

# 不同载体微球在 p300 与 ROR $\gamma$ t Co-IP 实验效率的比较

王秀男<sup>1</sup> 滕 霄<sup>2</sup> 刘 彪<sup>2</sup> 殷浩程<sup>2</sup> 任翠平<sup>1</sup> 刘 森<sup>1</sup> 沈际佳<sup>1</sup>

**摘要** 目的 在免疫共沉淀(Co-IP)过程中使用 Protein A/G-琼脂糖珠捕获蛋白和使用 Protein A/G-磁珠捕获蛋白的比较分析。方法 先通过共转染 Flag-p300 和 Myc-ROR $\gamma$ t 质粒入人胚肾细胞系 293T(HEK293T)进行过表达,裂解细胞制备蛋白,分别使用 Protein A/G-琼脂糖珠捕获蛋白和使用 Protein A/G-磁珠捕获蛋白进行 Co-IP;再通过分离人脐血单个核细胞诱导分化人辅助性 T 细胞 17(Th17)进行 Co-IP 比较分析;通过 CCK8 实验排除转染试剂等对细胞活性毒性。结果 过表达的 HEK293T 细胞和诱导分化的 Th17 细胞中均显示腺病毒 E1A 结合蛋白(p300)与维甲酸相关孤儿核受体(ROR $\gamma$ t)在 Co-IP 过程中使用 Protein A/G-磁珠捕获大分子的 p300 蛋白效果好于中分子的 ROR $\gamma$ t 蛋白,使用 Protein A/G-琼脂糖珠捕获中分子的 ROR $\gamma$ t 蛋白效果好于大分子的 p300 蛋白。结论 在 Co-IP 过程中使用 Protein A/G-磁珠捕获大分子蛋白效果较好,使用 Protein A/G-琼脂糖珠捕获中分子蛋白效果较好。

**关键词** p300; 维甲酸相关孤儿核受体; Co-IP; Protein A/G-琼脂糖珠; Protein A/G-磁珠

中图分类号 R 341.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)11-1722-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.012

免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)技术作为检测蛋白质之间相互作用的经典且常用方法被现代基础医学研究广泛使用,具有灵敏性高、特异性强、可信度高、自然状态下可操作且能够对蛋白半定量分析等优点<sup>[1-4]</sup>。腺病毒 E1A 结合蛋白 p300(adenovirus E1A binding protein p300, p300)是一种组蛋白乙酰转移酶,分子量为 300 ku。维甲酸相关孤儿核受体(retinoid-related orphan receptor gamma t, ROR $\gamma$ t)是辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)的特异性关键转录因子,分子量为 72 ku。由

于 p300 与 ROR $\gamma$ t 蛋白大小悬殊较大且两者相互作用,在实验进程中发现由于 p300 与 ROR $\gamma$ t 蛋白质分子量差别较大,进行 Co-IP 时使用 Protein A/G-磁珠或者 Protein A/G-琼脂糖珠很难做出真正显示出其蛋白表达量且清晰准确的目的蛋白条带,因此为解决此问题,本文选取 p300 与 ROR $\gamma$ t 两目的蛋白探究如何准确选取 Protein A/G-磁珠或者 Protein A/G-琼脂糖珠进行 Co-IP 试验。

