

产品 FAQs

一. IP、Co-IP、Pull&Down 三者的有哪些区别

免疫沉淀 (IP) : 是指从细胞/组织/血液混合物中富集纯化其特异性的靶标或抗原。

免疫共沉淀 (Co-IP) : 指用抗体用于从混合样品中富集纯化其靶抗原及其结合蛋白。在这种情况下, 抗原是诱饵蛋白, 而其结合蛋白是通过抗体-抗原相互作用共同纯化的相互作用的蛋白。

Co-IP 证明两个蛋白在胞内有相互作用, 但是这个作用可以是直接相互作用, 也可以是形成复合物后的间接相互作用。

Pull down : 类似 Co-IP, 它是使用诱饵蛋白来“下拉”作为其结合的配体蛋白, pull down 与 IP 或 Co-IP 的不同之处在于它不是基于抗原-抗体相互作用。在这里, 诱饵蛋白是通过标签而不是抗体固定的。通常在诱饵蛋白上有标签蛋白, 类似包括: 6 x His, GST 和生物素。结合配体 Beads 包括: 用于所述蛋白质标签的镍/钴, 谷胱甘肽和链霉亲和素等。一般用于体外检测蛋白质与蛋白质之间相互作用、用于验证两个已知蛋白的相互作用, 或者筛选与已知蛋白相互作用的未知蛋白。pull-down 胞外纯化蛋白后证明两个蛋白之间有相互作用, 这个相互作用必然是直接相互作用。

二. 我应该选择磁珠还是凝胶去做免疫沉淀实验呢?

磁珠比较适合特定蛋白质和蛋白质复合物的常规小规模分离, 其在重复性, 纯度和节省成本上具有很大的优势。而琼脂糖凝胶适合纯化大量蛋白质或抗体。凝胶的抗体结合能力更高, 但是免疫沉淀中的更重要的是抗体的亲和性和特异性, 而不是磁珠或凝胶的结合能力, 并且凝胶在免疫沉淀中的过量结合能力只会助长非特异性结合或珍贵抗体的浪费。所以免疫沉淀实验一般建议使用磁珠。

与琼脂糖凝胶不同, 磁珠是固体和球形, 并且抗体结合于每个珠的表面。尽管磁珠不具有多孔中心来增加结合能力的优势, 但它们粒径比琼脂糖凝胶 (90 μm 左右) 小得多, 这共同为它们提供了足够的表面积与体积之比, 以实现最佳抗体结合。

高功率磁铁可以将磁珠定位在 EP 管的侧面，并且不影响细胞裂解液的抽吸，而也不会吸取结合在磁珠上的免疫复合物。磁分离避免了离心，离心会破坏弱的抗体-抗原结合并导致靶蛋白损失。

此外，如果使用琼脂糖凝胶进行免疫沉淀需要用到离心机等设备，但磁珠用于免疫沉淀应用只需要磁力架即可，可以大大降低实验时间成本，操作更简洁。

三.磁珠的技术角度特点有哪些？

快速的结合动力学：由于磁珠的数量大约是相同体积琼脂糖凝胶的 1,000 倍，因此磁珠击中目标的可能性要大得多。

孵育时间：由于快速的结合动力学，该孵育通常很短。

背景低：由于快速的结合动力学和较短的孵育时间，背景也非常低。

杂质的捕获：珠粒没有内部空间用于杂质的非特异性结合。

抗体消耗量低：磁珠是无孔，均匀的超顺磁性，单分散，高度交联的聚苯乙烯微球，由磁性材料均匀分散在整个磁珠中组成。磁珠上涂有一层薄薄的高度交联的聚苯乙烯外壳，该外壳包裹磁性材料，并防止磁珠泄漏或配体滞留在磁珠内部。外层还提供了用于吸附或偶联各种分子（例如抗体）的限定表面积。珠粒大小和形状的均匀性提供了一致的物理和化学性质。这些统一的物理特性提高了高质量，可重复的结果。

四.直接免疫沉淀和间接免疫沉淀的区别？

直接法：一抗首先与 Biolinkedin® Protein A、Protein G 或 Protein A / G 磁珠结合。然后将磁珠和样品混合并在 2-8°C 下孵育。孵育时间取决于靶蛋白的浓度和抗体对该靶蛋白的特异性。当目标蛋白质的浓度很高时，较短的孵育时间应足以捕获目标。如有需要，可在 4°C 下延长孵育时间，也可以过夜。

