



蛋白的互作验证研究方法简述

殷一航, 范榕珊, 梅宝霞, 刘晓铃, 马平安, 段柳

武湖北大学生命科学学院

摘要

蛋白质相互作用网络是高等生物系统的一个关键的特征。这些互作网络对细胞功能有着至关重要的作用, 通过对目标蛋白质互作网络的挖掘, 明确互作蛋白的性质和方式, 有利于理解目标蛋白在互作网络中的角色和作用方式。通过酵母双杂交筛选库实验针对重要蛋白进行研究并获得可能互作的蛋白质, 对其进行后续蛋白互作验证研究, 可明确其是否真实互作。这些研究将有利于理解蛋白的功能及其发挥功能的方式, 为后续该蛋白的应用提供理论支持和科学基础。因此, 本文针对蛋白的互作研究方法进行综述。

关键词: 蛋白互作; 酵母双杂交; 双分子荧光互补

1. 前言

全球物种繁多, 其中动植物与人类的关系尤其紧密。近年来, 随着科学的发展以及研究的深入, 人们正在努力挖掘动植物及人类的遗传信息, 并且开始深入研究它们的蛋白质组成及其对于生物的重大作用。探索蛋白的作用机制有利于理解蛋白的功能, 有助于开发耐逆植物品种、提高农业生产的稳定性和可持续性。此外, 研究人类和动物蛋白质功能, 有利于阐明疾病机理, 进行新药研发等。

1.1. 蛋白质互作的概念

蛋白互作是指在细胞内, 两个或多个蛋白质分子之间发生相互作用, 形成稳定的复合物, 共同参与生物的生长、发育、生理和代谢等生命活动。细胞接受外源或内源的信号, 经由其特有的信号途径

调节基因的表达, 从而维护和改变自身的生理机能。在这个过程中, 蛋白质占有很重要的地位, 它可以参与机体的内部调节, 促进和发挥多种生理功能。虽然有一些蛋白质可以通过单体的形式发挥作用, 但是大部分蛋白质都是和分子伴侣或是与其他蛋白质形成复合物来发挥作用的。

1.2. 蛋白质互作研究的意义

蛋白质的互作研究具有十分重要的生物学意义。一方面, 蛋白互作的研究有助于揭示生物生长发育的分子机制。例如, 研究发现, 生物激素信号传导过程中的蛋白质互作网络对于其生长发育的调控起着关键作用^[1]。另一方面, 植物蛋白互作在植物抗逆性研究中也具有重要意义。植物在面对生物和非生物逆境, 可以通过蛋白质互作来调节自身的生理和代谢过程, 从而提高抗逆性。通过蛋白互作来揭示抗逆蛋白与其他分子之间的相互作用关系及其形成的复杂调控网络, 有助于阐明植物如何感知并响应不