## 1 材料与方法

**1.1 材料来源** Myc-ROR $\gamma$ t、Flag-p300 等相关质粒由中国科学院上海巴斯德研究所李斌研究员提供。

**1.2 主要试剂** 抗-ROR $\gamma$ t(#14-6988-82)购自上海 EB 生物公司;抗-p300(sc-48343)购自德国 Santa Cruz 生物公司;抗  $\beta$ -actin(BM0627)购自上海 BOSTER 生物公司;蛋白抑制剂 Cocktail(#083M4021V)和抗-Myc(#2276)购自德国 Sigma 公司;抗-Flag(AT002)抗体购自青岛 CMC 生物公司;Opti-MEM 培养基和抗-CD3/CD28(11161D) Dynal beads 购自美国 Gibco 公司;Protein A/G-磁珠(LSKMAGA10)购自美国 MILLIPORE 公司;Protein A/G-琼脂糖珠(A10001)购自美国 Abmart 公司,重组人白介素 6(recombinant human interleukin 6, rhIL-6)、rhIL-21、rhIL-23、重组人转化生长因子  $\beta$ (recombinant human transforming growth factor  $\beta$ , rhTGF- $\beta$ )、rhIL-1 $\beta$ 、白介素 4 抗体(interleukin 4 antibody, anti-IL-4)、 $\gamma$  干扰素抗体(interferon- $\gamma$  antibody, anti-IFN- $\gamma$ )均购自北京 R&D 公司。

**1.3 HEK293T 细胞** 人胚肾细胞系 293T(human embryonic kidney 293T cells, HEK293T)培养于 DMEM 高糖完全培养基中,含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 美国 Gibco 公司)[内含 1% 青霉素(即 100 U/ml)、1% 链霉素(即 100 mg/ml)、1% 谷氨酰胺]。

**1.3.1 质粒转染** 转染前 1 d 将生长状态良好的 HEK293T 细胞以每孔  $1 \times 10^6$  个铺于 6 孔板中,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养过夜。第 2 天细胞密度生长达到 70% ~ 90% 时进行换液,Opti-MEM 培养

2019-06-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81471982)

作者单位:安徽医科大学<sup>1</sup> 病原生物学教研室、<sup>2</sup> 生命科学院,合肥 230032

作者简介:王秀男,女,硕士研究生;

沈际佳,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: shenjijia@hotmail.com

基 900  $\mu\text{l}$  /孔置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 1 h。以 1  $\mu\text{g}$  Myc-ROR $\gamma\text{T}$  和 3  $\mu\text{g}$  Flag-p300 为例 将 1  $\mu\text{g}$  Myc-ROR $\gamma\text{T}$  和 3  $\mu\text{g}$  Flag-p300 的质粒 DNA 和 100  $\mu\text{l}$  OPTI-MEM 培养基混合后加入 12  $\mu\text{l}$  聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 并涡旋振荡 2 s, 混合均匀, 点动离心, 室温静置 10 min。将上述质粒和 PEI 混合液缓慢滴加到 HEK293T 细胞中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱孵育 5 h。5 h 后去除含有转染混合液的培养基, 更换成含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基, 继续培养 48 h。收取细胞进行实验。为摸索最佳质粒转染浓度, 实验设置了 3 组浓度对比, 分别为: Myc-ROR $\gamma\text{T}$  : Flag-p300 为 1  $\mu\text{g}$  : 2  $\mu\text{g}$  或 1  $\mu\text{g}$  : 3  $\mu\text{g}$  或 1  $\mu\text{g}$  : 4  $\mu\text{g}$ 。

**1.3.2 Co-IP 实验** 收集细胞, 加入 300  $\mu\text{l}$  细胞裂解液(现配现用), 100 W 超声 5 s 后 4  $^{\circ}\text{C}$  垂直旋转 30 min。然后离心取上清液 30  $\mu\text{l}$ , 加入 30  $\mu\text{l}$  2  $\times$  SDS 上样缓冲液作 Input。将剩余约 270  $\mu\text{l}$  上清液中加入 3  $\mu\text{g}$  anti-Myc 抗体于 4  $^{\circ}\text{C}$  垂直旋转 3 h。洗涤 Protein A/G-琼脂糖珠或者 Protein A/G-磁珠加入裂解的细胞中 4  $^{\circ}\text{C}$  垂直旋转孵育过夜。清洗珠子, 然后每管加 40  $\mu\text{l}$  上述洗涤液和 10  $\mu\text{l}$  5  $\times$  上样缓冲液(SDS), 100  $^{\circ}\text{C}$ , 煮沸 10 min, 置于冰上冷却进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转膜: p300 (约 300 ku) : 110 v, 3 h; ROR $\gamma\text{T}$  (72 ku);  $\beta$ -actin(42 ku) : 110 V, 1.5 h; 封闭 1 h 后孵育一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  滚动摇床过夜, 最后洗涤, 室温孵育二抗 1 h, 显影。

