

第五章 蛋白质纯化、鉴定及  
结构与功能分析-4

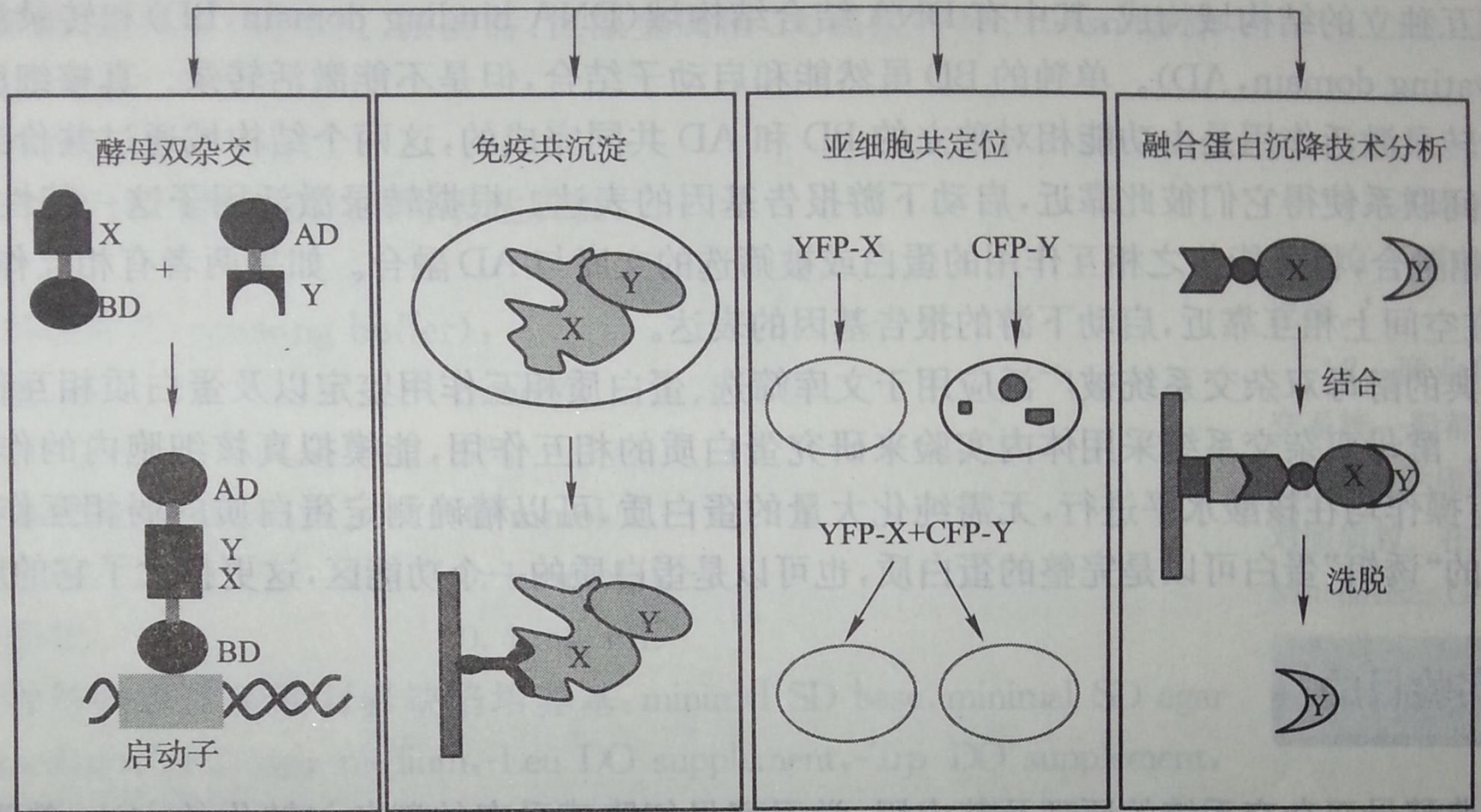
杜 芬

Email: [fen.du@whu.edu.cn](mailto:fen.du@whu.edu.cn)

# 蛋白质功能分析

1. 酵母双杂交；
2. 噬菌体展示技术；
3. 表面等离子共振技术；
4. 蛋白质芯片技术；
5. 细胞共定位技术；
6. 免疫印记技术；
7. 免疫共沉淀技术；
8. Pull-down技术；
9. 生物信息学；
10. 结构为基础的功能标识。

# 蛋白质与蛋白质相互作用研究



- ❁ 酵母双杂交系统: SOS招募系统, 新型, 可用于检测细胞质内相互作用蛋白, 不依赖转录激活
- ❁ 免疫共沉淀: 抗原和抗体特异性结合, 琼脂糖-蛋白A/G
- ❁ 蛋白质亚细胞定位: GFP, YFP, RFP, BFP, CFP, 结合Confocal技术
- ❁ 融合蛋白沉降技术(pull-down): GST, MBP, His
- ❁ 荧光共振能量转移
- ❁ 等温滴定微量热法

# 酵母双杂交技术

- **目的：** 利用杂交基因通过激活报告基因的表达，探测蛋白质-蛋白质的相互作用。
- **原理：** 酵母的GAL4转录因子的BD（1-147位氨基酸）和AD（768-881位氨基酸）：BD识别位于GAL4基因的上游激活序列，AD通过与转录复合体的其他成分作用。两个结构分开时分别具有功能，但分别作用不能够激活转录。

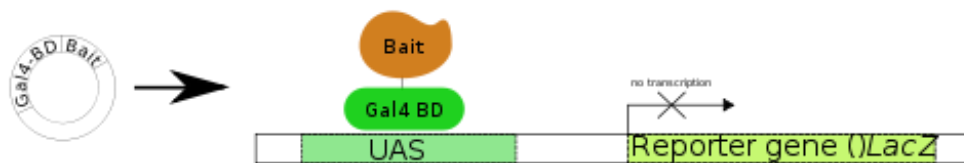
## ❁ 流程：

- (1) 将蛋白X与报告基因转录因子的特意BD融合，构建成诱饵表达载体；
- (2) 将蛋白Y基因与特异的AD融合，构建成猎物表达载体；
- (3) 两个重组体在同一酵母细胞中产生的融合蛋白是否激活报告基因的表达，来确定X蛋白和Y蛋白是否存在相互作用。

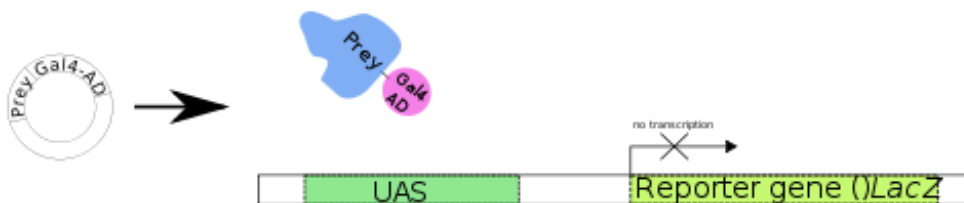
# 示意图



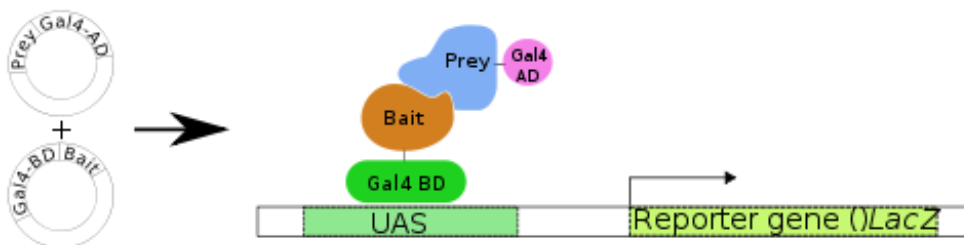
A. Regular transcription of the reporter gene



