

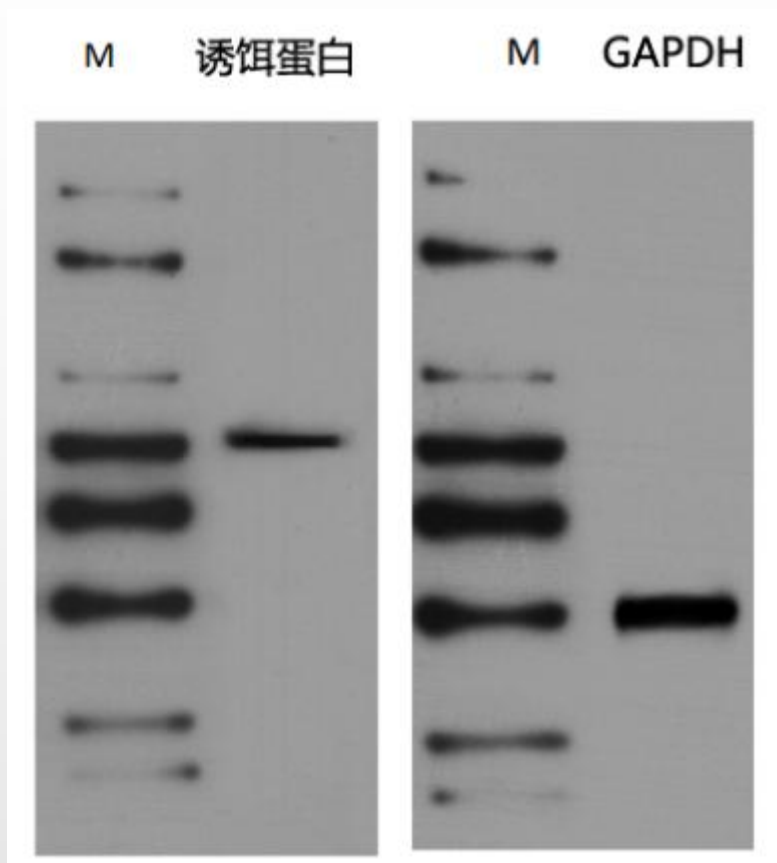
Co-IP结果解读

| 专注 | 品质 | 诚信 |

提供核酸和蛋白的整体研究方案

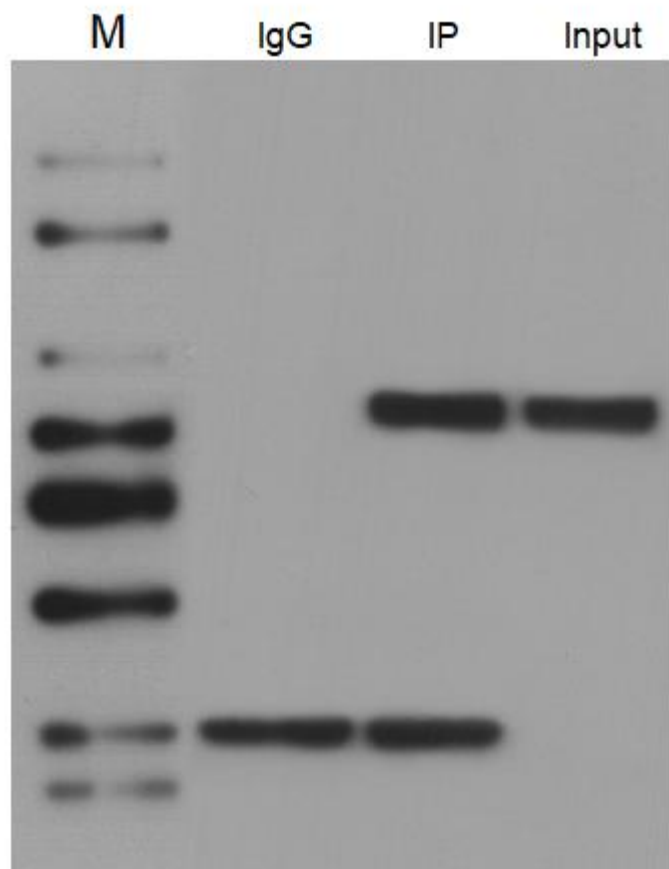
>>>

IP前WB



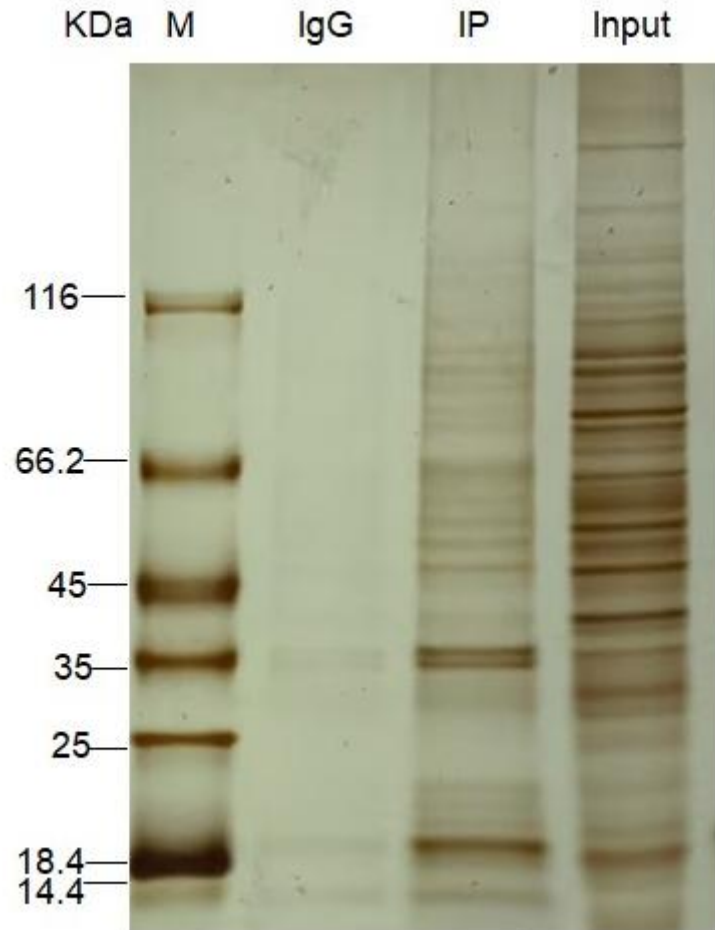
- 1、在正式实验前，务必要对样品做WB质控；
- 2、IP前WB检测的指标应至少包括诱饵蛋白以及内参蛋白，如果有预期的猎物蛋白，也应在IP前检测本底表达水平；
- 3、内参蛋白条带必须清晰无拖带，如果内参条带不正常，说明样本内蛋白已经发生降解，需要重新备样；
- 4、诱饵或猎物蛋白条带最好是强信号的单带，如果信号比较弱，IP后可能检测不到信号，导致实验失败，或误判成假阴性结果，建议在样本中过表达目的蛋白后再做尝试；
- 5、诱饵蛋白WB如果杂带较多，可能是该批次抗体在该样本中的特异性不够好，如果实在没有合适的抗体，也至少应当在目的条带的信号相较于杂带足够强的前提下，再进行后续实验，否则无法保证最终结果的可靠性。

