

免疫共沉淀 Co-IP 实验操作步骤

一、原理：

免疫共沉淀 (Co-Immunoprecipitation) 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。其原理是：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。目前多用精制的 prorein A 预先结合固化在 argarose 的 beads 上，使之与含有抗原的溶液及抗体反应后，beads 上的 prorein A 就能吸附抗原达到精制的目的。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。

其优点为：（1）相互作用的蛋白质都是经翻译后修饰的，处于天然状态；（2）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；（3）可以分离得到天然状态的相互作用蛋白复合物。缺点为：（1）可能检测不到低亲和力和瞬间的蛋白质 - 蛋白质相互作用；（2）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；（3）必须在实验前预测目的蛋白是什么，以选择最后检测的抗体，所以，若预测不正确，实验就得不到结果，方法本身具有冒险性。

二、准备工作：

预冷 PBS，RIPA Buffer，细胞刮子（用保鲜膜包好后，埋冰下），离心机

1. 用预冷的 PBS 洗涤细胞两次，最后一次吸干 PBS；

2. 加入预冷的 RIPA Buffer(1ml/107 个细胞、10cm 培养皿或 150cm² 培养瓶, 0.5ml/5×10⁶ 个细胞、6cm 培养皿、75cm² 培养瓶)
3. 用预冷的细胞刮子将细胞从培养皿或培养瓶上刮下, 把悬液转到 1.5EP 管中, 4℃, 缓慢晃动 15min (EP 管插冰上, 置水平摇床上)
4. 4℃, 14000g 离心 15min, 立即将上清转移到一个新的离心管中
5. 准备 Protein A agarose, 用 PBS 洗两遍珠子, 然后用 PBS 配制成 50%浓度, 建议减掉枪尖部分, 避免在涉及琼脂糖珠的操作中破坏琼脂糖珠
6. 每 1ml 总蛋白中加入 100μl Protein A 琼脂糖珠 (50%) , 4℃摇晃 10min (EP 管插冰上, 置水平摇床上) , 以去除非特异性杂蛋白, 降低背景
7. 4℃, 14000g 离心 15min, 将上清转移到一个新的离心管中, 去除 Protein A 珠子
8. (Bradford 法)做蛋白标准曲线, 测定蛋白浓度, 测前将总蛋白至少稀释 1: 10 倍以上, 以减少细胞裂解液中去垢剂的影响 (定量, 分装后, 可以在-20℃保存一个月)
9. 用 PBS 将总蛋白稀释到约 1 μg/μl, 以降低裂解液中去垢剂的浓度, 如果兴趣蛋白在细胞中含量较低, 则总蛋白浓度应该稍高 (如 10 μg/μl)
10. 加入一定体积的兔抗到 500μl 总蛋白中, 抗体的稀释比例因兴趣蛋白在不同细胞系中的多少而异
11. 4℃缓慢摇动抗原抗体混合物过夜或室温 2h, 激酶或磷酸酯酶活性分析建议用 2 h 室温孵育

12. 加入 100μl Protein A 琼脂糖珠来捕捉抗原抗体复合物，4℃缓慢摇动抗原抗体混合物过夜或室温 1h，如果所用抗体为鼠抗或鸡抗，建议加 2 μl"过渡抗体"（兔抗鼠 IgG，兔抗鸡 IgG）

13. 14000rpm 瞬时离心 5s，收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物，去上清，用预冷的 RIPA buffer 洗 3 遍，800μl/遍，RIPA buffer 有时候会破坏琼脂糖珠-抗原抗体复合物内部的结合，可以使用 PBS

14. 用 60μl 2×上样缓冲液将琼脂糖珠-抗原抗体复合物悬起，轻轻混匀，缓冲液的数量依据上样多少的需要而定（60 μl 足够上三道）

15. 将上样样品煮 5min，以游离抗原，抗体，珠子，离心，将上清电泳，收集剩余琼脂糖珠，上清也可以暂时冻-20℃，留待以后电泳，电泳前应再次煮 5min 变性。

RIPA Buffer 配制：

基础成分：

Tris-HCl（缓冲液成分，防止蛋白变性）

NaCl（盐份，防止非特异蛋白聚集）

NP-40（非离子去污剂，提取蛋白；用 H₂O 配制成 10%储存液）

去氧胆酸钠（离子去污剂，提取蛋白；用 H₂O 配制成 10%储存液；避光保存）

注意：准备激酶（致活酶）实验时，不要加去氧胆酸钠，因为离子型去污剂能够使酶变性，导致活性丧失。

RIPA 蛋白酶抑制剂

苯甲基磺酰氟 (PMSF) (用异丙醇配制成 200mM 的储存液, 室温保存)

EDTA (钙螯合剂; 用 H₂O 配制成 100mM 的储存液, PH 7.4)

亮抑酶肽 (Leupeptin) (用 H₂O 配制成 1mg/ml 的储存液, 分装, -20°C保存)

抑蛋白酶肽 (Aprotinin) (用 H₂O 配制成 1mg/ml 的储存液, 分装, -20°C保存)

胃蛋白酶抑制剂 (Pepstatin) (用甲醇配制成 1mg/ml 的储存液, 分装, -20°C保存)

RIPA 磷酸 (酯) 酶抑制剂

激活的 Na₃VO₄ (用 H₂O 配制成 200mM 的储存液, 见 Sodium Orthovanadate

Activation Protocol)

NaF (200mM 的储存液, 室温保存)