DOI: 10.14218/MRP.2024.10031

通讯作者: 段柳 Email: duanliu@hubu.edu.cn

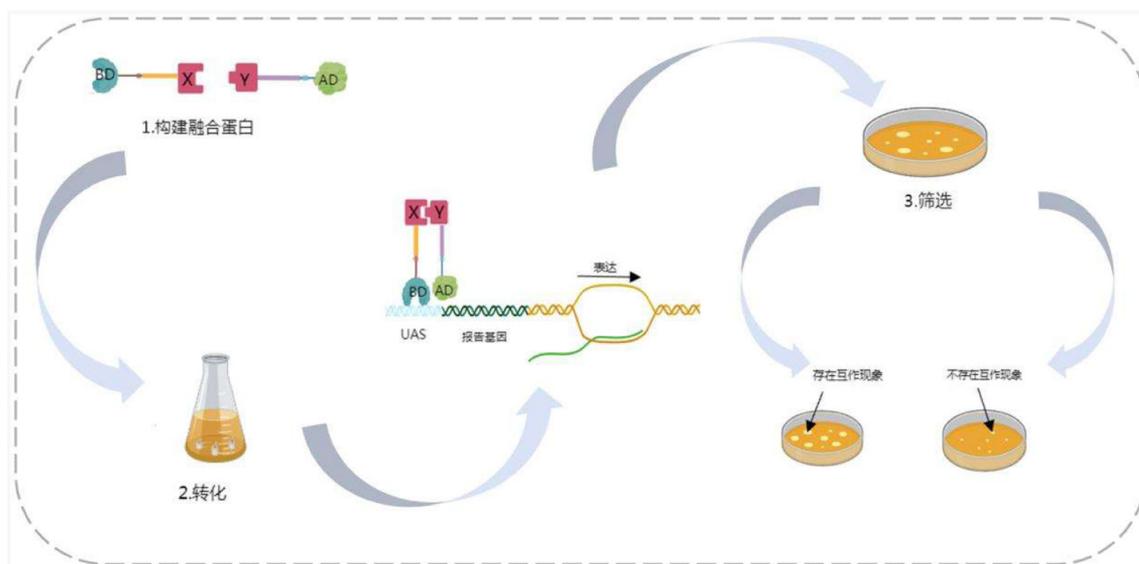


图1 酵母双杂交流程图

同的逆境信号，识别植物逆境响应中的信号通路及其调控逆境应激的机制，揭示抗逆蛋白在这些网络中的特定功能和整体调控机制。近年来，大规模的蛋白质组及蛋白互作网络的研究已经取得了一定的进展。2020年，一项研究系统地测定了13种不同植物的蛋白质复合物，鉴定并定量分析了超过2百万个蛋白质，大大拓宽了已知的植物中稳定蛋白质复合物的种类，并建立起一个庞大的蛋白互作网络^[2]。研究发现，植物抗病蛋白互作网络在植物抗病过程中起着重要作用^[3]。植物蛋白互作研究还有助于农作物病虫害的防治。例如，本氏烟中与RGSV P5互作的蛋白的筛选，为水稻草状矮化病毒病的防治提供了新的思路^[4]。此外，蛋白质互作研究在动物科学中的应用也已经非常广泛，涵盖了动物繁殖、营养、遗传育种和疾病防治等多个方面，对人类生活具有重要意义，特别是在提高畜牧产品质量和数量方面。还有多项研究表明人类的蛋白质互作研究有助于深入理解传染病的机理、多基因疾病的靶向治疗以及蛋白质分子作用机制^[5]。

因此，通过蛋白质互作研究，可为我们进一步进行目标抗逆蛋白质功能的深入研究提供基础，为农业生产和生态保护、畜牧业的产品质量和数量、人类的疾病研究等提供有力的科学支持。

2. 蛋白互作的常用研究方法

目前已经有多种研究蛋白互作的方法被开发出来，包括酵母双杂交法 (Yeast Two-Hybrid)、荧光素酶互补技术 (Luciferase Complementation Technology, LCA)、双分子荧光互补技术 (Bimolecular Fluorescence Complementation Technology, BiFC)、GST-pull down 技术，以及免疫共沉淀技术 (Co-Immunoprecipitation) 等是目前较常见的蛋白互作验证方法。根据不同方法的特点及适用范围，结合所要验证的蛋白质特性选择适合的验证技术尤为重要，也是实验成功的关键之一。以下将针对一些常见手段进行综述。

2.1. 酵母双杂交技术

酵母双杂交技术是一种用于研究蛋白质之间相互作用的有效方法。1989年，Fields和Song^[6]发明了酵母双杂交技术，通过酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 检测蛋白质-蛋白质直接的相互作用。其原理是：转录因子 Gal4 含有两个不同功能域：N端的DNA结合域 (DNA-Binding domain, BD) 和C端的转录激活域 (transcriptional activation domain,

AD), 单独存在的 AD 或 BD 并不能激活转录反应, 二者只有在空间上相互靠近时才可以行使转录因子的功能。将待检测的 Y 蛋白与 AD 结合成融合蛋白, 该复合物称为“猎物”(prey), 同时将感兴趣的 X 蛋白与 BD 结合成融合蛋白, 称为“诱饵”(bait)。将表达“诱饵”和“猎物”的载体同时转化酵母细胞, 使得两个融合蛋白能够在同一酵母细胞内表达, 如果两个融合蛋白质能够相互作用, 在空间上 BD 结合域就可以和 AD 激活域相互靠近并形成功能完整的转录激活因子。BD 结构域识别并结合到报告基因上, AD 结构域激活报告基因的转录和表达。报告基因的表达通常对酵母细胞在选择性培养基上的生长至关重要。最常见的报告基因之一是草胺酸合成途径中的草胺酸转换酶 (HIS3) 基因。如果报告基因被激活表达, 那么该酵母细胞就能够在选择培养基中生长, 表明两个融合蛋白质发生了相互作用, 从而验证了目标蛋白 X 与待检测的 Y 蛋白能够互作。该技术的基本步骤如下:

