到蛋白样品。

沉淀诱饵蛋白

利用磁珠偶联抗体沉淀诱饵蛋白：在样品中加入磁珠偶联抗体，抗体会与诱饵蛋白结合，利用磁铁将磁珠拉下，同时诱饵蛋白会一起被沉淀出来。如果存在与诱饵蛋白的相互作用的靶蛋白，也会被沉淀下来。如果没有诱饵蛋白的特异性抗体，可以给诱饵蛋白加上标签（Myc、HA、Flag 等），然后利用标签抗体沉淀蛋白。

SDS-PAGE 及 WB 检测

得到沉淀后，需要验证沉淀中是否存在相互作用蛋白。先利用 SDS-PAGE 将蛋白复合物分离，随后利用 WB 检测是否存在靶蛋白（如果靶蛋白的分子量是已知的，可以直接用 SDS-PAGE 检测是否存在靶蛋白）。

实验对照设置

为了确保最终得到的结果是天然状态下的相互作用，而不是由于某些方面造成的人工相互作用（也就是“假阳性”），在 Co-IP 的实验设计过程中，需要设置正确的对照。

假设 Co-IP 实验的实验组为“磁珠+抗 X 抗体+靶蛋白 X+目的蛋白 Y”，则可能出现的“假阳性”及对应需要设置的实验对照如下表所示：

可能出现的“假阳性”	需要设置的对照实验
磁珠与蛋白 X 非特异性结合	“磁珠+抗体 X+抗体 Y”
磁珠与蛋白 Y 非特异性结合	“磁珠+蛋白 Y”
抗 X 抗体和 Y 非特异性结合	“磁珠+抗体 X+蛋白 Y”
抗 X 抗体（或磁珠）会和细胞裂解液内其它蛋白结合	“磁珠+抗体 X+未转染质粒的宿主细胞裂解液”
抗体的非特异性结合	“normal IgG+蛋白 X+蛋白 Y”

上述为了避免出现“假阳性”的对照称为阴性对照，除此之外 Co-IP 实验还会设置一个阳性对照组（Input 组），Input 组为直接利用抗体 X（抗体 Y）对细胞裂解液进行 WB 检测，验证细胞裂解液中存在蛋白 X（抗体 Y）。在某些 Co-IP 实验中，实验人员会把 IP 后的上清分别进行蛋白 X 和蛋白 Y 的 WB 检测，该对照组称为 output 组。利用内源性 Co-IP 实验为验证两个蛋白是否存在已知作用，如果最终的结果为阳性，则可以证明两个蛋白之间存在相互作用；但如果结果为阴性，无法证明两个蛋白之间不存在相互作用，也有可能是蛋白在细胞内表达量低等原因导致。因此在进行内源性 Co-IP 验证两个蛋白是否存在相互作用时，建议先做过表达 Co-IP 作为对照。

免疫共沉淀结果真实性

在免疫共沉淀实验中要保证实验结果真实性，应注意以下几点：

- 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](#)具有特异性强、可大量生产、易标准化等优点，使用单克隆抗体有助于避免污染的发生；
- 要确保抗体的特异性，如果抗体不能和细胞溶解物中的抗原结合，则不会引起共沉淀反应；
- 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。

免疫共沉淀技术应用

免疫共沉淀实验可以用于：

- 测定两种目标蛋白质是否在体内结合

- 确定一种特定蛋白质的新的作用搭档
- 分离得到天然状态的相互作用蛋白复合物

随着对蛋白质研究的不断深入，人们将免疫沉淀方法与其他方法结合起来，在其基础上衍生出许多较为复杂的技术，从而使得分析方法更为多样化，它的应用范围也相当的广泛。免疫共沉淀是用来研究蛋白质与蛋白质相互作用的一种技术，可以应用于蛋白复合物的研究。它可验证蛋白复合物的存在，进而发现新的蛋白复合物；免疫共沉淀技术与免疫印迹法或质谱等方法结合，用于确定诱饵蛋白-目的蛋白在天然状态下的结合情况，确定特定蛋白质的新作用搭档。免疫共沉淀实验也可以应用于低丰度蛋白的富集和浓缩。

同时免疫共沉淀技术是一个相对比较经典的探讨蛋白质间相互作用的技术，在现代医学研究中应用范围广泛且可信度较高。蛋白质之间相互作用渗透于机体每一个细胞的生命活动过程中，生物学中会出现很多现象如复制、转录、翻译、剪切、分泌、细胞周期调控、信号传导和中间代谢等都受到蛋白质间相互作用的调控。有些蛋白质由多个亚单位组成，蛋白质之间的相互作用就显得尤为普遍。又有些蛋白质结合得十分紧密；而有些蛋白质却只有短暂的相互作用。可是不论出现哪些种情况，它们都控制着大量的细胞生命活动的事件，比如细胞的增殖、分化和死亡。且通过蛋白质之间的相互作用，能改变细胞内蛋白质的动力学特征，比如底物结合特性、催化活性，也可以产生新的结合位点，对改变蛋白质对底物的特异性有作用，还可以使其他蛋白质失活，其他基因表达得到调控。因此，只有让蛋白质之间相互作用得以顺利进行，细胞的正常生命活动过程才会得到保障。因为蛋白质之间相互作用具有如此重大的意义，所以它的检测方法的研究也备受关注与重视。自此以后蛋白相互关系的研究会愈演愈烈，未来不仅仅可以通过免疫共沉淀技术来证实，还将会有越来越多的先进技术值得去应用和发展。

其他相互作用检测方法

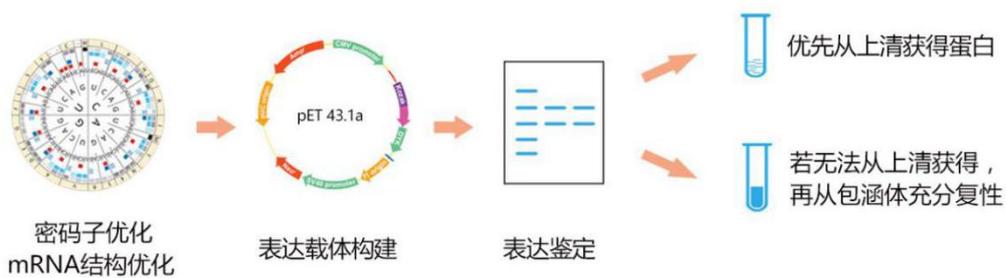
- [Gst pull down](#)
- [生物膜光学干涉技术 \(BLI \)](#)
- [酵母双杂交技术](#)

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

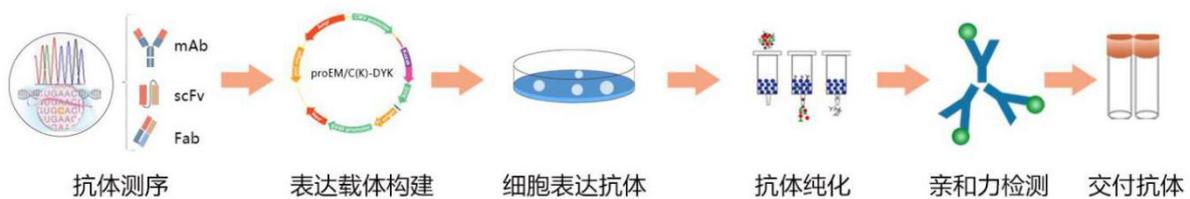
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

