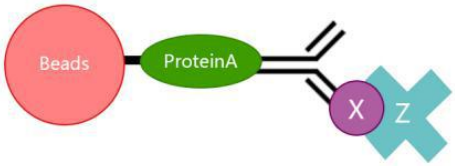
免疫共沉淀概述



免疫共沉淀(Co-IP)的基本策略是利用抗原与抗体之间的专一性作用为基础，从而用于研究蛋白质与蛋白质之间的相互作用的经典方法。免疫共沉淀技术的发展经历了几个阶段。早期，研究人员利用凝胶电泳来分离出免疫共沉淀蛋白：将抗原溶液加入琼脂糖之类的小孔内，并在邻近小孔内加入抗血清，之后随着抗原抗体的扩散，大分子进入凝胶内，两者之间产生相互作用，形成复合物，通过抗原和抗体的扩散从而形成浓度梯度并在最适浓度处形成多分子网络复合物，最终大分子蛋白复合物从溶液中析出。随着社会的发展，免疫共沉淀技术不断完善。分离免疫共沉淀复合物的方法改进为促进多聚体反应，使得免疫复合物从溶液中析出。20 世纪 70 年代中期，人们开始使用固相反应，利用固定在金黄色葡萄球菌表面的蛋白 A 吸附抗体，再与相应的抗原结合。随着科技发展，目前这方法已经改进为利用表面固定蛋白 A 或蛋白 G 的微球来分离抗原抗体复合物，以达到检测抗原或目标蛋白的目的。

免疫共沉淀原理

免疫共沉淀的实验原理为：若用蛋白质 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 proreinA 预先结合固化在琼脂糖微珠上，使之与含有抗原的溶液及抗体反应后，琼脂糖微珠上的 proreinA 与抗体 Fc 特异性结合，由于抗体抗原特异性，沉淀蛋白 X；溶液中有和蛋白 X 相互作用的物质，就能沉淀下来。

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。

优势与局限性

优势

- 蛋白质以翻译后被修饰的天然状态存在;
- 可以检测体外和细胞内的相互作用
- 抗原与相互作用的蛋白以细胞中相类似的浓度存在，避免了过量表达所造成的人为效应;
- 可以分离得到天然状态下的相互作用蛋白复合体。

局限性

- 灵敏度不如亲和色谱来的高;
- 假阳性率较高，试验需要设置正确的对照
- 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;
- 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;
- 由于蛋白质形成复合物以后，某些表位就会被掩盖，因此可能导致使用某一种 pull-down 抗体，无论怎么增加抗体浓度，也极少能将不到一半的目标蛋白复合物沉淀出来，如有必要最好使用多种不同抗体分别进行 Co-IP;
- 由于检测的是天然状态，因此在不同的时间和不同的处理下，Co-IP 拉下来的蛋白复合物都可能是不同的，当然随着实验次数的增加，得到的蛋白复合物成员也会越来越庞大。

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的真实性，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，而并非外源非特异蛋白，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。

更多阅读

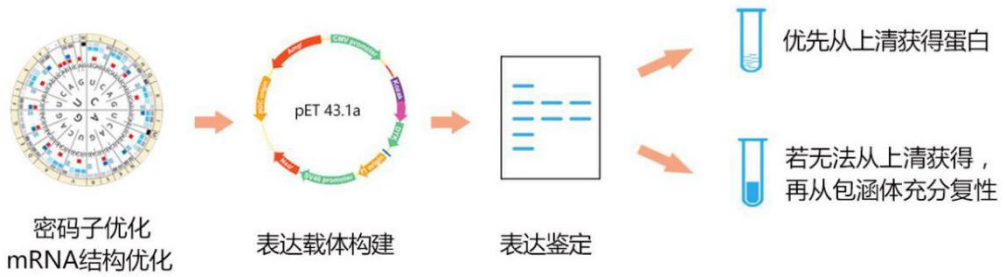
免疫共沉淀实验操作步骤及注意事项

Co-IP 实验常见问题解析

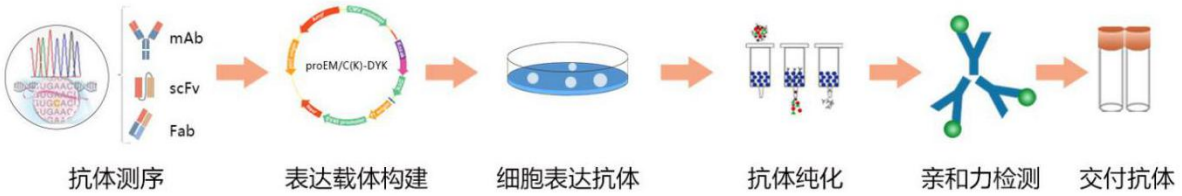
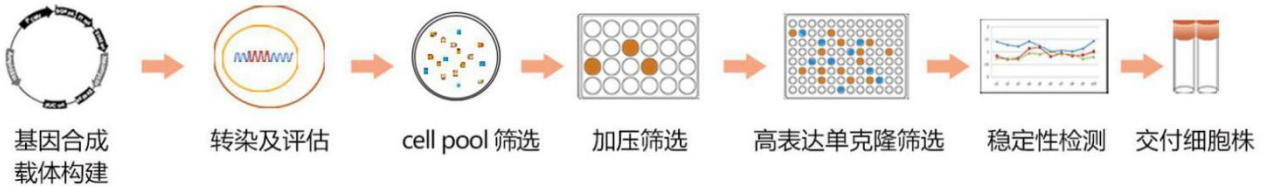
南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

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