

碧云天免疫共沉淀技术服务

Co-Immunoprecipitation by Beyotime



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订购热线：400-168-3301或800-8283301
技术咨询：info@beyotime.com
技术服务：service@beyotime.com
网址：<http://www.beyotime.com>

碧云天免疫共沉淀技术服务

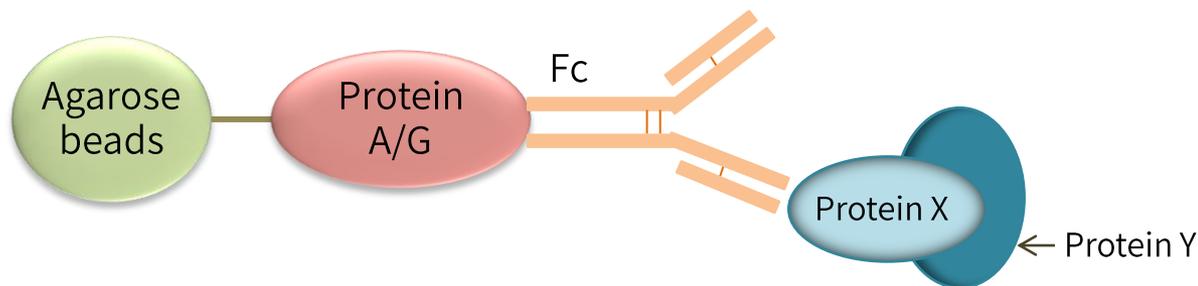
概述

- 免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation, Co-IP)技术是以抗原、抗体间的特异性免疫反应为基础，研究蛋白质间相互作用的经典方法。
- 与其它研究蛋白质相互作用的方法相比，免疫共沉淀是在生理条件下检测蛋白质间相互作用，因此，不仅可以检测到体内形成的天然复合体，而且可排除过表达靶蛋白所带来的假阳性；由于内源性的靶蛋白是完全加工、修饰成熟的蛋白质，所以依赖于修饰的蛋白质间相互作用也可以被检测到。
- 免疫共沉淀可分为细胞内过表达蛋白、细胞内源性蛋白、组织内蛋白的免疫共沉淀。

碧云天免疫共沉淀技术服务

原理

- 免疫共沉淀技术原理是以细胞内源性靶蛋白(protein X)为诱饵, 将protein X的抗体与细胞总蛋白进行共孵育, 促进免疫复合物的形成; 随后加入能够与抗体Fc段结合的protein A/G(预先结合固化在琼脂糖微珠上), 这样在protein X所在的环境中与其有相互作用的蛋白(protein Y)会被一起沉淀下来, 形成“结合蛋白-靶蛋白-靶蛋白抗体-protein A/G微珠”复合物, 纯化该复合物后凝胶电泳分离蛋白, 应用Western blot 或者质谱技术鉴定靶蛋白的结合蛋白。



碧云天免疫共沉淀技术原理示意图

碧云天免疫共沉淀技术服务

技术特点

➤ 优点

- ✓ 相互作用的蛋白质都是经翻译后修饰的，处于天然状态；
- ✓ 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；
- ✓ 可以分离得到天然状态的相互作用蛋白复合物。

➤ 缺点

- ✓ 可能检测不到低亲和力或瞬间的蛋白质-蛋白质相互作用；
- ✓ 两种蛋白质的结合可能不是直接结合，而是有第三者在中间起桥梁作用；
- ✓ 如用Western blot检验，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，若预测不正确，实验就得不到结果。

碧云天免疫共沉淀技术服务

应用

➤ 免疫共沉淀应用

- ✓ 动植物生理活动研究
- ✓ 分子生物学研究
- ✓ 物种及微生物鉴定
- ✓ 寻找新的相互作用蛋白
- ✓ 验证目的蛋白和待测蛋白是否具有相互作用

碧云天免疫共沉淀技术服务

碧云天的优势

- ◆ **金品质：**碧云天凭借多年的生物试剂盒研发经验，提供高灵敏度、高特异性的免疫共沉淀相关试剂；
- ◆ **高质量：**碧云天的技术服务人员拥有精湛的技术和丰富的操作经验，保证优质高效的完成客户实验；
- ◆ **服务全：**碧云天拥有先进的实验设备，完善的实验条件，客户可根据实验需求定制个性化服务；
- ◆ **价格低：**碧云天以最优惠的价格为客户提供最全面的服务，帮助客户有效节约科研经费；
- ◆ **时间短：**碧云天拥有全套检测设备和专业实验平台，在最短的时间内为客户提供服务。

碧云天免疫共沉淀技术服务

实验步骤

➤ 免疫共沉淀实验 步骤

- ◆ 蛋白样品准备 （如为细胞样品需先裂解）
- ◆ 抗原抗体结合反应
- ◆ Protein A/G与抗原抗体复合物结合
- ◆ 免疫复合物与Protein A/G解离 （2%SDS煮沸处理）
- ◆ 分析鉴定 （Western blot 或质谱分析）

碧云天免疫共沉淀技术服务

细胞裂解液制备

➤ 细胞裂解液制备

- 细胞裂解液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，通常采用非离子变性剂。每种细胞的裂解条件不同，需要根据经验确定。
- 不能用高浓度的变性剂(0.2%SDS)，细胞裂解液中需加各种酶抑制剂。

