

技术指南 #64

免疫沉淀 (IP) 技术指南和实验方案

TR0064.0

目录

简介	1
IP、Co-IP 和 Pull Down 实验的通用介绍	2
A. 免疫沉淀 (IP)	2
B. 免疫共沉淀 (Co-IP)	2
C. Pull-Down 实验	2
影响免疫沉淀的因素	3
A. 方法类型	3
B. 支持物类型	3
C. 抗体固相化 (IP 和 Co-IP)	4
D. 诱饵蛋白固相化 (Pull-Down)	6
E. 加样顺序	7
F. 样本预纯化 (和对照)	7
G. 结合缓冲液	7
H. 洗涤缓冲液	8
I. 洗脱缓冲液	8
常见问题和原因	9
A. 纯化所得抗原量低	9
B. 纯化所得抗原纯度低	9
通用免疫沉淀实验流程	10
免疫沉淀实验方案的调整	11
Thermo Scientific Pierce IP、Co-IP 和 Pull-Down 试剂盒	12

简介

免疫沉淀 (IP) 和免疫共沉淀 (Co-IP) 是利用固定在固相支持物上的抗体，从复杂的混合物中，富集或纯化特定蛋白质或蛋白质组的方法。IP 是许多蛋白质组工作流程中的重要步骤，用于研究蛋白质的存在、分子量大小、相对丰度、丰度的上调或下调、蛋白稳定性、翻译后修饰及相互作用等。利用 IP 获得的纯化抗原可采用多种技术进行分析，如 ELISA 和 Western Blotting 等。分离所得的蛋白还可以在酶切后，通过质谱进行鉴定或定量分析。

最早的免疫沉淀方法，是将放射性前体（如氨基酸）加入细胞培养基中，使得细胞在生长的过程中，总蛋白可以直接被标记。裂解细胞后，利用固定在微珠支持物上的特异抗体，从蛋白混合物中纯化获得抗原。纯化所得抗原用 SDS-PAGE 分离后，再通过放射自显影，将凝胶上的放射性信号显示到胶片上。

这种放射性免疫检测方法仍在使用，但有关放射性材料使用的安全性、监管和成本问题促进了非同位素方法的开发。不同于预先标记抗原，现在更常见的方法是从裂解物中纯化抗原，采用 SDS-PAGE 分离，然后转印至膜上进行 Western Blotting 检测。灵敏的化学发光底物的问世，意味着该方法可以轻松达到与放射性技术相当的灵敏度，在抗体亲和力一致的前提下，提供了更高的特异性。

IP、Co-IP 和 Pull-Down 实验的通用介绍

A. 免疫沉淀 (IP)

“免疫沉淀”一般是指采用固定在固相支持物上的结合蛋白，进行小规模蛋白质亲和纯化的实验。更确切地说，IP 是采用固定在微珠支持物（一般是琼脂糖树脂）上的特定抗体，从复杂的混合物中，纯化单一抗原的实验。固定化蛋白质复合物的组装既可以分步进行，也可以一步完成（图 1）。常见的加样顺序：抗体和样本（如细胞裂解物）一起孵育，然后加入亲和微珠，用于捕获抗体 - 抗原复合物。也可以将抗体和微珠（通过抗体结合蛋白，如蛋白 A、G 或 A/G 等，直接或间接结合抗体）先进行孵育，然后再加入含有抗原的样本。当抗原、抗体和固相支持物产生结合以后，充分洗涤微珠，再采用适当的洗脱缓冲液从支持物上洗脱抗原。在设计 IP 实验时应考虑诸多因素（包括加样顺序等），后续章节中将会一一进行讨论。

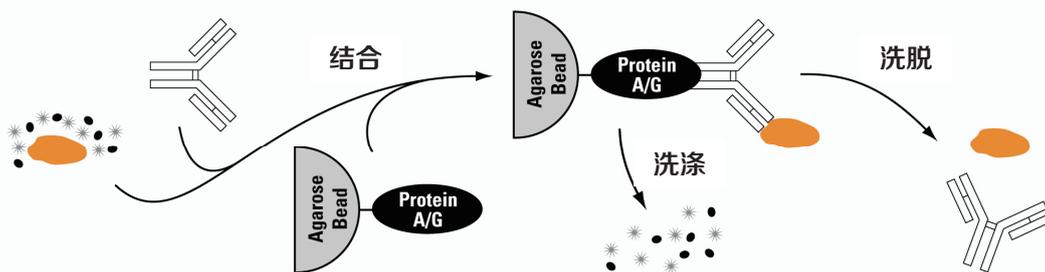


图 1. 免疫沉淀步骤的示意图。含有抗原的样本（通常是细胞裂解物）、抗体和琼脂糖亲和树脂（通常是蛋白 A 或 G）相互结合。未结合的组分在洗涤过程中被冲洗掉，然后再采用可以破坏结合反应的缓冲液洗脱抗体和抗原。如果使用还原型 SDS-PAGE 上样缓冲液进行洗脱，则抗体和抗原将会变性还原为多肽。

B. 免疫共沉淀 (Co-IP)

免疫共沉淀分析（Co-IP）与 IP 十分类似，基本的技术都是采用目标抗原特异性的固相化抗体；但 IP 的目标是纯化单一抗原，而 Co-IP 旨在分离抗原及与抗原结合的蛋白质或配体。在 Co-IP 实验中，已知抗原称为诱饵蛋白，与之结合的蛋白则称为靶蛋白。靶蛋白可能是一些复杂的伴侣蛋白、信号分子、结构蛋白、辅助因子等，蛋白间相互作用强度范围可能介于高度瞬时和十分稳定之间。基本的 Co-IP 实验方案与 IP 相同，实际上任何 IP 系统均可用于 Co-IP。但是，还有许多其他因素需要考虑，例如，结合和洗涤条件的优化，优化时，需要考虑到诱饵蛋白 - 靶蛋白的相互作用强度以及抗体 - 诱饵蛋白的亲合力。

