免疫沉澱法

撰文:謝馨慧

尋找蛋白質與基因的親密關係

Epigenetics在蛋白質體學相關領域裡，主要是針對基因修飾進行研究，然而其基因也會跟蛋白質結合進而調控誘發下游之反應，我們可以藉由純化其蛋白質去探討彼此間交互作用。免疫沉澱（Immunoprecipitation,IP）為純化蛋白或研究蛋白質間交互作用的生物技術，利用抗體與抗原結合特異性，將蛋白質視為抗原，並利用抗體去偵測，為分離蛋白質複合體實驗中常用方法之一，也因為應用性廣，所以更受各實驗室的愛戴。最常用來探討:

- 抗原定性
- 抗原相對分子量
- 抗原合成或降解量
- 蛋白質活性比例
- 後轉譯修飾蛋白的表現
- 蛋白質與核酸、蛋白質或其他配體交互作用

IP種類

- **Traditional IP:**將特定抗體固定在一載體，並辨認複雜樣品中之抗原。
- **Co-IP:**為IP的延伸方法，主要探討蛋白質與蛋白質間交互作用。先利用一個專一性抗體找尋與抗原有交互作用之蛋白(Cat:# 786－638)。
- **Chromatin immunoprecipitation assay(ChIP assay):**探討基因表現調控中DNA與蛋白的結合性，確認其調控蛋白與嵌合之DNA序列。
- **RNA Immunoprecipitation(RIP):**與ChIP assay相似，探討RNA與蛋白的相關性。
- **Tagged Protein-IP:**其技術為利用帶有標示物(tag)的標的蛋白質抗原，純化蛋白複合體。其重組蛋白的tag常見的有GST、Flag、myc等融合蛋白質去純化複合體。

傳統的IP方法

免疫沉澱主要目的是小規模的抗體-抗原特異性的親和純化，主要可以分成下列步驟(圖一):

1.樣品製備，帶有其有興趣之抗原，找到適合的抗體

2.形成抗體-抗原複合物

3.辨認並純化有興趣之蛋白

岑祥股份有限公司www.thco.com.tw 台北02-2785-1156 新竹03-530-7592 台中04-2471-0255 高雄07-343-1735

傳統上會直接先將抗體固定在Protein A 或Protein G 樹脂上進行實驗，辨認有興趣之抗原，並去除非專一性之結合，洗滌出有興趣之蛋白。但如果樣品中其蛋白濃度過低或是抗體專一性不佳時，則可先將抗體與樣品反應後，再與Protein A 或Protein G 樹脂上結合。最後，抗體-抗原複合體在洗滌出的液體裡時，可以跑SDS-PAGE，利用分子量分辨其抗體與有興趣之抗原；若標的蛋白與抗體分子量相近時，則不適用此方式辨認。

其基本原理除了抗體-抗原專一性外，其固定Protein A或G的基底也有所不同，除了傳統利用樹脂外，現在也有磁珠的方式進行純化。樹脂的方式主要是利用重力滴定或是離心的方式；磁珠系統則是藉由磁力方式，收集懸浮樣品中之與抗原結合之抗體-磁珠。

