

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710118027.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/539 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月16日

[11] 公开号 CN 101105493A

[22] 申请日 2007.6.27

[21] 申请号 200710118027.0

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院放射  
与辐射医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路27号军医  
科院放射与辐射医学研究所

[72] 发明人 刘琼明 林 从 何 为 许丹科

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 鲁 兵

权利要求书2页 说明书11页 附图3页

## [54] 发明名称

基于蛋白芯片的免疫共沉淀检测蛋白相互作用的方法以及一种蛋白相互作用检测试剂盒

## [57] 摘要

蛋白质—蛋白质相互作用 (protein - protein interaction, PPI) 对于所有生物学过程都至关重要, 因此, 蛋白质相互作用研究一直是细胞生物学与分子生物学领域的一大研究热点。免疫共沉淀 (co - immunoprecipitation, CoIP) 是以抗体和抗原之间的特异性作用为基础的用于研究蛋白质相互作用的经典方法, 是发现和验证 PPI 最常用、最有效的方法。传统的基于树脂的 CoIP 步骤复杂、费时费力, 难以实现 PPI 的通量化检测。本发明的核心是: 利用重组蛋白的表位标签, 在固定了抗标签抗体的玻璃醛基片上进行 CoIP, 再通过荧光标记的抗体进行相互作用的检测。该方法大大简化了传统 CoIP 的操作步骤, 同时检测样品的通量化大大提高, 是一个简便、快速、高通量研究 PPI 的新型技术平台。

1、一种基于蛋白芯片的免疫共沉淀检测蛋白相互作用的方法，其特征在于，制备一 Flag 抗体芯片，然后将含有 Flag-诱饵融合蛋白和 Myc-猎物融合蛋白的细胞裂解液加入到芯片表面进行免疫共沉淀反应，经荧光标记 c-Myc 抗体检测诱饵蛋白和猎物蛋白是否具有相互作用。

2、根据权利要求 1 所述方法，其特征在于，采用以下步骤：

步骤一：制备 Flag 抗体芯片，将醛基玻片分成多个芯片框，将 anti-flag M2 单抗及作为抗体对照的鼠 IgG 喷点到各芯片框内，保存备用；

步骤二：构建诱饵和猎物表达载体，将诱饵的编码基因构建到 flag 标签载体上，将猎物的编码基因构建到 Myc 标签载体上，分别形成诱饵融合蛋白和猎物融合蛋白；

步骤三：细胞转染及制备裂解液，将诱饵和猎物真核表达载体共转染到细胞中，收集细胞并充分裂解，将实验品细胞裂解液上清收集待用；同样制备阴性对照品细胞裂解液收集待用；

步骤四：检测蛋白相互作用，将实验品细胞裂解液和对照品细胞裂解液分别加入处理后的芯片中不同芯片框内，免疫共沉淀反应一定时间后，洗涤；在每一芯片框内再加入 anti-c-Myc-Cy3，反应一段时间后洗涤，干燥后用荧光芯片扫描仪扫描；

步骤五：将荧光芯片扫描仪中获取的信号及数据输出，比较实验品和对照品的荧光信号，实验品信号强度强于对照品的，说明诱饵与猎物蛋白之间有相互作用，反之，没有信号或信号微弱的说明诱饵与猎物蛋白之间没有相互作用。

3、根据权利要求 2 所述方法，其特征在于，所述步骤一中 Flag 抗体芯片用贴膜分为  $3 \times 6$  个芯片框，每个芯片框内平行点入 anti-flag M2 单抗及作为抗体对照的小鼠 IgG，anti-flag M2 单抗和小鼠 IgG 各点 3 个重复点。

4、根据权利要求 2 或 3 所述方法，其特征在于，所述步骤四中，

芯片处理是指用封闭液封闭芯片，室温孵育，然后用 TBST 重复洗涤；

将实验品细胞裂解液和对照品细胞裂解液加入芯片框中的量为 20  $\mu$  l/框；

所述免疫共沉淀反应指在室温保湿条件下反应 2 小时；

所述洗涤指用 TBST 洗涤 15 分钟，重复 3 次；

所述加入 anti-Myc-Cy3 单抗的浓度为 1:200，加入量为 20  $\mu$  l/芯片框，反应在室温避光保湿条件下反应 1 小时。

5、一种蛋白相互作用检测试剂盒，其特征在于，包括一具有多个分区的醛基玻片，权利要求 1 至 4 任一所述方法中所述的 FLAG 和 c-Myc 标签载体和其对应的单抗，以及基于权利要求 1 至 4 任一所述方法的使用说明书。

6、根据权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于，所述醛基玻片分为 3 $\times$ 6 个分区。

7、根据权利要求 5 或 6 所述的试剂盒，其特征在于，所述醛基玻片型号为 CSS-100，所述 FLAG 标签载体为 SIGMA 公司的 pFLAG-CMV-2，所述 c-Myc 标签载体为 (CLONTECH 公司的 pCMV-Myc，所述 FLAG 单抗为 SIGMA 公司的 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 单克隆抗体，所述 c-Myc 单抗为 SIGMA 公司的单克隆 ANTI-c-MYC Cy3 CONJUGATE CLONE 9E10。