酵母双杂交具有操作简单、成本低等优点, 同时可以检测稳定的和微弱的蛋白质相互作用。该技术的应用很快就扩展到了筛选基因库的领域, 使得研究者能够高通量地筛选蛋白质相互作用。酵母双杂交筛库技术的重要用途是从 cDNA 文库中筛选能与目的蛋白相互作用的未知蛋白^[7]。这些基因库可以来自特定生物体的 cDNA 库, 或者是已知蛋白质集合。该技术的发展推动了蛋白质相互作用研究的高通量和系统性, 目前在生物学实验中应用广泛, 可用于筛选互作蛋白、绘制蛋白质相互作用图谱、筛选药物靶标等。

在酵母双杂交技术的基础上还发展了多种适应不同目的需要的改型的双杂交技术。反向双杂交技术^[8]用于检测并鉴定出能阻断两个蛋白间相互作用的因子, 例如寻找某些结构域上的突变使相互作用中断或寻找某些分子阻断相互作用。三杂交技术^[9]可用于研究大分子物质对于蛋白质相互作用的影响, 例如: 激酶、RNA、多肽等。其实质与双杂交相同, 只是需要借助第三个分子的介导将两个杂交蛋

白聚合到一起。例如小配体三杂交系统就是借助具有渗透能力的二聚体化学诱导物, 将 AD 和 BD 融合蛋白交接到一起, 激活报告基因的表达。核外双杂交技术用于检测核外蛋白之间的相互作用。此外, 1998 年 Stagljar 等开发出了基于分裂泛素的遗传系统, 用于分析体内膜蛋白之间的相互作用^[10]。由于在真核细胞中部分蛋白质位于膜上, 所以传统酵母双杂交系统很难检测蛋白互作, 而膜酵母双杂交系统主要是基于体内重组泛素进行加工检测的泛素分裂法。蛋白发生相互作用, 泛素进行重组, 蛋白裂解, 转录因子得以释放, 从而激活基因的表达, 可以利用该系统来检测膜蛋白之间的相互作用。1997 年 Aronheim 发明的 SRS 系统 (SOS recruitment system)^[11], 不仅可以检测出膜蛋白的相互作用, 还可以用来检测分泌蛋白与膜蛋白之间的相互作用, 并且很大程度上降低了假阳性的概率。

然而, 酵母双杂交技术也存在缺点, 如需要制备重组蛋白、可能存在假阳性、假阴性结果等。未来, 随着科学技术的不断发展, 实验仪器的不断更新, 研究方法的不断完善, 酵母双杂交将会得到更多的应用和改进。酵母双杂交技术及其衍生技术在蛋白质组学、信号分子网络、筛选药物靶点等方面发挥越来越重要的作用, 促进科学研究的进程。总的来说, 酵母双杂交是一种强大的工具, 可以帮助人们更好地理解蛋白质的相互作用和细胞生命活动的过程。

2.2. 荧光素酶互补技术

荧光素酶互补技术是将荧光素酶 (luciferase, luc) 拆分成没有活性的 N 端部分 (N-terminal fragment, Nluc) 和 C 端部分 (C-terminal fragment, Cluc)。荧光素酶是一种荧光标记蛋白质, 两个分割的部分单独存在时不能产生可测量的荧光信号, 但如果将它们分别与两个存在相互作用的蛋白融合在一起, 并将这两个融合蛋白质通过转染、转化或其他适当的方法导入细胞中使其表达, 若两个待测的融合蛋白质相互作用, 荧光素酶的 Nluc 和 Cluc 片段