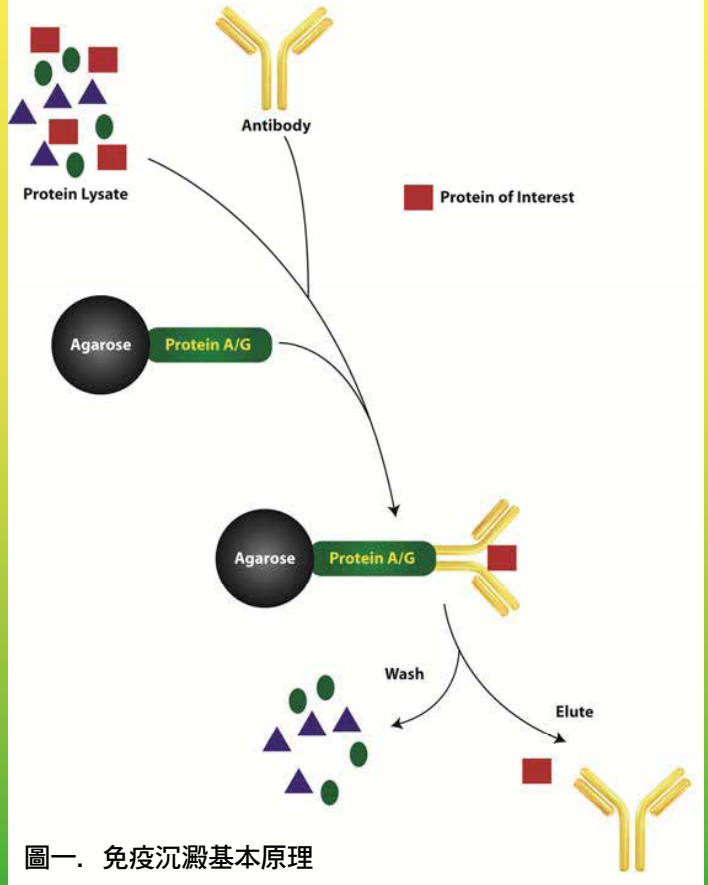
成功關鍵

1.樣品中抗原之種類

免疫沉澱最常使用於純化可溶性的蛋白，不可溶蛋白或是過度黏稠之樣品則不適合此種方式去做純化。通常約10^5或是10^6個細胞即可利用免疫沉澱法純化出可溶性蛋白。

2.抗體-抗原專一性

免疫沉澱法是依靠抗體-抗原結合而達到純化結果，然而當樣品中抗原濃度過低或是抗體親和力不足時，則會影響後續純化之效益。抗體親和力建議在10^8 $mole^{-1}$或更高，其純化效果最佳，雖說10^7 $mole^{-1}$也可偵測到抗原存在，但其後續定量效果較差。



圖一. 免疫沉澱基本原理

樣品前製備

裂解試劑(lysis buffer)為很重要的關鍵，決定後續實驗是否可以順利進行，其試劑必須穩定原本蛋白質(native protein)結構，抑制蛋白酶活性，最少的抗體結合位點變性，並可以大量從細胞或組織釋放出蛋白質。通常會建議 lysis buffer 需因標的蛋白在細胞內位置不同（例如:細胞膜、細胞質、細胞核）去選擇，才能達到最大的裂解效果。常見的 IP lysis buffer 有以下三種:

1.非變性(non-denaturing)lysis buffer：為了要讓抗體可以辨認native protein結構。這一類的試劑大都包含非離子洗液(non-ionic detergents)，例如:NP-40、Tween 20或是Triton X-100。

2.Denaturing lysis buffer：常見的為Radioimmunoprecipitation Assay(RIPA)buffer(G-biosciences, #786-490)，這種試劑是利用SDS或是sodium deoxycholate等ionic detergents去釋放蛋白，針對不易釋出之蛋白，（例如:核蛋白），此種試劑也是個不錯的選擇，但是無法維持住蛋白原本之結構。以上兩種試劑大都包含NaCl and Tris-HCl，且pH值穩定於7.4–8之間。

3.Detergent-free buffers：最常用於利用物理性的方式來裂解細胞，例如加熱或是均質時搭配的lysis buffer。

無論是哪一種的lysis buffer，都可以順利進行IP的實驗，然而當蛋白質釋放出來時，為了保護蛋白不受蛋白酶(proteases)和磷酸酶(phosphatases)降解，實驗過程除了放在4度C之外，也會另外添加蛋白酶抑制劑，例如：PMSF, aprotinin and leupeptin，而常見的sodium orthovanadate或是sodium fluoride則為磷酸酶抑制劑，這些抑制劑都可以單獨使用，不過現在市面上也有許多商品化抑制劑，例如：G-Bioscinces的proteases cocktail(#786-108)
phosphatases cocktail(#786-450)，其效果更佳且更省成本喔！

