



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105891462 A

(43)申请公布日 2016.08.24

(21)申请号 201610474048.5

(22)申请日 2016.06.24

(71)申请人 厦门大学

地址 361000 福建省厦门市思明南路422号

(72)发明人 吴丽娜 汪旭 颜晓梅

(74)专利代理机构 厦门市首创君合专利事务所
有限公司 35204

代理人 张松亭

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

一种定量检测蛋白质相互作用强度的方法

(57)摘要

本发明公开了一种定量检测蛋白质相互作用强度的方法,引入相对报告因子表达量,结合流式细胞检测技术与细菌双杂交系统,实现了蛋白质相互作用强度的定量检测。

1. 一种定量检测蛋白质相互作用强度的方法,其特征在于:基于细菌双杂交系统与流式细胞检测技术,包括:

1)选择一对待确定相互作用强度的蛋白质A与蛋白质B;构建带有编码蛋白质A的基因序列a与第一标签的第一载体,构建带有编码蛋白质B的基因序列b与第二标签的第二载体;其中第一载体为低拷贝载体,第二载体为高拷贝载体;

2)将所述第一载体与第二载体共转化至报告细菌,得到同时包含基因序列a和基因序列b的重组细胞;

3)在适合表达蛋白质A与蛋白质B的条件下,培养步骤2)得到的重组细胞;重组细胞表达蛋白质A与蛋白质B;蛋白质A与蛋白质B相互作用后可促进报告基因的转录与表达,产生报告因子;

4)在步骤3)得到的体系中对报告因子和第一标签进行直接或间接的免疫荧光双染;通过流式细胞检测技术分别检测报告因子和第一标签相对应的荧光强度,分别得到报告因子和蛋白质A的表达量;报告因子表达量与蛋白质A表达量的比值为相对报告因子表达量,该相对报告因子表达量的值可定量蛋白质A与蛋白质B相互作用的强度:该相对报告因子表达量的值越大,表明蛋白质A与蛋白质B的相互作用越强;该相对报告因子表达量的值越小,表明蛋白质A与蛋白质B的相互作用越弱。

2. 根据权利要求1所述的定量检测蛋白质相互作用强度的方法,其特征在于:所述第一标签为His,Flag,TC,HA。

3. 根据权利要求1所述的定量检测蛋白质相互作用强度的方法,其特征在于:所述第二标签为Flag,His,TC,HA。

4. 根据权利要求1所述的定量检测蛋白质相互作用强度的方法,其特征在于:所述第一载体为pKT25,pKT25N,pKT25-His。

5. 根据权利要求1所述的定量检测蛋白质相互作用强度的方法,其特征在于:所述第二载体为pUT18C,pUT18,pUT18-Flag。

6. 根据权利要求1所述的定量检测蛋白质相互作用强度的方法,其特征在于:所述报告细菌为E.coli BTH101,E.coli DHM1。

7. 根据权利要求1所述的定量检测蛋白质相互作用强度的方法,其特征在于:所述报告基因为lacZ,gfp,egfp;其对应的报告因子分别为 β -半乳糖苷酶,GFP,EGFP。

一种定量检测蛋白质相互作用强度的方法

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质检测技术领域,具体涉及一种定量检测蛋白质相互作用强度的方法。

背景技术

[0002] 定性筛选与鉴定和定量分析是蛋白质相互作用研究的两个主要目的,蛋白质相互作用的体内定量检测有助于增进我们对蛋白质相互作用网络和相互作用结构基础的理解。对其他相关领域的研究,比如设计新的相互作用蛋白对,抗体亲和力成熟研究等也有促进作用。但目前很少有方法可以在高通量筛选的同时做到定量分析。以等温滴定为代表的定量分析方法多用于已知相互作用蛋白的分析,一般需要对蛋白质进行纯化,导致实验过程相对复杂,无法满足高通量检测的要求,而且体外检测无法反映蛋白质在细胞内的真实情况。以酵母双杂交技术为代表的体内检测技术虽然具备高通量、操作简单等优点,但是由于这类方法并不直接检测相互作用蛋白,而是通过转录激活等原理间接获得相互作用信息。以酵母双杂交技术为例,常用的检测转录激活的报告因子包括 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、荧光蛋白以及生长曲线。然而,由于转录激活的机制复杂,目前还无法通过对报告因子的检测对蛋白-蛋白相互作用进行定量分析。此外,在细胞中还有其他因素会影响蛋白相互作用以及报告因子的读出,比如蛋白质、mRNA的稳定性和翻译活性以及质粒拷贝数等。因为无法建立相互作用强度与报告因子读出之间的数量关系,所以这类方法只能用于定性研究。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于克服现有技术的不足之处,提供了一种定量检测蛋白质相互作用强度的方法,引入相对报告因子表达量,结合流式细胞检测技术与细菌双杂交系统,实现了蛋白质相互作用强度的定量检测。