B. One fusion protein only (Gal4-BD + Bait) - no transcription

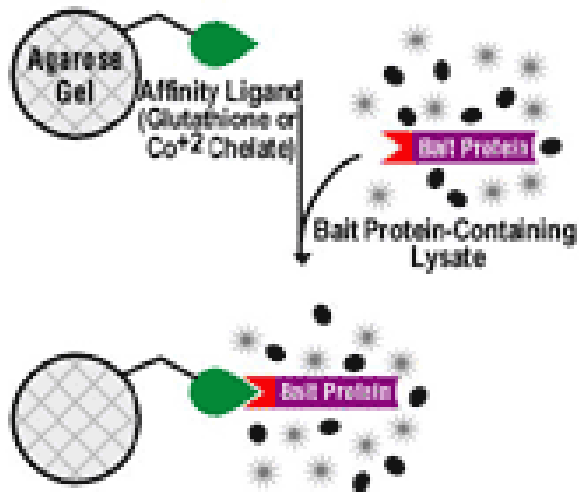


C. One fusion protein only (Gal4-AD + Prey) - no transcription



D. Two fusion proteins with interacting Bait and Prey

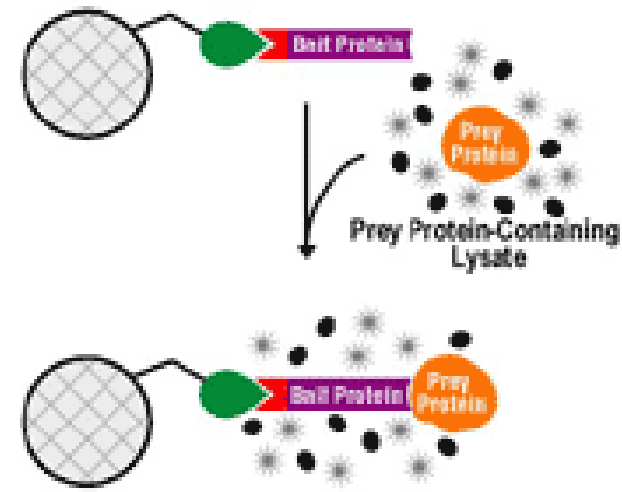
**Step 1.** Immobilize the fusion-tagged "bait" from the lysate.



**Step 2.** Wash away unbound protein.



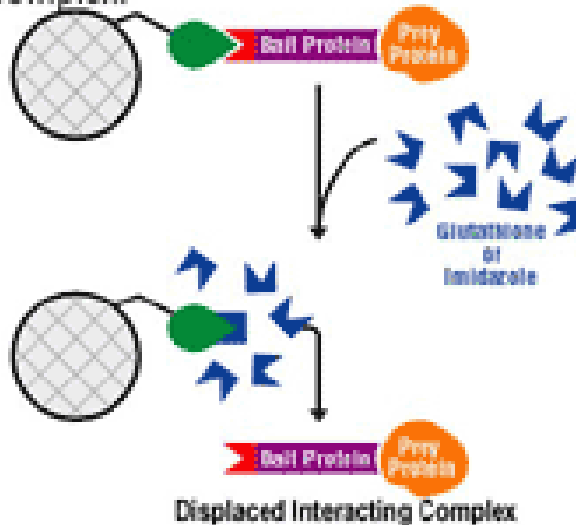
**Step 3.** Bind "prey" protein to immobilized "bait" protein.



**Step 4.** Wash away unbound protein.



**Step 5.** Elute protein:protein interaction complex.



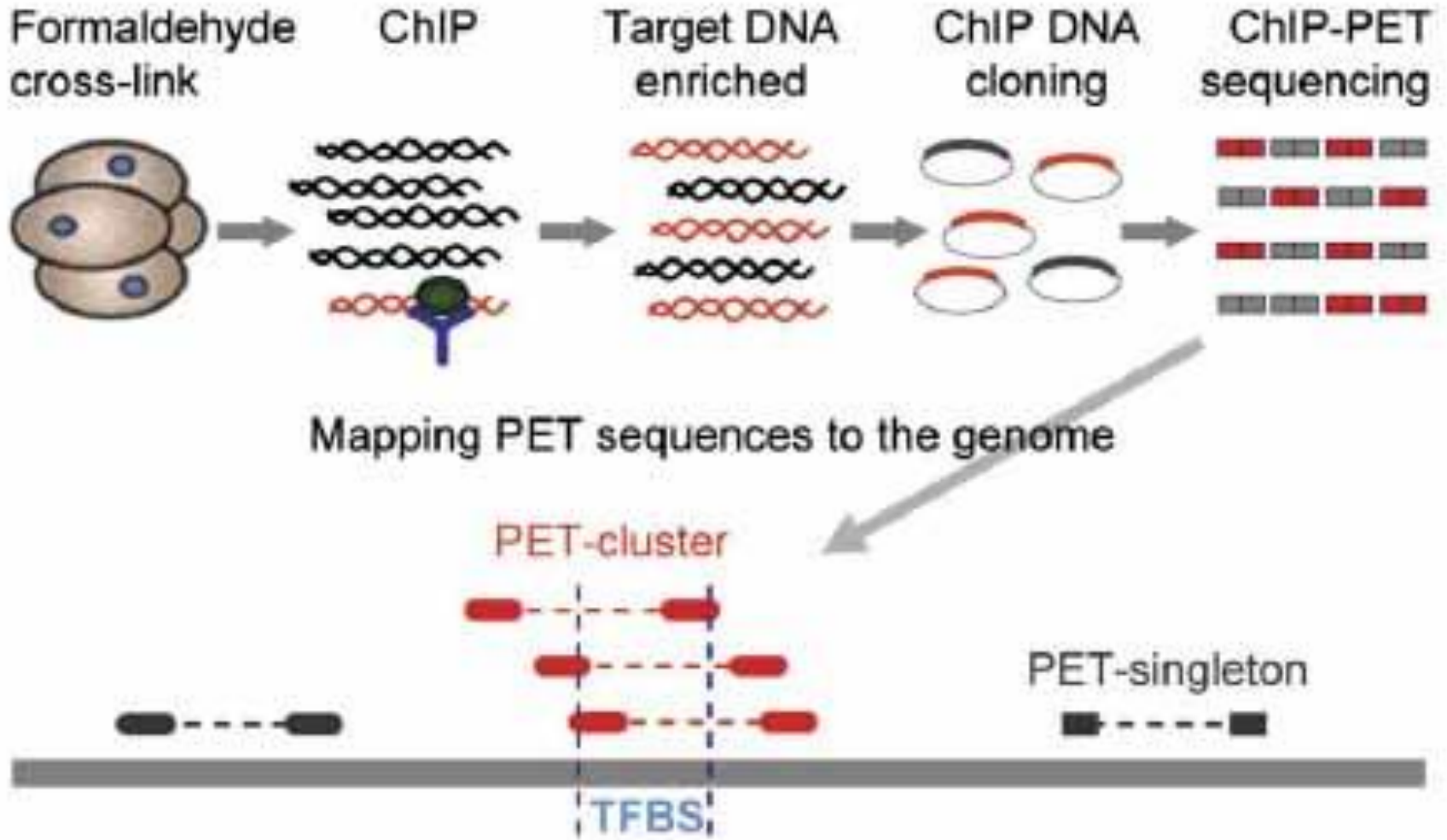
**Step 6.** Analyze protein:protein interaction complex on SDS-PAGE.



▶ = Fusion Tag (GST or polyHis)