## 基于蛋白芯片的免疫共沉淀检测蛋白相互作用的方法

### 以及一种蛋白相互作用检测试剂盒

#### 技术领域：

本发明涉及生物领域，具体涉及一种对蛋白相互作用的检测方法。

#### 背景技术：

免疫沉淀 (immunoprecipitation, IP) 是利用抗原和抗体的特异性结合 (例如细菌蛋白质 “蛋白 A” 和免疫球蛋白 FC 片段的特异性地结合) 开发出来的方法。例如，用蛋白 X 的抗体 A 免疫沉淀 X，那么与 X 在体内结合的蛋白 Y 可能也被沉淀下来。基于与蛋白 X 的生理性相互作用，蛋白 Y 的免疫沉淀就叫免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP)。

免疫共沉淀是发现或验证两种蛋白质间生理性相互作用的最有效、最常用的方法。它的具体操作是在保持蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 的条件下收获和裂解细胞，从细胞提取液中免疫沉淀目的蛋白，然后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离免疫沉淀物。目前多用纯化的蛋白 A 预先结合固定在琼脂糖 (agarose) 磁珠 (beads) 上，使之与抗原、抗体反应后的细胞裂解液作用，磁珠 (beads) 上的蛋白 (protein) A 就能吸附细胞裂解液中的抗原，从而达到沉淀靶标蛋白 (抗原) 和与其相互作用的蛋白的目的。再进一步通过 SDS-PAGE 分离、免疫印迹 (Western blot) 检测相互作用蛋白。

传统的 co-IP 作为检测和鉴定 PPI 最经典和有效的方法，在功能基因组研究中发挥了巨大的作用，然而这种方法本身也存在着一些明显的不足：如操作过程复杂烦琐，费时费力，常需要培养大量细胞。并且，通过 SDS-PAGE 分离免疫沉淀物、Western blot 检测相互作用进一步延长了实验过程，极大程度上限制了检测的效率，因而不符合高通量检测的要求。

另一方面，在当今蛋白质组时代，相关研究的逐步深入，需要大量数据信息作为分析研究蛋白质的基础。传统的 co-IP 检测鉴定方法不能满足其需要。蛋

蛋白质芯片 (protein array) 是近年来兴起的一种有效的高通量研究方法。它与基因芯片相似, 是将蛋白质固定到固相载体上, 然后与需检测的组织或细胞等进行特异性地相互识别, 再通过自动化仪器分析得出结果。与传统的研究方法相比, 蛋白质芯片的优点是小型化和高通量化, 能够一次平行分析成千上万的蛋白样品, 具有很高的灵敏度和准确性。然而, 现有蛋白芯片, 如美国 BD Clontech 公司推出的抗体芯片, 是在芯片上排列了 378 种已知蛋白的单抗 (Ab Microarray 380, 目录号 K1847-1), 通过免疫反应, 在实验中筛选出与其中一种或几种单抗相关联的蛋白。这种芯片, 只通过免疫反应检测单抗与蛋白之间的反应, 因而需要点入多种单抗。其主要缺点是必须获得各种蛋白的抗体, 而目前可获得的抗体非常有限, 难以满足当今蛋白质组学研究的的要求。而本发明利用融合蛋白的表位标签, 使用通用抗体制备抗体芯片, 在芯片上进行任意两种蛋白相互作用的检测, 克服了抗体芯片制备中抗体难获得的瓶颈问题。

#### 发明内容:

本发明的目的在于将免疫共沉淀反应与蛋白芯片结合应用, 利用芯片技术建立一种简捷实用、快速灵敏的高通量分析蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 的方法。

本发明提供一种基于蛋白芯片的免疫共沉淀检测蛋白相互作用的方法, 其中, 制备一 Flag 抗体芯片, 然后将含有 Flag-诱饵融合蛋白和 Myc-猎物融合蛋白的细胞裂解液加入到芯片表面进行免疫共沉淀反应, 经荧光标记 c-Myc 抗体检测诱饵蛋白和猎物蛋白是否具有相互作用。

本发明提供的基于蛋白芯片的免疫共沉淀检测蛋白相互作用的方法, 采用以下步骤:

步骤一: 制备 Flag 抗体芯片, 将醛基玻片分成多个芯片框, 将 anti-flag M2 单抗及作为抗体对照的鼠 IgG 喷点到各芯片框内, 保存备用;

步骤二: 构建诱饵和猎物表达载体, 将诱饵的编码基因构建到 flag 标签载体上, 将猎物的编码基因构建到 Myc 标签载体上, 分别形成诱饵融合蛋白和猎物融合蛋白;

步骤三: 细胞转染及制备裂解液, 将诱饵和猎物真核表达载体共转染到细胞中, 收集细胞并充分裂解, 将实验品细胞裂解液上清收集待用; 同样制备阴性对照品细胞裂解液收集待用;

步骤四：检测蛋白相互作用，将实验品细胞裂解液和对照品细胞裂解液分别加入处理后的芯片中不同芯片框内，免疫共沉淀反应一定时间后，洗涤；在每一芯片框内再加入 anti-c-Myc-Cy3，反应一段时间后洗涤，干燥后用荧光芯片扫描仪扫描；