[0004] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0005] 一种定量检测蛋白质相互作用强度的方法,基于细菌双杂交系统与流式细胞检测技术,包括:

[0006] 1)选择一对待确定相互作用强度的蛋白质A与蛋白质B;构建带有编码蛋白质A的基因序列a与第一标签的第一载体,构建带有编码蛋白质B的基因序列b与第二标签的第二载体;其中第一载体为低拷贝载体,第二载体为高拷贝载体;

[0007] 2)将所述第一载体与第二载体共转化至报告细菌,得到同时包含基因序列a和基因序列b的重组细胞;

[0008] 3)在适合表达蛋白质A与蛋白质B的条件下,培养步骤2)得到的重组细胞;重组细胞表达蛋白质A与蛋白质B;蛋白质A与蛋白质B相互作用后可促进报告基因的转录与表达,产生报告因子;

[0009] 4)在步骤3)得到的体系中对报告因子和第一标签进行直接或间接的免疫荧光双染;通过流式细胞检测技术分别检测报告因子和第一标签相对应的荧光强度,分别得到报

告因子和蛋白质A的表达量;例如,在步骤3)得到的体系中加入报告因子对应的荧光底物,报告因子可水解该荧光底物,产生荧光物质;通过流式细胞仪检测该荧光物质的荧光强度可得到报告因子的表达量;第一标签的免疫荧光染色和流式检测采用本领域常规技术即可完成;报告因子表达量与蛋白质A表达量的比值为相对报告因子表达量,该相对报告因子表达量的值可定量蛋白质A与蛋白质B相互作用的强度:该相对报告因子表达量的值越大,表明蛋白质A与蛋白质B的相互作用越强;该相对报告因子表达量的值越小,表明蛋白质A与蛋白质B的相互作用越弱。

[0010] 免疫荧光染色的过程中,对于非跨膜荧光底物,加入荧光底物染色前需对重组细胞进行破膜处理,改变细胞的渗透性;对于可跨膜荧光底物,可直接进行荧光染色;所述荧光底物的终浓度可为10nM~1mM,反应时间可为1~240min,反应温度可为4~80℃。

[0011] 一实施例中:所述第一标签为His,Flag,TC,HA。

[0012] 一实施例中:所述第二标签为Flag,His,TC,HA。

[0013] 一实施例中:所述第一载体为pKT25,pKT25N,pKT25-His。

[0014] 一实施例中:所述第二载体为pUT18C,pUT18,pUT18-Flag。

[0015] 一实施例中:所述报告细菌为E.coli BTH101,E.coli DHM1。

[0016] 一实施例中:所述报告基因为lacZ,gfp,egfp;其对应的报告因子分别为β-半乳糖苷酶,GFP,EGFP。

[0017] 本发明采用的仪器、设备、材料、试剂等,除有特别说明外,均可从市面上购买到。本发明中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等分子克隆实验室手册中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件进行。

[0018] 本技术方案与背景技术相比,它具有如下优点:

[0019] 本发明引入相对报告因子表达量,结合流式细胞检测技术与细菌双杂交系统,实现了蛋白质相互作用强度的定量检测,克服了现有技术中由细菌异质性、培养时间、诱导浓度等各种因素导致的无法通过检测报告因子或相互作用蛋白来定量蛋白相互作用强度的缺陷,实现了在单细菌水平对体内蛋白质相互作用强度的灵敏、快速、高分辨定量检测。

附图说明

[0020] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0021] 图1为实施例2中β-gal酶活性检测结果。

[0022] 图2为实施例2中TolB蛋白和Pal蛋白的Western blot检测结果。

[0023] 图3为实施例2中在不同培养时间下重组细胞表达β-gal和TolB蛋白的双参数检测流式直方图。

[0024] 图4为实施例2中MF1_{β-gal}值和MF1_{His-TolB}值的线性曲线。

[0025] 图5为实施例4中双参数流式检测所得的不同单菌落中β-gal表达与His-TolB表达的相关曲线。

[0026] 图6为实施例4中β-gal酶活与相对报告因子表达量RRPE的相关性。

[0027] 图7为实施例5中质粒pKT25-His-tolB^{Δ22-25}和pKT25-His-tolB^{Δ22-33}的构建过程的琼脂糖凝胶电泳结果。

[0028] 图8为实施例5中三种不同相互作用强度蛋白对双杂交细菌某一单菌落样品的双

荧光散点图以及它们对应荧光通道的信号分布直方图。

[0029] 图9为实施例5中Pal与TolB、TolB^{Δ22-25}和TolB^{Δ22-33}各自构成的双杂交细菌的相对报告因子表达量。

具体实施方式

[0030] 下面通过实施例具体说明本发明的内容：

[0031] 实施例1：利用本发明的定量检测方法检测蛋白对的相互作用强度

[0032] 1)选择一对待确定相互作用强度的蛋白质A与蛋白质B，本实施例之中以TolB蛋白和Pal蛋白为例，它们是革兰氏阴性细菌内膜蛋白质系统中Tol-Pal系统的两个功能蛋白，TolB蛋白和Pal蛋白相互作用组成了细菌外膜复合体。