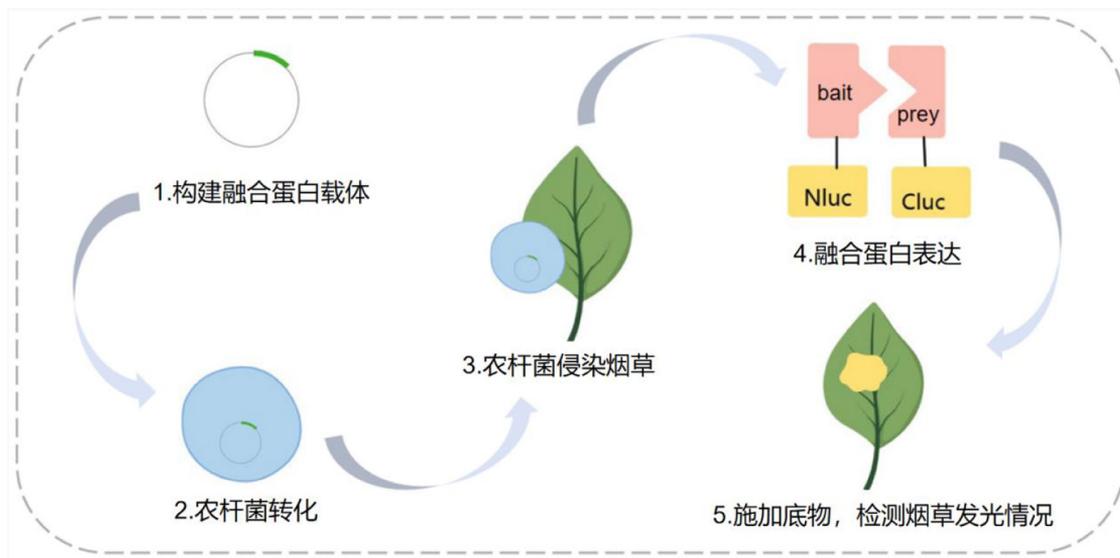


图2 荧光素酶互补流程图

会靠近彼此，促使荧光素酶的两个片段重新组合形成完整的酶，能够催化荧光素底物的反应，产生荧光信号，荧光信号的强度可直接反映融合蛋白质的相互作用强度^[12]。常用的荧光素酶有两种，一种是海肾荧光素酶，以腔肠荧光素作为底物，一般会发蓝光；另一种是萤火虫荧光素酶，其底物是D-荧光素，一般产生黄光到红光。在荧光素酶的催化作用下，底物会被氧化，发出荧光^[13]。不同的荧光素酶具有不同的特性，如发光波长、光稳定性等，因此选择合适的荧光素酶通常取决于实验的具体要求。常把该技术与烟草瞬时表达系统相结合，通过活体成像系统和发光检测仪等进行定性定量分析。基本步骤如下：

这种方法的优势在于其实时性、灵敏性和可定量性，可以检测蛋白互作的动态变化，并且不受植物体内叶绿体等细胞结构产生的自发荧光影响^[14]。此外，荧光素酶互补技术是一种非破坏性的方法，通常在活细胞中进行，不需要破坏细胞或组织结构即可观察，有助于保持生物系统的自然状态。除了研究蛋白质相互作用外，荧光素酶互补技术还可用于研究蛋白质定位、蛋白质构象变化等多个方面。目前已有学者运用荧光素酶互补技术鉴定了水稻中锌指蛋白OsC3H54的互作蛋白，发现锌指蛋白OsC3H54与乙烯信号通路蛋白OsEIL3之间的强相

