

免疫共沉淀 Co-IP

1.准备

- 1.1 预冷 4 °C 摇床、磁力架、低蛋白吸附 EP 管与枪头
- 1.2 Protein A/G 磁珠室温轻涡旋 → 置冰
- 1.3 用 5 % BSA 封闭枪头 15 min → PBS 冲洗

2.配液

- 2.1 1 mL 预冷 IP 裂解液 + 10 μL 蛋白酶抑制剂 + 10 μL 磷酸酶抑制剂
- 2.2 冰上备用

3.裂解

- 3.1 收集 2×10^7 对数期细胞
 - 贴壁: PBS 冰洗 2 × → 加 1 mL 裂解液
 - 悬浮: 300 g 3 min → PBS 重悬 → 加 1 mL 裂解液
- 3.2 冰浴吹打 10 s, 静置 30 min (每 10 min 轻颠 3 s)

4.澄清

- 4.1 4 °C 12 000 g × 10 min
- 4.2 取上清 = Input (留 50 μL 备对照)

5.预清除

- 5.1 加 20 μL 洗净磁珠 (1 mL PBS 轻颠 10 s → 磁架 30 s 吸尽上清)
- 5.2 4 °C 摇床 15 min → 磁架弃珠

6.预孵育

- 6.1 取 500 μg 预清裂解液 + 2-5 μg 目标一抗
- 6.2 4 °C 轻摇 120 min (设 IgG 对照)

7.偶联

- 7.1 取 30 μL 磁珠, PBS 洗 2 × (1 mL、轻颠 10 s、磁架 30 s)
- 7.2 5 % BSA 阻断 10 min → 裂解液快速洗 1 ×
- 7.3 加入 6.2 体系, 4 °C 摇床孵育 60 min

8.洗涤

- 8.1 磁架 1 min 吸珠 → 弃上清
- 8.2 加 1 mL 洗涤液 (0.1 % NP-40, 150 mM NaCl) 轻颠 2 min
- 8.3 重复 8.1-8.2 共 3 × (背景高时末次 NaCl 升至 500 mM)

9.洗脱

- 9.1.1 变性: 40 μL 2 × SDS Buffer, 95 °C 5 min → 磁架取上清
- 9.1.2 低 pH: 100 μL 0.1 M Glycine pH 2.5 轻混 5 min → 磁架取上清
- 9.2 立即加 10 μL 1 M Tris-HCl pH 8.0 中和 → 补 20 μL 2 × SDS Buffer, 95 °C 3 min

10.上样

- 10.1 变性洗脱可直接 SDS-PAGE; 低 pH 洗脱经中和后同上
- 10.2 同胶加载 Input / IgG-IP / 目标 IP
- 10.3 Western blot 检测 (猎物与重链重叠时用轻链专一二抗)

常见问题解析

1. Co-IP无条带或信号弱怎么办？

①检查表达：先用Input跑Western blot确认诱饵和猎物在样品中充分表达；②温和裂解：将NP-40降至0.1%，NaCl保持150 mM，裂解时间控制在冰浴30 min内；③降低洗涤强度：洗涤三次即可，每次1 min；④固定弱互作：裂解前加入1-2 mM DTBP或DSP交联5-10 min，洗脱时以DTT或高温解除；⑤增加抗体量或孵育时间：在确认抗体亲和力高的前提下，将一抗量提升至5 μ g/500 μ g蛋白，4 $^{\circ}$ C孵育延长到2 h或过夜。

2. 背景条带多且IgG对照阳性怎么办？

①空珠预清：裂解液与磁珠4 $^{\circ}$ C预孵10-15 min再行正式IP；②BSA阻断：Protein A/G磁珠用2-5% BSA冰浴阻断10 min；③增强洗涤：末次洗涤将NaCl升至500 mM或加入0.5% Tween-20，同时维持低温快速离去；④减少抗体与样品过量：遵循2-5 μ g一抗/500 μ g蛋白，避免高浓度抗体拖带背景。

3. 抗体重链（ \approx 50 kDa）干扰猎物条带怎么办？

①用轻链特异性二抗替代常规二抗；②更换不同物种来源的一抗-二抗组合，使重链分子量不被检测；③交联一抗：将一抗用DMP或BS³共价交联到磁珠，洗脱时重链留在珠体；④调整胶浓度：选择适合目标蛋白分子量的SDS-PAGE浓度，拉开分辨率。

参考文献

- [1] Burckhardt CJ, Minna JD, Danuser G, et al. Co-immunoprecipitation and semi-quantitative immunoblotting for the analysis of protein-protein interactions [J]. STAR Protocols, 2021, 2(3):100644..
- [2] Lagund ž in D, Krieger KL, Law HCH, Woods NT An optimized co-immunoprecipitation protocol for the analysis of endogenous protein-protein interactions in cell lines using mass spectrometry [J]. STAR Protocols, 2022, 3(1):101234.