IP后WB



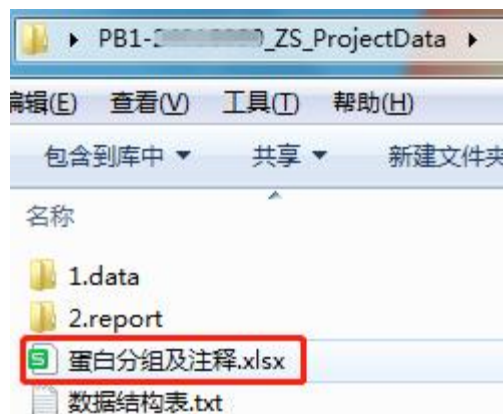
- 1、一次完整严谨的COIP实验，应当包含IgG对照组、IP实验组以及Input组；
- 2、Input泳道所点样本与IP前WB一致，作为阳性对照；
- 3、判定COIP实验成功标准，是能够在IP泳道检测到**诱饵**蛋白信号，且IgG泳道检测不到；如果IgG泳道也检测到诱饵蛋白，说明该蛋白能够与所有IgG类的抗体结合，只能换别的实验如酵母杂交、GST pull down等来验证。
- 4、在IP后能够检测到**诱饵**蛋白的前提下，如果检测不到**猎物**蛋白，说明两个蛋白不互作，至少在这个样本和实验体系下不互作，并不代表实验本身有问题；
- 5、COIP后往往会在IgG和IP泳道出现目的条带以外的杂带，这是由于COIP实验会往实验体系中加入抗体进行富集，这些抗体最终也会也会被WB的二抗识别到；
- 6、抗体由轻链和重链构成，轻链分子量约为25KD，重链分子量约为50-70KD，如左图所示，由于使用了识别轻链的二抗，因此IgG和IP泳道均在25KD左右出现了抗体链条带；
- 7、在做IP后WB时，为了避免抗体链对结果的干扰，应灵活选择二抗，如左图所示，由于目的条带在重链范围，因此选择了识别轻链的二抗。

银染和质谱鉴定



- 1、银染通常作为质谱送样上机前的质控，检测IP后蛋白液的质量，或在知道预期蛋白大小的前提下切胶送质谱，减少杂蛋白的干扰；
- 2、在质谱结果中挑选候选蛋白时，建议选择IP组中iBAQ较高，且与研究方向相关的蛋白，如鉴定到的蛋白太多需要缩小选择范围，可以考虑优先选择IP组特有蛋白；
- 3、质谱在上机前会将蛋白酶解成肽段，而高丰度的肽段很可能会掩盖掉低丰度肽段的信号峰，因此质谱无法保证一定能鉴定到某一个或某一类蛋白；
- 4、IgG组的蛋白液因为蛋白丰度都比较低，肽段信号被掩盖的情况有时候反而没有IP组那么多，因此可能最终鉴定出来IgG组的特异性蛋白比IP组还要多，这也是很正常的情况。

