

免疫共沉淀常见问题解析

1. 免疫共沉淀中的 input 是指什么？

答：input 是阳性对照

2. Co-ip 实验两个抗体需要不同种源吗

答：最好选择两个不同种源的抗体。选择同一种源的抗体的问题在于：在 WB 之前进行的蛋白变性这一步，由于加样缓冲液中含有巯基乙醇，巯基乙醇会把抗体的重链和轻链之间的二硫键破坏，从而使的抗体变成重链分子 55KD 和轻链分子 25KD。假设你 IP 的抗体是兔抗的，目的蛋白进行 WB 的抗体也是兔抗的，而且目的蛋白的分子量为 55KD，可以想象，55KD 的位置除了你的目的蛋白以外，还有 IP 抗体的重链 IgG。由于 IP 的抗体用量非常大(1ug)，就导致 55KD 处的信号会非常强。如果你用抗兔的二抗进行显色，那么 55KD 处的 ip 抗体的重链和你的目的蛋白会重叠在一起，无法分辨。

然而这个时候如果你的目的蛋白进行 WB 的抗体不是兔抗的，比如小鼠抗的，那么就需要用抗小鼠的二抗进行显色，而抗小鼠的二抗是无法跟兔抗的 IP 抗体发生反应的。因此 55KD 位置的 IP 抗体的重链 IgG 就无法显色，发生反应的就是你的目的蛋白了。

3. 免疫共沉淀如何避免假阳性？

答：若抗体浓度高，则降低抗体浓度；若抗体特异性不好，则换抗体；若 PCR 污染，则重新配置缓冲溶液。

4. 免疫共沉淀中 ProteinA/G 琼脂糖珠有何作用？

答：ProteinA/G 能特异性地结合到免疫球蛋白的 FC 片段，因此能和抗体结合，而抗体与目标蛋白结合，目标蛋白和相互作用的蛋白结合。

5. Co-ip 实验中使用的对照抗体有哪些？

单克隆抗体：正常小鼠的 IgG 或另一类单抗；

多克隆抗体：正常兔 IgG

6. 免疫共沉淀阴性对照的意义是什么？

答：排出污染的可能性，例如检测一个兔子细胞的某种蛋白质，若没有设置 LgG 的对照，而操作中有非特异性蛋白质，又和设计的抗体有作用，就会出现阳性的结果。如果做了阴性对照，也就是 IgG 对照，对照没有出现阳性就说明没有非特异性的蛋白，对照出现阳性，说明抗体有非特异结合的可能，需要重新开始实验。

7. Co-ip 实验中如何去除重链轻链的影响？

答：用兔的 IgG 做对照；用抗 Fab 和 Fc 抗体特异性封闭轻链和重链；在 WB 二抗上着手，这种二抗针对的是轻重链间的二硫键，若跑 SDS 胶，最后显影是检测不到重链和轻链的。

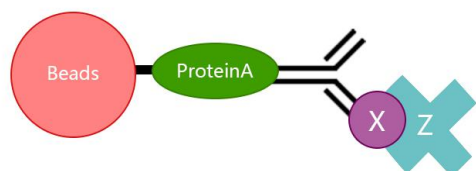
8. 免疫共沉淀中没有检测到与目的蛋白相互作用的蛋白或检测得到的信号太弱？

答：裂解液中的去垢剂浓度太高或配方过于剧烈：此时降低去垢剂浓度或更换去垢剂种类；

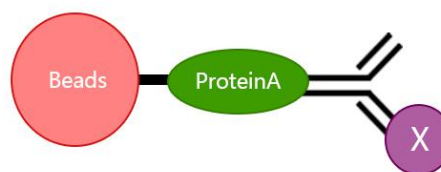
受蛋白的亚细胞定位影响：应重新选择裂解液配方来释放目的蛋白；

蛋白与蛋白之间的相互作用太弱或不太稳定：应选择亲和力更高的抗体以捕获更多的目的蛋白，从而捕获更多的相互作用蛋白；过表达提高目的蛋白的含量：选择目的蛋白或相互作用蛋白含量高的样品进行免疫共沉淀实验。

9. 免疫共沉淀与免疫沉淀的区别



免疫共沉淀



免疫沉淀

免疫沉淀 (immunoprecipitation) 是指利用抗体可与抗原特异性结合的特性，将抗原 (常为靶蛋白) 从混合体系沉淀下来，初步分离靶蛋白的一种方法。