互作用关系，为解析锌指蛋白调控水稻生命活动的机制提供了基础^[15]。该方法有利于验证从酵母双杂交分析中收集的蛋白质相互作用组数据。

2.3. 双分子荧光互补技术

双分子荧光互补技术本质上与荧光素酶互补实验类似，通过利用荧光蛋白的两个片段的互补性实现。在荧光蛋白的两个 β 片层间的环状结构上，存在着多个特异性位点，可以在保证荧光蛋白活性的前提下插入所需的外源蛋白，BiFC就是基于这一特性，寻找合适的位点切割荧光蛋白，将其拆分成没有荧光的N-端和C-端，并且分别使其与目标蛋白融合表达。若目标蛋白间存在互作关系，则N-端和C-端片段相互靠近形成完整的荧光基团，荧光活性得以恢复，从而在激发光的激发下发出荧光；反之，则无荧光。Sung等人^[16]设计并构建了一系列含有黄色荧光蛋白片段的酿酒酵母表达载体，并利用双分子荧光互补技术分析，证实了Sis1与Sis1、Net1与Sir2、Cet1与Cet1以及Pho2与Pho4之间存在相互作用。该技术与LCA主要区别在于荧光素酶互补是根据被拆分成两部分的酶蛋白是否能靠近并恢复活性，进而催化底物荧光素发光来验证蛋白质互作，

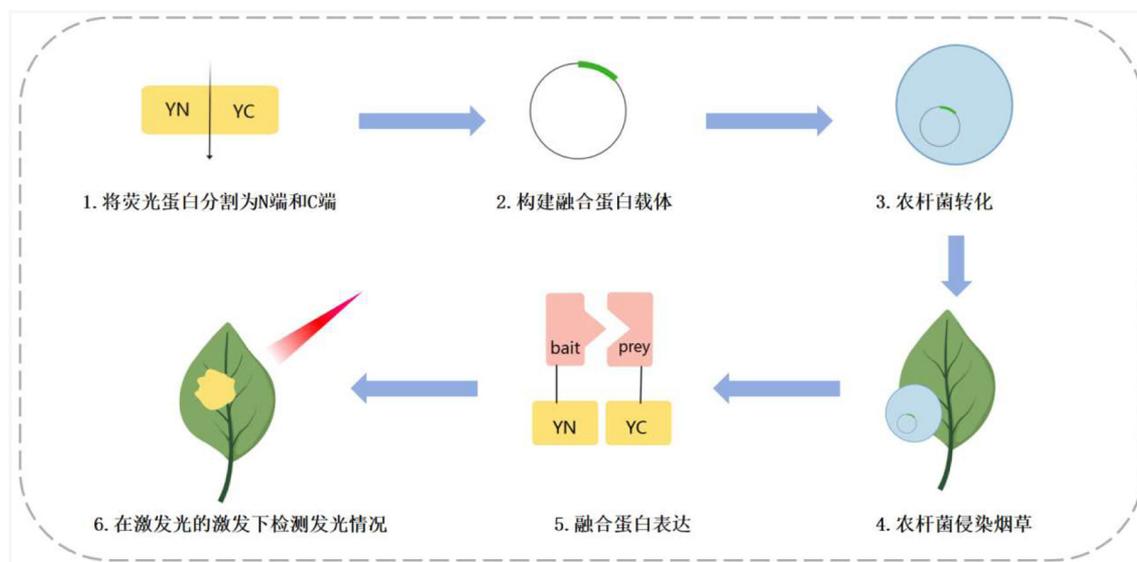


图3 双分子荧光互补流程图

而 BiFC 是直接根据被拆分成两部分的荧光蛋白能否靠近互补并在激发光的刺激下本身发光。BiFC 的操作流程与 LCA 基本相同。基本步骤如下：

与 LCA 一样，荧光信号也能够定位活细胞中发生相互作用的目标蛋白，允许实时和动态地监测蛋白质相互作用。同时，BiFC 允许定量测量荧光信号的强度，以此评估蛋白质相互作用的程度。此外，BiFC 技术可用于研究蛋白质在细胞中的定位，包括亚细胞结构内的位置。目前，BiFC 也被广泛应用于植物抗逆蛋白的互作验证中。近年来有研究通过 BiFC 技术验证了斯里兰卡木薯花叶病毒 AC2 与拟南芥 SGS3 蛋白的互作关系，表明二者之间的相互作用可能是斯里兰卡木薯花叶病毒感染拟南芥的分子基础^[17]。还有科研人员利用该技术筛选了葡萄 VvGCN5 基因的互作蛋白，并能以此进一步探究葡萄成熟茎、心皮、种子中的信号调控机制^[18]。

