

免疫共沉淀检测已知蛋白相互作用 (Co-IP) 实验

1. 案例概述	3
2. 实验设计	3
3. 转染级质粒扩增抽提	3
3.1. 质粒抽提	3
3.2. 质粒检测	4
4. 转染 HEK293 细胞	4
5. 总蛋白提取与目的蛋白鉴定	5
6. 杂蛋白去除	5
7. 捕获目的蛋白复合物	5
8. 洗脱抗原抗体复合物	6
9. SDS-PAGE 电泳鉴定	6
9.1. 对照设计	6
9.2. CO-IP 实验结果	6
10. 服务网址	7

1. 案例概述

免疫共沉淀技术是在非变性条件下裂解细胞，从而保留细胞内部蛋白质的相互作用，再用其中一种蛋白的抗体沉淀相互作用的蛋白质。德泰生物在实验中会设置多组对照，充分排除干扰因素，得到准确的实验结果。我们还会用灵敏度更高的银染法确认实验结果，并在实验结束后进行重复实验确保实验结果可重复。

某客户有两种蛋白 X 和 Y，想要确认这两种蛋白之间是否有相互作用，委托我们公司设计 Co-IP 方案验证这两种蛋白之间是否有相互作用。

2. 实验设计

构建共表达的载体，给 X 蛋白添加 Flag 标签，Y 蛋白添加 His 标签。将质粒转化到 DH5a 克隆菌株中，通过质粒大抽试剂盒提取转染级质粒，之后将质粒通过转染试剂转染到哺乳动物细胞 HEK293 中表达。细胞裂解液裂解细胞后，用 Flag 单抗进行 Co-IP，SDS-PAGE 电泳后，分别用考马斯亮蓝染色和银染分析实验结果。再用纯化后的 X 蛋白以及 Y 蛋白样品做 CO-IP，与细胞裂解液的结果进行对照。最终用抗 Flag 标签抗体和抗 His 标签抗体进行 WB 实验确认结果。

3. 转染级质粒扩增抽提

3.1. 质粒抽提

1. 将表达质粒分别转化到 DH5a 感受态细胞中。
2. 从新鲜的转化培养板中挑取单克隆于 2-5mL LB 培养基，37°C，200rpm 培养 8h。
6. 按 1/500 比例接种于 200mL LB 培养基中，37°C，200rpm 培养 16h。
7. 收集培养后的菌液离心，去掉上清。
8. 试剂盒抽提质粒。

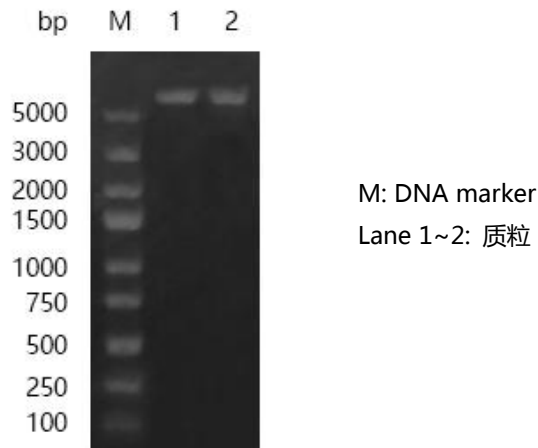


图 3-1 琼脂糖凝胶电泳分析质粒

3.2. 质粒检测

用鲎试剂检测质粒的内毒素水平，确认质粒的内毒素水平达到转染标准后，进行下一步转染。

检测内容	转染级质粒标准	共表达质粒
A260/A280	1.8-2.0	1.92
内毒素	内毒素 < 50EU/mg	鲎试剂检测，< 50EU/mg
无菌检测	无菌	LB 平板检测，无菌落

表 3-1 质粒内毒素水平检测

4. 转染 HEK293 细胞

1. 转染前 1 天将 HEK293 细胞悬浮培养至 200 mL，接种密度为 1.0×10^6 cells/mL，置于培养箱中 110rpm，37°C，5% CO₂ 培养。
2. 向转染缓冲液中加入质粒 DNA 及转染试剂混匀，37°C 温育。
4. 将 DNA-转染试剂混合物加入待转染细胞中，放入培养箱中培养。
5. 转染后约 3 天，取出细胞培养物，离心，收集细胞。