C. Pull-Down

Pull-Down 的概念与 Co-IP 类似，其目的是研究与已知诱饵蛋白结合的蛋白或配体。Pull-Down 旨在证明两种蛋白质之间的相互作用或探索可与目的蛋白结合的未知蛋白或分子。Pull-Down 不同于 IP 或 Co-IP 之处在于，它不是基于抗体 - 抗原相互作用，不是免疫反应。诱饵蛋白（或配体），通过非抗体亲和系统固定到固相支持物上，这种固定可以通过共价偶联结合到活化的微珠上，也可以通过与支持物上的受体分子结合的亲和标签结合，从而固定。例如，固定化金属螯合亲和层析 (IMAC) 树脂，可用于组氨酸标签诱饵蛋白的 Pull-Down。Pull-Down 的优化需要考虑所采用的亲和系统的特殊性质。

影响免疫沉淀的因素

尽管就逻辑和程序而言免疫沉淀的方法十分简单，但由于不同的蛋白质和不同的一抗之间可能存在各种特殊差异，因此影响实验成功的变量和因素不仅多且各不相同。免疫沉淀实验是采用特定的结合条件进行蛋白质或蛋白复合物纯化的操作。通常都需要经过预实验，并不断优化实验条件，才能最终分离获得数量和纯度均满足要求的特定蛋白质。如果能够事先考虑这些变量可能带来的影响，对于确认特定免疫沉淀实验中的关键要素一定大有裨益。表 1 列出了常见的实验影响因素及相关变量。在随后的篇幅中还详细讨论了这些因素带来的各种问题。在指南的最后，提供了常规的分步实验方案，也标注了在不同的步骤可以进行的优化建议。

表 1. 影响蛋白复合物纯化的主要因素

因素	可变特性
方法类型	柱式法与管式法；离心柱与重力柱
支持物类型	物理特性、容量、非特异性结合
抗体固定方法	数量、方向和连接方法
诱饵蛋白固化	标签、亲和配体
加样顺序	微珠、抗体 / 诱饵蛋白和抗原 / 靶蛋白
裂解物预纯化	非特异性结合
结合缓冲液	组分、强度
洗涤缓冲液	组分、强度
洗脱缓冲液	组分、洗脱强度

A. 方法类型

柱式法 vs. 管式法

采用管式法进行免疫沉淀，只需将实验中的各个组分在容器（通常是微量离心管）中混合，反应一段时间，使之相互结合即可。管式法中，每个步骤都是通过离心将固相介质和溶液（未结合的样品，洗涤缓冲液，洗脱缓冲液）进行分离，即固相介质沉淀管底后，将上清小心吸出。

柱式法则是先将微珠树脂填装到塑料或玻璃材质的柱内，再加入 IP 组分一起孵育。样本在重力或离心力（参见下一段）作用下通过柱子，从而使抗原抗体产生结合；当然，也可以将已经加样的柱子封好，使样本与树脂充分混合孵育（可旋转颠倒混匀），以便抗体和抗原能够进行更长时间的结合反应。在柱式法中，样品溶液是利用重力或离心收集法与微珠进行分离的。

重力流 vs. 离心柱

大规模 IP (>10 ml 树脂) 一般只能采用重力流，因为较大的离心柱往往不易操作，尤其是没有配套的收集管可以使用。相反，极小量的 IP 实验则需要用到离心柱法，因为几微升的溶液是无法仅在重力作用下通过滤膜的。大多数中等规模的 IP 采用重力流或离心方法均可，只要有合适的离心柱和离心管，且微珠支持物能够耐受相应的离心力（参见下文）。

离心柱相比重力柱和管式方法具有独特的优势，因为几乎所有残留溶液均可离心通过滤膜，使固相和液相分离更彻底。重力柱需要一直观察，以确保树脂中溶液不会流干，从而产生气泡。此外，抗原会被洗脱至多个组分中，因此需要检测每个组分中是否存在抗原。由于含有抗原的组分均需收集，终体积将大大超过最初的样本体积，因此抗原还需要再进行浓缩处理。管式法的缺点则是由于形成了树脂沉淀，沉淀中含有大量无法通过吸取移除的溶液，所以需要额外的洗涤和洗脱步骤，才能获得纯度和产量均理想的抗原。

B. 支持物类型

琼脂糖

科研型 IP 应用中最常用的微珠支持物是交联的琼脂糖微珠（图 2）。交联琼脂糖是一种简单易用的通用支持物，还可

以通过修饰,活化或结合至所需配体上。树脂持久耐用,能够耐受至 5000 × g、100 psi 的离心力(取决于交联的程度)和高达 120°C 的温度,且在這些条件下,结构或流速的影响并不明显。琼脂糖与复杂样本的非特异性结合程度很低,不会受中等含量的多数去污剂、盐、大多数有机溶剂或极端 pH (pH 长期耐受范围为 3-14,不会被大量水解)等条件的影响。

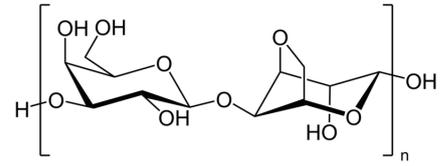


图 2. 琼脂糖的化学结构。

磁珠

除了琼脂糖微珠,磁珠是近几年来颇受欢迎的 IP 固相支持物,如 Thermo Fisher Scientific Invitrogen Dynabeads® 和 Thermo Scientific Pierce Protein A/G 磁珠。因为具有磁性,无需离心,只要配合磁力架使用,即可完成对固相和液相的分离。这种方法更快速,也更温和,适用于高通量,自动化的解决方案(如 Thermo Scientific KingFisher® 仪器)。不同于琼脂糖微珠,磁珠表面没有多孔结构,表面更均一,因此产生非特异结合的可能性更小,而实验重复性则更理想。由于磁珠表面积小于琼脂糖珠,单位体积的结合能力会低于琼脂糖树脂。

