



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110456075 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(21)申请号 201910825400.9

(22)申请日 2019.09.02

(71)申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市玄武区钟灵街  
50号

(72)发明人 付健美 施雨 纪锐 方继朝

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所  
(普通合伙) 32204

代理人 王艳

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/541(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页  
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行  
免疫共沉淀检测蛋白互作的方法

(57)摘要

本发明公开基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,将目标基因分别构建到表达载体的N端,提质粒后转化农杆菌,制备农杆菌侵染液共注射模式植物,提取共注射烟草叶片蛋白,用GFP-Trap A beads去富集带有GFP标签的目标蛋白,同时将带有mCherry标签的其他目标蛋白免疫下来,最后分别使用GFP和mCherry标签抗体检测目标蛋白在免疫前和免疫后的表达及互作情况。本发明在实现荧光可视化实时监控目标蛋白在活细胞内表达及共定位的同时,可实时选择表达量最高的时期直接进行免疫共沉淀高效验证蛋白互作,极大提高蛋白互作验证的成功率,大幅度降低时间和经济成本。

```
mCherry NVSRGEEENMAIIKKEFRFPWMDG-VHGHEFEIEGEGEGRPYEETQRAELVYKGGPFAADIESPQF 70
GFP NVSFGRE----LFTGVVPIIIELELQVNGHFEVSGEGEDATYKLEIKETIQG-KERVHPTAVTTL 65
mCherry MDSKAVVKGADIP--HYLLESLFEGFQKRRNRRRERQVTVTQDSSLQGGRTYKVFISDTNPSG 138
GFP TGGVQCFSRYSIDMGKQKQVYFSAAMEKQVGERIFPELIDNRYKTRAEVKFEGDTLVNRIEQQHIDKQDQ 135
mCherry FVMQKFMG-WEASSERMYFED--GALREIKLKLKDE--GHYDAEVKTYKAKQKMLRQAYNNIK 203
GFP NILGRLEYNYSNHNVYIMADKQKQIENYFEBHNIEGSSVQLADHYQQNPEIGDGEVLEIDNHYLSTQ 205
mCherry LDITS-HEDYTYVEQYRABGRRSKCHDELVEFYDVIDYA 245
GFP SALSQDFRSGDMMVLLSPVTAAGIIEKNGELVK----- 239
```

1. 基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 分别构建含有待验证互作目标基因的载体:将两个或两个以上待验证互作的目的基因分别同源重组到表达载体pBinplus-GFP和/或pBinplus-mCherry的N端,提取质粒后分别转化农杆菌;

2) 将步骤1)得到的两个或两个以上的农杆菌混合制备农杆菌侵染液共注射模式植物;

3) 提取步骤2)共注射模式植物叶片蛋白获得蛋白粗提液,用GFP-Trap A beads去富集蛋白粗提液中带有GFP标签的目标蛋白,同时将带有mCherry标签的其它目标蛋白免疫下来,最后分别使用GFP和mCherry荧光标签抗体检测两种或两种以上的目标蛋白在免疫前和免疫后的表达及互作情况。

2. 根据权利要求1所述的基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,其特征在于,所述步骤1)的两个或两个以上的待验证互作目的基因为*cry1Ab/c*基因、*CAMTAs*、*DAHP*、*HKMTs*基因中的任意两种或两种以上。

3. 根据权利要求1所述的基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,其特征在于,所述步骤1)的农杆菌为根癌农杆菌GV3101。

4. 根据权利要求1所述的基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,其特征在于,所述步骤2)的农杆菌侵染液的制备步骤为:将步骤1)得到的农杆菌分别在含有相应抗生素的LB培养基中培养48h得到两种或两种以上菌液离心弃上清得到菌体,用瞬时侵染液悬浮菌体得到两种或两种以上农杆菌侵染液,将所述两种或两种以上的农杆菌侵染液OD<sub>600</sub>值分别均调到1.0~1.2,等体积混匀备用。

5. 根据权利要求1所述的基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,其特征在于,所述步骤2)中的农杆菌侵染液中还包括沉默抑制子P19。

6. 根据权利要求1所述的基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,其特征在于,所述步骤2)的模式植物为烟草叶片。

7. 根据权利要求1所述的基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,其特征在于,所述步骤3)共注射模式植物叶片蛋白的提取步骤为:称取植物组织,用锡箔纸包好,在液氮中挤压成小碎片后倒入已预冷的研钵中或直接用液氮研磨成粉末,加入extraction buffer,研磨直到变成匀浆;加入预冷的20%Triton,继续研磨;用移液枪转移至预冷的EP管中,迅速用涡旋仪充分混匀,置于冰上,然后放置于预冷摇床上摇,离心,取上清转移至新的EP管中,离心,上清液即为蛋白粗提液。

8. 根据权利要求7所述的基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,其特征在于,所述extraction buffer包括DTT、1×蛋白酶抑制剂和TNEG缓冲液,所述TNEG缓冲液组分包括50mM Tris、150mM NaCl,0.5mM EDTA和8%甘油。

9. 根据权利要求7所述的基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,其特征在于,所述步骤3)中还包括用IP buffer清洗GFP-Trap A beads步骤,所述IP buffer的组成为:20%Triton、DTT和TNEG缓冲液。

10. 根据权利要求7所述的基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,其特征在于,所述GFP荧光标签抗体浓度为1:4000,mCherry荧光标签抗体浓度为1:1000。

## 基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法

[0001] 技术领域本发明涉及蛋白互作技术的应用,尤其涉及一种基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法。

### 背景技术

[0002] 蛋白质是生命活动的承载体和功能的执行者,蛋白通过彼此之间的相互作用构成蛋白质互作网络来参与生物信号传递、基因表达调节、能量和物质代谢及细胞周期调控等生命过程的各个环节。人们通过酵母双杂交、免疫共沉淀以及双分子荧光互补等技术的综合应用,研究蛋白互作的真实性,进而探索相关生理表型深层次的分子机理。其中,免疫共沉淀技术是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础的用于研究蛋白互作的经典方法,既可以将目标蛋白作为诱饵初筛与之互作的可能猎物蛋白,也可以用于两个蛋白一对一互作的真实性验证。该方法验证的蛋白互作结果符合其在细胞内的真实互作情况。