步骤五：将荧光芯片扫描仪中获取的信号及数据输出，比较实验品和对照品的荧光信号，实验品信号强度强于对照品的，说明诱饵与猎物蛋白之间有相互作用，反之，没有信号或信号微弱的说明诱饵与猎物蛋白之间没有相互作用。

本发明提供的基于蛋白芯片的免疫共沉淀检测蛋白相互作用的方法，步骤一中Flag抗体芯片用贴膜分为3×6个芯片框，每个芯片框内平行点入anti-flag M2单抗及作为抗体对照的小鼠IgG，anti-flag M2单抗和小鼠IgG各点3个重复点。

本发明提供的基于蛋白芯片的免疫共沉淀检测蛋白相互作用的方法，步骤四中：

芯片处理是指用封闭液封闭芯片，室温孵育，然后用TBST重复洗涤；

将实验品细胞裂解液和对照品细胞裂解液加入芯片框中的量为20 μl/框；

所述免疫共沉淀反应指在室温保湿条件下反应2小时；

所述洗涤指用TBST洗涤15分钟，重复3次；

所述加入anti-Myc-Cy3单抗的浓度为1:200，加入量为20 μl/芯片框，反应在室温避光保湿条件下反应1小时。

本发明还提供一种蛋白相互作用检测试剂盒，包括一具有多个分区的醛基玻片，上述方法中的FLAG和c-Myc标签载体和其对应的单抗，以及基于上述方法的使用说明书。

本发明提供的试剂盒中醛基玻片分为3×6个分区。

本发明提供的试剂盒中，醛基玻片型号为CSS-100，FLAG标签载体为SIGMA公司的pFLAG-CMV-2，c-Myc标签载体为(CLONTECH公司的pCMV-Myc，FLAG单抗为SIGMA公司的ANTI-FLAG®M2单克隆抗体，c-Myc单抗为SIGMA公司的单克隆ANTI-c-MYC Cy3 CONJUGATE CLONE 9E10。

采用以上技术方案，本发明利用重组蛋白的表位标签，将抗标签的通用抗体固定在醛基玻片上，使其捕获细胞裂解液中的靶标蛋白，在保持蛋白-蛋白相

互作用的条件下，通过荧光标记的抗体检测免疫共沉淀的蛋白，最后通过荧光芯片扫描仪获得蛋白-蛋白相互作用的信号。其最大的特点是小型化和高通量化，能够一次平行分析大量样品，具有很高的敏感度与准确性，并且操作简化，可特异性高效检测细胞裂解液中蛋白与蛋白之间的相互作用。与现有的抗体芯片相比，它不需要制备或购买各种蛋白的特异性抗体，而只需要两种通用的抗标签抗体就能进行任意两种蛋白间相互作用的检测，克服了抗体芯片制备中抗体难获得的瓶颈问题。另一方面，与其他用于蛋白相互作用检测的蛋白芯片相比，它不需要进行各种蛋白的表达纯化，而直接利用诱饵和猎物共转染的细胞裂解液进行相互作用检测，克服了蛋白芯片制备中蛋白来源难的瓶颈问题，既省时省力，又大大节约研究成本。

#### 附图说明：

图 1为本发明方法实验流程示意图。

图 2为本发明芯片免疫共沉淀及相互作用检测示意图。

图 3为本发明中 pCMV-myc-p65 和 pFlag-p50 重组子的双酶切电泳鉴定图，其中，各泳道表示：1.pCMV-myc-p65（未酶切）；2. pCMV-myc-p65（xhoI 和 NotI 酶切）；3.pFlag-p50（未酶切）；4. pFlag-p50（EcoRI 和 SalI 酶切）

图 4 为本发明免疫共沉淀芯片检测 p65-p50 相互作用荧光信号图片。

图 5为本发明免疫共沉淀芯片验证6对蛋白潜在相互作用的荧光信号图片。

图 6-1和图6-2为本发明免疫共沉淀芯片验证6对蛋白潜在相互作用的荧光强度及其比值图。图6-1为样品的相互作用的荧光强度：1, 2: FN1及其阴性对照；3, 4: Myo18A及其阴性对照；5, 6: ATF5及其阴性对照；7, 8: HLA-B及其阴性对照；9, 10: ATF4及其阴性对照；11, 12: MCM3AP及其阴性对照。图6-2为样品的相互作用荧光强度比值：1: FN1/阴性对照；2: Myo18A/阴性对照；3: ATF5/阴性对照；4: HLA-B/阴性对照；5: ATF4/阴性对照；6: MCM3AP/阴性对照。

图 7 是传统免疫共沉淀验证 5 对蛋白潜在相互作用的免疫印迹图。

#### 具体实施方式：

以下以具体实施例详细描述本发明。

本发明所用到的试剂包括：

抗体：单克隆抗 FLAG 抗体 (Monoclonal anti-FLAG<sup>®</sup> M2 antibody, Sigma)；  
Cy3 标记单克隆抗 c-Myc 抗体 (Monoclonal anti-c-Myc-Cy3 antibody, Sigma)；  
小鼠 IgG (中山金桥生物公司)。

脂质体：脂质体 2000 (Lipofectamine<sup>™</sup>2000 reagent, Invitrogen)。

醛基玻片：CSS-100 醛基玻片 (Aldehyde CSS-100 Silylated Slides, CEL Associates, Inc.)