其他支持物

琼脂糖微珠的常见替代物包括交联的丙烯酰胺/双丙烯酰胺树脂,如 Thermo Scientific UltraLink® Biosupport,它们具有诸多独特优势,如耐受微生物污染、良好的化学和 pH 稳定性以及较低水平的非特异结合。UltraLink Biosupport 还可以耐受至多 1000 psi 的压力。但与琼脂糖相比,UltraLink Biosupport 也存在一些不足:例如流速不理想、机械稳定性一般,且在各种缓冲液和溶剂中容易产生皱缩或膨胀。

适用于 IP 亲和纯化的其他固相支持物还包括纤维素树脂、聚苯乙烯颗粒或微孔板以及可控微孔玻璃珠等。

C. 抗体固相化 (IP 和 Co-IP)

蛋白 A、蛋白 G 或蛋白 A/G 抗体固相化

蛋白 A、蛋白 G 和重组蛋白 A/G 是免疫球蛋白 (Ig) 结合蛋白,作为亲和配体与微珠支持物结合时,是适合 IP 应用的最常用的抗体结合平台。蛋白 A 最初从金黄色葡萄球菌的细胞壁中分离获得,蛋白 G 最初从 C 和 G 群链球菌表面分离获得。这两种蛋白质目前均采用大肠杆菌表达,以重组蛋白的形式大量生产。蛋白 A/G 是结合了四种蛋白 A 和两种蛋白 G 抗体结合位点的重组蛋白。

表 2. 免疫球蛋白的结合特性

抗体	蛋白 A	蛋白 G	蛋白 A/G	抗体	蛋白 A	蛋白 G	蛋白 A/G
人 IgG1	S	S	S	大鼠 IgG1	W	M	M
人 IgG2	S	S	S	大鼠 IgG2a	NB	S	S
人 IgG3	W	S	S	大鼠 IgG2b	NB	W	W
人 IgG4	S	S	S	大鼠 IgG2c	S	S	S
人 IgM	W	NB	W	牛 IgG1	W	S	S
人 IgE	M	NB	M	牛 IgG2	S	S	S
人 IgD	NB	NB	NB	绵羊 IgG1	W	S	S
人 IgA	W	NB	W	绵羊 IgG2	S	S	S
人 IgA1	W	NB	W	山羊 IgG1	W	S	S
人 IgA2	W	NB	W	山羊 IgG2	S	S	S
人 Fab	W	W	W	鸡 IgY	NB	NB	NB
人 ScFv	W	NB	W	仓鼠 IgG	M	M	M
小鼠 IgG1	W	M	M	猪 IgG	S	W	S
小鼠 IgG2a	S	S	S	马 IgG	W	S	S
小鼠 IgG2b	S	S	S	兔 IgG	S	S	S
小鼠 IgG3	S	S	S	猫 IgG	S	W	S
小鼠 IgM	NB	NB	NB	猴 IgG*	S	S	S

关键词: W = 微弱结合, M = 中等结合, S = 强结合, NB = 未结合, * = 恒河猴

蛋白 A 可与抗体重链的 Fc 区段特异性地结合，实现分子高效定向，抗原结合位点朝外。蛋白 G 也优先结合 Fc 区段，但也有报道称在某些情况下与轻链结合。蛋白 A 和 G 均对多种不同亚类和种属的抗体具有高亲和力 (表 2)。所有分别能与蛋白 A 和 G 结合的抗体亚类均可与蛋白 A/G 结合。

蛋白 A、G 和 A/G (此后统称为“蛋白 A/G”)是将抗体结合到微珠支持物上以用于 IP 应用的高效工具 (图 3)。蛋白 A/G 树脂的创新，使研究人员开发出了商品化的高结合性能支持物，只需少量体积的微珠即可获得极佳的免疫沉淀结果。Thermo Scientific 蛋白 A/G 琼脂糖微珠产品可提供常规结合力和高结合力规格，适用于各种规模的免疫沉淀。结合性能为 30-50 毫克 Ig/ 毫升树脂，非特异性结合水平极低。

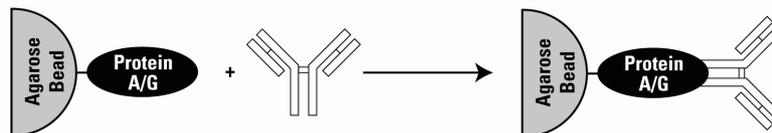


图 3. 抗体与蛋白 A/G 琼脂糖树脂结合的示意图。传统免疫沉淀和免疫共沉淀方法的基础原理。Thermo Scientific Pierce™ 经典 IP 试剂盒即采用该方法 (参见第 12 页)。

抗体的直接固相化

蛋白 A/G 支持物不适合某些特定的 IP 实验系统，例如，当 IP 抗体的种属或亚类不与这些蛋白结合 (参见上表 2)，或者当含有抗原的样本是血清 (血清中包含的免疫球蛋白会与 IP 抗体竞争结合) 时。幸运的是，我们还有其他固相化方法可供选择。所有抗体 (与种属或亚类无关) 均可以通过化学方法直接结合至活化的微珠支持物上 (图 4)。Thermo Scientific AminoLink® Plus 树脂是已经过醛基活化的琼脂糖微珠。这些醛基与伯胺 (-NH₂) 具有很强的反应性，伯胺在抗体及其他蛋白中含量十分丰富 (例如赖氨酸残基的侧链)。胺和醛基反应生成中间产物 Schiff 碱。Schiff 碱可被氰基硼氰化钠还原为稳定的仲胺键，永久性地固定抗体 (无化学基团脱落)。每 ml 支持物最多可以固定 15 mg 蛋白质。

