

xxx 蛋白和 xxx 蛋白免疫共沉淀实验

项目编号: xxx

客户单位: xxx

联 系 人: xxx

联系方式

胡志伟

手机号码: 18667909633

河南臻质生物科技有限公司

河南省郑州市金水区鸿苑路 65 号金科智汇谷 1 号楼 2 层

目录

一、背景介绍.....	3
二、实验原理.....	4
三、实验材料.....	5
1. 主要试剂.....	5
2. 样本材料.....	5
2.1 细胞.....	5
2.2 实验方案设计.....	5
四、技术路线.....	6
五、实验步骤.....	6
1.蛋白提取.....	6
2. IP 孵育.....	7
3.样本洗脱.....	7
4、WB 检测.....	7
六、Co-IP 检测结果.....	8
七、实验结论.....	8



一、背景介绍

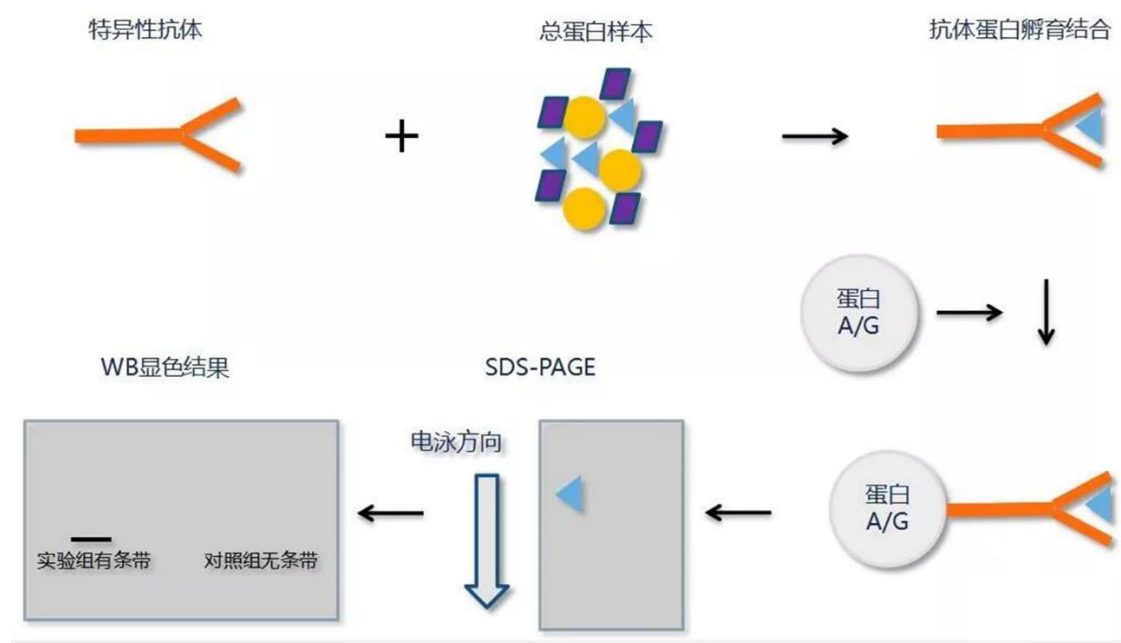
蛋白质之间相互作用渗透于机体每一个细胞的生命活动过程，生物学中会出现很多现象如复制、转录、翻译、剪切、分泌、细胞周期调控、信号传导和中间代谢等都受到蛋白质复合体调控。而复合体由多个蛋白质组成，蛋白质之间的相互作用就显得尤为重要；然而蛋白质与蛋白质之间的相互作用十分复杂：有些蛋白质结合得十分紧密，而有些蛋白质却只有短暂的相互作用。可是不论出现哪些种情况，它们都控制着大量的细胞生命活动事件，比如细胞的增殖、分化和死亡。且通过蛋白质之间的相互作用，能改变细胞内蛋白质的动力学特征，比如底物结合特性、催化活性，也可以产生新的结合位点，对改变蛋白质对底物的特异性有作用，还可以使其他蛋白质失活和其他基因表达得到调控。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。正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愈演愈烈。

免疫共沉淀是用蛋白质 X 的抗体免疫沉淀蛋白质 X，那么与蛋白质 X 在体内结合的蛋白质 Y 也能沉淀下来，利用 Western blot 就可以检测两个蛋白之间是否有相互作用。免疫共沉淀技术有着自己独特的优势，在确定两种蛋白相互作用的方法技术上，通常作为首选技术，因此免疫共沉淀技术得到广泛应用。

免疫共沉淀技术主要应用方面有：1、可以测定两种目标蛋白质是否在体内结合；2、确定一种特定蛋白质的新的作用搭档；3、分离得到天然状态的相互作用蛋白复合物；4、免疫共沉淀实验也可以应用于低丰度蛋白的富集和浓缩。随着对蛋白质研究的不断深入，人们将免疫共沉淀技术与其他方法结合起来，在其基



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，它的应用范围也在增大。基于这些技术的支持，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。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。