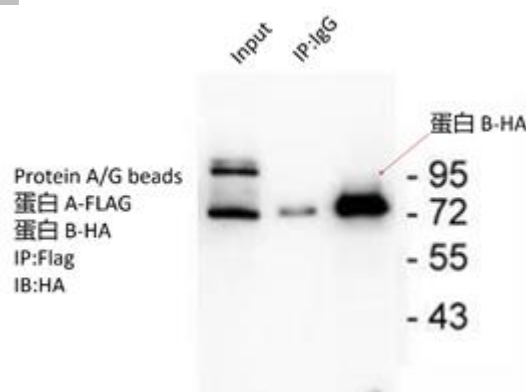
间接法：当抗体对靶蛋白的亲合力较弱或靶蛋白的丰度较低时，这是首选方法。首先将一抗与细胞裂解液一起孵育以形成抗体-抗原复合物。然后通过向样品中添加 Biolinkedin® Protein A、Protein G 或 Protein A / G 磁珠一起孵育，孵育结束后进行磁分离。必须注意避免使用过量的抗体，因为游离抗体结合珠子的速度要比抗体-抗原复合物的结合速度快得多。游离抗体会占据磁珠上的结合位点可能会降低蛋白质产量。

五. IP、Co-IP、Pull down 针对裂解液有什么方面的建议？

选用裂解液需要考虑特定的实验应用，以及靶蛋白在细胞内的位置（细胞核，细胞质或细胞膜等）或则根据样品类型和靶蛋白需求多种不同的裂解缓冲液。裂解策略的目的是以最大程度地保证结构的完整性。同时注意裂解液中的离子强度（盐浓度），去污剂的选择和裂解缓冲液的 pH 值等，都可能影响免疫沉淀效率以及靶蛋白的完整性。一些常用的裂解缓冲液包括 RIPA 缓冲液、NP-40 缓冲液等。Biolinkedin 品牌可提供专用优化的细胞裂解液，以及相配套蛋白抑制剂、洗脱 buffer、中和液、磁力架等。

六. 阴性对照组出线目的蛋白条带？

有时候实验中会出现以下情况：对照组出现条带。



一般这种情况并非磁珠质量问题，主要是磁珠与抗体-抗原混合液孵育结束后没有清洗干净，导致对照组的非特异性结合。

建议：增加洗涤次数、延长洗涤时间等

七．免疫沉淀实验中如何避免重轻链干扰？解决方案有哪些？

重轻链产生的原因一：

免疫沉淀是指从细胞/组织/血液混合物中富集纯化其特异性的靶标或抗原。抗体与细胞裂解液中的靶蛋白结合后，与 Protein A/G 磁珠孵育结合，形成磁珠-Protein A/G-抗体-目的蛋白复合体，经过洗涤后，用电泳上样缓冲液，煮沸 5-10min，在高温及还原剂的作用下，抗原与抗体解离，磁性分离后，上清包含抗体、目的蛋白或少量杂蛋白。

进行 WB 检测环节中，当使用 Anti-IgG(H+L)酶标二抗时，通常会出现免疫沉淀一抗变性后的重链（50KDa）和轻链（25KDa）两条带（可能轻链出现频率不高）。如果检测目的蛋白分子量在此附近时，会受到这两条带的干扰。

解决方案：

方法一：选择 WB 一抗时，选择和 IP 用一抗不同的种属，避免 IP 一抗的干扰

方法二：选择只和重链或轻链反应的二抗。

重轻链产生的原因二：

当使用 Biolinkedin® 标签抗体系列磁珠（如 Anti-Flag 磁珠），细胞裂解液中的靶蛋白结合后，与 Anti-Flag 磁珠孵育结合，形成磁珠-Anti-Flag 抗体-带 Flag 标签的目的蛋白复合体，经过洗涤后，用电泳上样缓冲液，煮沸 5-10min，在高温及还原剂的作用下，抗原与抗体解离，磁性分离后，上清包含抗体、目的蛋白或少量杂蛋白。

进行 WB 检测环节中，当使用 Anti-IgG(H+L)酶标二抗时，通常会出现免疫沉淀一抗变性后的重链（50KDa）和轻链（25KDa）两条带（可能轻链出现频率不高）。如果检测目的蛋白分子量在此附近时，会受到这两条带的干扰。