另外，讓lysis buffer在最適合的條件下反應也很重要，常見的限制如下:

Component	Range
Non-ionic detergents (NP-40, Triton X-100)	0.1 to 2%
Ionic detergents (SDS, sodium deoxycholate)	0.01 to 0.5%
Salt concentrations	0 to 1M
Divalent cations	0 to 10mM
pH	6 to 9
EDTA	0 to 5mM

清除樣品雜質為做IP實驗前的步驟。樣品中殘留的脂質、碳水化合物、DNA或是RNA可能會去跟Protein A 或 G 產生非專一性的結合，為了避免這樣的狀況發生，建議先利用非專一性抗體與樣品反應，做一次IP檢查，如果沒有非專一性結合發生，則可不需要清除雜質，此外也可做為IP的negative control喔！

IP載台

IP的操作方法與邏輯相當簡單，雖然影響實驗成功的關鍵在於抗體與抗原親和力與專一性，儘管如此，實驗內件的品項也會跟實驗流程與結果相關。**樹脂（agarose beads）**為目前最廣泛使用於IP的非水溶性載台，也就是常聽到的resin；名字乍聽下為球狀物體，其實為類似海綿結構的多孔體，其孔隙空間都可與配體結合，大小約50 to 150μm。這種高度多孔材料中具有最高的抗體結合能力，且耐久使用又堅固，在無損壞的狀況下，可以承受5,000g的離心，100磅的壓力和120度的高溫，且可耐大多數detergents、鹽類、有機溶劑和極端的pH值(3-11)，也因如此才會如此廣泛性的被使用。

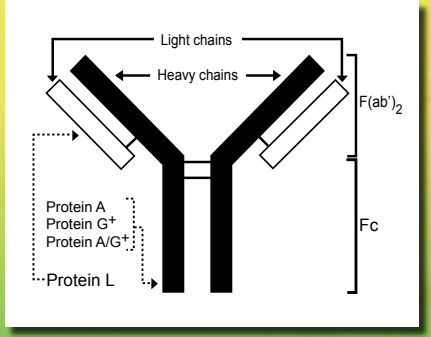
磁珠(Magnetic Beads)resin不同的地方在於為球狀固體，抗體只能接在磁珠表面，所以與抗體結合力不像resin多孔體佳，且磁珠大小也只有1 to 4μm，但是若給予足夠的磁珠量，其表面會與抗體有最佳結合。此系統是利用磁力的方式去收集磁珠，通常都需要磁盤的幫忙，此種方式不能離心，避免破壞抗體-抗原的結合，導致標地蛋白的流失。

抗體固定

常見的方法有兩種固定抗體在載台上，一種是將利用樹脂連接蛋白質，並與抗體結合後去做純化；另一種則是抗體直接利用共價鍵連接在樹脂上。

Antibody-binding Proteins

Protein A、Protein G和 Protein A/G可以與抗體 IgG 恆定區域(Constant Domain)做結合，也因為如此才可以固定抗體的方向位置，確認抗原可以順利接上（圖二）。



圖二. Protein A、Protein G和Protein A/G與抗體連接位置

Protein A、Protein G和Protein A/G對於不同物種及抗體種類的親和性都有所不同，可參閱表一。Protein A有4個IgG結合位，Protein G有2個IgG結合位，而Protein A/G則有6個結合位。但是Protein A、Protein G和Protein A/G並不適用各種IP實驗，需依抗體種類的特性不同而選用適當的結合蛋白。然而，在傳統IP中，抗體的花費成本是最令人擔憂的，因為每次沖提，都會造成目標抗體的損失，且也不能重複使用其抗體，因此這是個需要考量的花費。此外也要考慮抗體與抗原分子量的因素，因為抗體的重鏈分子量為55kDa，而輕鏈為25kDa，若抗體與抗原的分子量過於接近，會導致後續實驗中，在SDS-PAGE上無法利用分子量辨認為抗體還是抗原。