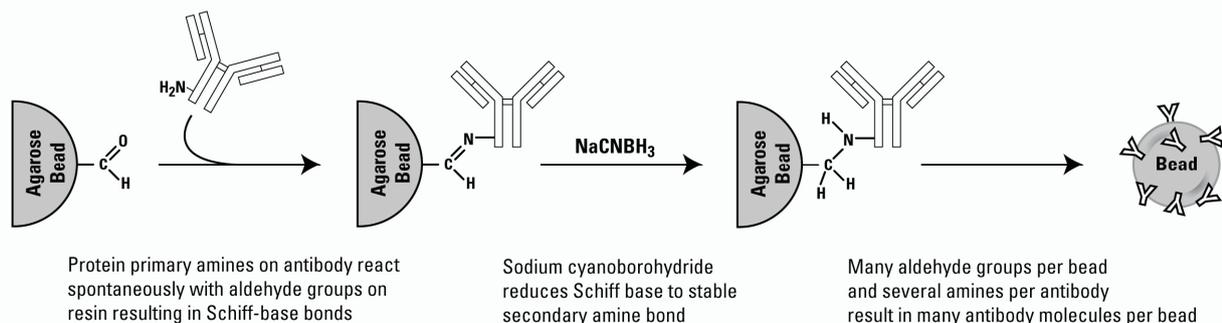


图 4. AminoLink 反应 (还原胺化) 用于共价固定 IP 抗体的示意图。Pierce Co-IP 试剂盒即采用该方法 (参见第 12 页)。

尽管这种方法是随机结合抗体 (基于表面伯胺基团与反应性醛基的接触)，但通常只对 IP 抗体的抗原结合功能和性能产生微弱的影响。这种直接固定的方法不仅可以避免对蛋白 A/G 的依赖，还为免疫沉淀实验提供了很多好处。最重要的是，因为抗体是共价连接在微珠上的，只要采用适合的洗脱缓冲液 (非还原缓冲液)，IP 抗体就不会与抗原一起被洗脱下来。IP 抗体片段与抗原的共洗脱及在 SDS-PAGE 上的共迁移，是传统 IP 结果分析面临的主要障碍。另外，抗体不被洗脱，理论上还表示抗体支持物可以重复使用多次。当然，利用这种直接固相化方法，还需要考虑一些先决条件：1) 加样顺序，抗体必须首先固定在微珠上，然后才能加入样品孵育；2) 由于固定反应是基于伯胺基团进行的，因此 IP 抗体必须是纯抗体 (即不含 BSA 或明胶等蛋白稳定剂，且缓冲液成分中不含伯胺基团)。某些抗体必须先进行脱盐或纯化处理后，方可用于该方法。

交联固定的抗体

除了直接固定，还可以采用交联剂将抗体共价连接到蛋白 A/G 支持物上 (图 5)。常用的交联剂包括 DSS 和 BS3，它们均为末端带有胺基反应性 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯基团的短碳链。NHS 酯可与伯胺 (赖氨酸残基的侧链) 反应，生成共价酰胺键。如果抗体先与蛋白 A/G 支持物结合，然后再与交联剂溶液混合，则交联剂分子可与抗体和蛋白 A/G 相邻的胺基共价连接。



图 5. 采用 DSS 交联剂，将抗体固定在蛋白 A/G 琼脂糖微珠的示意图。Pierce Crosslink IP 试剂盒即采用该方法 (参见第 12 页)。

与直接固相化方法一样，交联方法可以避免抗体片段共洗脱，抗体支持物可以重复多次使用。该方法只适用于可与蛋白 A 或 G 结合的抗体。与直接方法不同的是，交联方法无需纯化抗体；在抗体与蛋白 A/G 结合之后，加入交联剂之前，可以将原抗体溶液中含有胺基的组分洗涤去除。由于抗体包含多个胺基基团，且不仅只分布于 Fc 区段，因此必须优化交联剂的用量。如果交联剂用量过少，则抗体可能无法连接至蛋白 A/G 琼脂糖上，而如果用量过高，会引起抗体结合位点上的胺基基团被过度修饰，进而导致抗体无法与抗原结合。

D. 诱饵蛋白固相化 (Pull-Down)

IMAC/ 组氨酸标签系统

在 Pull-Down 中，已知蛋白质或配体 (诱饵蛋白) 被固相化，用于从复杂的混合物中分离结合蛋白 (靶蛋白)。六个组氨酸残基组成的短序列是纯化或结合表达蛋白最常用的标签之一，被称为组氨酸标签，通常缩写为 “His- 标签”。此类标签通常在蛋白质的 C 末端或 N 末端共表达，能够结合诸如镍、钴或铜等二价阳离子。Ni²⁺、Co²⁺ 或 Cu²⁺ 离子通过螯合固定在固相支持物上，即可用于结合并固定 His- 标签蛋白。标签亲和系统通常在大规模重组蛋白纯化的应用中更为常用，但也可用于 Pull-Down 检测。Thermo Scientific PolyHis 蛋白互作 Pull-Down 试剂盒 (货号: 21277) 即采用该方法。

谷胱甘肽 /GST 系统

GST 表示谷胱甘肽 -S- 转移酶，它是一种 26 kDa 的酶，在重组蛋白表达中常用作表达标签。GST 与其底物谷胱甘肽 (一种三肽) 结合紧密，将谷胱甘肽固相化后，可在 Pull-Down 中用于锚定诱饵蛋白。由于 GST 必须维持酶的功能才可与谷胱甘肽底物结合，因此通常认为该系统不及 His- 标签系统稳定。但是，GST 体积相对较大，具有提高不溶性诱饵蛋白溶解度的优点，使这些蛋白质在 Pull-Down 中更容易纯化和操作。Thermo Scientific GST 蛋白互作 Pull-Down 试剂盒 (货号: 21516) 即采用该方法。

亲和素 / 生物素系统

生物素是一种 244 Da 的维生素，由带有短碳尾的双环结构组成，末端为羧基基团 (图 6)。尽管生物素不能与重组蛋白共表达，但采用活化的生物素衍生物可以轻松对蛋白质进行生物素化。生物素羧基基团可以采用如 NHS 酯、马来酰亚胺或肼等反应基团进行化学修饰，分别可与胺基 (-NH₂)、巯基 (-SH) 或醛基 (-CHO) 等基团进行反应。Thermo Scientific EZ-Link® 生物素标记试剂和试剂盒 (如货号: 21435 等) 提供了多种方案，用于蛋白质的生物素标记。