[0003] 为了便于检测互作蛋白,往往会在参试蛋白N端或C端人为添加标签蛋白。目前免疫共沉淀检测中应用最多的标签蛋白有GFP、GST、HA、Flag、His、Myc等。耦合上述标签蛋白后,只能通过步骤繁琐、耗时较长、对操作者技术要求较高、结果不容易稳定的Western Blot验证蛋白表达后进行免疫共沉淀互作验证,且难以实时监控两种目标蛋白是否在外源细胞中得到充分表达。实验不稳定因素较多,对于阴性结果难下结论。

[0004] 因此,迫切需要一种更方便、更直接进行免疫共沉淀验证蛋白互作的新途径,一方面可以通过荧光实时监测两种待验证互作蛋白的外源表达情况,便于判断外源蛋白是否表达,并选择蛋白表达量最高的时期进行后续免疫共沉淀互作验证,极大提高蛋白互作验证成功率,大幅度降低时间和经济成本。一方面需要在现有市售试剂中,能够找到成熟稳定的配套产品,便于后期各种蛋白互作验证实验的顺利开展,大大提高蛋白互作验证的效率和准确性。这对于高效利用免疫共沉淀技术进行蛋白互作验证具有十分重要的现实意义。

[0005] 参考文献:

[0006] 1、Olivier V,Susana R,Pere M,et al.An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the P19 protein of tomato bushy stunt virus[J].The Plant Journal,2003:949-956.

[0007] 2、Li Q,Chen Y,Wang J,et al.A Phytophthora capsici virulence effector associates with NPR1 and suppresses plant immune responses[J].Phytopathology Research,2019,1:6.

[0008] 3、Hu L,Ye M,Li R,et al.The rice transcription factor WRKY53 suppresses herbivore-induced defenses by acting as a negative feedback modulator of map kinase activity[J].Plant physiology,2015,169(4):2907-2921.

[0009] 4、Tu J,Datta K,Firoz AM,Fan Y,et al.Expression and function of a hybrid Bt toxin gene in transgenic rice conferring resistance to insect pest [J].Plant Biotechnology,1998,15:195-203.

## 发明内容

[0010] 发明目的:针对现有免疫共沉淀技术中存在的优缺点,本发明的目的在于借助双色荧光标签蛋白GFP和mCherry,实现荧光可视化实时监控两个或两个以上目标蛋白在活细胞内表达,选择表达量最高的时期直接进行免疫共沉淀试验,高效地进行两个或两个以上目标蛋白的互作验证,同时可以提前检测参试蛋白的亚细胞共定位,判断两个蛋白在空间上互作的可能性,较好地将免疫共沉淀技术和亚细胞共定位检测结合到一起。

[0011] 技术方案:为了解决上述技术问题,本发明提供了一种基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,包括:

[0012] 1) 分别构建含有待验证互作目标基因的载体:将两个或两个以上待验证互作的目的基因分别同源重组到表达载体pBinplus-GFP和pBinplus-mCherry的N端,提取质粒后分别转化农杆菌;

[0013] 2) 将步骤1)得到的两个或两个以上的农杆菌混合制备农杆菌侵染液共注射模式植物;

[0014] 3) 提取步骤2)共注射模式植物叶片蛋白得到蛋白粗提液,用GFP-Trap A beads去富集蛋白粗提液中带有GFP标签的目标蛋白,同时将带有mCherry标签的其他目标蛋白免疫下来,最后分别使用GFP和mCherry荧光标签抗体检测两种或两种以上目标蛋白在蛋白上清和免疫后的表达及互作情况。

[0015] 其中,所述步骤1)的两个或两个以上待验证互作目的基因包括但不限于Cry1Ab/c基因、CAMTAs、DAHP、HKMTs基因中的任意两种或两种以上,其它基因均可以进行验证。

[0016] 其中,所述步骤1)的农杆菌为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101。

[0017] 其中,所述步骤2)的农杆菌侵染液的制备步骤为:将步骤1)得到的农杆菌分别在含有相应抗生素的LB培养基中培养48h得到两种或两种以上菌液离心弃上清得到菌体,用瞬时侵染液悬浮菌体得到农杆菌侵染液,将两种或两种以上农杆菌侵染液OD<sub>600</sub>值分别均调到1.0~1.2,等体积混匀备用。

[0018] 其中,所述瞬时侵染液包括10mM MgCl<sub>2</sub>,1mM PH5.7的2-吗啉乙磺酸MES,100uM乙酰丁香酮。

[0019] 其中,所述步骤2)中的农杆菌侵染液中还包括沉默抑制子P19。

[0020] 其中,所述步骤2)的模式植物包括但不限于烟草叶片,其它叶片类植物拟南芥同样适用。

[0021] 其中,所述步骤3)共注射模式植物蛋白的提取步骤为:称取植物组织,用锡箔纸包好,在液氮中挤压成小碎片后倒入已预冷的研钵中或直接用液氮研磨成粉末,加入extraction buffer,研磨直到变成匀浆;加入预冷的Triton,继续研磨;用移液枪转移至预冷的EP管中,迅速用涡旋仪充分混匀,置于冰上,然后放置于预冷摇床上摇,离心,取上清转移至新的EP管中,离心,上清液即为蛋白粗提液。

[0022] 其中,所述extraction buffer包括DTT、1×蛋白酶抑制剂和TNEG缓冲液,TNEG缓冲液组分包括50mM Tris、150mM NaCl,0.5mM EDTA、8%甘油。

[0023] 其中,所述步骤3)中还包括用IP buffer清洗GFP-Trap A beads步骤,所述IP buffer的组成为:20%Triton、DTT和TNEG缓冲液。

[0024] 其中,所述GFP荧光标签抗体浓度为1:4000,mCherry荧光标签抗体浓度为1:1000,

所述的荧光标签蛋白为氨基酸序列相似度较低、发射波长和激发波长差距较大以及荧光颜色易于区分的绿色荧光GFP和红色荧光mCherry。

[0025] 作为优选地,所述共转化侵染烟草的含有目的基因的农杆菌最终OD<sub>600</sub>为0.5~0.6,若目的蛋白表达量较低可以往混匀液中加入一定体积的沉默抑制子P19的GV3101侵染液,调整P19侵染液最终OD<sub>600</sub>值为0.3~0.4。

[0026] 作为优选地,所述的进行免疫共沉淀提取烟草叶片蛋白的提取液extraction buffer配方为(每样所需2ml):20mM DTT(1M母液)10ul,1×蛋白酶抑制剂(100×)20ul,TNEG缓冲液(8%甘油、25mM Tris、0.5mM EDTA、150mM NaCl)补齐至2ml(含2%PVPP)。