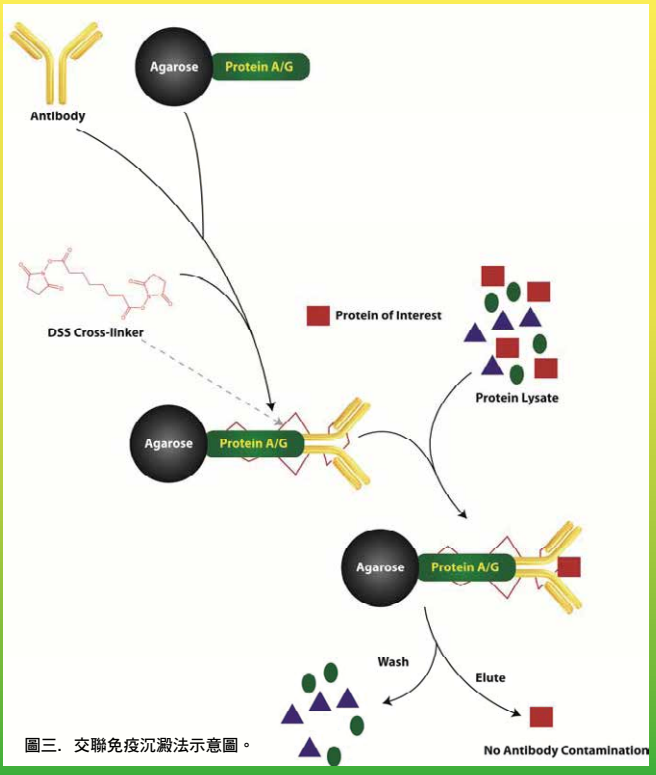
Species	Antibody Class	Protein A	Protein G	Protein A/G
Mouse	Total IgG	++++	++++	++++
	IgG_1	+	+++	+++
	IgG_{2a}	++++	++++	++++
	IgG_{2b}	++++	++++	++++
	IgG_3	+++	+++	++++
Human	Total IgG	++++	++++	++++
	IgG_1	++++	++++	++++
	IgG_2	++++	++++	++++
	IgG_3	+	++++	++++
	IgG_4	++++	++++	++++
Rat	Total IgG	+	++	+++
	IgG_1	-	+	+++
	IgG_{2a}	-	++++	++++
	IgG_{2b}	-	++	+
	IgG_{2c}	++	+++	++++
Hamster	Total IgG	++	++	++
Guinea Pig	Total IgG	++++	++	++++
Rabbit	Total IgG	++++	+++	++++
Horse	Total IgG	++	++++	++++
Cow	Total IgG	++	++++	++++
Pig	Total IgG	+++	++	++++
Sheep	Total IgG	+	++	++++
Goat	Total IgG	+	++	++++
Chicken	Total IgG	-	-	-

表一. Protein A、Protein G和Protein A/G與抗體結合力比較圖
＋ 越多結合力越佳，－ 為無法結合。

Crosslinking IP

交聯劑(cross-linker)可利用來增加抗體與 Protein A、Protein G 、 Protein A/G 共價連結，DSS and BS_3等短碳鏈主要是有N-Hydroxysuccinimidyl(NHS)結構，利用NHS與一級胺結合形成共價鍵達到固定蛋白之目的。如果是先將抗體接在 Protein A、Protein G、Protein A/G 瓊脂樹脂上，再與交聯劑溶液混合。交聯劑可幫助抗體Fc端和重組蛋白相鄰胺基產生共價鍵而相連接，加強抗體與重組蛋白之鍵結，並可進行後續IP實驗。