由于生物素与亲和素类蛋白 (包括四聚体糖蛋白亲和素，低糖类似物链霉亲和素和 Thermo Scientific NeutrAvidin™ 中性亲和素蛋白) 的高亲和力，生物素化的蛋白极易通过亲和素类蛋白固相化。生物素 - 亲和素相互作用的强度极高，因此固相化的亲和素尤其适用于锚定生物素化的诱饵蛋白，用于 Pull-Down。Thermo Scientific 生物素化蛋白互

作 Pull-Down 试剂盒 (货号: 21115) 即采用该方法。

当生物素化的抗体用作诱饵蛋白时, 基于生物素的 Pull-Down 实际上就是一种免疫沉淀。这是另一种 IP 实验方法, 无需使用蛋白 A/G (例如, 适用于不与蛋白 A 或 G 结合的免疫球蛋白种属或亚类)。

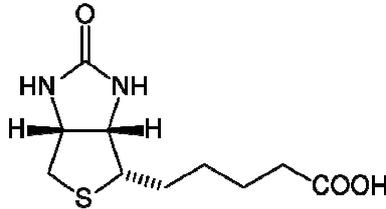


图 6. 生物素的化学结构。

直接固相化

如果诱饵蛋白不带标签, 或没有适合的配体亲和系统可供选择, 或者实验系统中的标签需要用作其他功能, 则必须采用其他方法固定诱饵蛋白用于 Pull-Down 实验。纯化的诱饵蛋白可以通过共价方法直接固定至活性支持物上, 具体方法与第 5 页所述的抗体固相化方法相同。Pierce Co-IP 试剂盒或 AminoLink Plus 树脂均可用于该用途。

E. 加样顺序

将传统的蛋白 A/G 支持物用于 IP 应用时, 固相化抗体 / 抗原复合物有 3 种不同的加样顺序。第一种方法是将抗体加入蛋白样品中, 使之与抗原相互作用, 然后再加入蛋白 A/G 支持物, 结合抗体并沉淀蛋白复合物。该方法抗原产量最高, 但缺点是抗体会与抗原一起被共洗脱下来。第二种方法是先将抗体结合到支持物上, 然后将其与蛋白样品混合。相比第一种方法, 抗原产量和纯度稍有下降; 但它同时降低了非特异背景。第三种方法是直接将三种组分混合到一起; 尽管该方法速度较快, 但通常获得的抗原纯度和产量均最低。

显而易见, 采用直接或交联法进行 IP 时必须采用第二种顺序 (即先结合抗体与支持物)。直接和交联法可以保证抗原洗脱时无抗体干扰, 这种优势显然比加样顺序带来的限制更重要。

F. 样本预纯化 (和对照)

样本预纯化是一个可选步骤, 旨在去除与微珠支持物非特异结合的蛋白质和配体。预纯化需要在进行复合物结合之前进行。通常在用蛋白 A/G 琼脂糖和 IP 抗体进行 IP 实验前, 先将样本与普通琼脂糖微珠 (即用于 IP 反应的基础支持物, 未包被蛋白 A/G) 进行孵育。预纯化步骤如果成功, 则可以去除样本中与树脂非特异结合的无关蛋白或其他组分, 这样在实际的 IP 实验中, 它们就不会与靶抗原一起被纯化出来。

普通微珠或未结合 IP 抗体的蛋白 A/G 微珠, 还可用作 IP 或 Co-IP 实验的阴性对照。在这些对照条件下获得的产物均来自于非特异 (非靶向) 结合。直接固相化方法的优点之一是可以完全避免使用蛋白 A/G 组分, 从而去除可能由蛋白 A/G 引起的非特异结合。

G. 结合缓冲液

蛋白复合物是否能够结合, 往往取决于 IP 结合缓冲液与所有组分之间结合反应的兼容性。在传统的 IP 中, 这些结合反应包括抗体与蛋白 A/G 的亲合作用以及抗体与抗原的亲合作用。在 Co-IP 中, 还涉及诱饵抗原和靶蛋白之间的亲合作用。在大多数情况下, 抗体 - 抗原相互作用较为稳定, 可在任意一种近中性 pH 的标准缓冲液中进行, 如磷酸盐缓冲液 (PBS) 或 Tris 盐缓冲液 (TBS)。相反, 诱饵蛋白 - 靶蛋白相互作用的强度和则不确定, 可以是长期不可逆的结合, 也可以是瞬时且不稳定的结合。如果已知诱饵蛋白和靶蛋白在体内的结合需要一些特定的分子或辅助因子, 则 IP 结合缓冲液中也需添加这些组分。许多研究人员使用的结合缓冲液和洗涤缓冲液配方相同——此时可以同时优化这两种缓冲液 (参见洗涤缓冲液章节)。

当使用蛋白 A、G 和 A/G 时，可以使用特定的结合缓冲液提升抗体结合能力。尽管在大多数生理缓冲液中均可发生结合，但专用的蛋白 A 和蛋白 G 结合缓冲液可以提高结合水平，在某些情况下可以使结合能力至少翻倍，不过这些缓冲液未必都适用于抗原或蛋白相互作用。例如，蛋白 A 在 pH 8.2 的条件下与 IgG 的结合效果最佳，而蛋白 G 在 pH 5.0 的缓冲液中与 IgG 的结合效果最佳。

在大多数情况下，需要根据经验优化结合条件，尤其是在免疫共沉淀实验中。直接或交联固相化方法的优点之一则是，能将抗体 - 蛋白 A/G 相互作用因素从最终的 IP 结合反应中去除。

H. 洗涤缓冲液

在 IP 应用中选择适合的洗涤缓冲液时，需要能够满足如下条件：维持理想的蛋白质相互作用，同时避免并去除非特异性的蛋白质结合。琼脂糖是一种碳水化合物，即便是琼脂糖微珠也可与特定的蛋白质及其他细胞组分结合。如果某个 IP 实验存在大量背景，则需要根据经验摸索出一种有效的洗涤条件。