[0027] 作为优选地,所述的GFP-Trap A beads与蛋白上清液在4℃孵育的时间为2h~3h

[0028] 作为优选地,所述免疫共沉淀的IP缓冲液配方为(每样所需10ml):20% Triton 50ul,1M DTT 10ul,TNEG缓冲液补齐至10ml。

[0029] 作为优选地,所述的进行SDS-PAGE的蛋白上样量为蛋白粗提液超滤后15ul/孔。

[0030] 具体地,本发明还提供了一种提取植物叶片蛋白的方法,包括:称取约1g植物组织,用锡箔纸包好,在液氮中挤压成小碎片后倒入已预冷的研钵中或直接用液氮研磨成粉末,加2ml上述提到的extraction buffer,研磨直到变成匀浆;加入4℃预冷的20% Triton 60ul(终浓度0.6%),继续研磨2min;用1ml移液枪转移至预冷的2ml EP管中,迅速用涡旋仪充分混匀,置于冰上,待所有样品均研磨完后放置于4度冰箱的摇床上摇20min,置于4℃12500rpm离心6min,取上清转移至新的1.5ml EP管中,4℃12500rpm离心20min;上清液即为蛋白粗提液,适用于蛋白定量、SDS-PAGE以及Western blot等分析。

[0031] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0032] 1、本发明用到的荧光标签蛋白GFP和mCherry的氨基酸序列相似度较低,为27.3%(图1),不存在GFP-Trap A beads同时富集GFP和mCherry造成互作假阳性的可能性。

[0033] 2、目前市面上也在售荧光标签蛋白mCherry-Trap beads(或可以用RFP-Trap beads替代),便于将2个目标蛋白与2个荧光标签蛋白GFP和mCherry随机组合去验证蛋白互作真实性。

[0034] 3、荧光蛋白GFP和mCherry的发射波长和激发波长差距较大,荧光颜色易于区别,便于观察细胞共定位情况,并提前对互作可能性做出预判。

[0035] 4、假如将2个目标蛋白分别与HA/flag/His等其它普通非荧光标签蛋白与GFP标签蛋白融合后验证互作,需要经过繁琐的Western blot先检测目标蛋白是否表达后再进行免疫共沉淀分析,其步骤繁琐,耗时费力,经济成本很高,而本方法则简单易行,可以实时监控目标蛋白的表达,并选择表达量最高的时期进行免疫共沉淀,极大提高了蛋白互作验证的成功率,大幅度降低了时间和经济成本等(表1)。

[0036] 表1 双色荧光标签蛋白组合对比其它常用标签蛋白组合进行免疫共沉淀试验的优缺点

[0037]

名称	其它常用 标签蛋白组合	GFP-mCherry 标签蛋白组合
亚细胞共定位 (是/否)	否	是
免疫共沉淀 (是/否)	是	是
蛋白表达的判断方法	Western blot	荧光
蛋白表达量高低判断方法	BCA-Western blot	荧光强度
蛋白互作验证成功率	低	高
难易程度	难	易
经济成本	高	低
其它	步骤繁琐	步骤简单易行
	耗时耗力	实时监控表达

[0038] 注:其它常用标签蛋白组合为GFP、GST、HA、Flag、His、Myc等间的任意2种

#### 附图说明

[0039] 图1 DNAMAN软件比较GFP标签蛋白和mCherry标签蛋白的氨基酸序列相似度;

[0040] 图2共转化2个目的基因的烟草叶片蛋白SDS-PAGE电泳结果;M:180KD maker,泳道1:CAMTAs-GFP+Cry1Ab/c-mCherry,泳道2:HKMTs-GFP+Cry1Ab/c-mCherry,泳道3:DAHP-GFP+Cry1Ab/c-mCherry;

[0041] 图3外源Cry1Ab/c-mCherry蛋白分别与水稻内源蛋白CAMTAs-GFP、HKMTs-GFP、DAHP-GFP在烟草细胞中的亚细胞共定位结果,mCherry:标记外源Cry1Ab/c蛋白的红色荧光图片,GFP:标记内源融合蛋白的绿色荧光图片,Merge:2个荧光重叠的图片;

[0042] 图4免疫共沉淀技术验证外源Cry1Ab/c-mCherry蛋白分别与水稻内源蛋白CAMTAs-GFP、HKMTs-GFP、DAHP-GFP在烟草细胞中的互作情况(Westernblot),IP:共免疫出的互作蛋白,Input:全细胞裂解液, $\alpha$ GFP即为GFP抗体杂出的目的条带:依次为CAMTAs-GFP+Cry1Ab/c-mCherry (约117KD,泳道为1和8)、DAHP-GFP+Cry1Ab/c-mCherry (约86KD,泳道为2和7)、HKMTs-GFP+Cry1Ab/c-mCherry (约102KD,泳道为3和6)以及空载对照GFP+Cry1Ab/c-mCherry (约27KD,泳道为4和5), $\alpha$ mCherry:mCherry抗体杂出的单一目的条带,即为Cry1Ab/c-mCherry (约94KD),\*表示目的条带;

[0043] 图5双分子荧光互补技术验证外源Cry1Ab/c-cYFP蛋白分别与水稻内源蛋白CAMTAs-nYFP、HKMTs-nYFP、DAHP-nYFP在烟草细胞中的互作情况,eYFP:显示互作的黄色荧光图片,Bright:明场图片,Merge:2个图片叠加结果;

[0044] 图6外源Cry1Ab/c-mCherry蛋白分别与水稻内源蛋白CAMTAs-GFP、HKMTs-GFP、DAHP-GFP在烟草细胞中的亚细胞共定位结果,mCherry:标记外源Cry1Ab/c蛋白的红色荧光图片,GFP:标记内源融合蛋白的绿色荧光图片,Merge:2个荧光重叠的图片(对比例1);

[0045] 图7共转化2个目的基因的烟草叶片蛋白SDS-PAGE电泳结果;M:180KD maker,泳道1:CAMTAs-GFP+Cry1Ab/c-mCherry,泳道2:DAHP-GFP+Cry1Ab/c-mCherry,泳道3:HKMTs-GFP+Cry1Ab/c-mCherry(对比例2);