**1.4 CCK8 实验** 96 孔板每孔 5 000 个 HEK293T 细胞培养 24 h, 根据试剂盒说明书进行 CCK8 (CK04, 上海东仁化学科技有限公司) 检测。

**1.5 Th17 细胞分化** 收集人脐血分离出单个核细胞, 使用 EasySep<sup>TM</sup> Human Naïve CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit( #28067) 分选试剂盒分选出 Naïve T 细胞, 在 anti-CD3/CD28 dynal beads 的刺激下, 50 ng/ml rhIL-6、25 ng/ml rhIL-21、100 ng/ml rhIL-23、10 ng/ml rhIL-1 $\beta$  和 1 ng/ml rhTGF- $\beta$  等细胞因子和 10 ng/ml anti-IL-4 和 10 ng/ml anti-IFN- $\gamma$  两个抗体条件下, Naïve CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化, 培养至第 6 天, 收集细胞进行实验。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 实验结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组数据间的比较采用 *t* 检验处理, 三组数据间的比较采用方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。每一项实验指标重复检测 3 次。

## 2 结果

**2.1 选取 1  $\mu\text{g}$  Myc-ROR $\gamma\text{T}$  和 3  $\mu\text{g}$  Flag-p300 转染 HEK293T 细胞** 选取生长状态良好的 HEK293T 细胞铺板(6 孔板), 培养 24 h 后, 共转染质粒 Myc-ROR $\gamma\text{T}$  : Flag-p300 为 1  $\mu\text{g}$  : 2  $\mu\text{g}$  和 1  $\mu\text{g}$  : 3  $\mu\text{g}$  和 1  $\mu\text{g}$  : 4  $\mu\text{g}$ , 见图 1 结果显示 Myc-ROR $\gamma\text{T}$  : Flag-p300 为 1  $\mu\text{g}$  : 3  $\mu\text{g}$  时转染效果最佳(实验重复 3 次以上)。

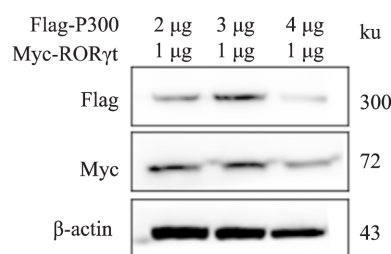


图1 过表达 Myc-ROR $\gamma\text{T}$  和 Flag-p300 入 HEK293T 细胞

**2.2 CCK8 细胞活性实验检测** 为了排除转染试剂 PEI 影响细胞活性而导致蛋白表达不均一的可能, 实验使用 HEK293T 细胞在 96 孔板中培养 24 h 后进行 CCK8 细胞活性实验检测, 分别设置了 PEI 8、10、12、14  $\mu\text{l}$ , 图 2 显示 PEI 8、10、12  $\mu\text{l}$  时细胞活性并未受影响, PEI 14  $\mu\text{l}$  与 8  $\mu\text{l}$  比较时细胞活性略受影响( $F = 4.78$ ,  $P = 0.032$ ), 为了保证细胞活性不受影响且能够保证转染效率, 实验最终选择 PEI 12  $\mu\text{l}$  进行细胞转染。

