

文章编号 1006-8147(2015)06-0542-03

综述

蛋白质相互作用研究技术的新进展

郭睿综述,刘全忠 审校

(天津医科大学总医院皮肤性病科,天津 300052)

关键词 蛋白质相互作用;酵母双杂交系统;串联亲和纯化;噬菌体展示;免疫共沉淀;GST-Pull down;Far-Western blotting;荧光共振能量转移;生物信息学

中图分类号 Q7

文献标志码 A

蛋白质相互作用网络基于蛋白质的生物学原理,它们之间的相互作用决定了分子与细胞水平上作用机制,从而起到调控机体健康和疾病状态的作用。此作用网络对于复杂的多基因疾病的靶向治疗领域的研究具有深远的意义^[1]。本文着眼于酵母双杂交系统、串联亲和纯化、噬菌体展示、免疫共沉淀、GST-Pull down、Far-Western blotting、荧光共振能量转移、生物信息学等蛋白质相互作用研究方法,对其进行比较分析并进行综述。

1 生物化学与分子生物学研究技术

1.1 酵母双杂交系统

1.1.1 原理 Fields 和 Song^[2]首次在研究真核基因转录调控时建立该系统。其理论基础是基于 GAL4 转录激活因子的特性。GAL4 转录激活因子是一种由两个彼此分离但功能必需的结构域组合而成,即 DNA 结合结构域(DNA-BD)和转录激活结构域(AD)。二者在临近位置相互作用时可重建功能性转录因子。在 MATCHMAKER 酵母双杂交系统(Y2H)中,诱饵蛋白表达融合到 GAL4 的 DNA-BD,而猎物蛋白表达融合到 GAL4 DNA-AD。当诱饵和猎物蛋白相互作用时,DNA-BD 与 AD 形成功能性转录因子,导致酵母报告基因表达的激活,通过检测报告基因的表达产物可判断两种蛋白是否发生相互作用。此方法可以用来确定新的蛋白质的相互作用,分析两种已知蛋白的相互作用以及相互作用的蛋白质结构域分析^[3-4]。

1.1.2 优缺点 酵母双杂交技术可以精确地分析已知蛋白间的相互作用,筛选编码未知蛋白的基因,具有真实性、敏感性、高效性、广泛性等特性。其自身也存在缺点,如易产生假阳性、假阴性等^[5]。

1.1.3 应用 You 等^[6]将 wt-APP695 与 pBT3-SUC 诱饵载体相结合形成 pBT3-SUC-APP 复合物,利用

酵母双杂交筛选系统和免疫共沉淀技术,证实在阿尔茨海默症中,Staufen 1 蛋白(STAU1)可与淀粉样前体蛋白(APP)作用,由于 Stau1 属于双链 RNA 结合蛋白家族,在哺乳动物系统介导 mRNA 的降解,因此推测淀粉样前体蛋白也可能参与 mRNA 调控。

1.2 串联亲和纯化

1.2.1 原理 串联亲和纯化理论基础^[7]是一个利用两个亲和标签不同时序来纯化蛋白组件。TAP 标签蛋白由 Protein A、TEV 蛋白酶可剪切序列和钙调蛋白结合肽(CBP)组成^[8]。在第一步纯化步骤中,TAP 标记的蛋白复合物通过第一个标签 Protein A 特异性结合到 IgG 琼脂珠。此 TAP 标签标记的蛋白质成分可被 TEV 蛋白酶裂解。清洗之后用洗脱液(含 TEV 蛋白酶)分离 Protein A 标签使含有靶蛋白的复合物释放。第二步亲和步骤,该蛋白质复合物通过第二个标签 CBP 固定于钙调蛋白琼脂珠。CBP-钙调蛋白相互作用具有钙依赖性,而钙离子螯合剂用于第二步洗脱步骤来释放最后的蛋白复合物。此分离纯化的蛋白可通过串联质谱、免疫杂交等方法进行鉴定分析。TAP-MS 法已被证明在细菌、酵母和哺乳动物细胞以及多细胞生物如线虫、果蝇和老鼠的蛋白质相互作用研究中均有效^[9]。