除非已知存在特殊的相互作用，否则蛋白亲和方法中洗涤缓冲液优化的默认起点应为 PBS 或 TBS，它们具有生理水平的盐和 pH。如果观察到有目标相互作用，则可以加入低浓度（一般为 0.5-1.0%）的 NP[®]-40、Triton[®]-X-100、CHAPS 或其他温和去污剂，以降低背景。如果有非特异的相互作用，但目标相互作用很强，则可以将氯化钠 (NaCl) 浓度提高至 0.5 M 甚至 1 M，以降低离子的静电引力作用，从而进一步提高洗涤缓冲液的强度。低浓度的还原剂（如 1-2 mM DTT 或 BME）可以帮助破坏二硫键或亲核反应介导的非特异性相互作用。此外还可使用其他系统依赖性的添加剂，例如在使用 His 标签蛋白的 Pull-Down 实验中，常常可以加入低浓度的咪唑或 EDTA 以降低非特异结合水平。

I. 洗脱缓冲液

如果传统 IP 的下游分析是用还原性 SDS-PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）和蛋白质免疫印迹检测，则通常直接使用还原性 SDS-PAGE 上样缓冲液进行洗脱。该缓冲液可使蛋白质变性还原并用于电泳，十分高效，适用于亲和作用的解离。但 IP 的其他下游应用与该缓冲液系统不兼容，且当使用该洗脱缓冲液条件时，某些 IP 方法的优点也体现不出来（例如，直接或交联 IP 方法中的抗原洗脱液无抗体片段污染）。

蛋白亲和纯化方法（包括 IP）中最高效的非变性洗脱缓冲液是 0.1 M 甘氨酸，pH 2.5-3。低 pH 水平可以解离大多数抗体 - 抗原相互作用（以及假定未交联的情况下的抗体 - 蛋白 A/G 相互作用）。低 pH 甘氨酸并非通用；采用该缓冲液无法解离某些抗体 - 抗原相互作用；相反，一些抗体和靶抗原还会在该缓冲液中变性或失活。研究人员还开发出了其他类型的洗脱缓冲液，可高效用于亲和纯化，在相关技术指南 # 27《优化免疫亲和纯化的洗脱条件》中有详细的介绍。

Pull-Down 通常需要系统特异性的洗脱条件。在许多系统中，可以通过高浓度标签或配体的竞争结合完成洗脱。例如，采用游离的谷胱甘肽洗脱通过 GST 标签固定的蛋白质复合物。

基于生物素标签的 Pull-Down 在亲和系统中很突出，因为亲和素 - 生物素结合作用非常强。只有十分剧烈的条件（如 8 M 胍 • HCl，pH 1.5）可以有效洗脱亲和素或链霉亲和素树脂上的生物素标签。这给亲和素 - 生物素系统的使用带来了一定的限制，但也为 IP 和 Pull-Down 应用提供了便利：采用低 pH 甘氨酸或其他缓冲液高效洗脱抗原（或靶蛋白）时，生物素化的抗体（或诱饵蛋白）可以保留在链霉亲和素琼脂糖微珠上，不会由于共洗脱产生干扰。

常见问题和原因

A. 纯化所得抗原量低

抗原结合水平低

IP 应用中出现低抗原结合水平的可能原因有很多，结合反应所使用的溶液是重要原因之一。必须使用适合的缓冲液，有特定的 pH 和盐浓度，可能还需要添加互作所需的辅助因子。大多数 IP 应用均采用简单的缓冲液，如 PBS 或 TBS。加入去污剂、盐及其他添加剂可能会降低非特异结合，但也会使产量下降。需要根据经验进行条件优化，有时则不得不在产量和纯度之间做出权衡。

IP 或 Co-IP 中用于纯化的抗体是影响得率的另一个重要因素。如果抗体本身易失活或仅与抗原结合微弱，则可能很难找到足够温和的条件，即能产生结合，又能保证在孵育和洗涤过程中结合可以稳定保持。一些抗体甚至无法用于 IP (天然抗原)，只能用于蛋白质免疫印迹等分析 (变性抗原)。尽可能购买已经过 IP 验证的商品化抗体。

如果多克隆抗体未经过亲和纯化，则抗原特异性的抗体只占总 IgG 的 1-2%。这种类型的抗体可用于蛋白质免疫印迹，但不适用于 IP，因为样本中所有 IgG 分子 (与抗原特异性无关) 都会竞争微珠上的蛋白 A/G 结合位点。如果与固相支持物结合的大部分抗体都是非特异性的，势必会造成抗原得率很低。

抗原洗脱水平低

在某些情况下，抗原与抗体或结合蛋白结合之间可能会发生极强的相互作用，传统的洗脱缓冲液无法将其破坏。如果需要使用温和洗脱缓冲液收集功能性抗原，则上述矛盾尤为突出。如果抗原产量很低且怀疑抗原仍然结合在微珠支持物上，可以用如下的简单方法进行确认：用剧烈的缓冲液 (如 SDS-PAGE 上样缓冲液) 来煮沸少量微珠，然后离心微珠，再采用 SDS-PAGE/ 蛋白质免疫印迹分析上清，确认上清是否存在抗原。如果存在抗原，则应尝试其他强度更高的洗脱缓冲液，以确保抗原不会被灭活的洗脱条件 (参见技术指南 # 27 《优化免疫亲和纯化的洗脱条件》)。

B. 纯化所得抗原纯度低

非特异性蛋白污染

如果洗脱所得抗原纯度较低，则有几种方法可以进行优化。在结合或洗涤缓冲液中加入去污剂或其他可以降低非特异性结合的组分 (参见前面关于结合和洗涤缓冲液的讨论)。使用普通微珠预纯化样本还可以最大程度地降低非目标分子的共纯化。此外，还可以使用无关蛋白 (如 BSA) 封闭微珠 (与蛋白质免疫印迹或 ELISA 中的封闭步骤类似)。尽管会有少量的封闭蛋白与抗原一起被共洗脱下来，但其分子量已知，因此对下游分析造成的影响较小。

