

免疫共沉淀技术的研究进展

Study Progress of Co-immunoprecipitation Technology

郭纯

(湖南省人民医院, 湖南 长沙 410005)

[摘要] 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation)技术是检测蛋白质间相互作用的经典方法,也是较常用的方法。文章对近10余年有关免疫共沉淀技术的原理和应用及其优缺点的分析进行文献综述。

[关键词] 免疫共沉淀;蛋白质;相互作用;技术

[Abstract] Co-immunoprecipitation technology is classical method to examine the interaction among proteins, also a common method. The paper made a literature review, which referred to the principle of co-immunoprecipitation technology and its merit or flaw.

[Key words] Co-immunoprecipitation; Protein; Interaction; Technology

[中图分类号] R392-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2007)12-0086-04

蛋白质间的相互作用控制着大量的细胞活动事件,如细胞的增殖、分化和死亡。通过蛋白质间相互作用,可改变细胞内蛋白质的动力学特征。如底物结合特性、催化活性;也可产生新的结合位点,改变蛋白质对底物的特异性;还可失活其它蛋白质,调控其它基因表达。因此,只有使蛋白质间相互作用顺利进行,细胞的正常生命活动过程才有保障。由于蛋白质间相互作用具有如此重大的意义,因此其检测方法的研究也备受重视。由生化方法,如蛋白质亲和层析(protein affinity chromatography)、亲和印迹(affinity blotting)、免疫沉淀(immunoprecipitation)及交联(cross-linking),发展到当今的分子生物学方法,如以基因文库为基础的蛋白探测(protein probing)、噬菌体显示(phage display)及双杂交系统(two-hybrid system)等。另外,还发展了可定性和定量检测蛋白质间相互作用的简便又快捷的方法,如表面等离子共振(surface plasmon resonance)等。通过这些方法的联合使用,实验得出的蛋白质间的相互作用的结论显得更为可靠^[1]。

1 免疫共沉淀基本原理

细胞裂解物中加入抗体,这样可与已知抗原形成特异的免疫复合物,若存在与已知抗原相互作用的蛋白质,则免疫复合物中还应包含这种蛋白质,经过洗脱,收集免疫复合物,然后分离该蛋白质,对该蛋白质进行N端氨基酸序列分析,推断出相应的核苷酸序列。将包含活性物质的组织或细胞构建成cDNA文库,以上述核苷酸序列为探针从cDNA文库中分离出cDNA克隆。

1.1 免疫共沉淀技术的主要步骤

1.1.1 用磷酸盐缓冲液洗30块10 cm培养板上的适宜细

胞。刮去每块板上的细胞到1 ml冰冷的EBC裂解缓冲液中。

1.1.2 将每毫升细胞悬液转移到微量离心管中,在微量离心机上4℃以最大速度离心15 min。

1.1.3 收集上清(约30 ml)并加入30 μg的适当抗体,4℃摇动免疫沉淀物1 h。

1.1.4 加入0.9 ml的蛋白质A-Sepharose悬液,4℃摇动免疫沉淀物30 min。

1.1.5 用含900 mmol/L NaCl的NETN洗蛋白A-Sepharose混合物,再重复洗5次。最后,用NETN洗1次。

1.1.6 吸出混合物的液体部分。加入800 μl的1×SDS胶加样缓冲液到球珠中,煮沸4 min。

1.1.7 将样品加入到大孔的不连续SDS-PAGE梯度胶中,在10 mA的恒定电流下电泳过夜。

1.1.8 通过考马斯蓝染色观察蛋白质泳带。

1.1.9 从胶上切下目标带,将其放到微量离心管中,用1 ml 50%乙腈洗两次,每次3 min。

1.1.10 用胰蛋白酶消化胶中的蛋白质,再将肽电洗脱。

1.1.11 通过窄孔高效液相色谱分离肽。将收集的肽在ABI 477A或494A机器上进行自动Edman降解测序。

2 免疫共沉淀技术的应用

2.1 肿瘤 鼻咽癌细胞中p53相结合蛋白质的分离与鉴定:免疫共沉淀与LC2ESI2MS/MS分析相结合的方法对HNE1细胞蛋白条带3鉴定的p53相互作用蛋白之一HSP78进行了验证。首次在鼻咽癌细胞中鉴定了9个p53结合蛋白,为阐明鼻咽癌中p53蛋白聚集及失活的机制提供了重要