质谱鉴定

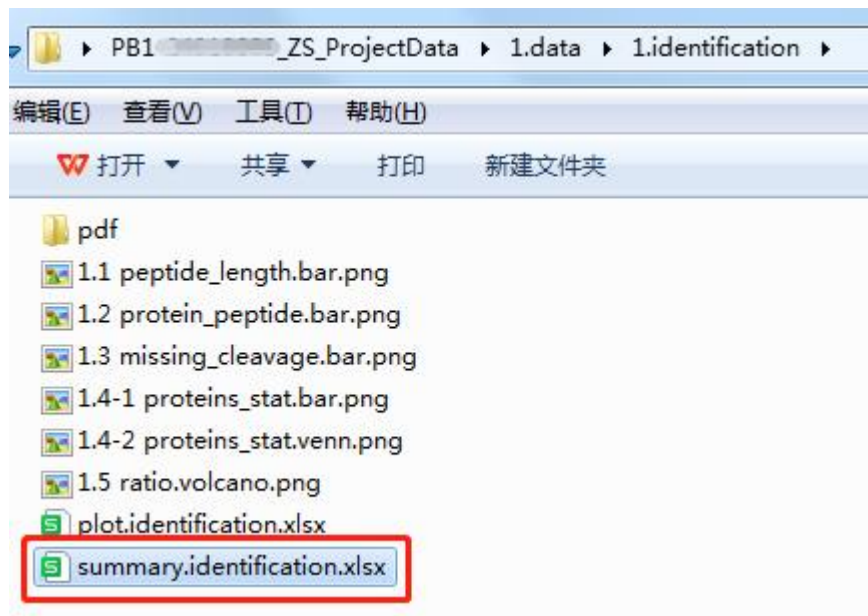


	A	B	C	D	E	F	
	Accession	Protein ID	Gene	Fasta description	Mw (kDa)	Length	Protein
3	P07814	SYEP_HUMAN	EPRS1	Bifunctional glutamyl-tRNA synthetase	170.591	1512	
4	P41252	SYIC_HUMAN	IARS1	Isoleucine--tRNA ligase	144.498	1262	
5	O95793	STAU1_HUMAN	STAU1	Double-stranded RNA-binding protein	63.182	577	Q9NUL3
6	P04843	RPN1_HUMAN	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide 4-epimerase	68.569	607	
7	Q12906	ILF3_HUMAN	ILF3	Interleukin enhancer factor 3	95.338	894	Q96SI9
8	Q86VP6	CAND1_HUMAN	CAND1	Cullin-associated NED5-like domain-containing protein 1	136.376	1230	
9	Q99623	PHB2_HUMAN	PHB2	Prohibitin-2 OS=Homo	33.296	299	
10	O75367	H2AY_HUMAN	MACROH2A1	Core histone macroH2A1	39.184	369	Q9POM6
11	P08238	HS90B_HUMAN	HSP90AA1	Heat shock protein 90 alpha class B member 1	83.264	724	P07900
12	P11388	TOP2A_HUMAN	TOP2A	DNA topoisomerase 2-alpha class A	174.385	1531	Q02880
13	P54652	HSP72_HUMAN	HSPA2	Heat shock-related 70 kDa protein	70.021	639	P11142
14	P55060	XPO2_HUMAN	CSE1L	Exportin-2 OS=Homo	110.417	971	

1、如图所示，我司质谱鉴定会将“对照组特有蛋白”、“实验组特有蛋白”、“共有蛋白”从data中挑出并单独制成表“蛋白分组及注释.xlsx”，包含蛋白功能注释、iBAQ等重点信息；

2、例图中“Unique.DZ”即对照组特有蛋白列表，“Unique.SY”即实验组特有蛋白列表，“common”即共有蛋白列表，实际sheet名称可能会根据项目不同有所变动。

质谱鉴定



表头信息如“Accession”等具体含义，总表中均有解释，文件路径如图所示，也可以百度一下，由于版面限制就不赘述了。



表单	条目	描述
help		各表单的表头解释
stat		本次项目的统计信息
	Sample	样品名
	Identified pr	鉴定到的蛋白数目
	Quantified p	定量到的蛋白数目
	Identified pe	鉴定到的肽段数目
	Quantified p	定量到的肽段数目
	Unique pept	“唯一匹配”的肽段数目
	Comparison	比较组编号
	Comparison	比较组名称
	Gx:Gy	分子组、分母组编号
	SampleX	分子组包含的样品
	SampleY	分母组包含的样品
	FC threshol	判定下调差异蛋白的比值边界
	FC threshol	判定上调差异蛋白的比值边界
	Log2 FC thr	下调边界对数转换后的值
	Log2 FC thr	上调边界对数转换后的值
	P value thre	比较组采用的T检验方式
	T test	比较组采用的T检验方式
	Down count	下调差异蛋白数目
	Up count	上调差异蛋白数目
	Total diff	所有差异蛋白数目
	No diff	非差异的蛋白数目
	NA	无法进行差异计算的蛋白数目
	Total	定量到的蛋白数目，等同于“Quantified proteins”
protein		蛋白结果
	Accession	蛋白条目的Uniprot数据库登记号
	Protein ID	蛋白条目的Uniprot数据库编号
	Gene	蛋白条目的基因名
	Fasta descr	蛋白序列数据库Fasta文件中对蛋白条目的描述信息

提供核酸和蛋白的整体研究方案

感谢聆听

提供核酸和蛋白的整体研究方案