[0046] 图8免疫共沉淀技术验证外源Cry1Ab/c-mCherry蛋白分别与水稻内源蛋白CAMTAs-GFP、HKMTs-GFP、DAHP-GFP在烟草细胞中的免疫共沉淀情况,箭头指示mCherry抗体在免疫上清后杂出的Cry1Ab/c-mCherry目的条带(约94KD),泳道1和4:CAMTAs-GFP+Cry1Ab/c-mCherry,泳道2和5:DAHP-GFP+Cry1Ab/c-mCherry,泳道3和6:HKMTs-GFP+Cry1Ab/c-mCherry,箭头表示目的条带(对比例3)。

### 具体实施方式

[0047] 下面结合具体实施例,进一步阐明本发明。

[0048] 本发明所用到的试剂:

[0049] extraction buffer的组成为(每样所需2ml):20mM DTT(1M母液)10ul,1×蛋白酶抑制剂(100×)20ul,TNEG缓冲液(8%甘油、50mM Tris、0.5mM EDTA、150mM NaCl)补齐至2ml(含2%PVPP)。

[0050] IP buffer的组成为(每样所需10ml):20%Triton 50ul,1M DTT 10ul,TNEG缓冲液补齐至10ml。

[0051] 10×Running buffer的组成为:Tris 30.2g,甘氨酸188g,SDS 10g,用超纯水定容至1L。

[0052] Tris-甘氨酸转膜缓冲液的组成为(每次1.3L,现用现配):Tris 3.94g,甘氨酸18.72g,甲醇195ml,用超纯水定容至1.3L。

[0053] Western blot所用的仪器是Thermo Fisher公司的iBind™蛋白质免疫印迹处理系统,所用的GFP抗体(Abmart)浓度为1:4000,mCherry抗体(Abcam)浓度为1:1000。

[0054] 实施例1

[0055] 一种基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法,包括以下步骤:

[0056] (1)分别构建含有待验证互作目标基因的载体

[0057] 建立In-Fusion克隆反应体系,通过内切酶BamHI将2个待验证互作的目的基因分别同源重组到荧光瞬时表达载体pBinplus-GFP(CN201711362357.4)和pBinplus-mCherry(Li et al.,2019)的N端,提取质粒后电击转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101(Li et al.,2019)。

[0058] (2)将上述农杆菌侵染液等比例混合后瞬时转化烟草叶片

[0059] 将上述菌检正确的GV3101菌液用枪头蘸取后分别转接到含有50ug/ml卡那霉素和50ug/ml利福平抗性的4~6ml LB液体培养基,28℃250rpm震荡培养48h;5000rpm离心3min,弃上清,用瞬时侵染液(10mM MgCl<sub>2</sub>,1mM PH5.7的2-吗啉乙磺酸MES,100uM乙酰丁香酮)悬浮菌体得到农杆菌侵染液,瞬时侵染液的量要根据样品数而定,一般总体积配制50ml备用。5000rpm离心3min,弃上清,重复3次,最后将菌液OD<sub>600</sub>值均调到1.0~1.2;将上述2种待验证互作的农杆菌侵染液等体积混匀,一般所需总体积为4ml。若目的蛋白表达量较低可以往混匀液中加入一定体积的沉默抑制子P19(Olivier et al.,2003)的GV3101侵染液,调整P19

侵染液最终OD<sub>600</sub>值为0.3~0.4得到农杆菌侵染液。将上述农杆菌侵染液28℃黑暗放置2h~4h活化农杆菌并浸润烟草叶片；用注射器吸取一定量上述农杆菌侵染液，选取生长状态良好且较肥厚的倒3、4叶，从叶片背面将菌液注射进入叶片，使叶片全部注满菌液为止，并将注射过的叶片做好区分标记，正常培养24h~72h，进行显微观察。

[0060] (3) 蛋白表达量及亚细胞共定位观察

[0061] 将针孔附件的烟草叶片剪下用水铺平置于载玻片上，背面朝上，使用激光共聚焦显微镜分别进行绿色荧光GFP (488nm) 和红色荧光mCherry (561nm) 的亚细胞共定位观察，即2个目标蛋白的表达及共定位情况。

[0062] (4) 表达蛋白的免疫共沉淀验证

[0063] 剪取上述共表达目的基因的烟草叶片，去除主叶脉后称取约1g，用锡箔纸包好，在液氮中挤压成小碎片后倒入已预冷的研钵中，加2ml extraction buffer，研磨直到变成匀浆；加入4℃预冷的20% Triton 60μl (终浓度0.6%)，研磨2min；用1ml移液枪转移至预冷的2ml EP管中，迅速用涡旋仪充分混匀，置于冰上，待所有样品均研磨完后放置于4度冰箱的摇床上摇20min。

[0064] 同时洗GFP-Trap A beads (Chromotek)：即预冷的1.5ml EP管预先加1ml IP buffer，用剪掉尖端的黄枪头取35ul GFP-Trap A beads于1.5ml EP管中，4℃2000g离心2min，每次至少留60ul液体于GFP-Trap A beads中，重复洗3次，最后一次留60ul液体于GFP-Trap A beads中，置于冰上备用。

[0065] 将摇床上的匀浆液4℃12500rpm离心6min，取上清转移至新的1.5ml EP管中，4℃12500rpm离心20min；取上清液1.5ml加入上述含有GFP-Trap A beads的1.5ml EP管中，封口膜封闭，4度冰箱上下翻转孵育3h。剩余上清液作为input，取80ul，加5\*SDS buffer，室温放置，95℃煮沸10min，剩余上清液分装后冻于-80℃冰箱备用。将上述与GFP-Trap A beads一起孵育的液体2000g离心3min后去上清，用IP buffer洗6次GFP-Trap A beads，每次2000g离心1min；用枪头去除上清，残余80ul，加5\*SDS buffer，室温放置，95℃煮沸10min，2000g离心2min。随后将解离后的上清用10KD大小超滤管过滤，室温5000rpm离心20min，丢弃滤液，将离心柱中液体离心至新的EP管中 (2000g, 2min)，即为最后上样液，western鉴定。