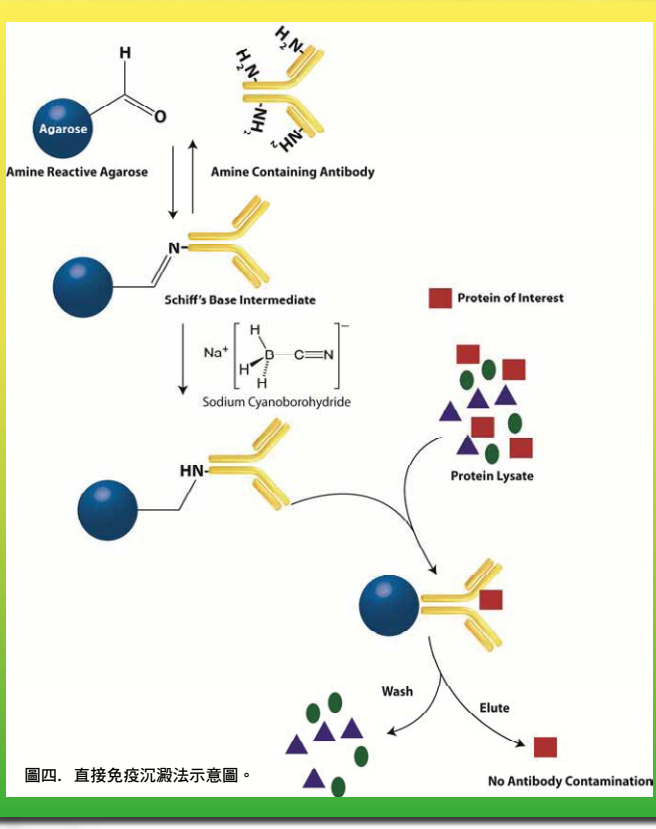
這樣的方式與傳統的IP不同，可增加抗體與重組蛋白連結，讓抗體能完全固定在管柱中，避免抗體在沖提時釋出；也可以增加管柱重複使用的次數。然而，抗體有許多位點都有胺基存在，並非只有Fc端才有胺基，若使用過多或過少的交聯劑都會影響最後的結果；過多可能會與抗原決定位結合導致正確抗原無法接上；過少又會增加抗體的使用量，因此交聯劑的使用量要特別注意。



