

蛋白相互作用检测方法综述

随着生命科学研究的不断发展，人们逐渐意识到基因组信息已经不能完全解释和预测各种生命过程及现象，而蛋白质作为细胞活性和功能的执行者，越来越受到人们的关注。然而，蛋白质功能的发挥不是凭借单个蛋白质独立执行，而是依靠蛋白间相互作用(protein-protein interaction, PPI)执行其功能。因此，蛋白质相互作用出现异常将会影响细胞活性和功能的发挥，从而引发许多疾病，如神经退行性疾病、癌症等。抑制这些异常的蛋白质相互作用对临床治疗具有重要意义。

检测范围	检测方法
In vivo 体内方法	免疫共沉淀 (Co-IP)
	荧光共振能量转移 (FRET)
	邻近蛋白标记 BioID
	酵母双杂交 (Yeast Two-hybrid)
In vitro 体外方法	融合蛋白沉降技术 (GST Pull down)
	生物膜干涉技术 (BLI)
	表面等离子共振 (SPR)
	Far-Western
	TAP 串联亲和纯化技术
	蛋白质芯片技术 (Protein microarrays)

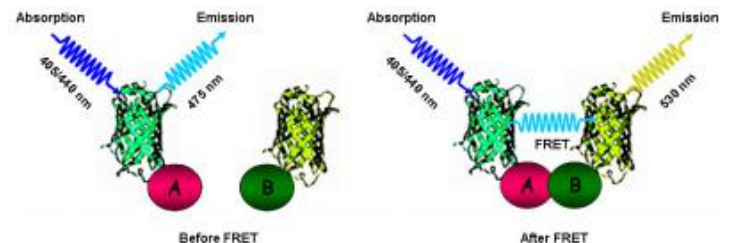
体内检测方法免疫共沉淀

免疫共沉淀以抗原抗体间的特异性为基础，检测分子间的相互作用，实验操作简便。利用蛋白 X 的抗体去免疫沉淀（通过琼脂糖微珠）蛋白 X，这样在蛋白 X 所在的环境中与其有相互作用的分子（Y）会被一起沉淀下来，在通过 Western Blot 去检测免疫沉淀的结果。

该技术是研究蛋白质相互作用的经典技术，应用广泛且可信度较高。它利用特异性抗体从细胞抽提物中分离目的蛋白和相互作用蛋白的复合物，之后通过 [Western blot](#) 及质谱法确定相互作用蛋白。如果在非变性的条件下裂解细胞，蛋白间相互作用可以保持，所以就可利用免疫共沉淀方法找出相互作用的蛋白质。免疫共沉淀既可以用于检验已知的两个蛋白质在体内的相互作用，也可以找出未知的蛋白质相互作用，不管是哪个，其原则都是一样的，都需要用特异性的抗体与其中的一种蛋白质结合，之后通过蛋白质 A 或蛋白质 G 琼脂糖微珠将复合物沉淀下来，然后用 SDS PAGE 鉴定。免疫共沉淀中设置正确的对照非常重要，因为该方法可能出现假阳性的概率比较高。设置的对照包括：在对照组中使用对照抗体，以缺失目的蛋白的细胞系作为阴性对照等等。（详细[免疫共沉淀实验](#)介绍）

荧光共振能量转移 (FRET)

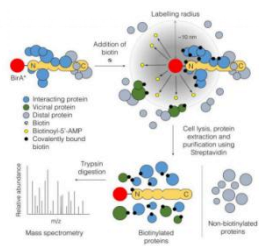
原理：荧光能量共振转移是距离很近的两个荧光分子间产生的一种能量转移现象。当供体荧光分子的发射光谱与受体荧光分子的吸收光谱重叠，并且两个分子的距离在 10nm 范围以内时，就会发生一种非放射性的能量转移，