[0066] western鉴定中，250KD蛋白Marker采用Bio-Rad公司Precision Plus Protein Western C Standards (Bio-Rad, 1610376)。利用4~20%的Bio-Rad蛋白预制胶在1\*Running buffer中对蛋白进行分离，蛋白上样量为15ul/孔。完成后通过Tris-甘氨酸转膜体系将蛋白转至PVDF膜上 (4℃, 40V, 14~18h)。转膜完成后，将膜浸入3%牛血清蛋白BSA溶液，置于30℃摇床中封闭2h (80rpm/min)。封闭完成后，按照Invitrogen公司iBind solution kit试剂盒 (Invitrogen, SLF1020) 说明书方法，用1×iBind flex solution (通过100×Additive、iBind Flex 5×buffer和纯水按比例配置) 分别以1:4000稀释GFP标签一抗 (Abmart, M20004) 和1:1000稀释mCherry标签一抗 (Abcam, ab125096)，分别以1:2000稀释羊抗鼠二抗 (Abcam, ab205719) 及1:1000稀释Marker蛋白的HRP抗体 (Bio-Rad, 1610380)。用配好的1×iBind Flex solution将iBind Card均匀湿润后，将PVDF膜接触蛋白胶的一面朝下放置在湿润的iBind Card (Invitrogen, SLF1010) 上，并用滚轮使其紧贴，之后合紧iBind Flex机器 (Invitrogen, SLF1000)，按顺序依次加入2ml一抗、2ml 1×iBind Flex solution、2ml二抗+Marker抗体、6ml 1×iBind flex solution开始孵育。孵育完成后，将

膜用TBS缓冲液清洗5min,之后按1:1混合加入ECL显色液和增强液(Bio-Rad,1705062)孵育2min后,通过VersaDoc成像系统(Bio-Rad)对膜上显色的条带进行检测。

[0067] 实施例2

[0068] 采用实施例1的具体方法对抗虫转基因水稻华恢1号表达的外源Cry1Ab/c蛋白(Tu et al.,1998)分别和3种不同分子量大小的水稻内源蛋白钙调蛋白结合转录因子CAMTAs(Gene ID:XM\_015758912.2)、3-脱氧-D-阿拉伯糖型庚酮糖酸-7-磷酸DAHP(Gene ID:XM\_015790892.1)、组蛋白赖氨酸甲基化转移酶HKMTs(Gene ID:XM\_015792076.2)进行免疫共沉淀检测蛋白互作,上述3种蛋白均是酵母双杂初筛能与外源Cry1Ab/c蛋白互作的水稻内源蛋白。

[0069] 具体构建方法如下:参照实施例1的方法建立In-Fusion克隆反应体系,通过内切酶BamH将cry1Ab/c基因同源重组到荧光瞬时表达载体pBinplus-GFP的N端,分别将CAMTAs、DAHP、HKMTs基因同源重组到荧光瞬时表达载体pBinplus-mCherry的N端,上述目的基因与瞬时表达载体pBinplus-GFP和pBinplus-mCherry同源重组的引物序列见表2。分别提取质粒后电击转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101,分别得到含有外源cry1Ab/c-mCherry基因的GV3101侵染液、含有CAMTAs-GFP基因的GV3101侵染液、含有DAHP-GFP基因的GV3101侵染液以及含有HKMTs-GFP基因的GV3101侵染液。

[0070] 表2目的基因与瞬时表达载体pBinplus-GFP(简称GFP)和pBinplus-mCherry(简称mCherry)同源重组的引物序列

[0071]

引物名称	引物序列	片段大小 (bp)
HKMTs-GFP-F	<u>CGGGGTCGACGGATCC</u> ATGGAG	2054
HKMTs-GFP-R	TGCTCACCATGGATCCATGGTT AACTTTCCCACCCAT	
CAMTAs-GFP-F	<u>CGGGGTCGACGGATCC</u> ATGCAG	2466
CAMTAs-GFP-R	TGCTCACCATGGATCCGAAATA ACCAGGGAGTGGTGTA	
DAHP-GFP-F	<u>CGGGGTCGACGGATCC</u> ATGGCG	1611

[0072]

DAHP-GFP-R	CTCGCCACCAA <u>TGCTCACCATGGATCC</u> GAAAGC CAATGGGGGCA	
Cry1Ab/c-mCherry-F	<u>CGGGGTCGACGGATCC</u> ATGGAC	1830
Cry1Ab/c-mCherry-R	TGCTCACCATGGATCCTTCAGC CTCGAGTGTTGC	

[0073] 注:下划线是同源重组臂,加粗为内切酶BamH

[0074] 将含有外源cry1Ab/c-mCherry基因的GV3101侵染液分别与含有CAMTAs-GFP基因

的GV3101侵染液、含有DAHP-GFP基因的GV3101侵染液、含有HKMTs-GFP基因的GV3101侵染液等比例混匀,混合后每种侵染液的最终OD<sub>600</sub>为0.5~0.6,往该混匀液中加入含有P19的GV3101侵染液,调整P19最终OD<sub>600</sub>为0.3~0.4;28℃避光静置2h后注射烟草叶片,正常培养24~72h后,激光共聚焦观察GFP绿色荧光(488nm)和mCherry红色荧光(561nm)。亚细胞共定位结果显示(图2),外源Cry1Ab/c蛋白与水稻内源CAMTAs、DAHP以及HKMTs蛋白在烟草细胞中均能高效正常表达且存在共定位效应,为蛋白互作可能性的判断提供了理论依据。

[0075] 激光共聚焦显微镜确定共注射的2种蛋白均高效表达后,选取注射区叶片,用本发明实施例1的蛋白提取方法和免疫共沉淀方法直接提取蛋白,并进行免疫共沉淀分析。SDS-PAGE凝胶电泳检测结果显示(图3),共表达目的基因的烟草叶片样品的蛋白条带清晰,条带比较丰富,表明本发明的蛋白提取方法适合进行后续免疫共沉淀分析。免疫共沉淀结果显示(图4),用GFP-Trap A beads在免疫CAMTAs-GFP、DAHP-GFP以及HKMTs-GFP融合蛋白的同时,也可以将Cry1Ab/c-mCherry融合蛋白免疫下来,但GFP-Trap A beads在免疫GFP空载的同时,却没有将Cry1Ab/c-mCherry融合蛋白免疫下来。以上结果表明外源Cry1Ab/c蛋白均可以与水稻内源CAMTAs、DAHP以及HKMTs蛋白在烟草细胞中互作。