5. 总蛋白提取与目的蛋白鉴定

使用 Pierce IP Lysis Buffer 对转染后的细胞以及 HEK293 空细胞进行裂解抽提总蛋白，SDS-PAGE 分析检测（图 5-1）。用 Anti-His 抗体以及 Anti-Flag 抗体检测目的蛋白否有表达（图 5-2）。

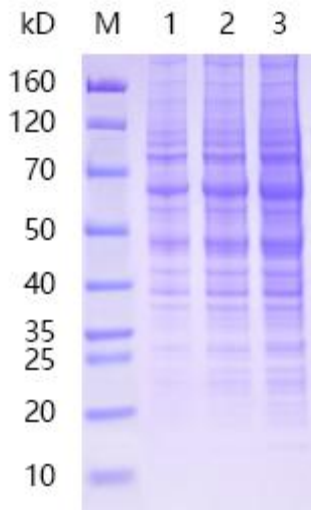


图. 5-1 SDS-PAGE 分析细胞裂解总蛋白
M1 : SDS-PAGE Protein Marker
Lane 1 : HEK293 cells 对照
Lane 2~3 : 目的蛋白表达

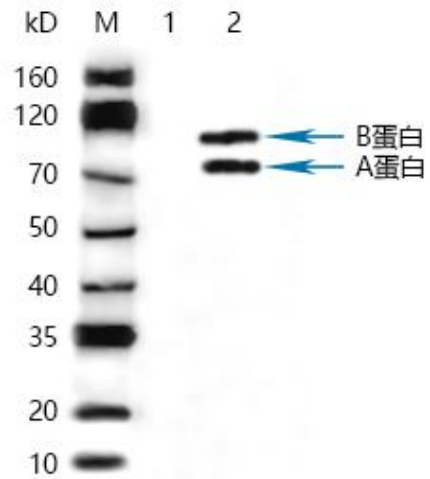


图 5-2 WB 分析细胞裂解总蛋白
M : WB Protein Marker
Lane 1 : HEK293 cells 对照
Lane 2 : 目的蛋白表达情况

6. 杂蛋白去除

每 150 μ l 总蛋白溶液中加入 100 μ l Protein A 磁珠（50%），4 $^{\circ}$ C 下水平缓慢摇晃 30min（摇床上冰浴），以去除能与 Protein A 结合的杂蛋白，降低背景，防止对实验结果造成的影响。用磁力架吸附 Protein A 磁珠，将上清转移到一个新的离心管中。

7. 捕获目的蛋白复合物

将去杂后的总蛋白溶液稀释 5-10 倍，测定溶液的蛋白浓度，定量分装后，留一管备用，其余 -80 $^{\circ}$ C 保存。用 PBS 将总蛋白溶液稀释到 1 μ g/ μ l 左右，以降低裂解液中去垢剂的浓度。加入 50 μ g 抗体到 150 μ g 总蛋白中，4 $^{\circ}$ C 下混合过夜（摇床缓慢摇晃）。加入 100 μ l Protein A 磁珠来捕捉抗体和目的蛋白复合物，室温下置于摇床中缓慢

摇晃混合 1h，进行下一步实验。

8. 洗脱抗原抗体复合物

用磁力架吸附 Protein A 磁珠，收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物，去上清，用预冷的 PBS 溶液洗 3 次，每次 800 μ l。用 60 μ l 上样缓冲液(100mM 甘氨酸，pH3.0)重悬琼脂糖珠-抗原抗体复合物，轻轻混匀。样品煮 5min，以游离抗原、抗体和磁珠。

9. SDS-PAGE 电泳鉴定

提取洗脱后的混合物，离心后取上清，电泳检测。由于银染比普通染色方法灵敏度更高，为了不漏掉任何可能与目的蛋白相互作用的未知蛋白，除用普通的考马斯亮蓝法染色分析之外，我们还会用银染再次检测分析，确保检测结果的准确性。

