

Co-IP 实验报告

1 实验原理

CO-IP (Co-Immunoprecipitation) 是一种以抗体和抗原之间的专一性互作为基础, 用于研究蛋白质相互作用的经典方法。其原理是通过特异性抗体捕获目标蛋白, 进而将与其相互作用的蛋白质一起沉淀下来。具体来说, 首先通过合适的方法处理样本, 将蛋白提取出来 (同时不能破坏蛋白之间的相互作用), 然后使用预先结合了琼脂糖珠或者磁珠的特异性抗体捕获目标蛋白, 与其相互作用的蛋白质也会一起被沉淀下来。最后将蛋白从珠子上裂解下来, 通过检测来确定这些蛋白质之间的相互作用。

2 实验器材及试剂

2.1 实验器材

名称	厂家	型号
电子天平	英衡电子天平	YHB3003
酶标检测仪	Molecular Devices	SpectraMax M2
冷冻离心机	Haier Biomedica	LX-165T2R
纯水仪	芷昂仪器 (上海) 有限公司	Clever-S15
磁力搅拌器	Servicebio	MS-150
脱色摇床	Servicebio	DS-S 100
电泳仪	北京东方瑞丽	DYY-600C
化学发光成像系统	上海勤翔科学仪器有限公司	ChemiScope 6100
-80°C冰箱	Haier	BCD-501WDGR
电转仪	ACE Biotechnology	S-TRANS FW606
电泳槽	北京东方瑞丽	DYC-ZY2



匀浆仪	Servicebio	KZ-II
超声仪	宁波新芝生物有限公司	JY92-IIN

2.2 主要实验试剂

试剂	厂家	货号
RIPA 裂解液	杭州浩克生物	HKW2011
5*cooktail	杭州浩克生物	HKW2016
PMSF (100mM)	杭州浩克生物	HKW2017
磷酸化蛋白酶抑制剂	杭州浩克生物	HKW2018
BCA 蛋白定量检测试剂盒	杭州浩克生物	HKW2019
5*蛋白上样缓冲液	杭州浩克生物	HKW2020
SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒	杭州浩克生物	HKW2028
蛋白质常规分子量标记(10-180kDa)	杭州浩克生物	HKW2024
PVDF 膜 0.45 μm	millipore	IPVH00010
PVDF 膜 0.22 μm	millipore	ISEQ00010
BSA 牛血清白蛋白	杭州浩克生物	HKW2084
TWEEN 20	Solarbio	T8220
超敏、高敏 ECL 化学发光试剂盒二合一	杭州浩克生物	HKW2095
β -actin	Proteintech	66009-1-Ig
α -Tublin	Proteintech	66031-1-Ig
GAPDH	Proteintech	60004-1-Ig
HRP 标记山羊抗兔	Proteintech	SA00001-2
HRP 标记山羊抗小鼠	Proteintech	SA00001-1
转膜缓冲液(干粉)	杭州浩克生物	HK2017
电泳缓冲液(干粉)	杭州浩克生物	HK2018
TBS-T(干粉)	杭州浩克生物	HK0003
免疫沉淀试剂盒 (HRP 标记蛋白 A)	Proteintech	PK10007

3 免疫沉淀实验步骤

3.1 细胞或组织裂解物的制备

3.1.1 细胞

- 1) 将离心机预冷至 4 °C。
- 2) 收集细胞前用血球计数板对细胞进行计数。
- 3) 4 °C、500 × g 离心 5 min，收集细胞。
- 4) 用冰上预冷的 1 × PBS 洗涤细胞三次，每 10⁶ 个细胞加入 100 μL 预冷的 IP lysis buffer（现加 Protease inhibitor 至 1 x）。若需获得高浓度蛋白裂解物，可以适当减少 IP lysis buffer 的用量。
- 5) 若靶蛋白为磷酸化蛋白质，则需额外加入适量磷酸酶蛋白抑制剂。
- 6) 在 IP lysis buffer 中重悬细胞，冰上裂解 30 min，期间每 10 min 轻柔颠倒一次。

3.1.2 组织

- 1) 解剖组织，用预冷的 1 × PBS 洗涤组织，尽可能去除组织中存留的血液，在冰上将目的组织剪成碎块。
- 2) 以每毫克目的组织 10-20 uL IP lysis buffer 的量加入相应数量的 IP lysis buffer（现加 Protease inhibitor 至 1x）。
- 3) 将组织碎块置于预冷的匀浆器中。
- 4) 对目的组织充分匀浆，冰上裂解 30 min，期间每 10 min 颠倒一次。

3.2 超声波破碎细胞或组织裂解物，在 180 W 功率下（超声 2 s 停 2 s 的循环），细胞超声 1 min，组织超声 2-5 min，整个超声过程在冰水浴中进行。

3.3 裂解物冰上放置 20-30 min，期间每 10 min 颠倒一次。

3.4 4 °C、10,000 × g 离心 10-15 min，将上清转入新的 EP 管中备用。

3.5 通过 BCA 法测定裂解物的总蛋白浓度。



3.6 裂解物用于 IP 和 Western blotting 实验，用于 Western blotting 实验时，向裂解物中加入 25 % 样品体积的 $5 \times$ Sample buffer ，并沸水浴加热 5 min。