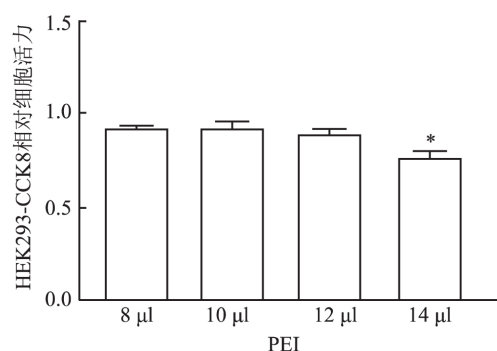


图2 CCK8 细胞活性实验检测  
与 PEI 8  $\mu\text{l}$  比较: \*  $P < 0.05$

**2.3 HEK293T 细胞中选取磁珠捕获 p300 蛋白而选取琼脂糖株捕获 ROR $\gamma\text{T}$**  体外细胞实验共转染 Flag-p300 和 Myc-ROR $\gamma\text{T}$  入 HEK293T 细胞 48 h 后进行 Co-IP, 细胞裂解液用 Flag 抗体进行免疫沉淀,

见图 3A; 细胞裂解液用 Myc 抗体进行免疫沉淀, 见图 3B, 泳道 1 指使用磁珠捕获蛋白, 泳道 2 指使用琼脂糖珠捕获蛋白, 图 3A、B 可以看出使用磁珠比使用琼脂糖珠捕获 p300 蛋白效果要好, 而捕获 ROR $\gamma$ t 蛋白效果则相反; 图 3C ( $t = 6.52, P = 0.007, P < 0.01$ ) 和图 3D ( $t = 2.89, P = 0.003, P < 0.01$ ) 分别为对图 3A 和图 3B 中目的蛋白灰度值比值统计分析, 图 3C、3D 数值来源于其对应的目的蛋白与对应的  $\beta$ -actin 的比值, 并且实验均重复 3 次。

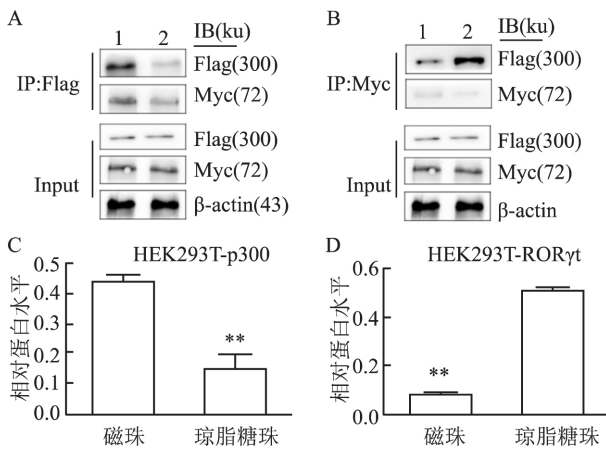


图 3 共转染 Flag-p300 和

Myc-ROR $\gamma$ t 入 HEK293T 细胞免疫共沉淀

A: 用磁珠捕获 p300 蛋白进行 Co-IP; B: 用琼脂糖珠捕获 ROR $\gamma$ t 蛋白进行 Co-IP; C: 两种珠子捕获 p300 蛋白效果的统计图; 与磁珠比较: \*\*  $P < 0.01$ ; D: 两种珠子捕获 ROR $\gamma$ t 蛋白效果的统计图; 与琼脂糖珠比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.4 Th17 细胞中捕获 p300 蛋白适合选取磁珠而捕获 ROR $\gamma$ t 适合选取琼脂糖珠** 体内细胞实验中, 收集诱导分化第 6 天的 Th17 细胞进行 Co-IP, 结果与 HEK293T 细胞结果一致, 即捕获 p300 大蛋白更适合使用磁珠而捕获 ROR $\gamma$ t 适合选取琼脂糖珠, 差异有统计学意义 (Th17-p300:  $t = 6.893, P = 0.008, P < 0.01$ ; Th17-ROR $\gamma$ t:  $t = 2.803, P = 0.005, P < 0.01$ ) , 见图 4。