蛋白酶抑制剂：无 EDTA 型完全蛋白酶抑制剂药片 (complete mini, EDTA free, protease inhibitor cocktail tablets, Roche)

其他各种分子生物学常用试剂均为市售进口试剂。

试剂配制：

EBC 裂解缓冲液：	Tris-Cl	50 mmol/L, pH8.0
	NaCl	120 mmol/L
	NP-40	0.5%(V/V)
	EDTA	1mmol/L
	用前补加 50 μg/ml PMSF, 蛋白酶抑制剂	
TBS:	Tris-Cl	20 mmol/L, pH8.0
	NaCl	150 mmol/L
TBST:	含 0.05% (V/V) 吐温 20 的 TBS	
封闭液:	10mg/ml BSA (牛血清白蛋白), 溶于 TBST 中。	

本发明检测诱饵和猎物蛋白之间的相互作用，可采用以下操作，参见图 1 所示流程以及图 2 所示原理：

Flag 抗体芯片的制备：在醛基玻片上贴上贴膜，使其分区形成 3×6 个用于区分样品的芯片框。将 anti-flag M2 单抗和小鼠 IgG (作为对照抗体) 喷点到醛基玻璃片各分区框内，每个反应框内平行点 3 个含 anti-flag M2 单抗的点和对应数量的含小鼠 IgG 的点。4℃ 保存备用。

本发明实施例采用 M2 单抗，由于 M2 单抗是鼠源 IgG，因此采用小鼠 IgG 作

为抗体对照。本发明不限于采用 M2 单抗，也可以选用其他型号的单抗。

诱饵和猎物表达载体的构建：将诱饵的编码基因构建到 flag 标签载体上，将猎物的编码基因构建到 Myc 标签载体上，分别形成 flag-诱饵融合蛋白和 Myc-猎物融合蛋白。

细胞转染及裂解液的制备：选择培养细胞，当细胞培养到 80% 密度时，以脂质体将诱饵和猎物真核表达载体共转染，收集细胞并充分裂解，将实验品细胞裂解液上清收集待用。用同样方法制备得到对照品细胞裂解液。

芯片 CoIP 及相互作用的检测：封闭液封闭芯片，洗涤后在其中之一芯片框内加入实验品细胞裂解液，同时在另一芯片框内加入对照品细胞裂解液作为阴性对照，反应一定时间后，洗涤；在每一芯片框内再加入荧光标记的另一单抗 (anti-c-Myc-Cy3)，反应一段时间后洗涤，将芯片上的贴膜取下，待玻片干燥后放入荧光芯片扫描仪中获得信号并读取数据，有荧光信号的，说明两蛋白之间有相互作用，没有信号或信号微弱的说明没有相互作用。

### 实施例 1：核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的 p65 和 p50 亚基相互作用的免疫共沉淀芯片分析

NF- $\kappa$  B 的 p65 和 p50 亚基在生理条件下，以异二聚体的形式存在，因此，以 p65 和 p50 的相互作用为阳性设计本实施例。

一、Flag 抗体芯片的制备：在醛基玻片上贴上贴膜，使其分区形成 3×6 个芯片框。用微阵列点样器 (microarrayer, CAPITALBIO 博奥, 晶芯 SmartArrayer-48) 将 anti-flag M2 单抗和小鼠 IgG (作为对照抗体) 喷点到醛基玻璃片各分区框内，每个反应框内点 3 个含 anti-flag M2 单抗的点和 3 个含小鼠 IgG 的点。4 °C 保存备用。

二、诱饵和猎物表达载体的构建和鉴定：将 p65 (NM\_021975) 和 p50 (NM\_003998) 分别构建到 pCMV-Myc 和 pCMV-Flag-2 载体上，获得 pCMV-myc-p65 和 pFLAG-p50 表达载体。

构建过程具体操作：

a) 设计 p65 和 p50 特异性引物，由赛百盛公司合成：

引物名称	引物序列	限制性内切酶
------	------	--------

p50-up	5' -CCGCGAATTCAATGGCAGAAGATGATCC-3' (序列 1)	EcoRI
p50-down	5' -CAGAGTCGACCTAAGTGTCCATGGTTCC-3' (序列 2)	SalI
p65-up	5' -ATCTCTCGAGGTATGGACGAACTGTTCCCC-3' (序列 3)	XhoI
p65-down	5' -CAATGCGGCCGCTTAGGAGCTGATCTGACTC-3' (序列 4)	NotI

b) 以肝脏 cDNA 文库 (Invitrogen) 为模板, PCR 扩增 p65 和 p50 基因:

PCR 体系为: 10×Buffer 5μl, dNTP Mixture (2.5mM) 4μl, 合成引物

(10μM) p50-up、p50-down 各 1μl, Pyrobest Taq (5U/μl) 0.5μl, cDNA 文库 1 μ l, 加去离子水至 50μl。PCR 反应条件为: 94℃预变性 2min; 94℃变性 1min, 55℃退火 1min、72℃延伸 2min, 扩增 35 个循环; 72℃继续延伸 7min。

c) PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下切下目的条带 (p65 大小为 1656bp, p50 大小为 1314bp), 使用凝胶回收试剂盒 (Promega) 并按照其说明书所述方法回收目的基因。

d) 目的基因及相应载体进行限制性酶切:p50 和 pFLAG-CMV-2 用 EcoRI&SalI 进行双酶切, p65 和 pCMV-Myc 用 XhoI&NotI 进行双酶切, 反应体系如下:

10×H buffer	5 μ l
PCR 纯化产物 P50 (或 P65)	20 μ l
EcoRI (或 XhoI)	2.5 μ l
SalI (或 NotI)	2.5 μ l

加无菌水至 50 μ l, 37℃水浴酶切 4h。

e) 酶切产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 使用凝胶回收试剂盒 (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) 并按照其说明书所述方法回收酶切片段, 切下目的基因 (P50 或 P65) 和载体酶切片段 (pFLAG-CMV-2 或 pCMV-Myc)。

f) 用 T4 连接酶连接, 连接体系如下:

10×Buffer	2 μ l
目的基因	10 μ l
载体酶切片段	1 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l

加去离子水至 20 μ l, 室温连接 2 小时或 4℃连接过夜。

g) 连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞: 将 20 μ l 连接产物加入 100 μ l 大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 轻轻旋转混匀; 冰水浴 30 分钟; 42℃热休克 90 秒; 冰上放置 2 分钟; 加入 500 μ l LB 培养液, 37℃摇床(150 rpm) 培养 45 分钟; 将培养液涂于加有氨苄的 LB 固体培养基平板上; 超净工作台中吹干后, 37℃培养箱倒置培养过夜。

采用以下步骤对 pCMV-Myc-p65 和 pFLAG-p50 载体进行鉴定:

h) 从平板上挑取单克隆菌落到一加有 3~5ml 含氨苄的 LB 液体培养基的无菌玻璃试管中, 37℃摇床(200 rpm) 过夜。

i) 使用小量质粒 DNA 提取试剂盒 (Wizard® Plus SV Minipreps, Promega) 并按照其说明书所述方法提质粒。

j) 质粒进行双酶切鉴定重组子: pFLAG-p50 用 EcoRI&SalI 进行双酶切, pCMV-Myc-p65 用 XhoI&NotI 进行双酶切, 反应体系如下:

10×H buffer	2 μ l
含有重组子 pFLAG-p50 (或 pCMV-Myc-p65) 的质粒 DN	5 μ l
EcoRI (或 XhoI)	1 μ l
SalI (或 NotI)	1 μ l

加无菌水至 20 μ l, 37℃水浴酶切 4h。

k) 酶切产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 如果电泳结果显示大小与预期相一致的两条带, 则表明该质粒为重组子。结果如图 3 所示: 其中 2, 4 分别为 pCMV-myc-p65 和 pFlag-p50 的重组子。

l) 选择重组子进行测序确认。

### 三、细胞转染及裂解液的制备：

#### 1、pCMV-myc-p65 和 pFLAG-p50 共转染细胞裂解液（实验品）的制备

用含 10% FBS（胎牛血清）（杭州四季青生物工程材料有限公司）的 DMEM 高糖培养液（北京天润善达生物技术有限公司），在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 培养箱内培养接种于 24 孔细胞培养板上的 HEK-293 细胞（人胚肾细胞，中国协和医科大学基础医学研究所细胞中心），显微镜下观察细胞，当细胞长到约 80% 密度时，以脂质体 2000 将 pCMV-myc-p65 和 pFLAG-p50 共转染细胞：在一个 0.5ml 无菌 EP 管中同时加入 300ng pCMV-myc-p65、300ng pFLAG-p50 和 50 μl 无血清的 DMEM 培养基，混匀；在另一个 0.5ml 无菌 EP 管中同时加入 2 μl 脂质体 2000 和 50 μl 无血清的 DMEM 培养基，混匀；室温孵育 5 分钟后，将两者混合到一起，混匀后室温孵育 20 分钟；将上述混合物加入 24 孔细胞培养板的各孔细胞中；将细胞放回含 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 培养箱内培养。

转染 24-36 小时后收集细胞：将细胞培养液吸走，然后用预冷到 4℃ 的 PBS（磷酸盐缓冲液，137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4）清洗细胞，之后向 24 孔细胞培养板的各孔中加入 EBC 裂解缓冲液（50 μl/孔），室温放置 15 分钟进行充分裂解。将 24 孔细胞培养板各孔中的细胞裂解液回收到 EP 管中，4℃，12000rpm 离心 10 分钟，收集细胞裂解液上清放入另一干净的 EP 管中，作为实验品备用。

#### 2、pCMV-myc-p65 和 pFLAG-CMV-2 共转染细胞裂解液（对照品一）的制备

用和 1 相同的操作制备对照品一，其中以脂质体 2000 将 pCMV-myc-p65 和 pFLAG-CMV-2 共转染，作为验证免疫沉淀特异性的阴性对照（flag-p50 缺失）。