1.2.2 优缺点 TAP 技术假阳性和假阴性水平低,与质谱等其他技术联用可大规模地研究细胞内蛋白质分子之间的相互作用网络。但 TAP 技术具有一定局限性:TAP 标签的引入可能会影响靶蛋白和亲和柱的结合;少数靶蛋白可能会在 TEV 蛋白酶处理过程中被破坏;细胞裂解过程有时会影响 TAP 标签表达^[10]。

1.2.3 应用 Campden^[11]应用 TAP 技术和质谱分析技术在胞核和细胞裂解物中来确定结合 Gβ1 亚基的候选蛋白,证实异三聚体蛋白 Gβγ 亚基调节细胞活性的作用。

1.3 噬菌体展示 噬菌体展示技术是将外源性

作者简介 郭睿(1991-),男,博士在读,研究方向:皮肤性病科学;通信作者:刘全忠,E-mail: liuquanzhong@medmail.com.cn。

(多)肽表达在噬菌体颗粒表面上,再利用其配体的特异性亲和力将有需要的蛋白质或多肽筛选出来的技术。一个文库的噬菌体颗粒可表达多种多样的肽,用来选择那些结合了所需的目标。噬菌体展示技术已被应用在蛋白质-蛋白质相互作用的抗原表位分析。特定的配体分离噬菌体库可以用于治疗目标验证、设计药物和疫苗的开发。噬菌体展示技术也可以和其他方法结合使用^[12]。噬菌体展示技术难点在于是如何根据不同研究目标和目的基因特征来采用相应的噬菌体,选择相应展示位点和锚定蛋白以及选择设计定位展示在噬菌体表面锚定蛋白的N端或是C端等,随着遗传学和基因工程学的发展,噬菌体展示技术会慢慢攻克其难点^[13-14]。

1.4 免疫共沉淀 免疫共沉淀是确定新蛋白间相互作用或确定已知蛋白质形成的复合物的最广泛使用的方法之一。原理是利用抗原抗体特异性结合以及细菌的 Protein A 或 G 特异性地结合到免疫球蛋白的 Fc 片段的现象。操作方法是目标蛋白与带标签蛋白的特异性抗体结合。抗体结合蛋白以及任何结合到目标蛋白的蛋白都可以用树脂沉淀,未结合到目标蛋白的蛋白可被洗涤样品洗脱。由此产生免疫复合物,然后通过免疫印迹分析,以研究蛋白质-蛋白质相互作用^[15]。此方法不适用于大规模筛查相互作用蛋白,但其优势在于能确定在生理条件下细胞或组织内是否存在与目的蛋白能够相结合并作用的蛋白质^[16]。

1.5 GST-Pull down

1.5.1 原理 使用 GST 融合蛋白的下拉技术或亲和沉淀测定法已成为最常见用来测定兴趣蛋白(诱饵蛋白)是否结合新蛋白质的方法之一。目的蛋白溶液过柱后,猎物蛋白会结合于琼脂珠或GST本身,洗脱结合物后通过 SDS-PAGE 电泳分析^[17]。

1.5.2 优缺点 GST-pull down 是在体外直接验证蛋白质-蛋白质相互作用的最常见的方式,能验证与已知融合蛋白质相互作用的未知蛋白并且能验证两已知蛋白质之间是否存在相互作用。该方法特异性较强,能减少一定的假阳性率^[18]。但该方法不适用于大规模筛查相互作用的蛋白,除此之外,活性融合蛋白的量及避免内源性诱饵蛋白干扰是该方法成功的关键^[19]。

1.5.3 应用 Rab5 蛋白是所有的真核细胞早期内涵体融合和内吞作用的主要调节器。Qi 等^[19]进行 Rab5 活性测定,采用 GST 融合蛋白结合 Rab5 效应器如 Rabaptin-5 或 Rabenosyn-5,证实 EEA1 特异结合 GTP 结合的 Rab5。

1.6 Far-Western blotting Far-Western Blotting 是研究蛋白质-蛋白质相互作用的一种简便方法,是将目标蛋白(猎物蛋白)固定在膜上,然后用非抗体蛋白(诱饵蛋白)检测。此方法检测蛋白质基于蛋白质探针结合位点的存在或缺失。当特定的模块化蛋白结合结构域作为探针时,这种方法可以用来研究蛋白质间相互作用,如参与信号转导的生物过程特性,包括翻译后修饰调节作用^[20]。