免疫共沉淀 (coimmunoprecipitation) 是一种在体外探测两个蛋白分子间是否存在特异性相互作用的一种方法。其原理非常简单，如果两个蛋白在体外体系能够发生特异性相互作用的话，那么当用一种蛋白的抗体进行免疫沉淀时，另一个蛋白也会被同时沉淀下来。与酵母双杂交技术不同，免疫共沉淀技术所利用的是抗原和抗体间的免疫反应，是一种基于体外非细胞的环境中研究蛋白质与蛋白质的相互作用的方法。

免疫共沉淀与免疫沉淀技术所使用的原理与方法大致相似，所不同的是，在免疫共沉淀中，对靶蛋白的结合与沉淀由另一个与之发生相互作用的蛋白替代。在免疫共沉淀或免疫沉淀的基础上，通过进一步与其它技术的结合，如聚丙烯酰胺凝胶电泳，还可进一步对靶蛋白的分子量等特性进行鉴定。

10. Gst pull-down 与免疫共沉淀的区别

免疫共沉淀：利用抗原抗体反应的特异性；

GST Pull down：一般指用一个带 GST 标签的重组蛋白，与目的蛋白进行孵育，最后用结合 GST 的 Beads 拉下相互作用复合物；

11. Co-ip 实验目的蛋白高背景产生的原因及处理方法

答：非特异蛋白结合，处理方法：在无血清培养液中裂解细胞；在免疫沉淀前用 protein (G/A)珠子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，处理方法：改用高严谨度裂解液，实验仪器或液体被污染，处理方法：使用洁净的仪器或液体转移膜上的非特异吸附，处理方法：戴手套，用镊子夹取，不要接触膜转移面。

12. 免疫共沉淀实验失败原因有哪些？

样品被蛋白酶降解，处理方法：添加蛋白酶抑制剂(protease inhibitor)；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，处理方法：调整 IP 和/或 IB 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，处理方法：选用适合于 IP 和/或 IB 的相应抗体；

IP 抗体未与 agarose 珠子结合，处理方法：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，处理方法：改变 tag 融合表达部位；

裂解液严谨度太高，处理方法：改用低严谨度裂解液。

相关阅读

[免疫共沉淀原理及优缺点](#)

[免疫共沉淀实验操作步骤及注意事项](#)

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

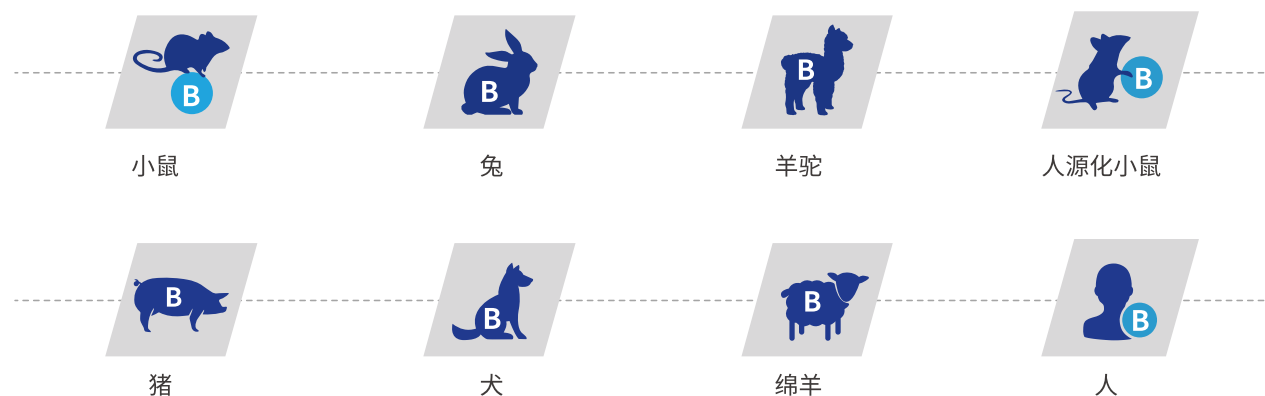
SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

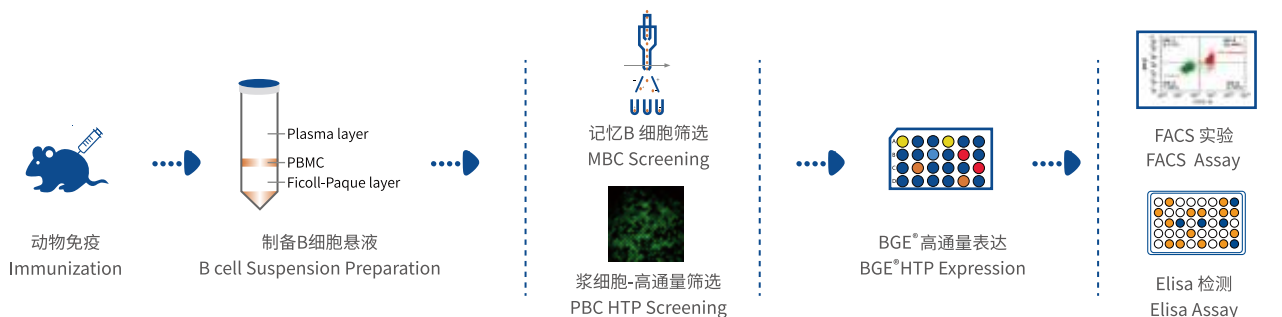
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