解决方案：

方法一：洗脱方式采用酸性洗脱或 3xFlag 多肽竞争洗脱方式

方法二：选择 WB 一抗时，选择和 IP 用一抗不同的种属，避免 IP 一抗的干扰

方法三：选择只和重链或轻链反应的二抗。

八．经常会遇到高背景或非特异性结合的问题，该如何解决？

我们可以从以下几个方面分析：

裂解步骤过程：

1. 超声处理期间样品过热：将样品放在冰上，减少脉冲持续时间，并延长脉冲之间的时间间隔。避免在超声处理期间样品过热。这可能会导致热损伤或目标蛋白质的片段化，或可能损害表位。
2. 蛋白质聚集：如果可能，使用新鲜的细胞。避免冷冻细胞。如果需要使用冷冻的材料，请使用冷冻的裂解物（在液氮中速冻并储存在 -80°C 的温度）。通过全速离心 30 分钟除去蛋白质聚集体。
3. 细胞裂解过程中的蛋白质降解和/或蛋白水解：将样品放在冰上，并添加蛋白酶抑制剂。如果和磷酸化蛋白一起使用时，还应添加磷酸酶抑制剂。始终使用新鲜制备的蛋白酶和磷酸酶抑制剂。
4. 样品成分太复杂：细胞收集后可用预冷的 PBS 洗一次再加细胞裂解液裂解。或者通过从某个细胞区室（例如细胞核）提取目标蛋白来降低裂解液的复杂性。

结合步骤：

1. 结合缓冲区不兼容：请使用合适的结合缓冲液，比如不含 SDS 等。如果需要特定化合物，请优化其浓度
2. 洗涤剂浓度过高：降低孵育缓冲液中洗涤剂的浓度：建议的最终浓度为 0.1%（例如 NP-40-或 Triton-X-100）。

蛋白质与珠子（基质）的非特异性结合

使用前，用洗涤/稀释缓冲液洗涤磁珠 1-2 次。

可将孵育步骤缩短至 60 分钟。

裂解液中细胞过多/蛋白质过多，导致洗脱液中有许多非特异性蛋白质

减少使用的细胞/裂解液数量。

按照磁珠推荐量（25-50ul/组）。每个 IP 反应 500 μ g 细胞裂解物。

九．经常会遇到靶蛋白没有结合或则结合量低的问题，该如何解决？

靶蛋白表达低或没有：目标蛋白浓度越高，IP 产量越高。可以通过蛋白免疫印迹检查靶蛋白的表达谱。如果目标蛋白表达水平较低，请减少裂解液的加入量，提高目标蛋白浓度。注意：这可能会增加非特异性结合。

蛋白质的蛋白水解和变性：在裂解和免疫沉淀过程中添加蛋白酶抑制剂，并将孵育样品置于冰上或 4 $^{\circ}$ C 环境下。

细胞裂解不完全或无裂解、靶蛋白质不溶：检查蛋白质是否可溶于裂解缓冲液。可通过蛋白免疫印迹在离心之前和之后表达量并及时配置相应合适的缓冲液。

结合步骤中的干扰物质

含有二硫苏糖醇（DTT），2-巯基乙醇或其他还原剂的裂解物可能会损害抗体，应避免使用。

孵化时间太短

延长磁珠与裂解物的孵育时间。

IP 过程磁珠沉降

确保在磁珠与裂解液孵育过程中悬于裂解液中，可使用旋转混匀仪等设备。孵育过程中的磁珠沉降将导致 IP 效率低下。

无磁力架时，磁珠可以采用离心方式

推荐 4 $^{\circ}$ C、1000rpm、3min，过高转速会造成磁珠碎裂。

磁珠附着在管壁上

加入去污剂以减少表面张力。或者更换低吸附离心管进行孵育。

难以接近的表位

通过为融合蛋白构建体使用长而灵活的接头序列，减少磁珠与目标蛋白之间相互作用的空间位阻。

洗涤条件

可以根据自身需要适当提高或者降低洗涤/稀释缓冲液中的洗涤剂 and/或盐浓度。

可以根据自身需要适当提高或者降低洗涤时间。

可以根据自身需要适当提高或者降低洗涤次数。

十.甘氨酸洗脱蛋白差或没有蛋白（低 pH）

1. 首先洗脱效率取决于实际目标蛋白表达总量，目标蛋白表达总量如果不足，那么磁珠结合目标蛋白表达量会很少，洗脱下来蛋白量自然很低。
2. 确保甘氨酸缓冲液的浓度和 pH 正确。通过不断地上下吸打 30-60 秒来提高洗脱效率，吹打过程中避免气泡产生。重复洗脱步骤。不要忘记在洗脱后立即调节 pH！
3. 在加入 2xSDS 样品缓冲液中洗脱后煮沸珠子，以确认洗脱效率。再通过蛋白免疫印迹分析上清液以确认蛋白质的存在。