即 FRET 现象，使得供体的荧光强度比它单独存在时要低的多（荧光猝灭），而受体发射的荧光却大大增强（敏化荧光）。

荧光共振能量转移(FRET)是用于对生物大分子之间相互作用定性、定量检测的一种有效方法。根据所基于的荧光显微镜配置不同而有不同的应用侧重，可在溶液，细胞悬液，多细胞，单细胞，细胞膜，细胞器等不同层次对生物大分子间的相互作用距离，动力学特性等进行研究。在生命科学领域，FRET 技术是检测活体中生物大分子纳米级距离和纳米级距离变化的有力工具，可用于检测某一细胞中两个蛋白质分子是否存在直接的相互作用。正如前述，当供体发射的荧光与受体发色团分子的吸收光谱重叠，并且两个探针的距离在 10nm 范围以内时，就会产生 FRET 现象。而在生物体内，如果两个蛋白质分子的距离在 10nm 之内，一般认为这两个蛋白质分子存在直接相互作用。（详细 [FRET 荧光共振能量转移](#)介绍）

邻近蛋白标记 BioID



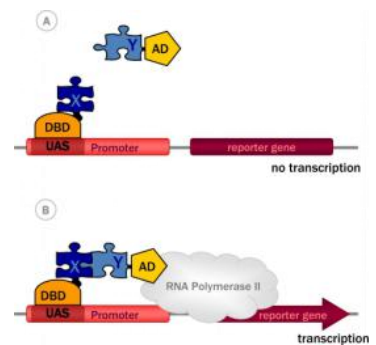
原理：邻近蛋白标记，顾名思义就是将靠近某一被标记的物质的蛋白或分子标记。例如，A 是重组表达获得的带有 BirA*生物素连接酶的蛋白，BirA*是 BirA 的一种突变体，BirA 需要特异性识别一段 15AA 的氨基酸序列，才能将靠近其的蛋白生物素化，经过突变的 BirA* 不需识别特定的氨基酸也能使其周围的分子生物素化

应用：

- 1) 已经被成功地运用到研究哺乳动物细胞和单细胞原核生物的各种各样的蛋白中；
- 2) 特别适用于研究不易溶解或者很难得到的亚细胞结构蛋白；
- 3) 能够检测弱的，瞬时的蛋白相互作用。

酵母双杂交 (Yeast Two-hybrid)

原理：待研究的蛋白分别融合到 Gal4p 转录因子的独立 DNA 结合域及转录激活结构域，如果这两种蛋白本身有相互作用，它们便可重组成一个功能性的 Gal4p，从而诱导报告基因的表达。该方法可测定两种蛋白相互作用的能力，转录报告系统可用来评价此相互作用。此外，使用这种方法还可以从蛋白库中筛选与未知的相互作用蛋白，这也是酵母双杂交系统的另外一特点。

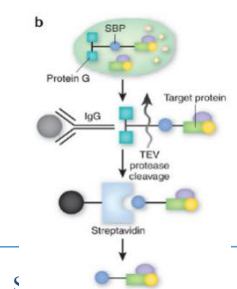


酵母双杂交是一种在酵母中利用转录激活物的重组来鉴定蛋白质之间相互作用的方法。简言之，就是诱饵蛋白质基因与一个报道基因 DNA 结合区融合表达，而在目的蛋白质基因上融合表达报道基因的激活区，如果这两个蛋白质间有相互作用，则可以激活报道基因的表达，从而从文库中钓出特异作用的蛋白质。后来又有研究者在细菌中进行双杂交。这个方法的优点是（1）细菌双杂交比酵母的文库更大，可以大于 10^8 ；（2）细菌双杂交可以鉴定一些在酵母中无法进行操作的蛋白质。

体外检测方法

融合蛋白沉降技术 (GST Pull-down)

利用重组蛋白表达技术将 GST 与目的蛋白融合，利用 GST 和谷胱甘肽偶联球珠的亲合力，从非相互作用蛋白的溶液中纯化相互作用蛋白。GST 与谷胱甘肽之间的亲合力较高，不是一般

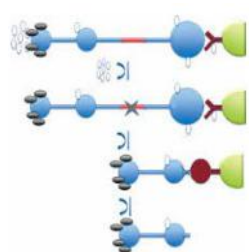


的缓冲液可以解离，大量的 GST 融合蛋白就能与固定在基质上的谷胱甘肽结合。GST 与嵌合的蛋白质之间有一段长的柔性连接段，使得 GST 和目的蛋白形成两个各自独立的功能域，因此 GST 并不阻碍其他蛋白质与融合蛋白的相互作用。利用这些特点，可以利用谷胱甘肽简单、高效的亲和纯化出相互作用的蛋白。