非必需的高强度洗脱缓冲液 (如 SDS-PAGE 上样缓冲液) 将导致多种非特异蛋白与抗原一起被共洗脱下来。采用高强度的洗脱缓冲液会将固相化的亲和配体片段 (如蛋白 A/G 或链霉亲和素的亚基) 从微珠上剥离。此时，使用更温和的缓冲液 (如 0.1 M 甘氨酸, pH 2.5) 可以防止此类污染。

抗体污染

使用蛋白 A、G 或 A/G 的经典免疫沉淀实验中会出现抗体与抗原共洗脱的情况。如果共洗脱会影响下游分析，则需要使用抗体通过共价连接固定至微珠的方法进行实验，如 Pierce 直接 IP 或交联 IP 的形式。

当只进行蛋白质免疫印迹检测时，如果采用的蛋白质免疫印迹方法无法检测到 IP 抗体片段，则无需调整 IP 步骤。可以采用下列几种方式：1) 使用不同种属的一抗进行 IP 和蛋白质免疫印迹检测；2) 采用非生物素化的抗体进行传统 IP，但采用链霉亲和素-HRP 二抗检测生物素化的抗体，进行蛋白质免疫印迹；3) 采用只与天然一抗结合而不与变性的 IP 抗体片段结合的二抗检测试剂。Thermo Scientific Clean Blot IP 试剂 (货号: 21230 和 21233) 采用的是第 3 种方法。

通用免疫沉淀实验流程

此例中采用蛋白 A/G 琼脂糖微珠和 2-10 μg 抗体进行基础或“传统”的 IP 操作。通常情况下，本实验流程所得抗原足够用于 3-5 个泳道的凝胶上样，以用于电泳和蛋白质免疫印迹检测。

A. 材料准备

- IP 裂解 / 洗涤缓冲液：0.025 M Tris、0.15 M NaCl、0.001 M EDTA、1% NP-40、5% 甘油，pH 7.4
- 盐溶液：0.15 M NaCl
- SDS PAGE 上样缓冲液 (2X)：使用超纯水将 Lane Marker 还原型上样缓冲液 (货号：39000) 稀释至 2X，也可以使用 100 mM Tris pH 6.8、40 mM DTT、2% SDS、20% 甘油、0.2% 溴酚蓝溶液
- 洗脱缓冲液：IgG 洗脱缓冲液 (货号：21004) 或 0.1-0.2 M 甘氨酸 •HCl，pH 2.5-3.0

B. 免疫复合物的制备

注：根据目标样本体积和预计的靶抗原浓度，使用足量的抗体和亲和树脂。所需的样本量和孵育时间取决于各个特定的抗原 - 抗体系统，可能需要优化以实现得率最大化。

表 3. 在 IP 实验中确保抗体完全捕获所需的 Pierce 蛋白 A/G 琼脂糖体积。

抗体	树脂
2 - 20 μg	10 μl
25 - 50 μg	20 μl
50 - 250 μg	50 μl

1. 制备蛋白质样本。从培养的哺乳动物细胞中制备裂解物，需使用 IP 裂解 / 洗涤缓冲液。每 50 mg 湿重细胞沉淀使用 500 μl IP 裂解 / 洗涤缓冲液 (即 10:1 v/w)。
2. 在微量离心管中加入 2-10 μg 亲和纯化的抗体与细胞裂解物混合。每次 IP 反应的总蛋白量建议在 500-1,000 μg 之间。
3. 使用 IP 裂解 / 洗涤缓冲液将抗体和细胞裂解物混合液稀释至 300-600 μl 。
4. 4°C 孵育 1 小时或过夜，以形成免疫复合物。

C. 免疫复合物的捕获

1. 轻轻晃动蛋白 A/G 琼脂糖试剂瓶，使琼脂糖微珠均匀悬浮。使用宽口吸头或切开移液器吸头，将 10 μl 树脂 (如果树脂为 50% 浆液，则吸取 20 μl 浆液) 加入离心柱中。将离心柱放入微量离心管中，1,000 \times g 离心 1 分钟。弃去溶液。
2. 用 100 μl 冷却的 IP 裂解 / 洗涤缓冲液洗涤树脂两次。每次洗涤后弃去溶液。
3. 在纸巾上轻拍离心柱底部，去除多余的液体，并将离心柱用底塞封闭。
4. 将抗体 / 裂解物混合液添加至离心柱内的蛋白 A/G 及琼脂糖树脂中。离心柱盖上螺旋盖后，进行温和颠倒混匀或摇床孵育 1 小时。
5. 拔出底塞，旋开螺旋盖，将离心柱置于离心管中。离心并保留溶液。直至确认 IP 完成前，切勿弃去溶液。
6. 旋开螺旋盖，将离心柱置于新的离心管中，加入 200 μl IP 裂解 / 洗涤缓冲液并离心。

注：如果需要不含去污剂的洗涤液，则可使用其他洗涤缓冲液，如 20X TBS 缓冲液 (缓冲液需要稀释至 1X 待用)。

7. 加入 200 μl IP 裂解 / 洗涤缓冲液洗涤树脂三次，每次洗涤后离心。
8. 加入 100 μl 盐溶液洗涤树脂一次。

D. 免疫复合物的洗脱

注：收集免疫复合物的方法有两种。上样缓冲液洗脱适用于蛋白质免疫印迹分析。低 pH 洗脱适用于酶或功能性分析（低 pH 被中和后）。

SDS 上样缓冲液洗脱

1. 将含有树脂的离心柱（未放置底塞）置于新的离心管中，加入 50 μ l 2X SDS PAGE 上样缓冲液。100 $^{\circ}$ C 孵育 5-10 分钟。
2. 离心收集样本洗脱液，冷却至室温后进行 SDS-PAGE 上样。

注：树脂加入 SDS 上样缓冲液，并加热处理后，无法再重新使用，必须弃去。

低 pH 洗脱：

1. 将离心柱置于新的离心管中，加入 50 μ l 洗脱缓冲液。室温孵育 10 分钟。无需闭合离心柱或混匀离心柱中的溶液。
2. 离心并收集溶液。
3. 根据需要二次洗脱。分别分析各洗脱液组分，以确保抗原已洗脱充分。