Co-IP 实验流程图

二、实验原理

免疫沉淀是利用抗体特异性反应纯化富集目的蛋白的一种方法。抗体与细胞裂解液或表达上清中相应的蛋白结合后，再与蛋白 A/G（Protein A/G）偶联的 agarose 或磁珠孵育，得到珠子-蛋白 A/G-抗体-目的蛋白复合物，在高温及还原剂的作用下，抗原与抗体解离，收集上清，上清中包括抗体、目的蛋白和少量的杂蛋白。



三、实验材料

1. 主要试剂

试剂名称	供应商
IP 裂解液	Beyotime
蛋白酶抑制剂混合物	Beyotime
Protein A/G Magnetic Beads	MCE
5XSDS loading buffer	Beyotime
BCA 试剂盒	Beyotime

2. 样本材料

2.1 细胞

样品名称	分组编号

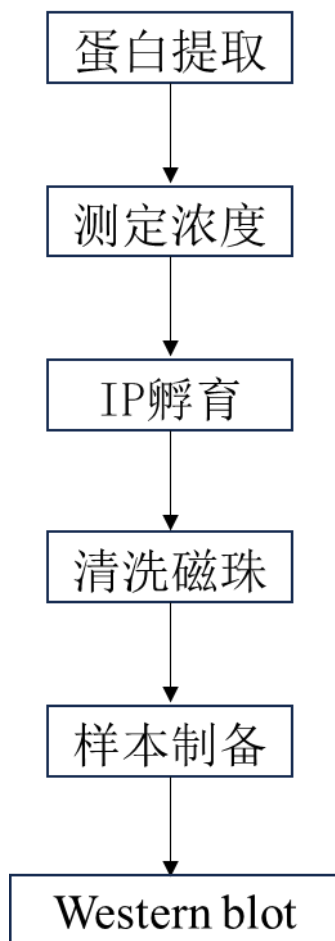
2.2 实验方案设计

实验方案设计分组如下：

对照组	实验组
IgG	



四、技术路线



五、实验步骤

1. 蛋白提取

- (1) 收集细胞；
- (2) 加入适量含有蛋白酶抑制剂的 IP Lysis Buffer，涡旋混匀；
- (3) 于 4℃ 转盘上裂解 30 min；
- (4) 用高速冷冻离心机离心 10 min，4℃，12000 r/min，取上清即为总蛋白；
- (5) BCA 测定蛋白浓度后，取 100 μ L 总蛋白液，加入 25 μ L 1×SDS Loading Buffer，99℃ 金属浴 5 min，记为 Input 组，-80℃ 保存备用。



2. IP 孵育

- (1) 向余下总蛋白中加入抗体及相应的对照 IgG 抗体，4 度过夜旋转孵育；
- (2) 将 Protein A/G beads 上下颠倒混匀数次，取 50 μ L 到 2 个洁净的 1.5 mL EP 管中，标记上对应的名称；
- (3) 加入 1mL 预冷的 PBST 重悬 beads，分离 beads 和溶液，用移液枪小心吸弃上清；
- (4) 重复洗涤 2 次，共洗 3 次，最后加入上述步骤的孵育混合物室温旋转孵育 2 小时。
- (5) 弃上清，加入 1mL 预冷的 PBST 重悬 beads，分离 beads 和溶液，重复洗涤 4 次；

3. 样本洗脱

加入 70 μ L SDS Loading Buffer (1 $\times$)，99 $^{\circ}$ C 金属浴 5 min，12000 rpm 离心 5min，取上清，记为 IP 组，-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

4、WB 检测

将 Input 组、IP 组、IgG 组进行 WB 实验，观察条带分子量以检测实验结果。



六、Co-IP 检测结果

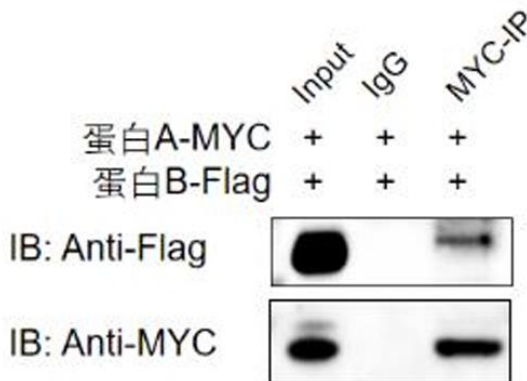


图 1 pcDNA3.1(+)-***-4×myc 和 pcDNA3.1(+)-***-3×Flag Co-IP 结果图

Note: input 组为细胞总蛋白，作为检验整个蛋白表达体系是否正常的标准（有无正确大小的条带），IP 组为需要免疫沉淀的蛋白，用来共沉淀可能互作的蛋白。

七、实验结论

（1）Input 组分别用 A 蛋白和 B 蛋白抗体进行 WB 检测，WB 结果显示在 xxxKDa 和 xxx KDa 检测到目的条带，与 A 蛋白和 B 蛋白理论大小相一致；

（2）IP 组分别用 A 蛋白和 B 蛋白抗体进行 WB 检测，WB 结果显示在 xxxKDa 和 xxxKDa 检测到目的条带，与 A 蛋白和 B 蛋白理论大小相一致；

（3）IgG 组分别用 A 蛋白和 B 蛋白抗体进行 WB 检测，WB 结果显示没有检测到目的条带。

综上所述，IP 实验成功，实验完整；A 蛋白和 B 蛋白有互作。