十一.Co-IP 实验没有成功，原因有哪些？

不存在相互作用蛋白

Co-IP 过程中通过 IP:蛋白 1 拉取蛋白 2，如果实验组相互作用蛋白没有阳性条带，那么我们首先通过免疫印迹确定 Input 中蛋白 1 和蛋白 2 均表达且表达量可观，然后通过免疫印迹确定蛋白 1 已被成功 IP,那么提示我们蛋白 1 和蛋白 2 在目前处理环境下不存在相互作用

裂解和结合过程可能造成的

1. 蛋白质-蛋白质相互作用在细胞冷冻过程中被破坏：如果可能，使用新鲜的细胞。避免冷冻细胞。

2. 缓冲液成分或浓度的原因破坏或抑制蛋白质-蛋白质相互作用：细胞裂解是 Co-IP 中的关键步骤，请确保使用合适的裂解缓冲液。RIPA 缓冲液可能会使靶蛋白质变性，并可能破坏蛋白质与蛋白质之间的相互作用。对于可溶性蛋白的 Co-IP，请使用非洗涤剂的低盐裂解缓冲液。这种温和的裂解缓冲液可能最不可能干扰蛋白质之间的相互作用。对于溶解度较低的蛋白质复合物，在裂解缓冲液中添加非离子型去污剂，例如 Nonidet™P40 Substitute 或 Triton™X-100。通过测试适合蛋白质-蛋白质相互作用的各种去污剂和盐浓度，尝试不同的结合条件。

3. 缺少蛋白质与蛋白质相互作用所需的添加剂或配体：如果需要，将添加剂或配体添加到结合缓冲液中，以促进蛋白质与蛋白质的相互作用。

4. 孵化时间过长：缩短孵育时间，某些相互作用/蛋白质复合物只是短暂的或不稳定的。如果要检测低亲和力或瞬态相互作用，则可以添加交联步骤。

洗涤过程原因

缓冲液成分浓度原因，破坏或抑制蛋白质-蛋白质相互作用

确保使用适当的清洗缓冲液：使用温和的洗涤缓冲液条件并减少洗涤步骤。洗涤剂，盐和其他添加剂可能会减少非特异性结合，但也会降低收率。通常需要改进洗涤步骤以确定不破坏蛋白质复合物的严格程度。每个蛋白复合物都需要其自己的洗涤缓冲液成分才能成功进行 Co-IP，并且无法预测分离蛋白复合物所需的缓冲液成分。从每个洗涤步骤中保存用过的洗涤缓冲液，以跟踪目标蛋白质及其相互作用伙伴是否通过洗涤而耗尽。

ChIP 实验过程在交联时间太长，无法再访问结合表位

确保您的 IP 试剂在交联后仍能识别靶蛋白。

样品过热

将样品放在冰上，减少超声时间，并延长超声之间的时间间隔。避免交联过程中温度太高

多聚甲醛会干扰蛋白质与蛋白质的相互作用

使用不含甲醇的甲醛，以避免过度交联。

十二.蛋白或抗体磁珠稳定性如何？

我们已经在 25 或 37 度下存放一周，与放置于 2-8 度下的样品进行测试。测试结果表明，
Biolinkedin®磁珠在 37 度下可以存放一周，效果不受影响，产品稳定性很好。

十三.磁珠可以重复利用吗？

建议不要重复利用，本身 IP/Co-IP 实验使用的磁珠推荐量为 25-50ul，体积很少，同时使用重复的磁珠增加非特异。

十四.什么是 Biolinkedin® Classic IP/Co-IP Kit?

Biolinkedin® Classic IP/Co-IP Kit 一款专门为免疫沉淀 (IP) 和免疫共沉淀 (Co-IP) 实验提供的试剂盒，试剂盒中提供 Protein A/G 磁珠、蛋白抑制剂、优化的缓冲液，磁性装备等将使客户能够方便快捷完成 IP/Co-IP。

该试剂盒的优点：

1. 自由使用任何抗体
2. 相关缓冲系统充分
3. 轻松优化
4. 重现性