可选操作：要中和洗脱缓冲液的低 pH 值（例如用于下游酶或功能分析），将 5 μ l 的 1 M Tris (pH 9.5) 加入离心收集管中，待样品离心后可中和 pH 值。或者使用中性 pH 洗脱缓冲液（即温和洗脱缓冲液，货号：21027）。

注：为获得浓度更高的洗脱液，可降低洗脱缓冲液用量；但相应的总产量也会下降。不建议洗脱缓冲液体积少于树脂的体积。

免疫沉淀实验方案的调整

A. Co-IP 实验

Co-IP 相比标准 IP 实验除了结合条件需要根据抗原 - 靶蛋白相互作用特性进行调整以外，无需进行过多的修改。如果 IP 裂解 / 洗涤缓冲液不适用于目标蛋白，则可以使用稀释的缓冲液或其他结合缓冲液。相比标准 IP，对照在 Co-IP 中更重要。参见上文关于结合和洗涤条件的讨论（第 7-8 页）。

B. Pull-Down

Pull-Down 需要适合特定标签 - 配体亲和系统且能够兼容靶蛋白（诱饵蛋白 - 靶蛋白）相互作用的结合、洗涤和洗脱缓冲液。根据系统不同，需要对默认实验方案进行或多或少的修改。大多数标签 - 配体相互作用机制已十分清楚，相关亲和支持物文献中已介绍了最佳条件。相比之下，特定的诱饵蛋白 - 靶蛋白相互作用由于仍在研究中，性质尚不明确，通常需要检测不同的结合和洗涤缓冲液。本实验方案中介绍的低 pH 洗脱缓冲液通常足以破坏诱饵蛋白 - 靶蛋白相互作用，同时也可能会破坏标签 - 配体间相互作用（例如 GST/ 谷胱甘肽、His 标签 /IMAC，但不足以破坏生物素 / 亲和素的互做）。

C. 结合和洗涤缓冲液优化

参见上文关于结合和洗涤条件的讨论（第 7-8 页）。

D. 实验规模放大

“免疫沉淀”和“Pull-Down”一般是指小规模（微量离心管）纯化，常用于蛋白质免疫印迹的直接比较分析。相同的亲和纯化原则同样适用于较大规模的“预备”抗原纯化（使用包含 1-10 ml 亲和树脂的分离柱）。但是，使用商品化一抗进行的大规模抗原纯化通常十分昂贵，尤其是抗体只能使用一次的传统 IP 方法。在大多数情况下，大规模抗原纯化只适合采用 Thermo Scientific AminoLink Plus 或 SulfoLink[®] Coupling 树脂的直接固相化方法，抗体可以固定，制备得到亲和树脂，以用于多次纯化。

Thermo Scientific Pierce IP、Co-IP 和 Pull-Down 试剂盒

26146	Pierce 经典 IP 试剂盒 经典方法 IP，采用加强型蛋白 A/G 琼脂糖和便捷的微量离心柱。
26147	Pierce 交联 IP 试剂盒 交联方法 IP，结合抗体后用胺基反应性交联剂 DSS 共价交联至蛋白 A/G 琼脂糖上。所得洗脱抗原中不含抗体片段的干扰。
26148	Pierce 直接 IP 试剂盒 直接方法 IP，任意种属或亚型的抗体直接共价固定到琼脂糖微珠上（使用 AminoLink Plus Coupling 树脂）。所得洗脱抗原中不含抗体片段的干扰。
26149	Pierce 免疫共沉淀试剂盒 直接固相化的 Co-IP（参见上面的 Direct IP 试剂盒）。除了部分缓冲液成分，其余与 Direct IP 试剂盒组分相同。
88804	Pierce 经典磁珠 IP/Co-IP 试剂盒 经典方法 IP，采用 Protein A/G 磁珠和 IP 专用裂解缓冲液
88805	Pierce 交联磁珠 IP/Co-IP 试剂盒 交联法 IP/Co-IP，结合抗体后用胺基反应性交联剂 DSS 供价结合至 Protein A/G 磁珠上，所得的洗脱抗原中不含抗体片段的干扰
20422	Pierce Protein A/G 琼脂糖 使用了 Protein A/G 重组蛋白，成分均一，结合载量高，结果重复性好
88802	Pierce Protein A/G 磁珠 相比通常的标准磁珠，其结合能力高出 4 倍，具有优异的非特异结合率
26180	Pierce HA-Tag IP/Co-IP 试剂盒 HA- 标签诱饵蛋白参与的蛋白免疫沉淀。提供预先固定的抗 HA 抗体琼脂糖树脂。
23620	Pierce c-Myc-Tag IP/Co-IP 试剂盒 c-Myc 标签诱饵蛋白参与的蛋白免疫沉淀。提供预先固定的抗 cMyc 抗体琼脂糖树脂。
21115	生物素化蛋白互做 Pull-Down 试剂盒 适用于生物素化诱饵蛋白或生物素化抗体参与的 Pull -Down 或免疫沉淀。
21516	GST 蛋白互做 Pull-Down 试剂盒 适用于 GST 标签诱饵蛋白参与的 Pull -Down。
21277	PolyHis 蛋白互做 Pull-Down 试剂盒 适用于 His 标签诱饵蛋白参与的 Pull -Down。采用高特异性的的钴螯合树脂。

扫描二维码，获取相关支持信息



蛋白相互作用技术方法概述



更多免疫沉淀相关产品信息



成网络讲座



产品促销

NP-40 (Nonidet) 是 Royal Dutch/Shell Group 的注册商标。Triton 是 ICI Americas 的注册商标。

如需当前的产品说明，请登录 www.thermofisher.com/proteinbiology。

© 2015 Thermo Fisher Scientific Inc. 版权所有。除特别说明外，所有商标均为 Thermo Fisher Scientific 及其附属公司的财产。