碧云天免疫共沉淀技术服务

抗体的选择

	多克隆抗体	单克隆抗体	单克隆抗体群(由一个免疫原产生的多个克隆抗体混合物)
抗体抗原作用信号强度	极佳	由抗体的亲和力决定(极佳或极弱)	极佳
特异性	通常很好, 但有时会有非特异性相互作用	极佳, 但有时会有交叉反应	极佳(因为是选择可以进行IP且没有交叉反应的抗体组成的单克隆抗体群)
优点	亲和力高(由于抗体可以与目的蛋白的多个抗原决定簇相互作用)	特异性好	特异性好, 亲和力高(因为是选择可以进行IP且没有交叉反应的抗体组成的单克隆抗体群)
缺点	非特异性相互作用很难去除	需要筛选亲和力高的抗体; 抗原表位可能会被相互作用蛋白遮蔽	能够筛选得到符合条件的单克隆并不多, 所以单克隆抗体群不容易获得
免疫共沉淀效果	通常很好, 但有时非特异性相互作用会带来假阳性	由抗体的亲和力和抗原表位是否被相互作用蛋白遮蔽决定(极佳或极弱)	极佳(由于选择可以成功进行IP且没有交叉反应的抗体组成单克隆抗体群)

碧云天免疫共沉淀技术服务

实验的关键

- 最需要注意的是抗体的特异性问题，尤其是多克隆抗体。
- 为防止蛋白的分解、修饰，裂解液必须加蛋白酶抑制剂，低温下进行实验。
- 考虑抗体/裂解液的比例。抗体过少就不能检出抗原，过多则不能沉降在 beads 上，残存在上清。裂解液太少蛋白不能完全裂解，过多蛋白浓度被稀释。
- 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。

碧云天免疫共沉淀技术服务

常见问题

➤ 未检测到目的蛋白或目的蛋白很少

可能原因	处理方法
样品被蛋白酶降解	添加蛋白酶抑制剂；所有操作保持4°C以下冰上操作并防止冻融
抗体浓度太低	调整抗体浓度，必要时设立浓度梯度，摸索最佳浓度
抗体亲和力太低	选用适合于IP和/或IB的相应抗体
IP抗体未与agarose珠子结合	选用适合于IP的相应珠子，正确保存防止变质或干燥
Tag未暴露在融合蛋白构象的表面	改变tag融合表达部位
裂解液严谨度太高	改用低严谨度裂解液

碧云天免疫共沉淀技术服务

常见问题

➤ 目的蛋白背景高

可能原因	处理方法
非特异性蛋白结合	在无血清培养液中裂解细胞 在免疫沉淀前用protein A/G 微珠预洗 免疫沉淀后增加漂洗次数和严谨度(高盐或去垢剂)
裂解液严谨度太低	改用高严谨度裂解液
实验仪器或液体被污染	使用洁净的仪器或液体

碧云天免疫共沉淀技术服务

服务流程



附件 《碧云天免疫共沉淀服务询价单》

《碧云天免疫共沉淀生物样品信息表》

《碧云天免疫共沉淀生物送样要求》

碧云天免疫共沉淀技术服务

询价与订购

- 请您下载并填写《碧云天免疫共沉淀技术服务询价单》，发送至 service@beyotime.com，我们的专业技术人员将在第一时间为您提供准确报价。
- 若有订购意向，碧云天的技术服务人员会与您联系，并签订《碧云天免疫共沉淀服务协议书》。
- 送样时，请下载并填写《碧云天免疫共沉淀生物样品信息表》，发送至 service@beyotime.com或碧云天免疫共沉淀技术服务人员邮箱，样品的具体要求参见《碧云天免疫共沉淀生物送样要求》。

碧云天免疫共沉淀技术服务

客户须知

➤ 样品要求

- 客户需提供样品：新鲜或正确保存的组织、细胞或蛋白样品，组织样品：动物组织 > 400mg/样品，植物组织 > 2g/样品；细胞样品：> 2×10^7 细胞数/样品；蛋白样品：裂解样品总蛋白量 > 2ml/样品；
- 客户提供目的蛋白和互作蛋白的详细信息，包括蛋白种属、大小、参考文献等；
- 碧云天建议客户提供目的蛋白阳性对照；
- 客户需提供符合免疫共沉淀技术要求的浓缩或即用型抗体，也可由碧云天代购；若因客户抗体原因导致实验失败，由此造成的损失由客户承担；
- 样本寄送要求：参考《碧云天免疫共沉淀生物送样要求》，样本应避免各类污染和反复冻融。

碧云天免疫共沉淀技术服务

客户须知

➤ 服务说明

- 客户应对所提供的材料及信息负责，如因客户提供的材料及信息不准确而引起的实验延误或经济损失由客户承担。
- 各种蛋白的丰度和表达水平在不同细胞或组织中差异很大，表达量过低的蛋白可能得不到免疫共沉淀的结果。
- 因科学实验的不确定性，实验结果不一定会出现阳性结果，我们保证实验结果的真实准确性，但是对结果是否符合预期不做承诺。

碧云天免疫共沉淀技术服务

服务承诺

➤ 碧云天免疫共沉淀技术服务承诺

- ◆ 碧云天承诺提供高分辨率的清晰图片，准确、客观、可信的检测数据和
分析结果：
 - ✓ 相互作用蛋白鉴定结果，质谱鉴定结果和(或)western blot鉴定结果；
 - ✓ 完整实验报告(包括详细实验步骤及免疫共沉淀结果相关的图表)。

Thank You



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订购热线：400-168-3301或800-8283301
技术咨询：info@beyotime.com
技术服务：service@beyotime.com
网址：<http://www.beyotime.com>