[0033] 以大肠杆菌K12基因组为模板，设计tolB和pal基因的引物并于生工合成，通过PCR分别获取tolB和pal基因，将它们分别插入细菌双杂交载体pKT25(带有His标签，且为低拷贝质粒)、pUT18C(带有Flag标签，且为高拷贝质粒)的EcoR I和Xho I酶切位点，构建得到pKT25-His-tolB与pUT18C-Flag-pal。

[0034] 2)将上述pKT25-His-tolB与pUT18C-Flag-pal共转化至报告细菌E.coli BTH101感受态中，培养得到同时包含tolB基因序列和pal基因序列的重组细胞E.coli BTH101pKT25-His-tolB/pUT18C-Flag-pal，完成细菌双杂交系统的构建。采用常规的蓝白斑筛选及比色定量法确定上述细菌双杂交系统的成功建立，同时采用Western Blot、免疫共沉淀、荧光显微镜等传统生物学实验手段进行验证。

[0035] 3)用接种环刮取少量上述重组细胞E.coli BTH101pKT25-His-tolB/pUT18C-Flag-pal在抗性LB平板上划线，并于30℃培养48h；用灭菌牙签随机挑取一个单菌落，接种于含有100μg/mL氨苄青霉素和50μg/mL卡那霉素的LB培养基中，IPTG诱导下，30℃，250rpm摇床培养，诱导重组细胞表达TolB蛋白和Pal蛋白，TolB蛋白和Pal蛋白相互作用后促进报告基因lacZ的转录与表达，产生报告因子β-半乳糖苷酶(β-gal)。

[0036] 4)检测上述体系中相对报告因子表达量(Relative reporter protein expression, RRPE)的值，可得到TolB蛋白和Pal蛋白的相对相互作用强度：该相对报告因子表达量的值越大，表明TolB蛋白和Pal蛋白的相互作用越强；该相对报告因子表达量的值越小，表明TolB蛋白和Pal蛋白的相互作用越弱。具体地：

[0037] 将相对报告因子表达量(Relative reporter protein expression, RRPE)定义为：

[0038] 相对报告因子表达量RRPE=报告因子β-gal表达量/TolB蛋白表达量

[0039] 本实施例之中，采用免疫荧光双染的方法进行，在步骤3)得到的体系中加入对应报告因子β-gal的荧光底物C₁₂FDG；β-gal可水解C₁₂FDG，产生绿色荧光；通过流式细胞仪检测绿色荧光强度(用绿色荧光的荧光中位值(Median fluorescence intensity, MFI)表征，记为MFI_{β-gal})可得到报告因子β-gal的表达量；同时，通过流式细胞仪检测His标签(采用本领域常规技术进行荧光染色)的红色荧光强度(用红色荧光中位值表征，记为MFI_{His-TolB})可得到TolB蛋白的表达量；因而，通过流式细胞仪检测两种荧光强度即可得到相对报告因子表达量RRPE的值，即为：

[0040] 相对报告因子表达量RRPE=MFI_{β-gal}/MFI_{His-TolB}

[0041] 这样,通过流式细胞仪检测即可得到相对报告因子表达量的值,从而直观地判断To1B蛋白和Pa1蛋白的相互作用强度。

[0042] 利用上述方法,可以定量检测任意一对蛋白质的相互作用强度。

[0043] 实施例2:本发明的定量检测方法的验证之一:不同培养时间下的有效性验证

[0044] 1)用接种环刮取少量实施例1中步骤2)得到的重组细胞E.coli BTH101pKT25-His-tolB/pUT18C-Flag-pa1在抗性LB平板上划线,并于30℃培养48h。用灭菌牙签随机挑取一个单菌落,接种于装有15mL含100μg/mL氨苄青霉素和50μg/mL卡那霉素的LB培养基的锥形瓶中,30℃,250rpm摇床培养。从第12h开始,每隔2h从锥形瓶中取出适量菌液直至20h,将剩余的菌液放回摇床中继续培养。取出的菌液先调节OD₆₀₀至1.0,接着取其中的200μL进行固定处理,其余菌液置于4℃保存。固定后的细菌重悬于GTE缓冲液中,并被保存于4℃,待检测用。