9.1. 对照设计

为了防止 Protein X 蛋白对实验结果产生干扰，设立“X 蛋白样品+Protein A 磁珠”、“Y 蛋白样品+Protein A 磁珠”以及“细胞裂解液+Protein A 磁珠”的对照实验，对照组电泳结果（图 9-1 Lane7~8 与 Lane11~14）显示，总蛋白溶液中不存在与 Protein A 作用的蛋白质。

9.2. CO-IP 实验结果

图 9-1 为考马斯亮蓝染色和银染结果图。上半图为考马斯亮蓝染色结果，下半图为银染分析结果。Lane1 是为了检测抗 Flag 标签单抗与 Protein A 磁珠的结合情况，Lane 7~8 与 Lane 11~14 是用于排除 Protein A 对于实验的影响，Lane 5 和 Lane 9 是用于检测 X 蛋白与 Y 蛋白之间的相互作用，Lane5 是检测纯化后的蛋白样品的相互

作用，Lane9 的目的是检测细胞裂解液中 X 蛋白和 Y 蛋白的相互作用。电泳结果表明两者之间存在相互作用，需要 WB 实验进行确认。

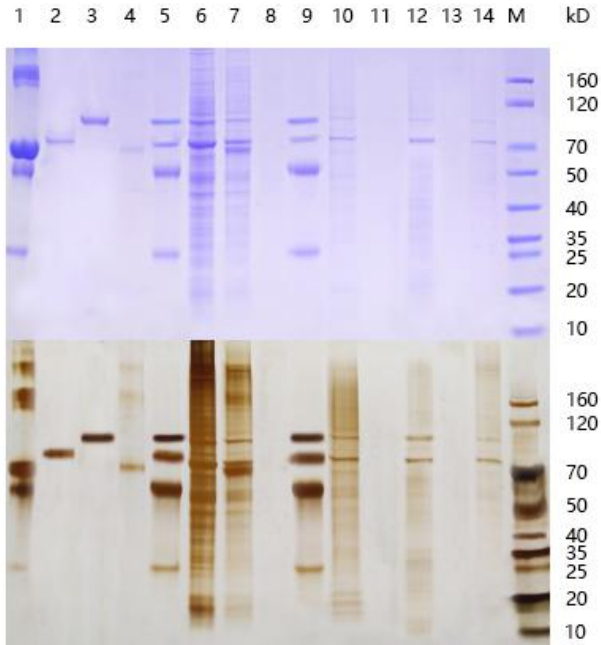


图 9-1 CO-IP 电泳结果

- Lane 1: Anti-Flag mAb + Protein A 磁珠
- Lane 2: X 蛋白样品
- Lane 3: Y 蛋白样品
- Lane 4: X 蛋白样品 + Y 蛋白样品 + Anti-Flag mAb+ Protein A 流出
- Lane 5: X 蛋白样品 + Y 蛋白样品 + Anti-Flag mAb+ Protein A 洗脱
- Lane 6: HEK293 细胞样品
- Lane 7: HEK293 细胞样品 + ProteinA 流出
- Lane 8: HEK293 细胞样品 + ProteinA 洗脱
- Lane 9: HEK293 细胞样品+Anti-Flag mAb+ ProteinA 洗脱
- Lane 10: HEK293 细胞样品+Anti-Flag mAb+ ProteinA 流出
- Lane 11: X 蛋白样品 + Anti-Flag mAb + ProteinA 洗脱
- Lane 12: X 蛋白样品 + Anti-Flag mAb + ProteinA 流出
- Lane 13: Y 蛋白样品 + Anti-Flag mAb + ProteinA 洗脱
- Lane 14: Y 蛋白样品 + Anti-Flag mAb + ProteinA 流出
- M : SDS-PAGE Protein Marker

10. 服务网址

www.detaibio.com/Co-Immunoprecipitation.html