2.4. GST-pull down

GST-pull down 技术是常用的体外检测互作蛋白的手段，其技术的原理是将诱饵蛋白与 GST 融合，将构建好的表达载体导入宿主细胞（通常是大肠杆菌），使其表达 GST-诱饵蛋白质融合蛋白。融合蛋

白通过亲和层析等技术纯化，与谷胱甘肽亲和树脂结合，固定于其上。与此同时，从含有潜在相互作用的猎物蛋白质的细胞或组织中制备总细胞提取物，与固定到谷胱甘肽亲和树脂的 GST-诱饵蛋白质融合蛋白共同孵育时，融合蛋白便可吸附与它有相互作用的猎物蛋白，再通过离心或洗涤的方式除去非特异性结合的蛋白质，最后通过 SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)或质谱分析所得到的蛋白，检测 GST-诱饵融合蛋白质是否成功地拉下 (pull down) 了与之相互作用的目标猎物蛋白质。该技术基本步骤如下：

GST-pull down 是一种相对简单的技术，易于操作，可以在同一实验中验证多个潜在的蛋白质相互作用。这种技术通常是体外实验，不需要使用活细胞，有助于研究特定蛋白质相互作用的生物化学性质，但无法完全模拟体内的生物环境，可能会忽略细胞内的复杂调控机制，无法提供关于蛋白质相互作用的动态过程信息。目前有学者利用该项技术筛选并验证了小麦类甜蛋白 TaTLP1d 的互作蛋白，证明了该蛋白对小麦抗叶锈病的防御有显著影响^[19]；赵杰等研究人员利用 GST-pull down 技术筛选毛白杨天冬氨酸蛋白酶 PtoAED3 的互作蛋白，为研究毛白杨的生长发育机制指出了初步方向^[20]。

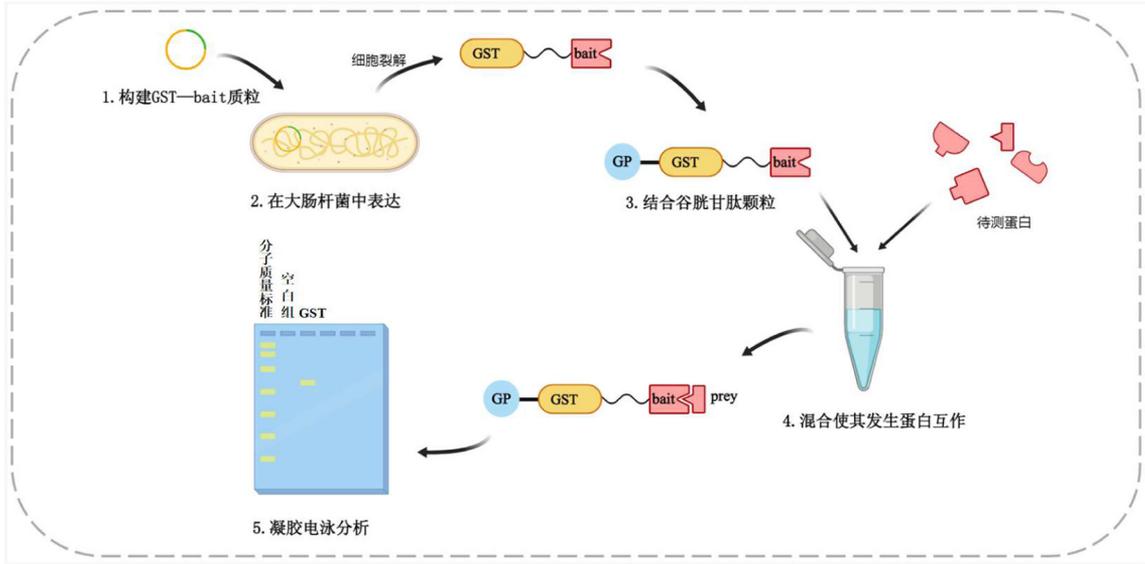


图4 GST-pull down 流程图

2.5. 免疫共沉淀

免疫共沉淀技术广泛应用于许多研究领域，该技术的基本原理是基于抗原、抗体的专一性，通过使用与目标蛋白具有高度亲和力的特异性抗体，从细胞或者组织提取的总蛋白混合物中捕获目标蛋白，经过沉淀、洗涤、洗脱等步骤得到共沉淀的蛋白质样品，间接捕获与目标蛋白发生相互作用的蛋白。再通过 Western blot、质谱鉴定等分析技术对沉淀下