3.7 上下颠倒混匀储存 rProtein A/G beads slurry 的管子，取出所需数量的 rProtein A/G beads slurry。

3.8 用 1ml $1 \times$ PBS 低速离心洗涤 beads 三次（每次 500 g 离心 30 s）。

3.9 最后用 PBS 将 beads 重悬至原体积。

3.10 吸取含有 1-3 mg 总蛋白的裂解物 200-350 uL，加入下端带有 End caps 的 Spin columns 中，同时加入 1-4 ug 特异性抗体以及 150-300 uL Incubation buffer。

3.11 向相同数量的裂解物与 Incubation buffer 中加入同种属相同数量的 Control IgG 作为阴性对照（阴性对照管的后续操作与目的样本管完全一样）。

3.12 4 °C 下，旋转孵育过夜或 2-4 h。

3.13 向 Spin columns 中加入准备好的重悬的 rProtein A/G beads slurry 以沉淀免疫复合物，4 °C 旋转孵育 1-4 h。

3.14 取下 End caps 保留备用，将上清自然流出弃除。

3.15 每次用 800 uL $1 \times$ Washing buffer 洗涤沉淀复合物，洗涤液自然流出弃除，重复洗涤 4-5 次。

3.16 洗涤结束后，在 4 °C，500 g 下将 Spin columns 置入 Collection tubes 中离心 30 s，弃 Collection tubes 以及离心产物。

3.17 用 End caps 堵住 Spin columns 下端出液口，向 Spin columns 中加入 80 uL Elution buffer，盖上盖子，室温静置 5-10 min，期间轻轻摇晃 2-3 次，重悬沉淀复合物。洗脱后，取下 End caps，将 Spin columns 置入新的 1.5 mL EP 管，4 °C 10000 g 下离心 1 min 收集产物。

3.18 向洗脱产物中加入 10 uL Alkali neutralization buffer 以及 23 uL 5 × Sample Buffer, 沸水浴加热 5 min。

4 Western Blot 实验步骤

4.1 SDS-PAGE 电泳

1) 灌胶与上样

将玻璃板对齐后放入夹中卡紧, 操作时要使两玻璃对齐, 以免漏胶。按实验安排配制分离胶, 加入 TEMED 后立即摇匀即可灌胶。大约 45min 后可倒去胶上层水并用吸水纸将剩余水吸干。

10%分离胶配比

试剂	体积
H ₂ O	2 mL
30% 丙烯酰胺 (29: 1)	1.65 mL
1.5M TRIS-HCl (PH 8.8)	1.25 mL
10% SDS	50 μL
AP	50 μL
TEMED	5 μL

4%浓缩胶配比

试剂	体积
H ₂ O	1.05 mL
30% 丙烯酰胺 (29: 1)	250 μL
1M TRIS-HCl (PH 6.8)	188 μL
10% SDS	15 μL
AP	15 μL
TEMED	1.5 μL

2) 按前面方法配 4%的浓缩胶, 加入 TEMED 后立即摇匀即可灌胶。将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中。

3) 加足够的电泳液后上样电泳。将样品加入电泳孔中, 电泳。浓缩胶电压 80V,

分离胶用 120V。电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳，进行转膜。

4.2 转膜（小于 20kd 的蛋白请使用 0.22um 的 PVDF 膜。）

- 1) 电泳时将转印 PVDF 膜放入甲醇中活化 5min，再放入含有 S-TRANS 阳极缓冲液的孵育盒中平衡 5min。
- 2) 将完成电泳的凝胶放置在盛有去离子水的托盘中浸泡 2min。
- 3) 取两张 S-TRANS 高效转膜垫片放至含有 S-TRANS 阳极缓冲液的孵育盒中充分浸润将“三明治结构”（底部为阳极缓冲液浸润的垫片、上为转印膜、再上为胶、再上为阴极缓冲液浸润的垫片）放至转印盒中，盖好盒盖，盖销完全插入锁定槽后将转印盒滑入转印槽中，1.5A，10min。
- 4) 转印完成，取出转印膜。

4.3 免疫反应

- 1) 将转好的膜于室温下脱色摇床上用 5%的脱脂牛奶(0.5%TBST 配)，封闭 1h。
- 2) 稀释一抗（TBST 溶解，磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5%BSA），4°C孵育过夜。
- 3) 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗五次，每次 5min。
- 4) 将二抗用 TBST 稀释 10000 倍，室温下孵育 120min 后，用 TBST 在室温下脱色摇床上洗五次，每次 5min。

4.4 化学发光 将 ECLA 和 ECLB 两种试剂在离心管中等体积混合，将 PVDF 膜的蛋白面朝上与此混合液充分接触，1-2min 后，去尽残液，放入 wb 显色呈像仪中显色。

4.5 凝胶图像分析 PhotoShop 整理结果，Image J 软件处理系统分析目的条带的灰度值。

5 WB 结果及分析（具体详见 Excel 灰度分析表格）