[0076] 实施例3通过双分子荧光互补技术验证上述免疫共沉淀结果的有效性

[0077] 按照实施例1的方法,建立In-Fusion克隆反应体系,通过内切酶BamH将cry1Ab/c基因同源重组到双分子荧光互补的表达载体PCV-cYFP(Hu et al.,2015)的C端,将CAMTAs、DAHP、HKMTs基因同源重组到表达载体PCV-nYFP(Hu et al.,2015)的C端,同源重组引物见表3,提取质粒后电击转化农杆菌GV3101获得含有外源cry1Ab/c-cYFP基因的GV3101侵染液、含有CAMTAs-nYFP基因的GV3101侵染液、含有DAHP-nYFP基因的GV3101侵染液以及含有HKMTs-nYFP基因的GV3101侵染液。

[0078] 将含有外源cry1Ab/c-cYFP基因的GV3101侵染液分别与含有CAMTAs-nYFP基因的GV3101侵染液、含有DAHP-nYFP基因的GV3101侵染液、含有HKMTs-nYFP基因的GV3101侵染液等比例混匀,混合后每种侵染液的最终OD<sub>600</sub>为0.5~0.6;往该混匀液中加入含有P19的GV3101侵染液,调整P19最终OD<sub>600</sub>为0.3~0.4。28℃避光静置2h后注射烟草叶片,正常培养48h,激光共聚焦观察YFP黄色荧光信号(514nm)。双分子荧光互补结果显示(图5),外源Cry1Ab/c蛋白与水稻内源CAMTAs、DAHP以及HKMTs蛋白在烟草细胞中可以互作(黄色荧光提示可以互作),与上述免疫共沉淀结果一致,间接证明通过本发明的双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀去验证蛋白互作具有较高的可行性。

[0079] 表3 目的基因与双分子荧光互补载体PCV-nYFP(简称nYFP)和PCV-cYFP(简称cYFP)同源重组的引物序列

[0080]

引物名称	引物序列	片段大小 (bp)
HKMTs- nYFP -F	<u>CGGGAGATGCGGATCCATGGAG</u> ATGGACACATCGCC	2054
HKMTs- nYFP -R	GCTCGCCTGGGGATCCATGGTT AACTTTCCCACCCAT	
CAMTAs- nYFP -F	<u>CGGGAGATGCGGATCCATGCAG</u> CAGCAGCAAAATGG	2466
CAMTAs- nYFP -R	GCTCGCCTGGGGATCCGAAATA ACCAGGGAGTGGTGTA	
DAHP- nYFP -F	<u>CGGGAGATGCGGATCCATGGCG</u> CTCGCCACCAA	1611
DAHP-nYFP -R	GCTCGCCTGGGGATCCGAAAGC CAATGGGGGCA	
Cry1Ab/c-cYFP-F	<u>CGGGAGATGCGGATCCATGGAC</u> AACTGCAGGCCATAC	1830
Cry1Ab/c-cYFP -R	GCTCGCCTGGGGATCCTTCAGC CTCGAGTGTTGC	

[0081] 注：下划线是同源重组臂，加粗为内切酶BamH

[0082] 对比例1：

[0083] 本对比例农杆菌侵染液等比例混合后瞬时转化烟草叶片步骤与实施例2基本一样，所不同的在于，本对比例在制备瞬时侵染液过程中未加入沉默抑制子P19，获得亚细胞共定位结果如图6所示，从图6中可以看出共表达2个目的蛋白Cry1 Ab/c-mCherry+CAMTAs-GFP和Cry1 Ab/c-mCherry+HKMTs-GFP的荧光强度较低，表明目的蛋白表达量太低，不适宜进行下一步的免疫共沉淀试验。

[0084] 对比例2

[0085] 本对比例蛋白提取实验步骤与实施例2基本一样，所不同的在于，本对比例在研磨过程中去掉了加20% Triton的操作步骤，获得的SDS-PAGE如图7所示，从图中可以看出蛋白条带模糊，蛋白丰度较低，不适宜进行下一步的免疫共沉淀试验。

[0086] 对比例3

[0087] 本对比例免疫共沉淀试验步骤与实施例2基本一样，所不同的在于，本对比例仅用IP buffer洗了3次GFP-Trap A beads，获得的IP免疫后的Western blot结果(mCherry抗体)如图8所示，泳道1-3为IP buffer洗了6次GFP-Trap A beads的对照组，从图8中可以看出在PVDF膜上呈现单一目的条带，泳道4-6为IP buffer仅洗了3次GFP-Trap A beads的处理组，从图8中可以看出在PVDF膜上呈现出除目的条带外的多条非特异性条带，容易造成对试验结果的误判。

[0088] 结论：通过对以上有效、可靠的试验结果分析，得出结论：双色荧光标签蛋白GFP和mCherry适用于多种蛋白的免疫共沉淀检测，且本方法简单易行，可以实时监控目标蛋白的表达，并选择表达量最高的时期进行免疫共沉淀，极大提高了蛋白互作验证成功率，大幅度降低了时间和经济成本。

## 序列表

<110>	江苏省农业科学院	
<120>	基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法	
<160>	16	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	hkmts-gfp-f (Artificial Sequence)	
<400>	1	
	cggggtcgac ggatccatgg agatggacac atcgcc	36
<210>	2	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	hkmts-gfp-r (Artificial Sequence)	
<400>	2	
	tgctcaccat ggatccatgg ttaactttcc cacccat	37
<210>	3	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	camtas-gfp-f (Artificial Sequence)	
<400>	3	
	cggggtcgac ggatccatgc agcagcagca aaatgg	36
<210>	4	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	camtas-gfp-r (Artificial Sequence)	
<400>	4	
	tgctcaccat ggatccgaaa taaccaggga gtggtgta	38
<210>	5	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	dahp-gfp-f (Artificial Sequence)	
<400>	5	
	cggggtcgac ggatccatgg cgetcgccac caa	33
<210>	6	
<211>	33	
<212>	DNA	

<213> dahp-gfp-r (Artificial Sequence)	
<400> 6	
tgctcaccat ggatccgaaa gccaatgggg gca	33
<210> 7	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> crylab/c-mcherry-f (Artificial Sequence)	
<400> 7	
cggggtcgac ggatccatgg acaactgcag gccatac	37
<210> 8	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> crylab/c-mcherry-r (Artificial Sequence)	
<400> 8	
tgctcaccat ggatccttca gcctcgagtg ttgc	34
<210> 9	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> hkmts- nyfp -f (Artificial Sequence)	
<400> 9	
cgggagatgc ggatccatgg agatggacac atcgcc	36
<210> 10	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> hkmts- nyfp -r (Artificial Sequence)	
<400> 10	
gctcgcttg ggatccatgg ttaactttcc cacccat	37
<210> 11	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> camtas- nyfp -f (Artificial Sequence)	
<400> 11	
cgggagatgc ggatccatgc agcagcagca aatgg	36
<210> 12	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> camtas- nyfp -r (Artificial Sequence)	
<400> 12	
gctcgcttg ggatccgaaa taaccagga gtggtgta	38