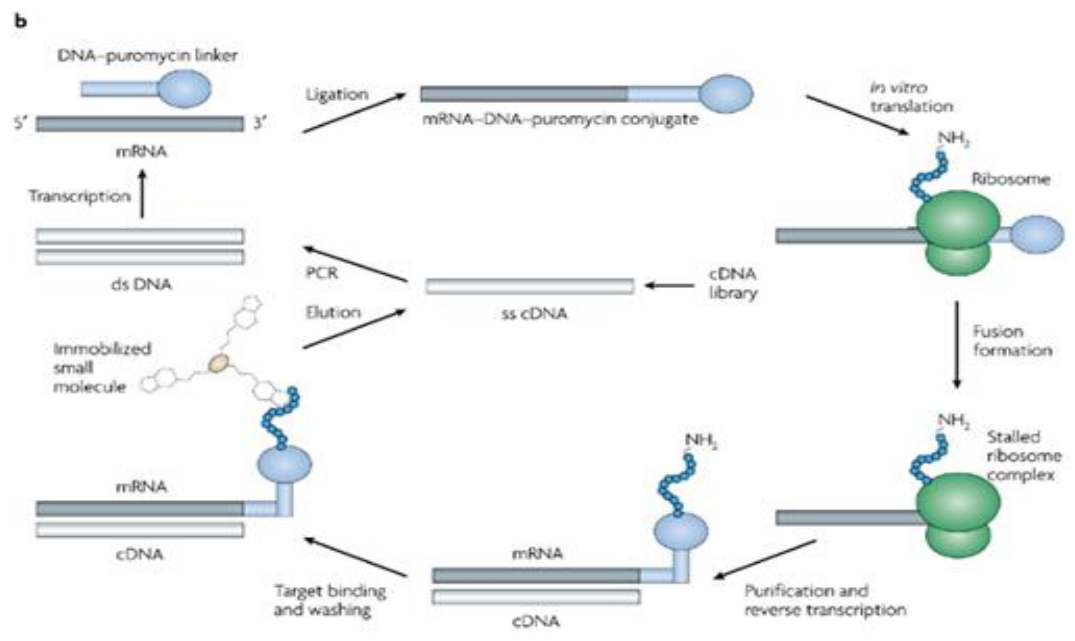
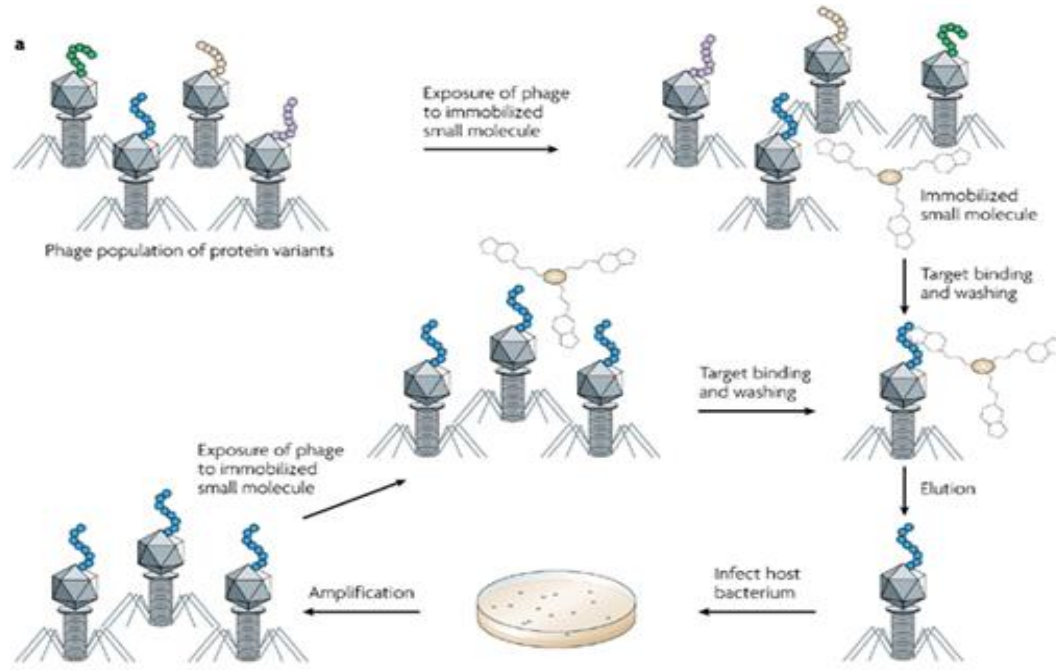


# 染色质免疫沉淀



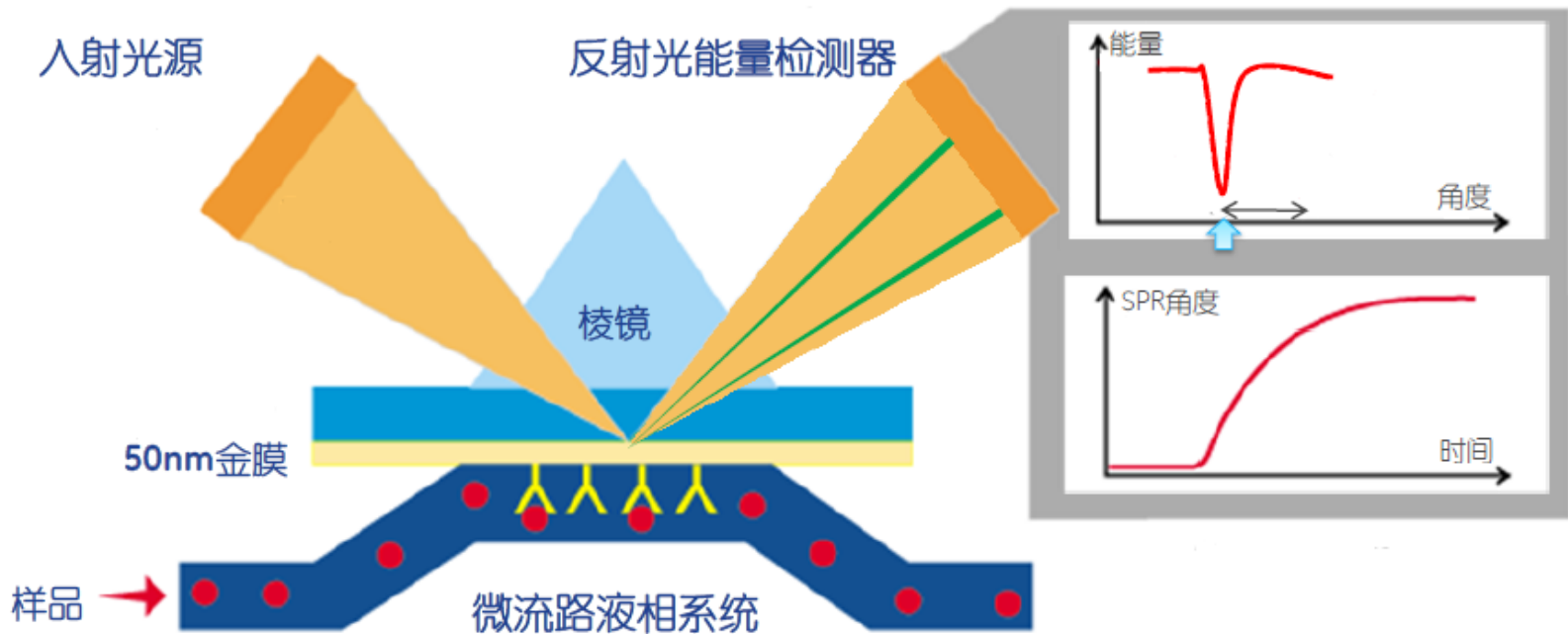
# 噬菌体展示技术

- ❁ **原理：** 在编码噬菌体外壳蛋白基因上连接一单克隆抗体的DNA序列，当噬菌体生长时，表面就表达出相应的单抗，再将噬菌体过亲和柱，柱上若含有目的蛋白，就与相应抗体结合。分离之后进行鉴定。
- ❁ **用途：** 研究蛋白质的相互作用。
- ❁ **优缺点：** 简便，高通量，可以直接得到基因、高选择性的筛选复合物、在筛选过程中通过适当改变条件可以直接评价相互结合的特异性等。