#### 3、pCMV-Myc 和 pFLAG-p50 共转染裂解液（对照品二）的制备

用和 1 相同的操作制备对照品二，其中以脂质体 2000 将 pCMV-Myc 和 pFLAG-p50 共转染，作为验证检测抗体（即 Cy3 标记的 c-myc 抗体）特异性的阴性对照（myc-p65 缺失）。

### 四、芯片 CoIP 及相互作用的检测：

用封闭液（20 μl/框）封闭芯片，室温孵育 45 分钟；TBST 洗涤 5 分钟，重复 3 次；在第一芯片框内加入实验品细胞裂解液（20 μl/框），在第二芯片框内

加入对照品一细胞裂解液 (20  $\mu$  l/框), 在第三芯片框内加入对照品二细胞裂解液 (20  $\mu$  l/框); 室温保湿反应 2 小时; TBST 洗涤 15 分钟, 重复 3 次; 加入 anti-Myc-Cy3 单抗 (1:200<抗体:封闭液>, 20  $\mu$  l/芯片框), 室温避光保湿反应 1 小时; TBST 洗涤 15 分钟, 重复 3 次; 将芯片上的贴膜取下, 待玻片干燥后放入荧光芯片扫描仪 (LuxScan-10K/A, CapitalBio) 中获得信号并读取数据。

#### 五、检测结果:

图 4 显示了检测相互作用的荧光信号。从结果可以看出: 固定在芯片上的 anti-flag 单抗能免疫沉淀下 flag-p50, 而 myc-p65 因与 p50 的相互作用而被免疫共沉淀下来, 所以可以检测到较强信号 (参看图 4 中 flag 行 A 列)。作为抗体对照的小鼠 IgG 几乎没有信号 (参看图 4 中 IgG 行), 同时作为样品对照的 pCMV-myc-p65 和 pFLAG-CMV-2 ((参看图 4 中 flag 行 B 列) 及 pCMV-Myc 和 pFLAG-p50 (参看图 4 中 flag 行 C 列) 共转染细胞裂解液信号也很弱。说明本发明免疫共沉淀芯片能有效的检测出 p65 与 p50 蛋白间的相互作用, 采用小鼠 IgG 作为抗体对照, 说明芯片上 flag 抗体免疫沉淀下的复合物为特异性产物, 因此检测到的信号为特异性靶标蛋白间的相互作用, 排除非特异性吸附的可能。

#### 实施例 2: 免疫共沉淀芯片对六对具潜在相互作用的蛋白进行相互作用的验证:

本实施例利用免疫共沉淀芯片对六对酵母双杂交来源的蛋白进行了相互作用验证。

前期以 TRB3 蛋白 (tribbles 3) 作为诱饵, 经酵母双杂交筛选人肝脏 cDNA 文库, 获得 6 个猎物蛋白: FN1、Myo18A、ATF5、ATF4、MCM3AP 和 HLA-B。

将诱饵构建到 pFLAG-CMV-2 真核表达载体上 (请参照实施例 1 的方法), 将六种猎物分别构建到 pCMV-Myc 真核表达载体上 (请参照实施例 1 的方法)。

参照实施例 1 中的方法; 将六种 pCMV-Myc-猎物蛋白分别和 pFLAG-TRB3 共转染 HEK-293 细胞, 同时以六种 pCMV-Myc-猎物分别和 pFlag-CMV-2 共转染作为诱饵缺失蛋白相互作用的阴性对照。获得十二个细胞裂解液后, 分别在芯片上不同芯片框内进行免疫共沉淀反应, 经荧光标记抗体 anti-Myc-Cy3 单抗检测后, 得到相应的相互作用信号。

检测结果参见图 5 和图 6。图 5 中, 行表示各列中转染的猎物名称, 列表示各行转染的诱饵名称, 如第一列: 上孔表示共转染了 myc-ATF5 和 Flag-TRB3, 下孔表示共转染了 myc-ATF5 和 pFlag-CMV-2); 图中显示: 猎物 ATF4、FN1、ATF5、

MCM3AP 与诱饵 TRB3 有相互作用，其荧光强度分别是相应阴性对照的 68.7、6.6、2.5、5.4 倍，而猎物 Myo18A、HLA-B 与诱饵 TRB3 没有明显的相互作用信号，其荧光强度与相应阴性对照相当，仅 1.5 倍。

本实施例的检测结果与传统基于树脂的免疫共沉淀验证结果（参见图 7）一致（其中，由于 mcy-HLA-B 未检测到表达，因此没做其与 TRB3 的免疫共沉淀分析），进一步表明本发明建立的免疫共沉淀芯片法在分析蛋白相互作用中有效。

通过以上实施例说明，本发明将蛋白质芯片与 CoIP 结合，利用 FLAG 和 c-Myc 表位标签和其对应的单抗，建立了一种基于芯片的免疫共沉淀检测蛋白相互作用的方法。该方法使细胞裂解液直接在芯片表面进行 CoIP 反应，洗去非特异结合的蛋白后，采用荧光标记的抗体直接进行相互作用的检测，省去了传统 CoIP 的琼脂糖磁珠的沉淀、SDS-PAGE 分离、western blot 检测等诸多费时、繁琐的步骤，大大简化实验过程。另外，使用该方法，样品、试剂需求量大大减少，并且同一样品可同时进行对照抗体的平行实验，大大降低实验成本。并且，该方法充分利用了芯片高通量化、流程简单、耗时短等特点，从而可实现对样品的通量化检测。在进行蛋白相互作用检测时，重复性好，背景噪音小，灵敏度高且检测效率与传统 co-IP 方法相当。本发明方法可取代过去耗时耗力的传统方法，成为蛋白质组学研究中高效有力的工具。