<210> 13	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> dahp-nyfp -f (Artificial Sequence)	
<400> 13	
cgggagatgc ggatccatgg cgctcgccac caa	33
<210> 14	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> dahp-nyfp -r (Artificial Sequence)	
<400> 14	
gctcgccctgg ggatccgaaa gccaatgggg gca	33
<210> 15	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> crylab/c-cyfp-f (Artificial Sequence)	
<400> 15	
cgggagatgc ggatccatgg acaactgcag gccatac	37
<210> 16	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> crylab/c-cyfp -r (Artificial Sequence)	
<400> 16	
gctcgccctgg ggatccttca gcctcgagtg ttgc	34

```

mCherry M VSRG EEDNMA I I K E F M R F F V H M E G S V N G H E F E I E G E G E G R P Y E G T Q T A K L K V T R G G L P F A W D I L S P Q F 70
GFP      M VSRGEE----LFTGVVPII V E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G - R L P V E W P T L V T T L 65

mCherry M Y G S K A Y V K H P A D I P -- D Y L K L S F E E G F K W E R V M N F E D G G V V T V T Q D S S L Q D G E F I Y K V K L R G T N E P S D G 138
GFP      T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M F E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L R G I D F K E D G 135

mCherry M P V M Q R K T M G - W E A S S E R M Y P E D -- G A L K G E I K Q R L K L R D G -- G H Y D A E V K T T Y K A K K E V Q L P G A Y N V N I K 203
GFP      N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q R N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q O N T P I G D G E V L L E D N H Y L S T Q 205

mCherry M L D I T S - H N E D Y T I V E Q Y E R A E G R H S T G C M D E L Y K Y P Y D V P D Y A 245
GFP      S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T L C M D E L Y K ----- 239
    
```