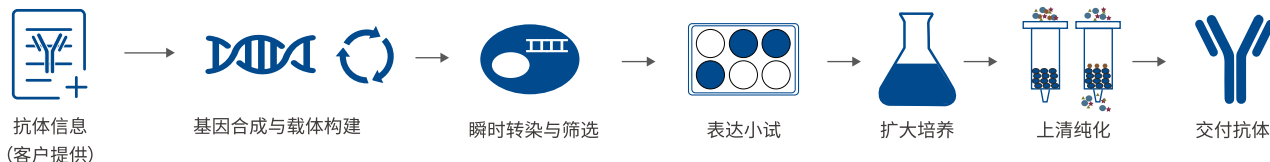
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

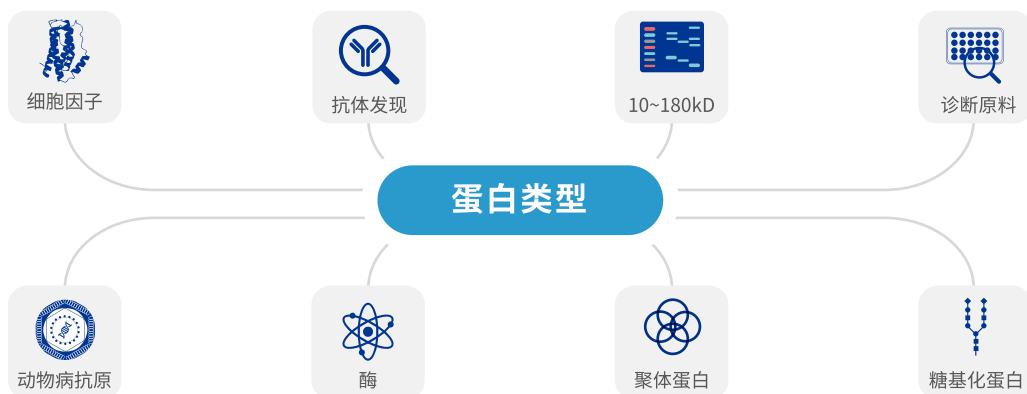


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

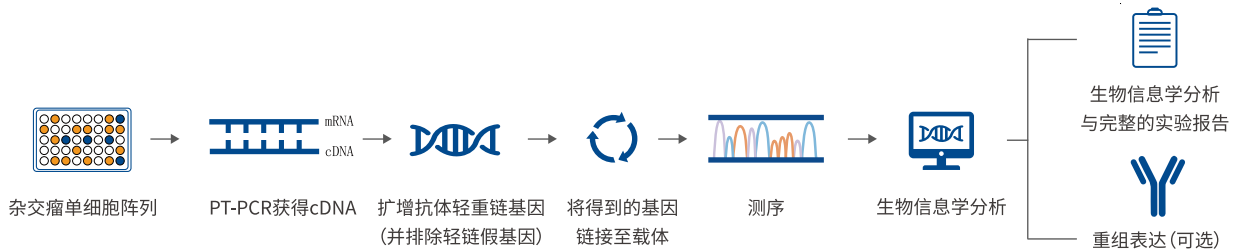
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



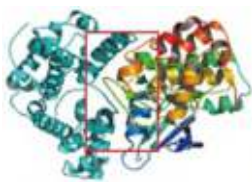
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

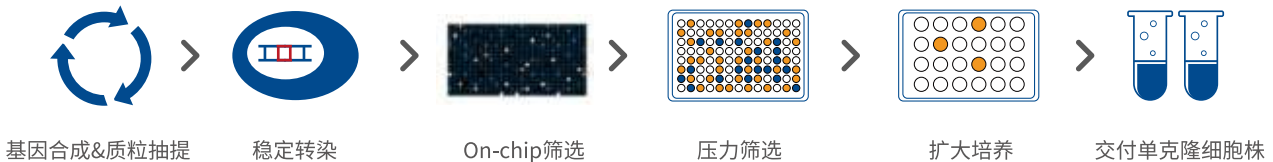
生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L