# 4.3 表面等离子共振 (SPR)

## 表面等离子共振原理 (SPR)



SPR 是一种折光率传感器

✓响应值反映了SPR角度的改变

✓响应信号依赖于芯片表面分子的浓度和温度

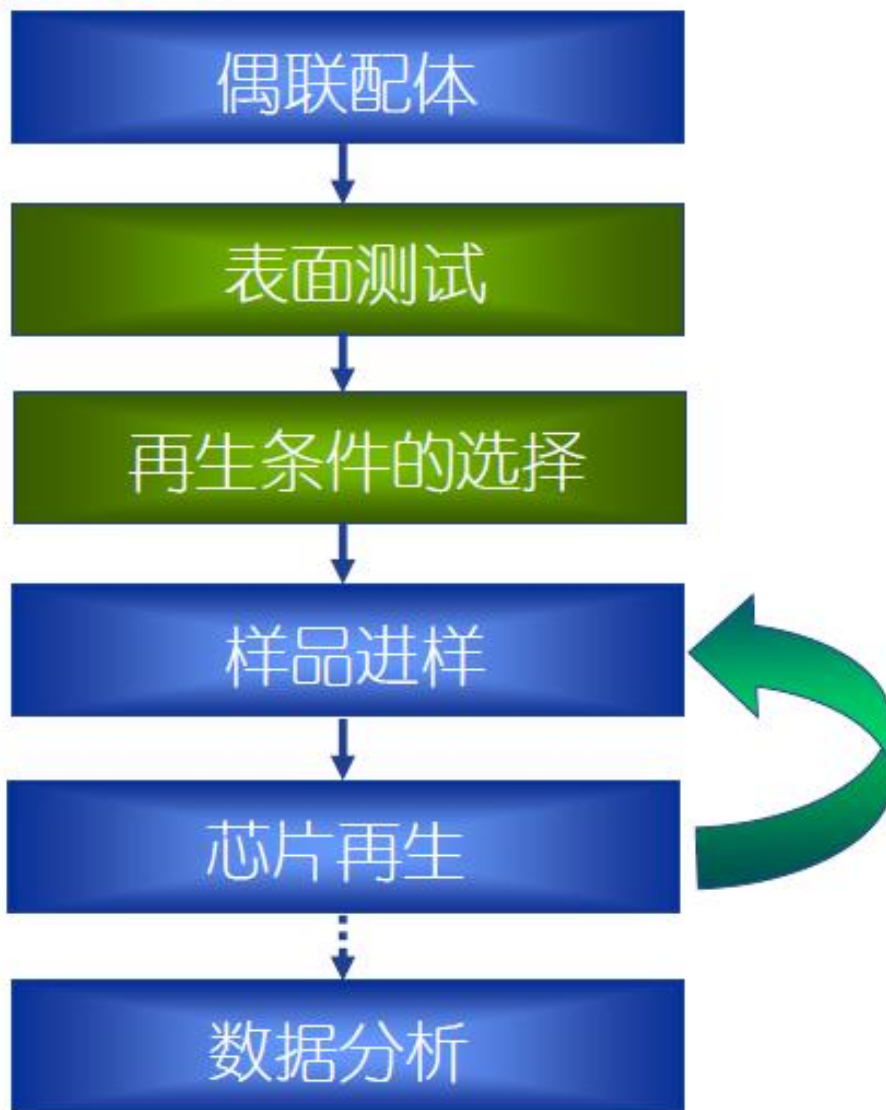
✓1RU的响应值大致上相当于芯片表面结合物质的浓度改变了 $1\text{pg}/\text{mm}^2$ (蛋白结合与CM5芯片)

# Biacore核心组件



# 3. 实验过程

实际实验中的额外考量





# Biacore的典型应用

- 特异性分析
  - 目标分子与靶分子之间是否发生结合？特异性如何？
- 多重结合分析
  - 哪些分子参与了复合体的形成？顺序是什么？
- 亲和力测定
  - 配体与分析物之间的结合强弱？
- 动力学分析
  - 两分子结合和解离的速率快慢？
- 浓度测定
  - 样品中的目标分子浓度高低？
- 热力学分析
  - 结合强弱、快慢的结构机理是什么？



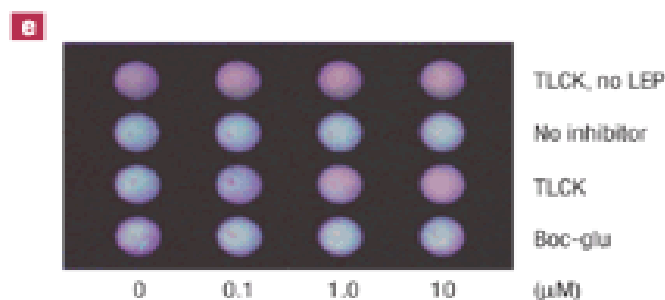
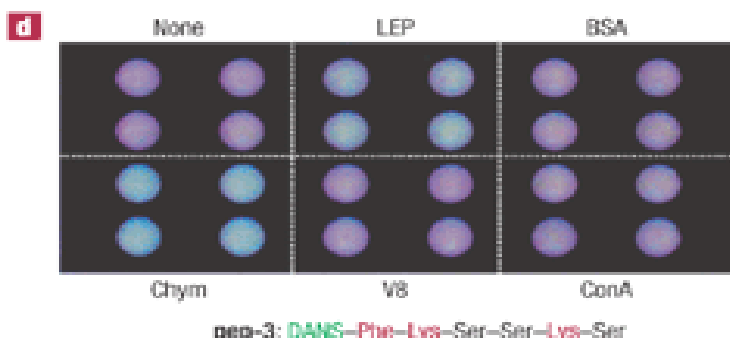
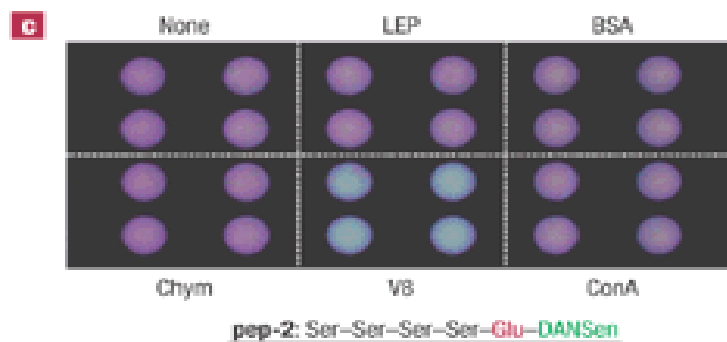
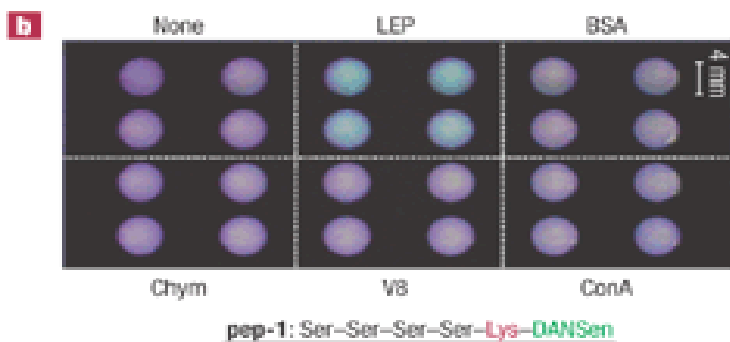
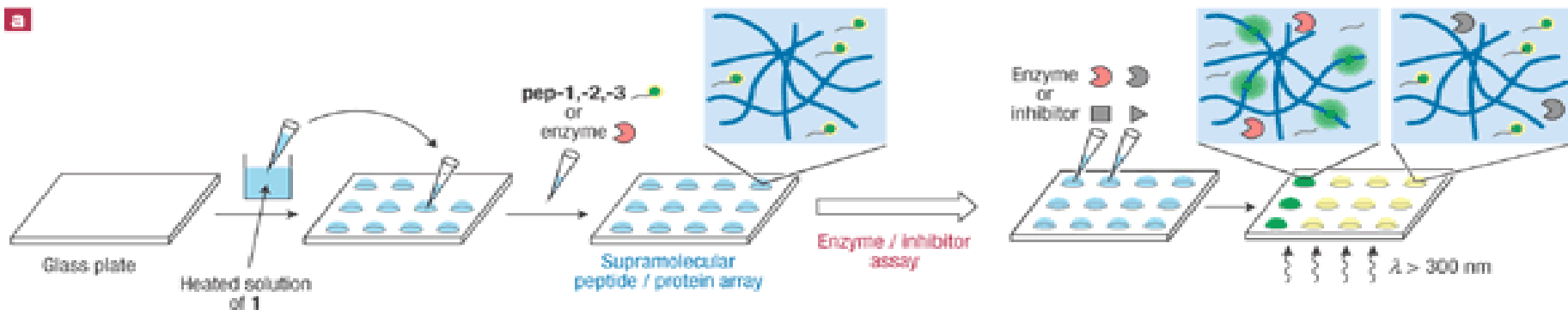
# 蛋白芯片技术

## (一) 原理和流程：

- (1) 将大量蛋白质分子按照预先设定的排列固定于载体（如滤膜等）表面形成微阵列；
- (2) 用标记了特定荧光的蛋白质或其他成分与芯片相互作用；孵育一段时间；
- (3) 漂洗去未能与芯片上的蛋白质互补结合的成份；
- (4) 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；
- (5) 比较荧光强度来分析蛋白质之间相互作用关系，可定性或者定量分析蛋白质。

(二) 蛋白质芯片技术是一种高通量、微型化和自动化的技术，可同时分析几百种乃至上千种蛋白质或多肽。





**a**, Preparation scheme of the supramolecular peptide/protein array. **b–d**, Fluorescent enzyme activity assay using a supramolecular hydrogel-based peptide chip. Conditions: [peptide] = 20  $\mu\text{M}$ , [gelator] = 0.25 wt% in 50 mM Tris buffer (pH 8.0) at room temperature. [enzyme or protein] = 0.5  $\mu\text{M}$ . **e**, Assay of LEP inhibitors using supramolecular hydrogel-based protein chip. Conditions: [LEP] = 1.0  $\mu\text{M}$ , [gelator] = 0.25 wt% in 50 mM Tris buffer (pH 8.5) at room temperature. [inhibitor] = 0, 0.1, 1.0, 10  $\mu\text{M}$ . [pep-1] = 40  $\mu\text{M}$ .