Far-western blotting

Far-western blotting 该技术是由 Western blotting 衍生而来研究蛋白质相互作用的方法，它运用经标记的或可被抗体检测的“诱饵”蛋白检测转移膜上的“猎物”靶蛋白。如果诱饵蛋白与靶蛋白存在相互作用，那么利用该诱饵蛋白的特异性即可检测出相应条带。利用该技术检测了 DNA 复制和修复相关蛋白质之间的相互作用，认为这是一种快速有效、可重复的蛋白质相互作用研究方法。该方法检测两种蛋白质是否发生直接的相互作用，如果相互作用是间接的，可以用候补蛋白进行进一步检测。由于该方法灵敏度较高，现已得到广泛的应用。

TAP 串联亲和纯化技术

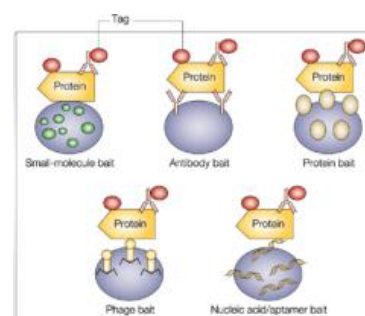


该技术是研究生理条件下蛋白质相互作用的方法，它利用特殊设计的蛋白标签，经过连续的亲和纯化得到接近自然状态的蛋白复合物。该方法假阳性率和假阴性率低，可分析稳定复合物中蛋白质相互作用及瞬时相互作用，采用两步亲和纯化使特异性得到提高，具备通用性及自动化等优势；但 TAP 标签可能会影响靶蛋白与亲和柱的结合，以及纯化中使用的

螯合剂有时会干扰蛋白质复合物的完整性和活性。

蛋白质芯片技术 (protein microarrays)

蛋白质芯片是将各种蛋白质有序地固定于固相支持物表面制成芯片，然后将带有特殊标记(如荧光染料)的样品蛋白质与芯片上的探针蛋白杂交，漂洗未能与芯片上的探针蛋白结合的蛋白，再利用荧光扫描仪或激光共聚焦扫描技术测定芯片上各点的荧光强度，通过荧光强度分析蛋白质相互作用，最终确定蛋白质功能。该方法快速、简便、高通量，可检测出一些通常难以鉴定的低丰度、小相对分子质量蛋白，但与靶蛋白结合的特异性有待提高。

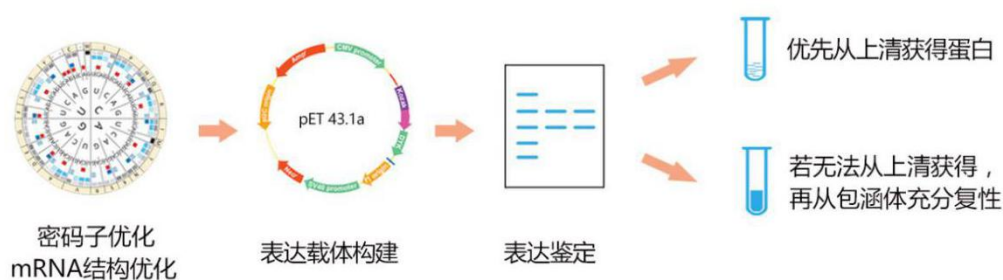


南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

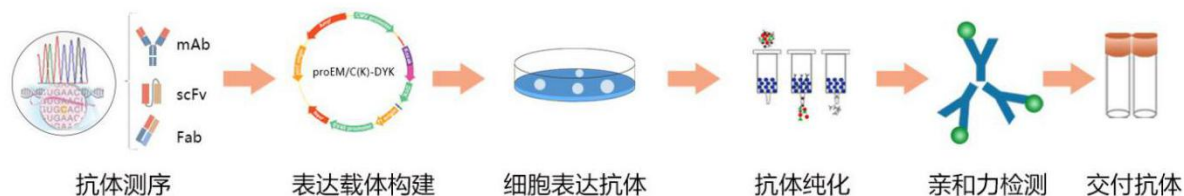
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