依据和线索。方法:在含2 mg 细胞总蛋白的1 ml 抽提缓冲液中,加入1 μ l 正常免血清和30 μ l protein G-Sepharose 4B 珠子,4 $^{\circ}$ C、振荡2 h,9000 r/min 离心5 min 去除珠子以消除非特异结合蛋白,保留上清液。在上清液中加入5 μ l 兔抗人p53 抗体和30 μ l protein G-Sepharose 4B 珠子,4 $^{\circ}$ C、振荡过夜,9000 r/min 离心5 min 去上清液,保留珠子。TBST 缓冲液洗涤含免疫复合物的珠子4 次,每次5 min,离心收集珠子。以BSA 取代p53 抗体作为对照^[2]。人肝癌中热休克蛋白70(HSP70)与p53 的相互作用:用免疫组织化学染色法,从12 例肝癌组织中筛选HSP70 与p53 均呈阳性表达的标本,并以免疫共沉淀法提取之,然后用SDS-PAGE 及Western blot 分析双阳性标本中两种蛋白的存在形式。检测到12 例肝癌组织中有3 例为双阳性,用抗HSP70mAb 免疫共沉淀的样品,可检测到p53 蛋白。用抗p53mAb 免疫共沉淀的样品也可检测到HSP70 蛋白,证明人肝癌中p53 与HSP70 以复合物的形式而存在,此可为肝癌的发病机制及免疫治疗的研究提供新的思路^[3]。肿瘤的异质性(Heterogeneity)是指单克隆起源的肿瘤细胞在生长过程中其侵袭能力、生长速度、对激素的反应、对抗癌药物的敏感性等方面能形成不同表型亚克隆的特性^[4]。肿瘤异质性是肿瘤研究的一个重要方向,对解释肿瘤基础及临床研究中出现的诸多问题具有重要意义。

随着分子生物学技术的发展,对于肿瘤异质性的研究方法已从形态学深入到细胞生物学、分子遗传学、分子病理学等方面,但其分子水平的研究多处于基因水平,而对蛋白质方面的研究甚少。由于蛋白质是生命活动的执行者和体现者,细胞各种重要的生理过程都是以蛋白质间相互作用来实现的,因此通过研究蛋白质的相互作用来探讨肿瘤异质性,将更直接、全面揭示异质性的发生机理及调控过程。免疫共沉淀用于细胞异质性分析在操作上亦需注意以下几点:(1)细胞全蛋白的质量浓度要足够,至少要高于10 mg/ml,这样沉淀物洗脱液中的蛋白质才能达到足够的质量浓度以用于电泳。(2)SDS-PAGE 一定要尽量用大块的胶,因为只有经过足够长距离的电泳才能使样品各成分充分分开,以便于进一步分析、提取和测序。免疫共沉淀法用于细胞异质性的分析,操作简单,结果直接明了,自动化分析快速且排除人为影响因素,分离后胶上蛋白质能有效回收,有利于后续的测序等分析工作。因此借助于免疫共沉淀法来研究肿瘤异质性的分子机制无疑是一条很好的途径,随着这一研究方法的完善,它将在细胞异质性的研究中发挥重要作用^[5]。

2.2 酶与病毒 端粒酶(或端粒体酶)是一种能延长端粒末端的核糖蛋白酶,主要成分是RNA 和蛋白质,其含有引物特异识别位点,能以自身RNA 为模板,合成端粒DNA 并加到染色体末端,使端粒延长,从延长细胞的寿命甚至使其永生^[6]。根据目前的研究,端粒酶至少有3 个亚单位组成,

RNA 亚单位TR (telomerase RNA)、端粒酶催化亚单位TERT (telomerase reverse transcriptase)和TEP1 (telomerase-associated protein1)。人类TERT(hTERT)是由1132 个氨基酸残基组成的多肽,hTEP1 可与p123/Est2p 的同源蛋白hTERT 免疫共沉淀,并和端粒酶活性有关^[7-9]。应用免疫共沉淀技术,验证新基因AngReml04 和糖皮质激素受体特异延伸因子(GR-EF)蛋白在哺乳动物细胞中的相互作用,为进一步研究AngReml04 的生理功能奠定基础。AngReml04 是我们在血管紧张素II(AngII)刺激人肾小球系膜细胞(MSC)增生和硬化过程中获得的上调表达新基因,全长1690bp,蛋白相对分子质量为37000,是一个多组织广泛表达的基因,在肾小球系膜细胞和肾小管上皮细胞均有AngReml04mRNA 表达^[10]。CD81 全基因序列编码蛋白可与HBeAg 在酵母细胞中相互作用。采用体外免疫共沉淀试验测了HBeAg 与CD81 的相互作用,对深入了解CD81 分子的功能及其在HBeAg 所致肝细胞损伤的作用奠定了基础^[11]。戊型肝炎是由戊型肝炎病毒(HEV)感染引起的急性肝炎,症状与甲型肝炎相似,但病死率较高。Grp78 作为HSP70 热休克蛋白家族中的一员,主要参与蛋白质在内质网的加工、折叠,包括某些病毒在胞内的组装、成熟与转运。前期研究同时揭示p239 可以吸附、进入HepG2 细胞并有效阻断野生HEV 对HepG2 和原代培养肝细胞的感染^[12,13],证实了p239 含有和HEV 相同的细胞结合表位。吴小成等^[14]筛选了p239 在肝细胞中的结合蛋白,发现p239 与热休克蛋白家族蛋白Grp78/Bip(Grp78)有相互作用。