# 蛋白质芯片的应用

- (1) 临床检验及环境毒物检测所需的免疫检测和酶活性分析；
- (2) 高通量抗体筛选；
- (3) 蛋白质组学研究；
- (4) 研究生生物大分子的相互作用；
- (5) 蛋白质和小分子的相互作用；
- (6) 药物靶标及其作用机理的研究；
- (7) 疾病诊断；
- (8) 食品中有毒、有害物质的检测和分析；
- (9) 毒理学和卫生检验中；
- (10) 基因表达的筛选；

# 细胞共定位

(1) 无论是转染到细胞内的质粒过表达的蛋白质产物，还是细胞内源性的基因表达产物，在细胞内都会有特定的定位。蛋白质在细胞内的共定位，是蛋白质互相作用或者功能协同的一种体现方式。

(2) 有多种方法：

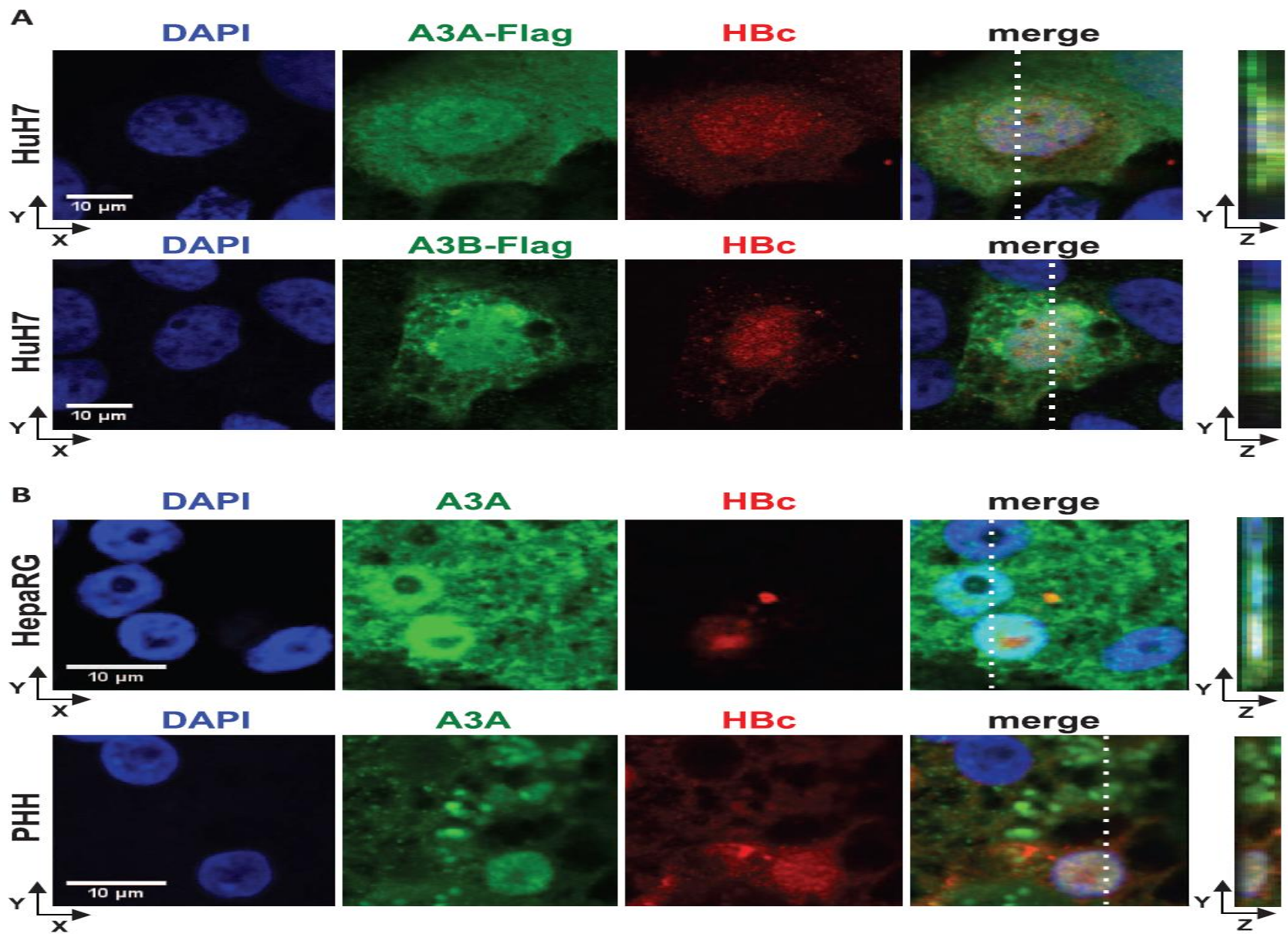
(i) 荧光蛋白融合技术；

(ii) 免疫荧光法；

(iii) 抽提细胞不同组分；

# 4.5.1 荧光蛋白融合技术

1. GFP和其变体在一定的光激发下，可以发出绿色的荧光，可用常用的投射荧光显微镜或者共聚焦显微镜下观察。
2. 如果蛋白质之间存在相互作用，那么他们在空间上可能有共同的细胞内定位或者一种蛋白的表达会影响到另一种蛋白的定位情况。为了确证，每一种蛋白的单一定位需要设置阴性对照。
3. 将GFP或者YFP等与代表特定亚细胞组份的蛋白融合，表达在细胞的特定区域，作为判断其他蛋白定位的标准。例如细胞核-SV40 T-抗原的核定位信号。
4. 有些时候，两种蛋白单独表达与共同表达的定位结果相同，而且不具有共同的细胞内分布，也无法确定的说它们不存在相互作用，需要考虑细胞类型、细胞周期、细胞的生理状态、所受的外界信号刺激等。例如有些蛋白质的定位强烈依赖于细胞类型，在一种细胞系中可能定位于细胞质，在另一种细胞系内可能定位于细胞核。
5. 另外，过表达的蛋白在细胞内的分布可能与生理条件下的自然分布有差异。所以，有时需要下一节提到的免疫荧光技术来确定内源表达蛋白的定位。



**Fig. 5. Colocalization of A3A and A3B with HBV core protein (HBc).** (A) HuH7 cells were co-transfected with an HBV 1.1× overlength genome and A3A-Flag— or A3B-Flag—expressing plasmids and stained using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and antibodies to HBc and Flag. (B) HBV-infected dHepaRG cells and PHHs were treated with IFN- $\alpha$  at 7 dpi for 3 days. A3A and HBc were analyzed by immunofluorescence staining. Right panels indicate Z stacks taken at the dotted lines.

## 4.5.2 免疫荧光法

(1)原理：将已知的抗体或抗原分子标记上荧光素，再与其对应的抗原或者抗体起反应，从而形成的免疫复合物上带有一定量的荧光素，在荧光显微镜下就可以看出发出荧光的抗原抗体结合部位，检测出抗原或者抗体。分为抗原荧光法和抗体荧光法。

(2) 按照原抗体反映的结合步骤，分为三种：

(i) 直接法：荧光标记的抗体与相应抗原结合，检查出相应的抗原部分。

(ii) 间接法：抗原-抗体-间接荧光抗体复合物，比直接法更为敏感。例如夹心法。

(iii) 补体法：特异性抗体和补体的混合液与标本上的抗原反应，补体结合在复合物上，再用抗补体的与不提结合，形成抗原-抗体-补体-荧光抗体复合物，荧光显微镜下即可以显示抗原所在部位。该方法不受特异性抗体种属的限制，而且很灵敏。