1.7 蛋白质芯片 蛋白质芯片是指将蛋白质或多肽等固定于支持介质表面,用于样品成分和蛋白质之间相互作用的分析^[21],具有高通量、高信噪比等特点,可有效减少药物研发周期并提高医疗诊断效率。目前存在的问题是如何高通量地制造纯化高亲和性的探针^[22]。

1.8 双分子荧光互补 原理是将荧光蛋白在特定的位点切开,形成不发荧光的 N 和 C 端 2 个多肽,2 个片段在细胞内共表达或体外混合时,不能自发组装成完整的荧光蛋白。但是,当这 2 个荧光片段分别融合到一组有相互作用的目标蛋白上,由于目标蛋白质的相互作用重新构建成完整的具有活性的荧光蛋白分子,受到激发后发射出特定波长荧光,可以快速、直观地检测目标蛋白是否具有相互作用^[23-24]。

2 生物物理学研究技术

2.1 荧光共振能量转移 荧光共振能量转移原理是两种蛋白质(bait 蛋白,prey 蛋白)分别缀合有供体和受体荧光团,当它们彼此相互作用,且距离比 100 Å (10 nm)更接近时,则可诱导 FRET 信号^[25]。FRET 结合显微镜使用,具有高时间和空间分辨率,可检测特定的亚细胞组分来研究蛋白相互作用的动力学。FRET 显微镜技术已成为检测体内两蛋白直接结合的相互作用的有力手段^[26-27]。

2.2 表面等离子共振分析 当入射光的光子撞击金属表面时发生表面等离子体共振(SPR)。在一定入射角时,部分光能可通过金属涂层与金属表面层的电子相耦合,从而达到激发态,这种电子运动被称为等离子体。在 SPR 生物传感器中,探针首先被固定到传感器表面。当目标分子的溶液流入并与该表面相接触,探针-靶点通过亲和相互作用相结合时,会引起 SPR 传感器表面折射率的增加,导致共振角的改变,通过软件检测处理这些信号从而得到最终分析结果。该技术具有测量灵敏度高,无需标签修饰,实时高效测定相互作用等特点^[28]。利用 SPR 生物传感器等研究可以应用于如下方面:(1)SPR 对特定的生物样本的最有效的亲和分离所需的固定化条件的选择。(2)SPR 结合质谱法进行蛋白质

鉴定。(3)基于 SPR 的固定化配体蛋白的鉴定以及相互作用的验证^[29]。

2.3 其他 原子作用力显微技术、等温滴定热分析技术、核磁共振谱分析技术、荧光偏振实验技术等相关技术各具其特性,丰富了生物物理学在分析蛋白相互作用中的方法。

3 生物信息学研究技术

蛋白质之间要发生相互作用必须要有相应的结构基础,包括接触面的互补性、结合特异性和亲和力等^[30]。生物信息学技术,包括蛋白质结构数据和结构预测等方法可以来预测蛋白质相互作用。主要方法有同源建模、多体串线法和计算机模拟分子对接等。

4 展望

蛋白质相互作用及作用网络已成为越来越热门的课题。目前各种研究方法均有优势与不足。相信通过对现有技术的改进、不同技术的结合以及新技术的创新,将会使蛋白质相互作用研究越来越丰富、准确。

参考文献:

- [1] Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Rezaei-Tavirani M, et al. Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases[J]. Gastroenterol Hepatol bed to bench, 2014,7(1):17
- [2] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989,340(6230):245
- [3] Maple J, Möller S G. Yeast two-hybrid screening[J]. Methods Mol Biol, 2007,362(362):207
- [4] 吴娟,钱凯,杨泽峰. 酵母双杂交系统的研究进展[J]. 安庆师范学院学报:自然科学版, 2005,11(2):59
- [5] 崔红军,魏玉清. 酵母双杂交系统及其应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015,43(13):45
- [6] Yu Y, Li Y, Zhang Y. Screening of APP interaction proteins by DUALmembrane yeast two-hybrid system[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015,8(3):2802
- [7] Li Y. The tandem affinity purification technology: an overview[J]. Biotechnol Lett, 2011,33(8):1487
- [8] Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration [J]. Nat Biotechnol, 1999,17(10):1030
- [9] Völkel P, Le Faou P, Angrand P O. Interaction proteomics: characterization of protein complexes using tandem affinity purification-mass spectrometry[J]. Biochem Soc Trans, 2010,38(4):883
- [10] 吴丽民,刘美龙,刘丽华. 串联亲和纯化(TAP)技术的研究进展[J]. 海峡药学, 2009,21(1):1
- [11] Campden R, Pétrin D, Robitaille M, et al. Tandem affinity purification to identify cytosolic and nuclear gB γ -interacting proteins[J]. Methods Mol Biol, 2015,1234(1234):161
- [12] Pande J, Szewczyk M M, Grover A K. Phage display: concept, innovations, applications and future[J]. Biotechnol Adv, 2010,28(6):849
- [13] 孟繁梅,张朝辉,艾云灿. 噬菌体展示技术系统发展进展[J]. 遗传, 2011,33(10):1113
- [14] Roncolato E C, Campos L B, Pessenda G, et al. Phage display as a novel promising antivenom therapy: a review[J]. Toxicon, 2015,93(93):79
- [15] Takahashi Y. Co-immunoprecipitation from transfected cells [J]. Methods Mol Biol, 2015,1278(1278):381
- [16] 涂占哈,林旭. 蛋白质相互作用研究的常用方法进展及比较[J]. 中国当代医药, 2012,19(14):18
- [17] Luo L, King N P, Yeo J C, et al. Single-step protease cleavage elution for identification of protein-protein interactions from GST pull-down and mass spectrometry[J]. Proteomics, 2014,14(1):19
- [18] Wissmueller S, Font J, Liew C W, et al. Protein-protein interactions: analysis of a false positive GST pulldown result[J]. Proteins, 2011,79(8):2365
- [19] Qi Y, Liang Z, Wang Z, et al. Determination of Rab5 activity in the cell by effector pull-down assay[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1298(1298):259
- [20] Jadwin J A, Mayer B J, Machida K. Detection and quantification of protein-protein interactions by far-western blotting[J]. Methods Mol Biol, 2015,1312(1312):379
- [21] 陈艺心,赵树铭. 蛋白质芯片构建技术的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013,34(8):989
- [22] Liao W, Guo S, Zhao X S. Novel probes for protein chip applications [J]. Front Biosci, 2006,11(11):186
- [23] 沈珂,吴群英,蒋晓山. 双分子荧光互补技术在蛋白质相互作用研究中的应用[J]. 中国医学创新, 2015,330(12):132
- [24] Miller K E, Kim Y, Huh W K, et al. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis: advances and recent applications for Genome-Wide interaction studies[J]. J Mol Biol, 2015,427(11):2039
- [25] Sinha C, Arora K, Moon C S, et al. Förster resonance energy transfer—an approach to visualize the spatiotemporal regulation of macromolecular complex formation and compartmentalized cell signaling[J]. Biochim Biophys Acta, 2014,1840(10):3067
- [26] Mattheyses A L, Marcus A I. Förster resonance energy transfer (FRET) microscopy for monitoring biomolecular interactions [J]. Methods Mol Biol, 2015,1278:329
- [27] Sun Y, Rombola C, Jyothikumar V, et al. Förster resonance energy transfer microscopy and spectroscopy for localizing protein-protein interactions in living cells[J]. Cytometry A, 2013,83(9):780
- [28] Nguyen H H, Park J, Kang S, et al. Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications [J]. Sensors (Basel), 2015,15(5):10481
- [29] Ivanov A S, Medvedev A E. Optical surface plasmon resonance biosensors in molecular fishing[J]. Biomed Khim, 2015,61(2):231
- [30] 黄浩,陈临溪. 生物信息学方法在预测蛋白质相互作用中的应用[J]. 中国医学创新, 2010(36):179

(2015-08-05 收稿)