图1

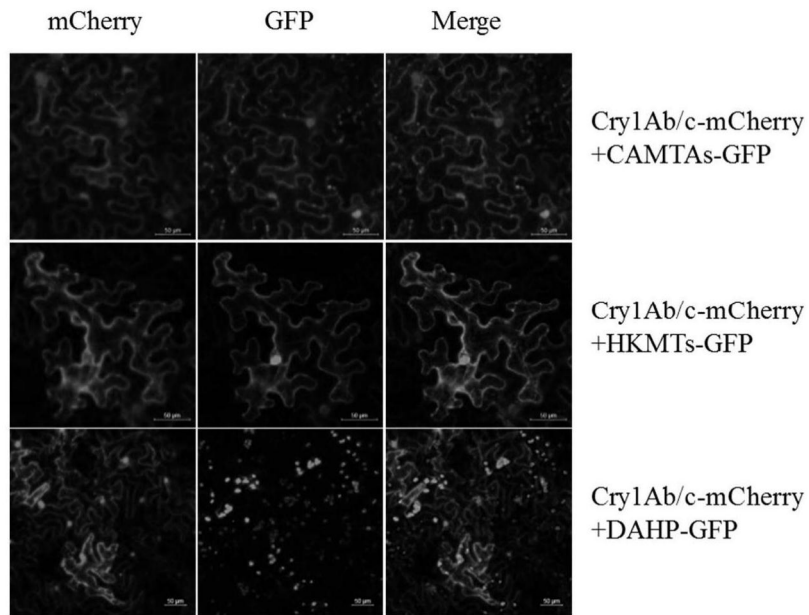


图2

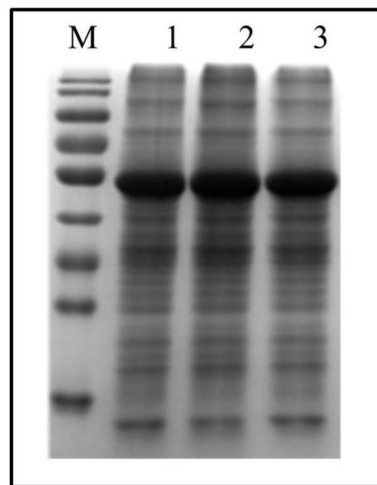


图3

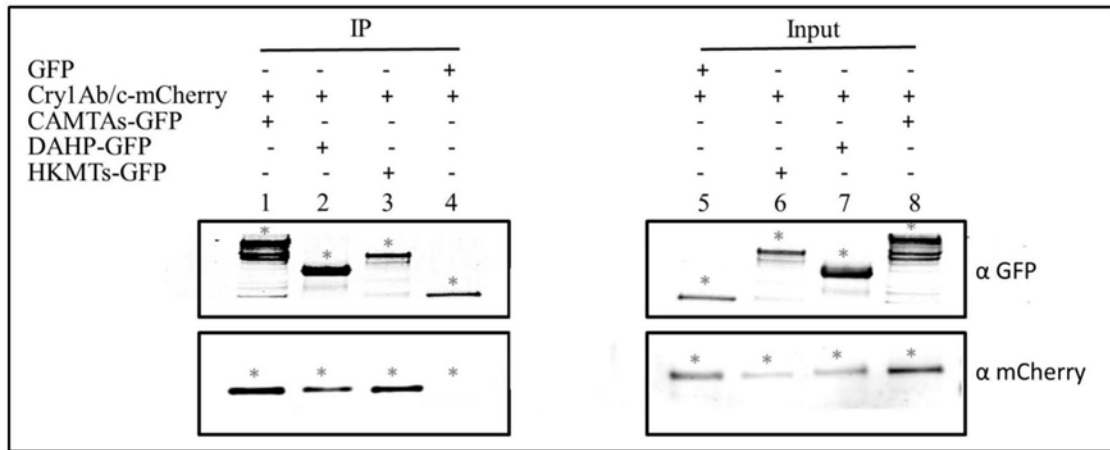


图4

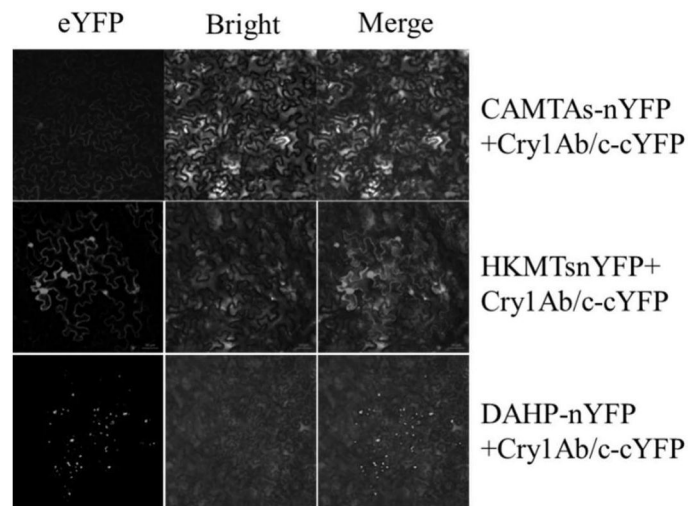


图5

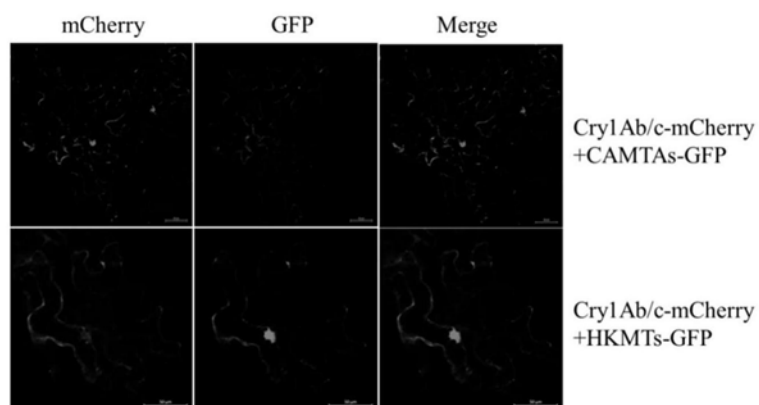


图6

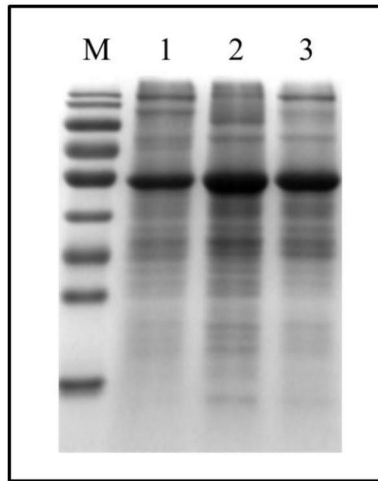


图7

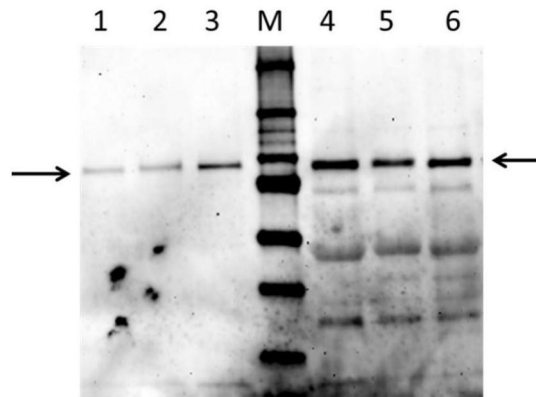


图8

专利名称(译)	基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110456075A</a>	公开(公告)日	2019-11-15
申请号	CN201910825400.9	申请日	2019-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	施雨 纪锐 方继朝		
发明人	付健美 施雨 纪锐 方继朝		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/541 G01N33/58 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6458 G01N33/533 G01N33/541 G01N33/582 G01N33/6845		
代理人(译)	王艳		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开基于双色荧光标签蛋白GFP和mCherry进行免疫共沉淀检测蛋白互作的方法，将目标基因分别构建到表达载体的N端，提质粒后转化农杆菌，制备农杆菌侵染液共注射模式植物，提取共注射烟草叶片蛋白，用GFP-Trap A beads去富集带有GFP标签的目标蛋白，同时将带有mCherry标签的其他目标蛋白免疫下来，最后分别使用GFP和mCherry标签抗体检测目标蛋白在免疫前和免疫后的表达及互作情况。本发明在实现荧光可视化实时监控目标蛋白在活细胞内表达及共定位的同时，可实时选择表达量最高的时期直接进行免疫共沉淀高效验证蛋白互作，极大提高蛋白互作验证的成功率，大幅度降低时间和经济成本。

```

mCherry ██████████DNMAIIEKPEMRP██████████EIE██████████RPIE██████████A██████████KVA██████████GFPADISPOF 70
GFP ██████████-----LPTGVVPTIL██████████ELD██████████SVS██████████DATYKIL██████████PICK██████████R██████████V██████████PTVVTL 65

mCherry ██████████M██████████SKAVK██████████ADIP██████████-██████████YL██████████LSE██████████K██████████M██████████E██████████G██████████VVTYQDSLDGCEIYK██████████V██████████T██████████PS 138
GFP ██████████T██████████VQCFSR██████████DEM██████████K██████████E██████████P██████████SAM██████████Y██████████V██████████I██████████P██████████D██████████NYKTRAEV██████████K██████████EGD██████████I██████████V██████████RIE██████████E██████████ID██████████KE 135

mCherry ██████████P██████████M██████████Q██████████MG-WEASSEMYPED--GAL██████████E██████████D██████████L██████████K██████████L██████████-██████████G██████████Y██████████AEV██████████T██████████Y██████████K██████████D██████████C██████████AYV██████████N██████████IK 203
GFP ██████████N██████████ILGE██████████L██████████EYNYNSENVYIMADK██████████R██████████K██████████G██████████I██████████N██████████P██████████L██████████H██████████I██████████E██████████S██████████VOLA██████████EYQ██████████Q██████████P██████████IG██████████C██████████L██████████DNEYLSTQ 205

mCherry ██████████LDIYS-██████████E██████████DYTTVEQ██████████R██████████AGRHS██████████C████████████████████P██████████YDVPDYA 245
GFP ██████████S██████████ALSKE██████████R██████████K██████████D██████████E██████████V██████████LL██████████E██████████V██████████TAAGI██████████L████████████████████----- 239

```