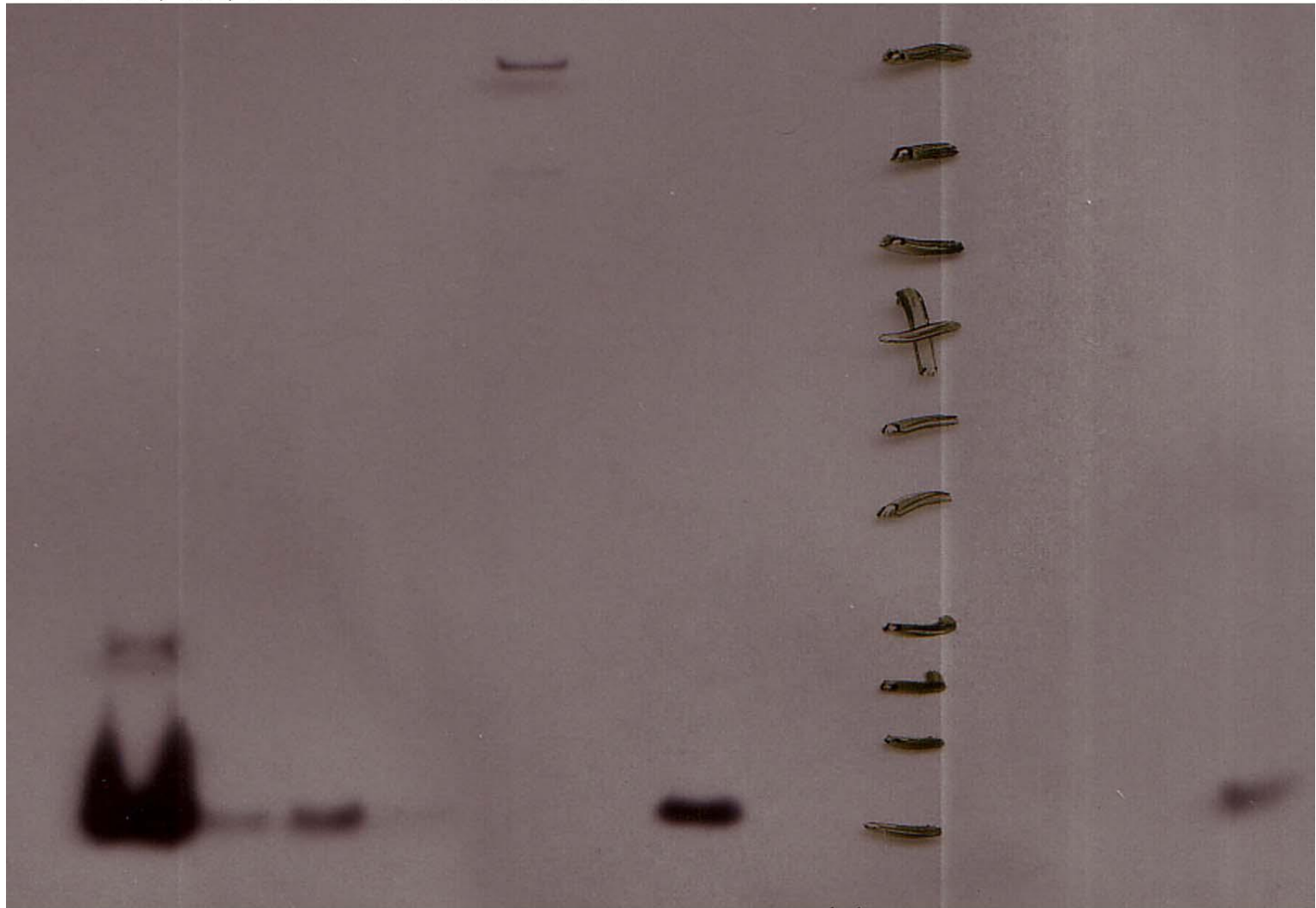
3. 可选择不同的荧光素种类，分别标记不同的蛋白，研究同一体系内不同蛋白的定位情况。最常用的荧光素有FITC和TRITC、Texas Red、Rho-damine等。前者类似GFP，后三者类似RFP。

# 免疫印记技术

(1) 可以检测混合组分中特定蛋白质的定性方法，也可以确定同一种蛋白质在不同细胞或同一种细胞中不同条件下相对含量的半定量方法。例如ImageJ可以计数WB得到的斑点来定量分析。

(2) 主要是利用抗原抗体反应，利用水相相互作用使得经过SDS-PAGE分离的蛋白质转移到PVDF或者nylon或者NC膜上，加入一抗反应一段时间后，再加入酶标记的二抗反应，最后加入酶的底物进行显色反应。

(3) 既可以定性和半定量检测蛋白质，也可以和其他很多种方法联用研究蛋白质的相互作用或者功能分析，例如Pull-down和CO-IP等。



A8	A12	MIF	A6A7	Sf21	A4	A1	A5	A4	A2
MIF	38	38/	3838	A4	B9	38	MIF	MIF	38
		107		38	38				/107



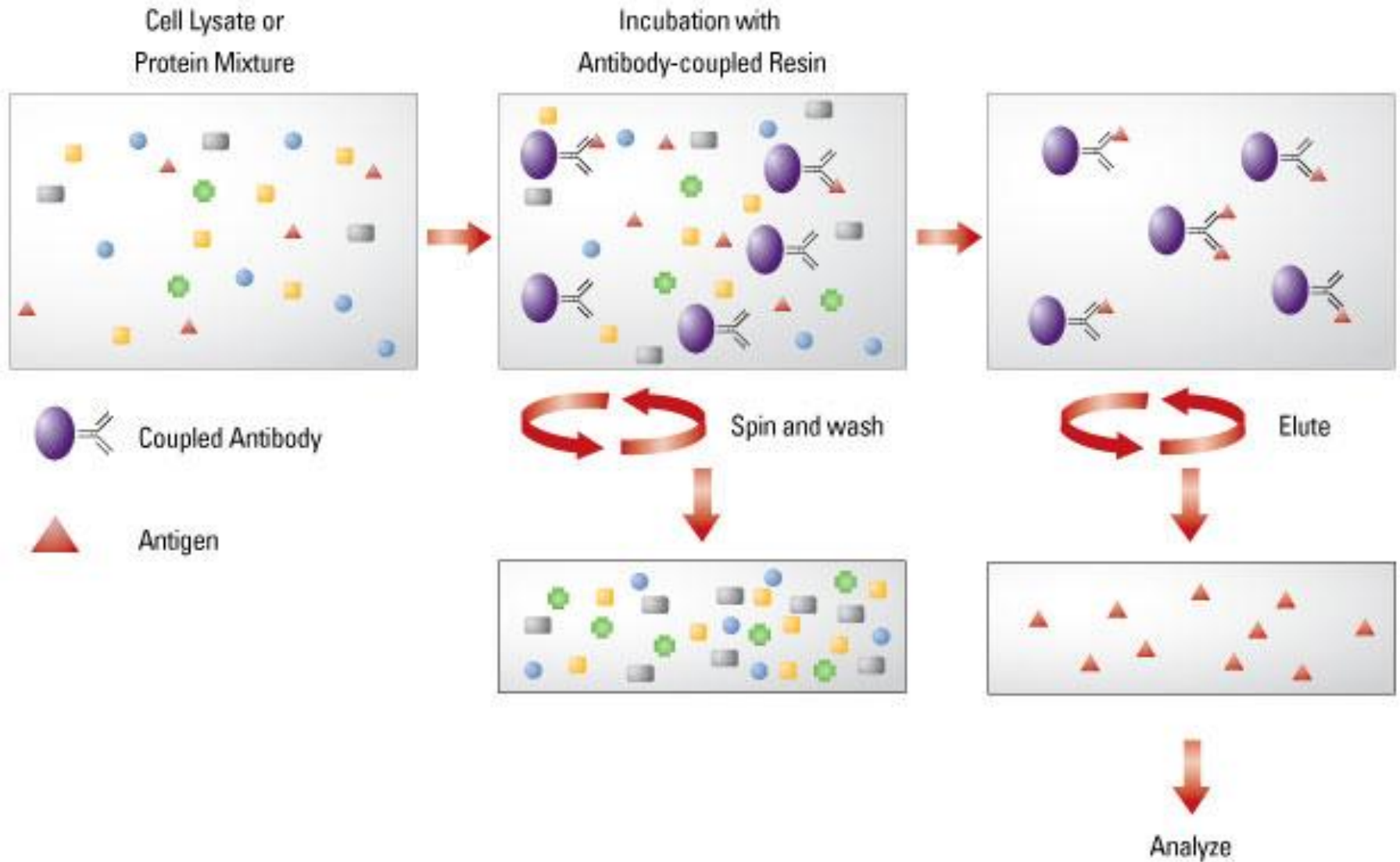
# 免疫共沉淀技术 (Co-IP)