本发明在具体实施中，还可以形成一种蛋白相互作用检测试剂盒，该试剂盒可包括：具有多个分区的醛基玻片（每个醛基片可进行 18 个样品的检测，可根据需要检测的相互作用数量选择醛基片的数量）；FLAG 标签载体 pFLAG-CMV-2；c-Myc 标签载体 pCMV-Myc；单克隆抗 FLAG 抗体；Cy3 标记单克隆抗 c-Myc 抗体；小鼠 IgG 及使用说明书。具体的一种试剂盒，其中醛基玻片型号为 CSS-100，FLAG 标签载体为 SIGMA 公司的 pFLAG-CMV-2，c-Myc 标签载体为 (CLONTECH 公司的 pCMV-Myc，FLAG 单抗为 SIGMA 公司的 ANTI-FLAG®M2 单克隆抗体，c-Myc 单抗为 SIGMA 公司的单克隆 ANTI-c-MYC Cy3 CONJUGATE CLONE 9E10。

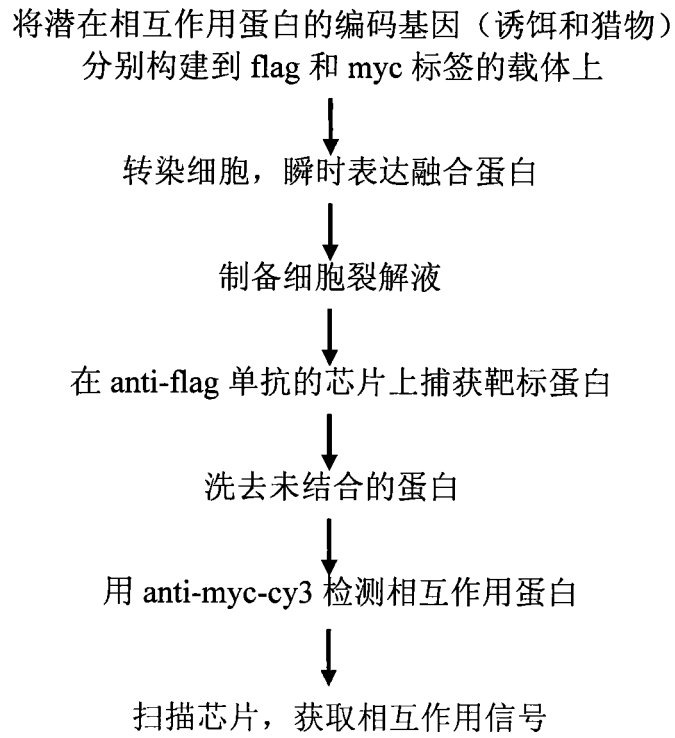


图 1

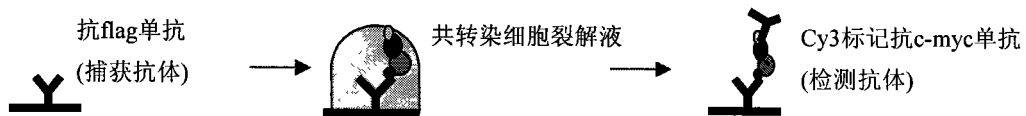


图 2

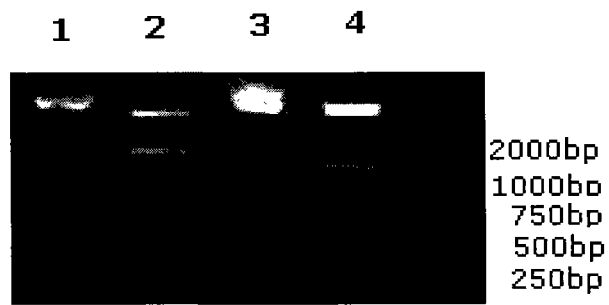


图 3

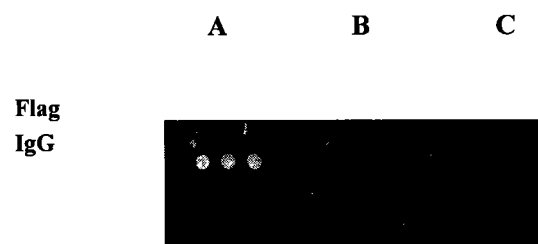


图 4

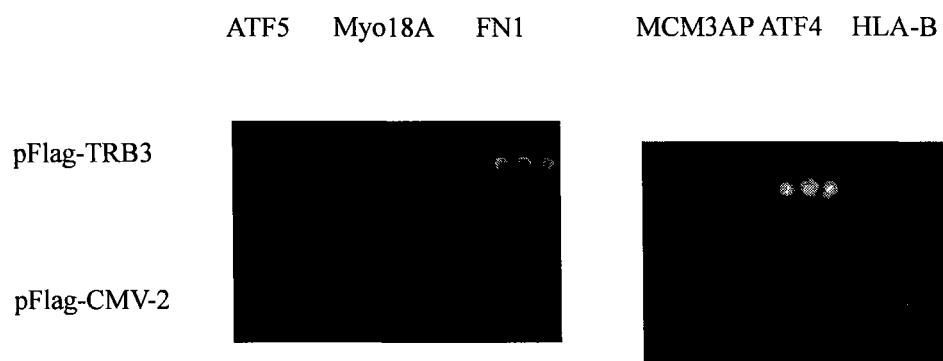


图 5

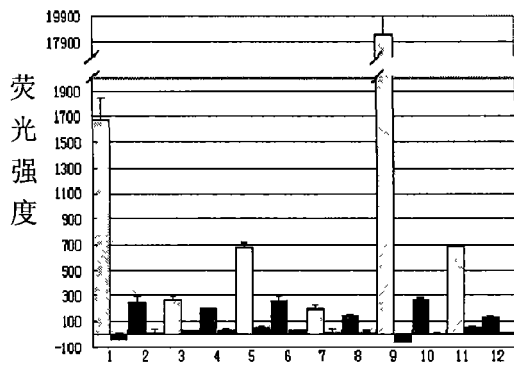


图6-1

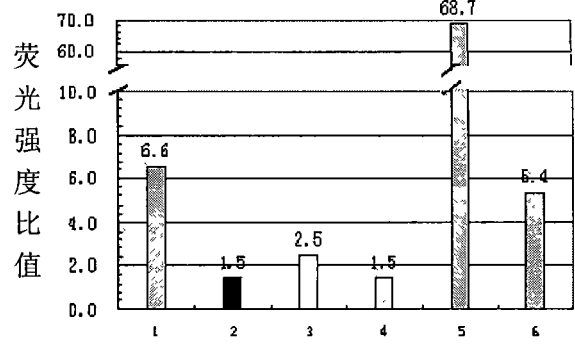


图6-2

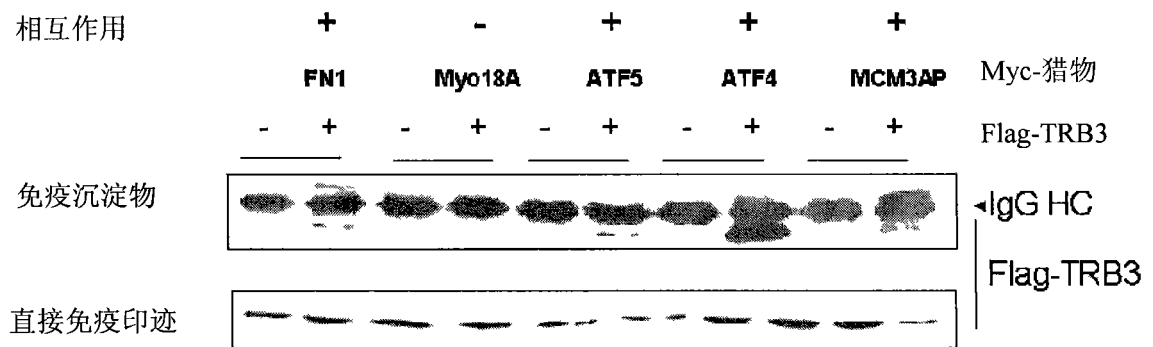


图7