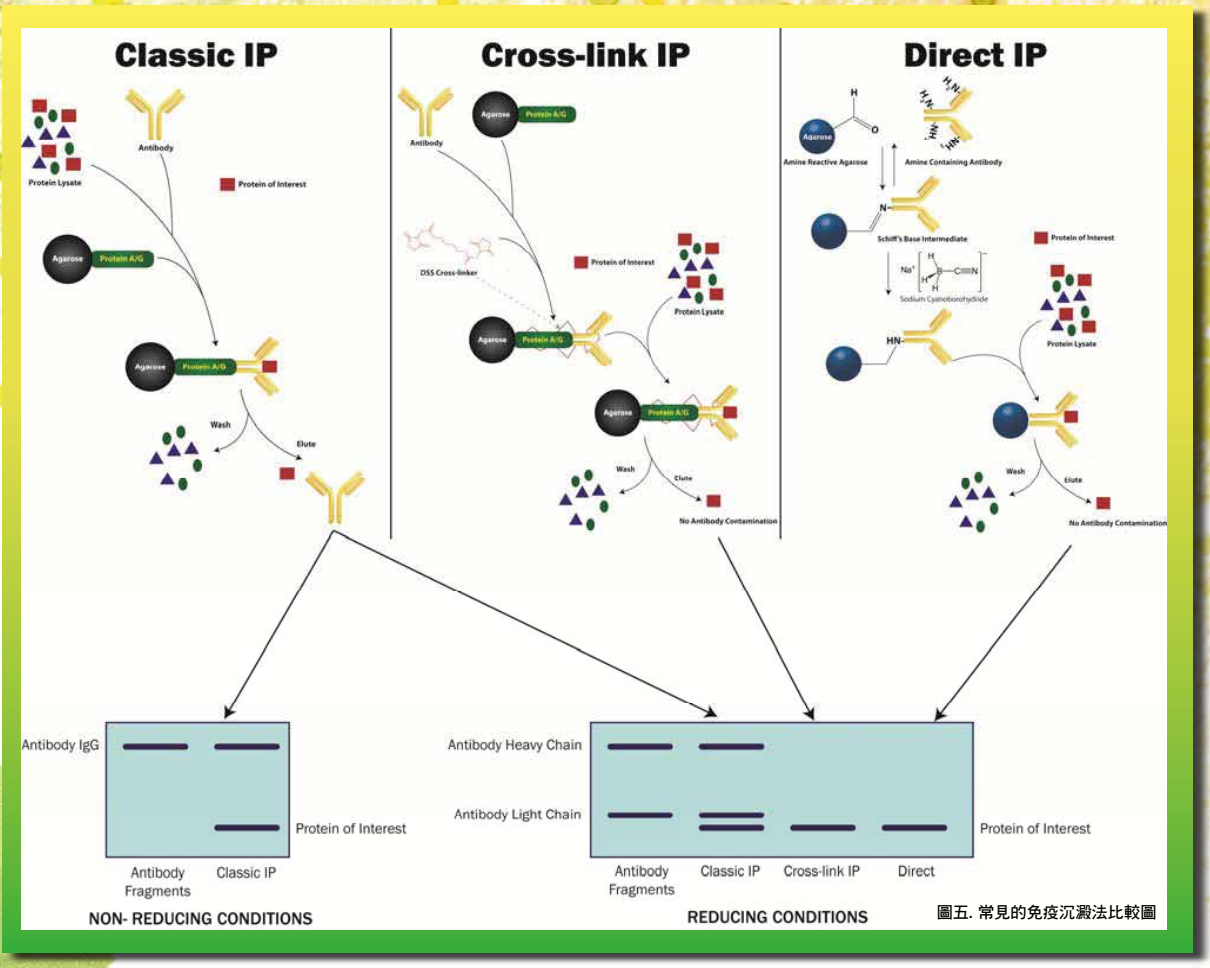
圖三. 交聯免疫沉澱法示意圖。

Direct Covalent IP

此種方式為抗體直接利用共價鍵樹脂結合，沒有Protein A/G的參與，因此抗體沒有指向性。可用於抗體對 Protein A/G 親和力微弱，或是抗體無Fc端時的IP選擇。抗體與抗原間聯結力相當微弱因此沖提出來的只會有抗原，因此抗體與管柱是可以重複使用的；但需注意此種方式是利用抗體胺基羥基(OH)的結合，故利用此種方式的所有試劑都不可以有胺基存在，避免干擾抗體連接。



圖四. 直接免疫沉澱法示意圖。



圖五. 常見的免疫沉澱法比較圖

如何找出適合自己的IP?

前述了許多不同的IP方法(圖五)，目前還是以傳統的IP為最多人使用，然而隨著實驗經費短缺，越來越多人選擇使用Cross-link IP的方式，除了增加抗體與重組蛋白結合效率外，也可減少抗體被沖提出來的量，進而減少抗體的使用，節省實驗經費，也能達到純化之效果。此外Direct IP管柱與抗體也可重複使用，但因為有胺基存在的限制，普及率較沒前面兩者高。在岑祥天地裡，可以找到最適合自己的工具，找到最想要看的蛋白，就讓岑祥小天使滿足你的願望吧。

Order information

1.Classical Immunoprecipitation Kit (Cat. # 786-637)
2.Cross-link Immunoprecipitation Kit (Cat. # 786-639)
3.Direct Immunoprecipitation Kit (Cat. # 786-636)