### 3 讨论

Co-IP 是用于蛋白质相互作用的经典方法, 其中捕获蛋白步骤在 Co-IP 实验过程中占据重要地位, 首先筛选出质粒共转染最佳比例, 本研究结果显示, Myc-ROR $\gamma$ t : Flag-p300 为 1  $\mu$ g : 3  $\mu$ g 时转染效果最佳; 转染过程中发现, 同等条件下共转染 Myc-ROR $\gamma$ t : Flag-p300 为 1  $\mu$ g : 4  $\mu$ g 时细胞状态较差, Western blot 显示其  $\beta$ -actin 表达较弱可能由于细胞

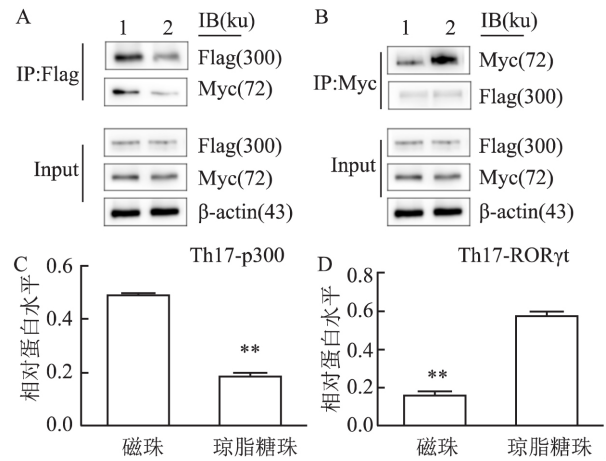


图 4 Th17 细胞免疫共沉淀

A: 用磁珠捕获 p300 蛋白进行 Co-IP 效果较好; B: 用琼脂糖珠捕获 ROR $\gamma$ t 蛋白进行 Co-IP 效果较好; C: p300 蛋白分别用磁珠和琼脂糖珠捕获蛋白进行 Co-IP 条带灰度值统计分析; 与磁珠比较: \*\*  $P < 0.01$ ; D: ROR $\gamma$ t 蛋白分别用磁珠和琼脂糖珠捕获蛋白进行 Co-IP 条带灰度值统计分析; 与琼脂糖珠比较: \*\*  $P < 0.01$

转染后细胞状态变差。本研究发现在保证转染试剂 PEI 既不会对细胞活性有毒性又保证转染效率的情况下, 共转染 Flag-p300 和 Myc-ROR $\gamma$ t 质粒条件相同时, 收取细胞进行 Co-IP, 结果显示用磁珠捕获 p300 蛋白比用琼脂糖珠捕获蛋白效果较好, 而 ROR $\gamma$ t 则相反, 于是本研究得出结论对于大分子蛋白来说, 使用磁珠进行 Co-IP 效果更佳, 而中小分子蛋白则适合使用琼脂糖珠。

由于目的蛋白分子量大小悬殊过大, 两者相互作用进行 Co-IP 可能影响实验结果以及对实验结果的判断。查阅很多文献发现 Co-IP 步骤类似, 其中捕获蛋白使用的载体珠不同, 总结出在分子量为 35 ~ 110 ku 蛋白使用 Protein A/G-琼脂糖珠捕获蛋白<sup>[5-7]</sup>, 分子量为 114 ~ 290 ku 的范围使用 Protein A/G-磁珠捕获蛋白<sup>[8-9]</sup>, 当然也有较少文献<sup>[10]</sup>使用 Protein A/G-磁珠捕获中分子量蛋白 (65 ku), 也有较少文献使用 Protein A/G-琼脂糖珠捕获较大分子量蛋白 (164 ku)<sup>[11]</sup>, 本研究对使用 Protein A/G-磁珠和 Protein A/G-琼脂糖珠在 Co-IP 过程中捕获不同大小的蛋白, 能够帮助研究者们在进行 Co-IP 实验选取较符合自己实验试剂和方案方法。本实验有利于研究者根据自己的试验目的选取正确的载体微球进行 Co-IP, 降低实验结果偏差而影响试验目的的判断。经检索中外文数据库, 均没有文献对层析介质进行比较的研究报道。两种微球在捕获不同分子量蛋白效率不同, 是由于其组成介质的不同, 抑或是