2.3 信号转导 Wnt 信号转导的经典通路,即:Wnt 配体与细胞表面的复合体LRP6/Frizzled 相互作用后,激活Dishevelled 蛋白进而使细胞质中 β -连环蛋白向细胞核聚集,从而激活下游基因的表达^[15]。正常的Wnt 信号传导通路在胚胎发育过程中极其重要,而Wnt 信号传导通路的异常活化则往往导致肿瘤的发生^[16]。通过免疫共沉淀证实了黑色素瘤相关抗原MAAT1p15 与LRP6 之间的相互作用,LRP6 为Wnt 受体的胞内区,MAAT1p15 对Wnt 信号通路传导有协同激活作用,提示MAAT1p15 可能参与了Wnt 信号通路对黑色素瘤的发生和转移过程的促进性调节^[17]。促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)在植物的胁迫反应应答方面占有重要地位。在确定MAPK 级联途径中有关激酶的种类时,特别是在与其余相似的激酶进行区分时,免疫沉淀法是一种微量、灵敏和特异性强的检测方法,得到了广泛的应用。MAPK 性抗体是通过识别双磷酸化的苏氨酸-谷氨酸-酪氨酸三肽模体pTepY 而发生免疫结合的。使用某种MAPK 的一段特异性序列制备的单一特异性抗血清(mono-specific antiserum)可以直接鉴定这种特定的MAPK^[18]。接头蛋白(adaptor or scaffold protein)是一类只有结合域(binding domain)而没有酶活性的蛋白质分子。在细

胞的信号转导过程中,接头蛋白通过其结合域将不同的信号转导分子连接起来,起着承上启下的作用,在信号转导级联反应中发挥了重要的作用。程小星等^[19]通过免疫共沉淀技术发现了 Bam32 与 Hic25 具有相互作用,证实可能在激活下游分子的信号转导级联反应以及调节细胞的黏附和运动等功能中发挥了重要的作用。

2.4 寄生虫 鼠弓形体表达两种不同增殖细胞核抗原,它们在速殖体增长过程中处于不同的亚细胞定位,鼠弓形体增殖细胞核抗原(TgPCNA)在细胞分裂周期中 TgPCNA1 集中在细胞核,然而 TgPCNA2 分布在 DNA 合成期(S期),在有丝分裂和 G1 期均匀分布在整个细胞。TgPCNA1 和 2 的相互影响可以通过免疫共沉淀技术来观察^[20]。Sean Dobson 等^[21]通过序列分析发现在恶性疟原虫丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 PP5(PfPP5)的 N-末端外部的催化核心有 4 个 tetratricopeptide repeats (TPRs),PfPP5 需要多不饱和脂肪酸磷酸酶的活化作用,免疫共沉淀证明了天然的 PfPP5 和恶性疟原虫的热休克蛋白 90(hsp90)之间的相互作用。PfPP5 几乎在整个恶性疟原虫的红内期表达,它对冈田酸中度敏感。这是寄生虫原虫顶复亚门 TPR-区域蛋白的第一个例子。TPR 区域在蛋白质-蛋白质的相互作用中有重要的地位,尤其与 PP5 磷酸酶的调节有关,PfPP5 在恶性疟原虫寄生生长与信号途径过程中起决定性作用。

3 免疫共沉淀技术的优点与不足

在体内蛋白质间相互作用的过程中,免疫沉淀现象是在不添加任何成分的细胞裂解物中发生的该方法有以下几个优点:(1)与蛋白质亲和层析一样,检测的产物是蛋白质的粗提物;(2)抗原与相互作用的蛋白以细胞中相类似的浓度存在,避免了过量表达所造成的人为效应;(3)蛋白质以翻译后被修饰的天然状态存在;(4)复合物以天然状态存在,蛋白的相互作用可以在天然状态下进行,可以避免人为影响,可以分离得到天然状态下相互作用的蛋白复合物^[22]。