来的蛋白质进行检测，确定蛋白质之间的相互作用。Co-IP 一般经历以下步骤：

通过免疫共沉淀来验证蛋白互作的优势在于它利用抗原、抗体之间的专一性作用这一原理来验证蛋白互作，检测过程是在纯自然状态下进行，很大程度上避免了人为因素的干扰，并且可以直接得到天然状态下相互作用的蛋白复合物，提供了有关生物体内相互作用的信息。此外，免疫共沉淀技术不仅能够富集单个蛋白质，还可用于富集整个蛋白质复

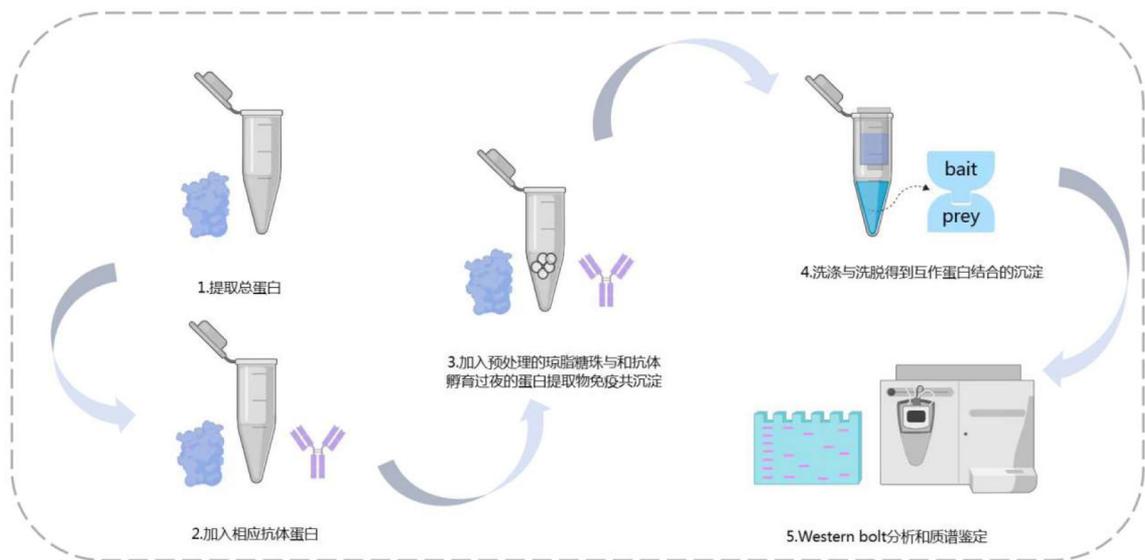


图5 免疫共沉淀流程图

合物。但该方法也具有一定的局限性，比如不合适的抗体可能导致假阳性或假阴性，或者丢失一些弱相互作用的互作蛋白。免疫共沉淀技术目前在蛋白质研究领域中得到广泛应用，特别是共沉淀结合蛋白质组学分析，可以有效筛选和鉴定新的相互作用蛋白质和确定细胞内蛋白-蛋白的相互作用，Phee等用该技术鉴定了拟南芥中的光敏色素相互作用蛋白的潜在互作蛋白^[21]。我国研究人员借助该技术筛选盐藻MAPK的互作蛋白，进一步探究了杜氏盐藻促有丝分裂原活化蛋白激酶(DsMAPK)的功能^[22]。

3. 小结

蛋白质不仅是生物体结构的重要组成部分，还对生物体内信号识别和传递、新陈代谢、遗传与变异起关键调节作用。一种蛋白质常常通过与其他蛋白发生相互作用来发挥其在生物体内的功能，因此蛋白质互作的研究为分析生物体内某些重要生理过程、探索和预测未知蛋白功能奠定了基础。本文综述了蛋白质互作研究中常用的几种方法，在真实世界的研究中，为了增加结果的可靠性、减少假阳性和假阴性的可能性，以及从不同角度全面了解蛋白质相互作用的特性，通常使用多种手段来同时验证蛋白的相互作用，提高特异性和实验结果的准确性，同时可以克服和弥补单一技术手段存在的局限性，获得体内外复杂生物学环境中的全面信息，提高实验结果的说服力。