Protein A/G 比例用量以及偶联方法不同等因素的影响,这是试剂研发和试剂使用选择时值得关注的问题。

### 参考文献

- [1] Isono E, Schwechheimer C. Co-immunoprecipitation and protein blots [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 655: 377–87.
- [2] Masters S C. Co-immunoprecipitation from transfected cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 261: 337–50.
- [3] Geva G, Sharan R. Identification of protein complexes from co-immunoprecipitation data [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(1): 111–7.
- [4] Lin J S, Lai E M. Protein-protein interactions: Co-immunoprecipitation [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1615: 211–9.
- [5] 顾 问,周 郑,吴文涌,等. 免疫共沉淀联合质谱分析筛选克罗恩病中 Intelectin-1 相互作用蛋白的初步研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(4): 519–23.
- [6] 霍寅萍,储著朗,余科科,等. SHP-2 酪氨酸磷酸酶激活突变的肥大细胞对 IL3 呈高增殖敏感性[J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(5): 593–6.
- [7] Blankenship A, Matsumura F. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system [J]. *Mol Pharmacol*, 1997, 52(4): 667–75.
- [8] Chen J C, von Lintig F C, Jones S B. High-Efficiency solid-phase capture using glass beads bonded to microcentrifuge tubes: immunoprecipitation of proteins from cell extracts and assessment of ras activation [J]. *Anal Biochem*, 2002, 302(2): 298–304.
- [9] Franca A, Carlos Melo Lima Filho A, Guerra M T, et al. Effects of endotoxin on type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in human cholangiocytes [J]. *Hepatology*, 2019, 69(2): 817–30.
- [10] Kowsari R, Yazdian-Robati R, Razavi B M, et al. Recognition and characterization of erythropoietin binding proteins in the brain of mice [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(9): 946–52.
- [11] Chen W, Nyuydzefe M S, Weiss J M, et al. ROCK2, but not ROCK1 interacts with phosphorylated STAT3 and co-occupies TH17/TFH gene promoters in TH17-activated human T cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16636.

## Comparison of experimental efficiency of different carrier microbeads in p300 and ROR $\gamma$ t Co-IP

Wang XiuNan<sup>1</sup>, Teng Xiao<sup>2</sup>, Liu Biao<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Pathophysiology, <sup>2</sup>Academy of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** Comparative analysis of p300 and ROR $\gamma$ t used Protein A/G-agarose beads to capture protein and Protein A/G-Magnetic beads to capture protein in the process of immunoprecipitation. **Methods** After co-transfection of Flag-p300 and Myc-ROR $\gamma$ t plasmids into HEK293T cells for expression, the cells were lysed to prepare proteins, and Protein A/G-agarose beads capture proteins and Protein A/G-Magnetic beads capture antigens were used for Co-Immunoprecipitation (Co-IP), respectively. Human umbilical cord blood monocytes were isolated from human umbilical cord blood monocytes to induce differentiation of human Th17 cells by Co-IP comparative analysis, and CCK8 assay was used to exclude the cytotoxicity of transfection reagents. **Results** Both overexpressed HEK293T cells and induced differentiation of Th17 cells showed adenovirus E1A binding protein (p300) and retinoic acid-associated orphan nuclear receptor (ROR $\gamma$ t) in the Co-IP process, using Protein A/G-magnetic beads to capture large the p300 protein of the molecule was better than the ROR $\gamma$ t protein of the middle molecule. The use of Protein A/G-agarose beads to capture the ROR $\gamma$ t protein of the molecule was better than that of the macromolecule p300 protein. **Conclusion** In the course of immunoprecipitation, it is better to capture macromolecular protein with protein A/G magnetic beads and protein A/G agarose beads to capture middle-molecular proteins, which is better than that by using protein A/G agarose beads in the process of immunoprecipitation.

**Key words** p300; ROR $\gamma$ t; Co-IP; Protein A/G-agarose beads; Protein A/G-magnetic beads