专利名称(译)	基于蛋白芯片的免疫共沉淀检测蛋白相互作用的方法以及一种蛋白相互作用检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101105493A</a>	公开(公告)日	2008-01-16
申请号	CN200710118027.0	申请日	2007-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所		
[标]发明人	刘琼明 林从 何为 许丹科		
发明人	刘琼明 林从 何为 许丹科		
IPC分类号	G01N33/539 G01N21/64 G01N33/577		
代理人(译)	鲁兵		
其他公开文献	CN101105493B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

蛋白质-蛋白质相互作用(protein - protein interaction, PPI)对于所有生物学过程都至关重要,因此,蛋白质相互作用研究一直是细胞生物学与分子生物学领域的一大研究热点。免疫共沉淀(co - immunoprecipitation, CoIP)是以抗体和抗原之间的特异性作用为基础的用于研究蛋白质相互作用的经典方法,是发现和验证PPI最常用、最有效的方法。传统的基于树脂的CoIP步骤复杂、费时费力,难以实现PPI的高通量检测。本发明的核心是:利用重组蛋白的表位标签,在固定了抗标签抗体的玻璃醛基片上进行CoIP,再通过荧光标记的抗体进行相互作用的检测。该方法大大简化了传统CoIP的操作步骤,同时检测样品的通量化大大提高,是一个简便、快速、高通量研究PPI的新型技术平台。

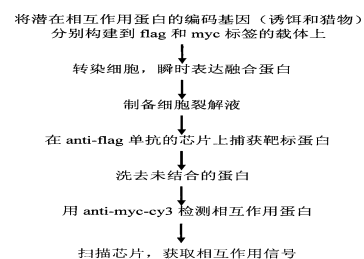


图 1

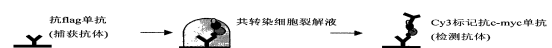


图 2