参考文献

- [1] Altmann M, Altmann S, Rodriguez PA. Extensive signal integration by the phytohormone protein network. *Nature* 2020;583(7815):271-6.
- [2] McWhite CD, Papoulas O, Drew K. A Pan-plant Protein Complex Map Reveals Deep Conservation and Novel Assemblies. *Cell* 2020;181(2):460-474.e14.
- [3] 付振超, 史文炯, 闫建培, 李广悦, 任杰, 曾洪梅. 拟南芥AtCERK1在禾谷镰孢菌中互作蛋白的筛选. *植物病理学报* 2023.
- [4] 熊桂红, 胡显颀, 吴祖建. 利用酵母双杂交系统筛选本氏烟中与RGSV P5互作的蛋白. *江西农业大学学报* 2023;45(02):404-12.
- [5] 丁晓春, 陈维信, 李雪萍. 蛋白质相互作用试验技术研究进展. *福建农业学报* 2016;31(10):1131-1138.
- [6] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;340(6230):245-246.
- [7] 吴娟钱, 杨泽峰. 酵母双杂交系统的研究进展. *农业生物技术学报* 2005;(02):59-63.
- [8] Vidal M, Brachmann RK, Fattacy A. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(19):10315-10320.
- [9] SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(16):8496-501.
- [10] Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(9):5187-92.
- [11] Aronheim A, Zandi E, Hennemann H. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 1997;17(6):3094-3102.
- [12] 潘教文, 李丹, 吴建国, 李臻, 王庆国, 管延安, 刘炜. 荧光素酶互补法对谷子中SiPKS32/SiCaBP5的互作研究. *山东农业科学* 2018;50(10):1-5.
- [13] 张坤. 利用荧光素酶片段互补技术构建REGγ与α7相互作用抑制剂筛选系统. 华东师范大学 2016.
- [14] 陈艳. 拟南芥细胞自噬相关基因的荧光素酶互补检测研究. 湖南农业大学 2011.
- [15] 易勇. 水稻锌指蛋白OsC3H54互作蛋白鉴定. 长江大学 2021.
- [16] Sung MK, Huh WK. Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2007;24(9):767-75.
- [17] 刘雪婷, 谢秋贤, 刘琳玉, 符艳, 张秀春, 任艳利. 斯里兰卡木薯花叶病毒AC2与拟南芥SGS3蛋白互作研究. *热带作物学报* 2024;45(7):1323-1331.
- [18] 陈雪琴, 庞倩倩, 裴丹, 任艳华, 房经贵. 葡萄VvGCN5基因的鉴定及互作蛋白筛选. *南京农业大学学报* 2023;46(05):852-861.
- [19] 申松松, 冯燕, 孟麟硕, 王菲, 崔钟池, 马秋颖等. 小麦类甜蛋白TaTLP1互作蛋白的筛选及其与TaGF14的互作验证. *农业生物技术学报* 2023;31(07):1345-1356.
- [20] 赵杰, 王兵, 骆梅, 莫黎杰, 李慧, 刘迪等. GST-pull down技术筛选毛白杨天冬氨酸蛋白酶PtoAED3互作蛋白. *北京林业大学学报* 2021;43(05):64-74.
- [21] 赵焕之, 赵其平, 朱顺海, 王璐, 刘桂玲, 李志行等. 免疫共沉淀联合质谱技术筛选柔嫩艾美耳球虫钙依赖蛋白激酶3互作蛋白. *中国动物传染病学报* 2020;28(05):1-7.
- [22] 岳金荣, 丛玉婷, 邢震宇, 高相楠, 王明芳, 柴晓杰. 利用免疫共沉淀联合质谱技术筛选盐藻MAPK的互作蛋白. *核农学报* 2020;34(06):1187-1195.