## (1) 原理和步骤:

- a. 细胞裂解液中加入抗目标蛋白的抗体 (一抗)
- b. 孵育后加入与一抗特异结合的偶联在琼脂糖上的相应的二抗或者固相化的蛋白A或者蛋白G捕获抗原-抗体复合物。
- c. 将沉淀下来的抗原抗体复合物在含有SDS或DTT的缓冲液中加热, 复合物被打开。
- d. 免疫印迹检测目的蛋白质。

(2) 可以应用于研究蛋白质的相互作用等。

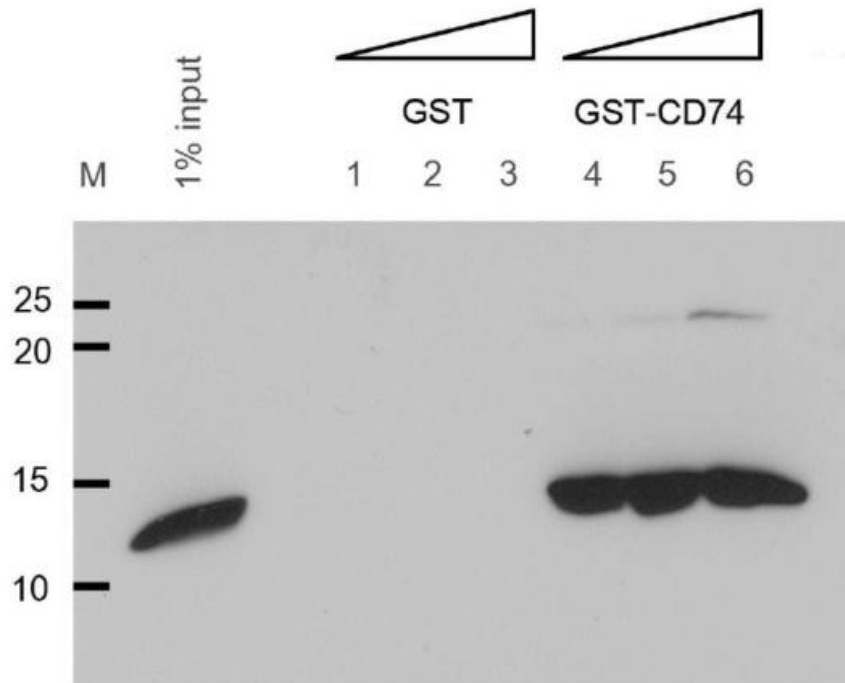
# Co-IP流程图示意图



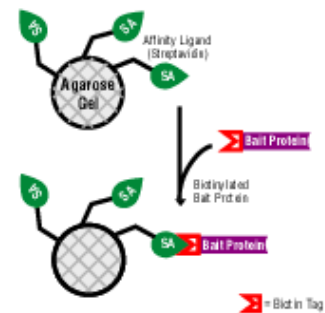
# Pull-down技术

(1)原理：将靶蛋白亲和固化在相应树脂上，作为与目的蛋白质亲和的支撑物，将含有目的蛋白质溶液过柱，从中捕获可与之相互作用的蛋白质，洗脱复合物后，通过SDS-PAGE和WB分析，证实蛋白质之间的相互作用。

(2)



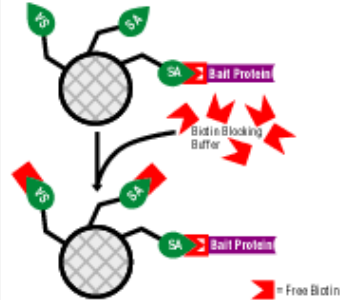
Step 1. Immobilize the biotinylated "bait" protein



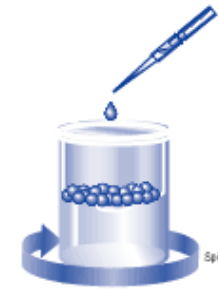
Step 2. Wash away unbound protein.



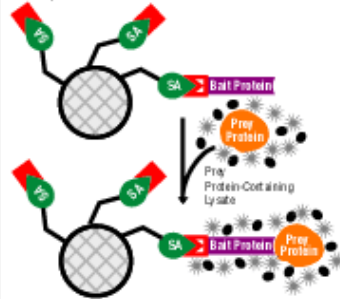
Step 3. Block available Streptavidin sites with free Biotin



Step 4. Wash away unbound Biotin.



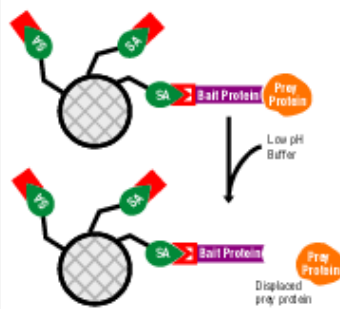
Step 5. Bind "prey" protein to immobilized "bait" protein.



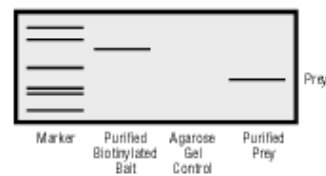
Step 6. Wash away unbound protein.



Step 7. Elute "prey" protein.



Step 8. Analyze for "prey" protein on SDS-PAGE.



# 4.9 生物信息学

(1) 基因序列或者蛋白质序列---属于何家族? 功能性质? 什么蛋白? 属于何种折叠类型?

(2) 搜寻蛋白质序列一次数据库和二次数据库, 寻找相似的蛋白质序列, 比较未知序列是否含有特殊蛋白质家族或功能的保守型残基、基序、等判断蛋白质功能; 例如锌指蛋白的基序。

(3) 以蛋白质一级序列为基础分析蛋白质的进化图谱, 推测蛋白质可能的功能。

(4) 生物信息学还可以预测蛋白质相互作用网络, 根据已知的蛋白质序列或三维结构。

## 4.10 结构为基础的功能标识

(1) 蛋白质结构决定功能，具有相似功能的蛋白质结构一般相似。蛋白质的三维结构比其一级结构在进化中更稳定的保守，从观察和总已知结构的蛋白质结构规律可以预测蛋白质的结构，从而预测功能。

(2) 获得三维结构后，可做一级序列和三维结构的数据库搜寻和比对分析，发现在数据库中（例如DALI）同源结构，两者分子叠加后发现关键结构的保守和活性位点的保守，推测可能的生物学功能，设计实验验证功能。

# 第三节 原核与真核体系表达真核基因的研究策略

- ❁ 有效表达重组蛋白质的方法选择
- ❁ 原核表达体系:大肠杆菌
- ❁ 真核表达体系:酵母表达系统, 昆虫表达系统, 哺乳动物细胞表达系统, 植物细胞表达系统
- ❁ <http://www.expasy.org>

原核表达载体的构建

- PCR/质粒纯化
- 限制性酶消化、胶回收、纯化
- 连接插入片段与表达载体
- 转化宿主菌
- 阳性克隆筛选及鉴定

转化到高效表达的宿主菌

- pGEX 载体、pET 载体和 pMAL 载体转化到 BL21 (DE3)

目的蛋白质的诱导表达

- IPTG 浓度、诱导表达的时间、温度等条件的优化
- SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳

细菌的扩大培养

制备细菌蛋白粗提物

- 超声破碎细胞
- 溶菌酶裂解细胞

目的蛋白质的纯化

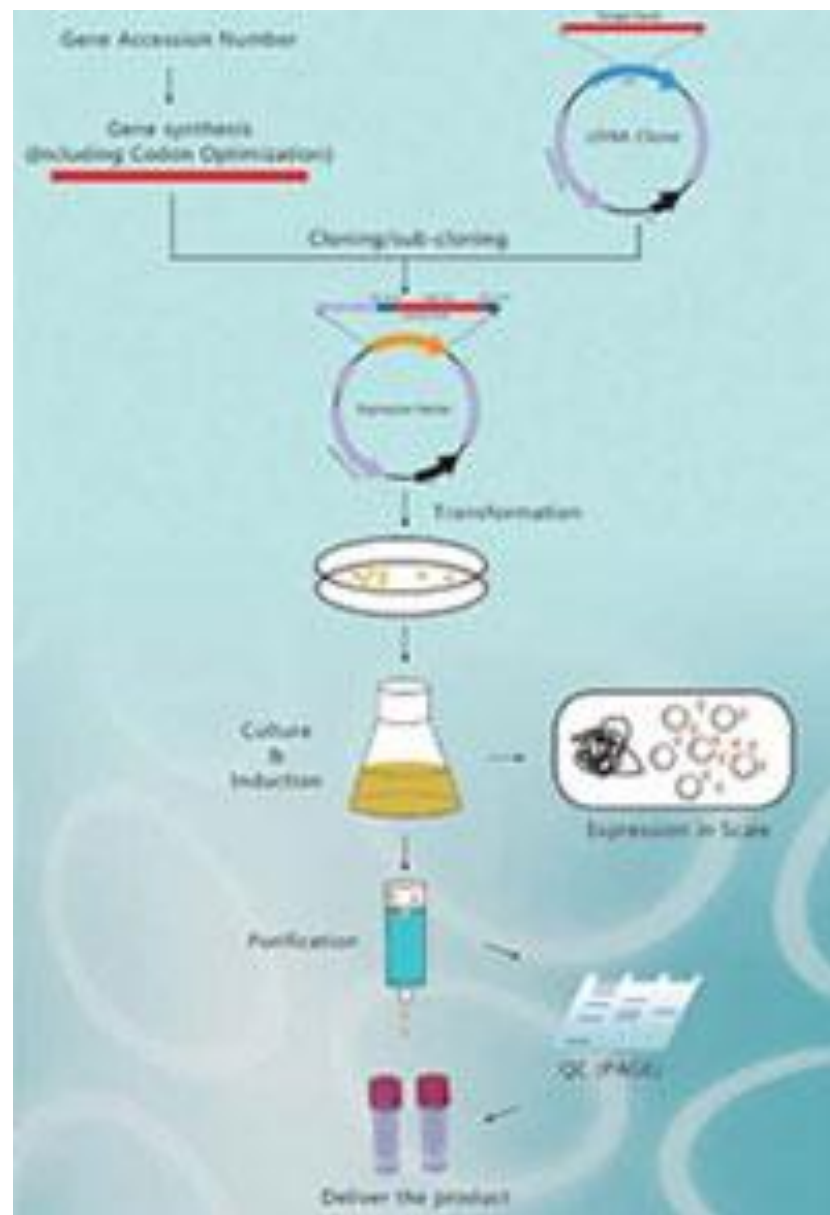
- 亲和纯化
- SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳
- 免疫印迹检测 (Western Blotting)
- 切去融合标签并去除蛋白酶



- ✿ [www.promega.com](http://www.promega.com) Commercial site describing various vectors.
- ✿ [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com) Commercial site describing various vectors.
- ✿ [www.bdbiosciences.com/clontech](http://www.bdbiosciences.com/clontech) Commercial site describing various vectors.
- ✿ [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) Commercial site describing various vectors.  
[www.orbigen.com/protocols/Vectors.html](http://www.orbigen.com/protocols/Vectors.html) Links to a variety of vector information and methods.
- ✿ [www1.qiagen.com/literature/handbooks/int/proteinpurification.aspx](http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/int/proteinpurification.aspx) Description of His-tag and its use to purify proteins.
- ✿ [www.leeds.ac.uk/bionet/compend/bnt11pst.htm](http://www.leeds.ac.uk/bionet/compend/bnt11pst.htm) A laboratory simulation of purification protocols.
- ✿ [rebase.neb.com/rebase](http://rebase.neb.com/rebase) Comprehensive database of restriction enzymes and their recognition sites.
- ✿ [www.ionsource.com/](http://www.ionsource.com/) Mass Spectrometry and Biotechnology Resource.

# 原核体系内重组蛋白质的表达与纯化

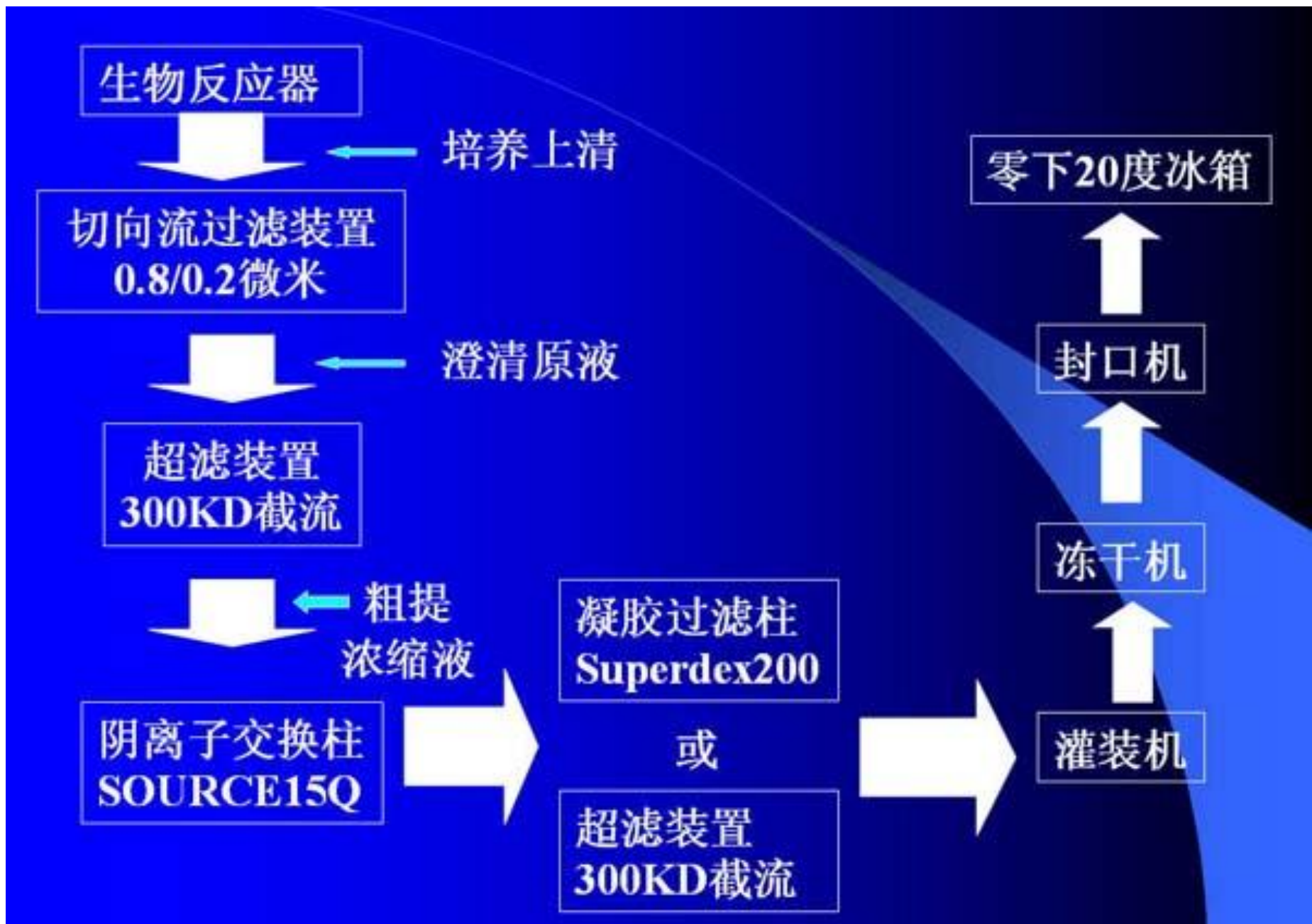
- ❁ 载体: pET, pGEX, pMAL-2
- ❁ 标签: His, GST, MBP
- ❁ 亲和层析:  $\text{Ni}^{2+}$ 树脂, 谷胱甘肽-琼脂糖, 麦芽糖-琼脂糖



# 真核体系内重组蛋白质的表达与纯化

✿ 酵母表达纯化

✿ 哺乳动物细胞: Invitrogen公司的  
Mammalian cell pcDNA3.1 Directional  
TOPO Expression System分离纯化C-末  
端融合His-Tag



# 推荐参考资料

- ❁ 《蛋白质纯化指南》 Richard R. Burgess and Murray P. Deutscher
- ❁ 《蛋白质分析实验技术指南》 李玉花，高等教育出版社，2011
- ❁ 《蛋白质结构与功能》 D. 惠特福特，科学出版社，2007
- ❁ 《分子克隆实验指南》 第3版，J. 萨母布鲁克