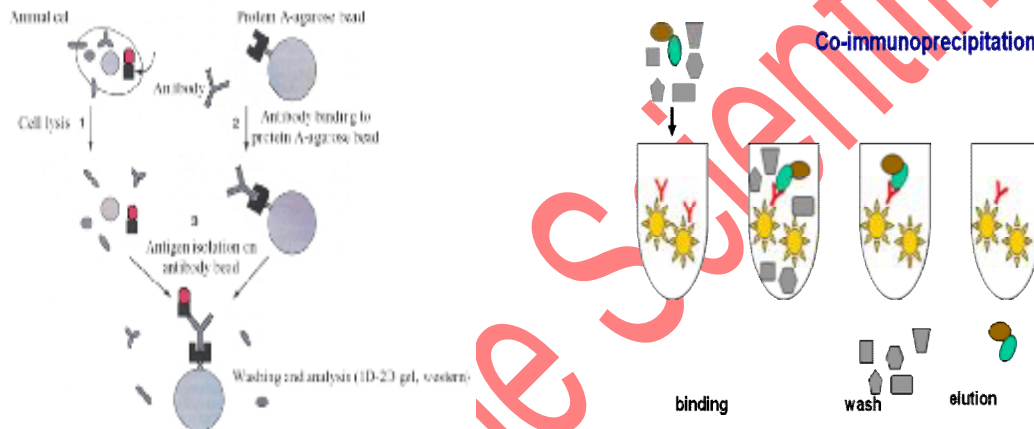


IP 和 Co-IP 技术

免疫沉淀是利用抗原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 Protein A/G 或二抗偶联的 agarose 或 Sepharose beads 孵育,通过离心得到 beads-protein A/G 或二抗-抗体-目的蛋白复合物,沉淀经洗涤后,重悬于电泳上样缓冲液,煮沸 5-10 min,在高温及还原剂的作用下,抗原与抗体解离,离心收集上清,上清中包括抗体、目的蛋白和少量的杂蛋白。

免疫共沉淀 (Co-Immunoprecipitation, 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。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。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。



服务要求

提供样品和 IP 和 WB 的一抗 (或者信诺金达代购)

注:但免疫共沉淀(co-IP)通常必须使用未经冻存的新鲜蛋白样品。普通的免疫沉淀虽然可以使用冻存的蛋白样品,但也宜用新鲜的蛋白样品为佳。

服务基本流程

1. 裂解样品,准备蛋白样品;
2. 准备抗体-Protein A beads;
3. 样品,抗体-Protein A beads 共孵育;
4. 洗脱;
5. WB 检测。

服务报告内容

WB 胶片, PVDF 膜, 和实验报告。

实验简要操作步骤:

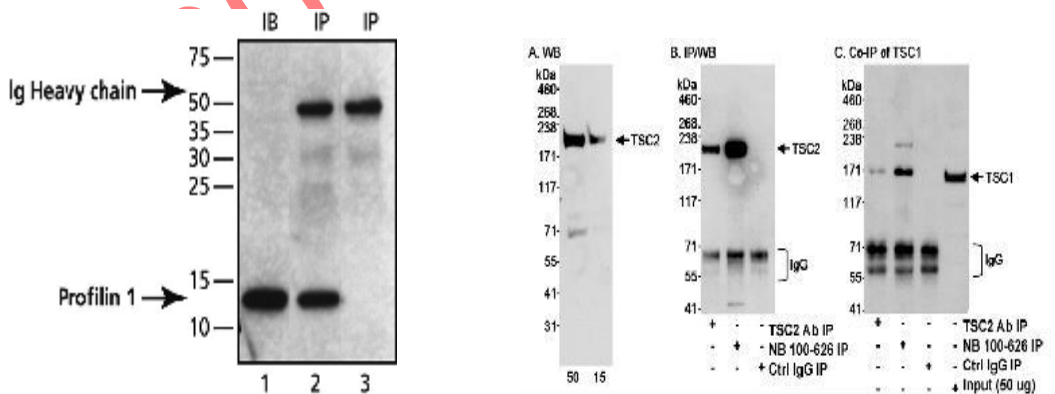


1. 用非变性蛋白提取液提取蛋白样品，然后定量总蛋白浓度。
2. 取少量裂解液以备 Western blot 分析, 剩余裂解液加 1 μ g 相应的抗体加入到细胞裂解液, 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇晃孵育过夜;
3. 取 10 μ l protein A beads, 用适量裂解缓冲液洗 3 次, 每次 3,000 rpm 离心 3 min;
4. 将预处理过的 10 μ l protein A beads 加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇晃孵育 2-4h, 使抗体与 protein A beads 偶连;
5. 免疫沉淀反应后, 在 4 $^{\circ}$ C 以 3,000 rpm 速度离心 3 min, 将 beads 离心至管底; 将上清小心吸去, beads 用 1ml 裂解缓冲液洗 3-4 次; 最后加入 15 μ l 的 2 \times SDS 上样缓冲液, 沸水煮 5 分钟;
6. SDS-PAGE, WB 检测。

注意的问题:

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)。每种细胞的裂解条件是不一样的, 通过经验确定。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, 如商品化的 cocktailer;
2. 使用明确的抗体, 可以将几种抗体共同使用;
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. 在免疫共沉淀实验中要保证实验结果的真实性和准确性, 应注意以下几点:
 - a) 确保共沉淀的蛋白是由所加入的抗体沉淀得到的, 而并非外源非特异蛋白, 单克隆抗体的使用有助于避免污染的发生;
 - b) 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;
 - c) 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。

IP 和 Co-IP 检测图片:



北京信诺金达生物科技有限公司

地址: 北京海淀区东北旺南路一号院北 321

电话: 010-62419956 传真: 010-62419956

www.sinogenesci.com info@sinogenesci.com