但是,这种方法最主要的局限性是需要多克隆抗体或 mAb,因而对大规模筛选未知蛋白会遇到障碍。免疫共沉淀同样不能保证沉淀的蛋白复合物时候为直接相互作用的两种蛋白。用于免疫共沉淀的抗体不是总是与操作相合适,与 Western blotting 或者 ELISA 相比容易出现假阳性反应^[23]。另外灵敏度不如亲和色谱高。

4 展望

免疫共沉淀是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础的用于研究蛋白质相互作用的经典方法。多抗与抗原有较高的亲和性,多抗的多个结合位点可以有助于形成稳定的抗原抗体蛋白复合物,单抗的优点是特异性好,缺点是亲和力差,当亲和力小于一定程度时,单抗很难用于免疫共沉淀技术,并不是所有的单抗都适用于免疫共沉淀反应。免疫共沉淀技术是一个比较经典的探讨蛋白质间相互关系的技术,在

现代基础医学研究中应用广泛且可信度比较高。蛋白质间相互作用存在于机体每个细胞的生命活动过程中,生物学中的许多现象如复制、转录、翻译、剪切、分泌、细胞周期调控、信号转导和中间代谢等均受蛋白质间相互作用的调控。有些蛋白质由多个亚单位组成,它们之间的相互作用就显得更为普遍。有些蛋白质结合紧密。有些蛋白质只有短暂的相互作用。然而不论哪种情况,它们均控制着大量的细胞活动事件,如细胞的增殖、分化和死亡。通过蛋白质间相互作用,可改变细胞内蛋白质的动力学特征。如底物结合特性、催化活性;也可产生新的结合位点,改变蛋白质对底物的特异性;还可失活其它蛋白质,调控其它基因表达。因此,只有使蛋白质间相互作用顺利进行,细胞的正常生命活动过程才有保障。由于蛋白质间相互作用具有如此重大的意义,因此其检测方法的研究也备受重视。蛋白质相互关系的研究以后会愈演愈烈,我们不仅仅可以通过免疫共沉淀技术来证实,还有很多越来越多的先进技术值得我们去运用和发展。

参考文献:

- [1] 黄翠芬,叶棋浓. 蛋白质间相互作用技术的研究近况[J]. 中国生物化学与分子生物学报,1998,14(1)
- [2] 胡巍,肖志强,陈主初,等. 鼻咽癌细胞中 p53 相互作用蛋白质的分离和鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展,2004,31(7):628-633
- [3] 崔崇伟,杨守京,刘雁平,等. 人肝癌组织中 p53 与 HSP70 相互作用的初步研究[J]. Chin J Cell Mol Immunol,2003,19(2):195-199
- [4] Heppner GH. Tumor heterogeneity[J]. Cancer Res,1984,44(6):2259-2269
- [5] 于莉娜,钟雪云,陈运贤,等. 免疫共沉淀法用于肿瘤异质性研究的可行性分析[J]. 免疫学杂志,2004,20(1):58-64
- [6] Hammond PW, Cech TR, Hammond PW, Cech TR. Eukaryotes telomerase: evidence for limited base-pairing during primer elongation and dGTP as an effector of translocation[J]. Biochemistry,1998(37):5162-517
- [7] Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I, Robinson MO. A mammalian telomerase-associated protein[J]. Science 1997,275:973-977
- [8] Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung DS, Mar V, Bass MB, Robinson MO. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits[J]. Genes Dev 1997(11):3109-3115
- [9] Li H, Zhao L, Yang Z, Funder JW, Liu JP. Telomerase is controlled by protein kinase Cα in human breast cancer cells[J]. J Biol Chem,1998(273):33436-33442

- [10] 张艳玲, 张宏, 侯平, 等. 新基因 AngRem104 与糖皮质激素受体特异延伸因子的相互作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2004, 20(4): 246-249
- [11] 李伯安, 刘岩, 李靖, 等. HBeAg 与 CD81 分子结合的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(6): 686-688
- [12] 何水珍, 郑子峥, 吴婷, 等. 戊型肝炎病毒细胞吸附模型的建立及病毒吸附区域初步研究[J]. 病毒学报, 2006(22): 426-430
- [13] 吴小成, 何水珍, 郑子峥, 等. HepG2 细胞中与戊型肝炎病毒衣壳蛋白相互作用蛋白的初步研究[J]. 病毒学报, 2006(22): 329-333
- [14] 吴小成, 苗季, 郑子峥, 等. Grp78/Bip 介导戊型肝炎病毒衣壳蛋白对宿主细胞的吸附[J]. 微生物与感染, 2007, 2(2): 83-87
- [15] Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis - a look outside the nucleus[J]. Science, 2000, 287(5458): 1606-1609
- [16] Polakis P. Wnt signaling and cancer[J]. Genes Dev, 2000, 14(15): 1837-1851
- [17] 韩亮, 张新军, 黄世思, 等. 黑色素瘤相关抗原 MAAT1p15 与 LRP6 的相互作用及其对 Wnt 信号通路的调控[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(6): 827-832
- [18] Lee J, Klessig D, Nfirnerger T. A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity[J]. The Plant Cell, 2001(13): 1079-1093
- [19] 程小星, 邓少丽, 蹇锐, 等. B 淋巴细胞信号转导相关接头蛋白 Bam32 与 Hic25 的相互作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(6): 796-800
- [20] Michael N. Guerini, Michael S. et al, Biochemical and genetic analysis of the distinct proliferating cell nuclear antigens of Toxoplasma gondii[J]. Molecular & Biochemical Parasitology, 2005(142): 56-65
- [21] Sean Dobson, Bratati Kar, Rajinder Kumar, et al, A novel tetratricopeptide repeat (TPR) containing PP5 serine/threonine protein phosphatase in the malaria parasite, Plasmodium falciparum[J]. BMC Microbiology, 2001(1): 31
- [22] Golemis EA, Brent R, Fused motifs inhibit DNA binding by LexA derivatives[J]. Mol Cell Biol, 1992(12): 3006-3014
- [23] Maria Monti, Stefania Orru, Daniela Pagnozzi, et al, Interaction Proteomic[J]. Bioscience Reports, 2005(25): 45-56

(收稿日期: 2007-12-07 编辑: 湘泉)

(上接第 80 页)

- [3] 蔡春江, 裴林, 李佃贵. 伏邪理论在慢性乙型肝炎治疗中的应用[J]. 浙江中医杂志, 2002, 37(2): 51-52
- [4] 陈华东, 何洁, 张玉亮. 百瘀汤治疗慢性乙型肝炎 43 例[J]. 安徽中医学院学报, 2002, 21(6): 17-19
- [5] 黄贤樟. 乙型肝炎的中医证治规律探讨[J]. 新中医, 2001, 33(1): 8-9
- [6] 叶丽红. 浅谈慢性乙型肝炎的中医辨证治疗[J]. 辽宁中医杂志, 2002, 11(11): 661
- [7] 田旭东, 卢雨蓓. 廖志峰主任医师辨证治疗 2 型病毒性肝炎经验点滴[J]. 甘肃中医, 2005, 18(2): 12
- [8] 汪静, 杨华秀, 谢朝良, 等. 辨舌分型治疗无临床症状慢性乙型肝炎 42 例[J]. 泸州医学院学报, 2003, 26(1): 25
- [9] 王陆军. 辨证分型治疗慢性乙型肝炎 286 例[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版) 2001, 17(6): 394-395
- [10] 宋跃龙. 自拟柴杞降酶汤治疗慢性乙肝 53 例[J]. 中医药临床杂志, 2004, 16(2): 125
- [11] 王匡君. 王朝安“乙肝克”治疗慢性乙型肝炎的临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2000, 34(6): 18-19
- [12] 范锡伟. 苦参素治疗慢性乙肝临床观察[J]. 山东医药, 2005, 45(25): 72-73
- [13] 马秀丽, 刘耀明, 刘霞. 丹参在慢性肝炎治疗及复发预防中的作用探讨[J]. 临床医学, 2000, 20(5): 42-43
- [14] 王立文, 肖杰. 中西医结合治疗慢性乙型肝炎 50 例疗效观察[J]. 四川医学, 2005, 26(3): 329
- [15] 李广. 中西医结合治疗慢性乙型肝炎 68 例疗效观察[J]. 四川中医, 2003, 21(1): 32-33
- [16] 刘文涛, 陈海燕. 针灸联合中药复方治疗慢性乙型肝炎临床观察[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1532-1533
- [17] 张爱玲. 穴位注射治疗慢性乙型肝炎疗效分析[J]. 中国针灸, 2005, 25(1): 25-26
- [18] 吴忠珍. 乙肝贴外用治疗慢性乙型肝炎 272 例临床观察[J]. 现代医药卫生, 2004, 20(11): 1021-1022
- [19] 陈瑞春. 肝病治疗的误区[J]. 中医杂志, 2001, 42(8): 507-508
- [20] 蒋森. 以正邪理论指导辨证治疗乙型肝炎 ALT 升高[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(1): 6-7
- [21] 魏睦新. 肝病防治领域里中西医结合的误区[J]. 中西医结合肝病杂志, 2001, 11(3): 187

(收稿日期: 2007-06-17 编辑: 李海洋)