[0045] 2)参照实施例1中步骤4)的方法,通过流式细胞仪检测本实施例步骤1)中不同培养时间的菌液中MFI_{β-gal}值和MFI_{His-To1B}值,计算得到检测相对报告因子表达量RRPE。理论上,To1B蛋白和Pa1蛋白的相互作用强度是一定的,因而可以反过来验证用相对报告因子表达量RRPE来对蛋白相互作用强度进行定量是否有效。

[0046] 同时,作为对比地,检测报告因子β-gal的表达量、酶活,To1B蛋白和Pa1蛋白的表达量,验证其是否可用于对蛋白-蛋白相互作用进行定量分析。

[0047] 对比实验的结果如图1至图3所示。图1中可看出,细菌总体的β-gal酶活性从第12h的375.1U/mL上升到第16h的702.1U/mL,之后开始逐渐下降。同样的,To1B蛋白和Pa1蛋白的Western blot实验也出现了类似现象(图2)。另一方面,通过流式细胞仪在单细菌水平的分析可知,随着培养时间的增加,表达蛋白的细菌比例以及单个细菌的蛋白表达量均有明显变化。图3是不同培养时间下重组细胞蛋白表达双参数检测的流式直方图,其中FL1为绿色荧光通道,代表β-gal的表达情况;FL2为红色荧光通道,代表His-To1B蛋白的表达情况。可见,表达β-gal蛋白和His-To1B蛋白的阳性菌比例随培养时间的延长不断升高(从7.5%到75.5%),而这部分阳性菌细菌的荧光强度却一直下降,其荧光中位值分别从14500(FL1)和4155(FL2)下降到2508和495,说明单个细菌的蛋白含量随培养时间的增加反而降低,这一现象可能是由细菌分裂导致的蛋白质稀释引起;而阳性菌比例的增加和单个细菌蛋白表达量的下降,也在单细菌水平解释了图1和图2中β-gal、To1B蛋白和Pa1蛋白的总体表达量/活性含量先升高后下降的现象。

[0048] 正是由于上述原因,导致报告因子β-gal的表达量、酶活,或者To1B蛋白和Pa1蛋白的表达量都无法用于对蛋白相互作用强度进行定量分析。

[0049] 然而,利用本发明的方法,如图4所示,通过流式细胞仪检测本实施例步骤1)中不同培养时间的菌液中MFI_{β-gal}值和MFI_{His-To1B}值,计算得到检测相对报告因子表达量RRPE。图4中可以看出,MFI_{β-gal}值和MFI_{His-To1B}值具有非常好的线性关系($R^2=0.9995$),表明随着培养时间的延长,MFI_{β-gal}值和MFI_{His-To1B}值的比值RRPE仍然保持恒定,不受培养时间的影响。这也反过来验证了本发明的采用相对报告因子表达量RRPE来对蛋白相互作用强度进行定量的方法,可以排除培养时间的影响,是有效的。

[0050] 实施例3:本发明的定量检测方法的验证之二:不同的诱导剂IPTG浓度下的有效性验证

[0051] 1)用接种环刮取少量实施例1中步骤2)得到的重组细胞E.coli BTH101pKT25-His-tolB/pUT18C-Flag-pal在抗性LB平板上划线,并于30℃培养48h。用灭菌牙签随机挑取一个单菌落在50μL的LB培养基中搅拌并尽量混匀。从中分别取10μL菌液加入到15mL各含0、50、500μM IPTG,以及100μg/mL氨苄青霉素和50μg/mL卡那霉素的LB培养基中,30℃,250rpm摇床培养。分别在第6、10、14、18h时取出适量菌液,调节OD₆₀₀至1.0,于4℃保存,待检测。

[0052] 2)参照实施例1中步骤4)的方法,通过流式细胞仪检测本实施例步骤1)中在不同IPTG浓度诱导下培养的菌液中MF1_{β-gal}值和MF1_{His-TolB}值,计算得到检测相对报告因子表达量RRPE。理论上,TolB蛋白和Pal蛋白的相互作用强度不受IPTG浓度的影响,是一定的,因而可以反过来验证用相对报告因子表达量RRPE来对蛋白相互作用强度进行定量是否有效。

[0053] 结果显示,在不同的IPTG浓度诱导情况下,MF1_{β-gal}值和MF1_{His-TolB}值的比值RRPE仍然保持恒定,不受IPTG浓度的影响。这也反过来验证了本发明的采用相对报告因子表达量RRPE来对蛋白相互作用强度进行定量的方法,可以排除IPTG浓度的影响,是有效的。

[0054] 实施例4:本发明的定量检测方法的验证之三:不同单菌落得到的体系中的有效性验证

[0055] 本领域技术人员可知,细菌个体之间的异质性有时会造成蛋白表达量的巨大差异,而这些差异可能随着细菌的增殖而不断传递和放大,最终导致菌落之间的异质性。由不同单菌落扩增得到的体系中,其β-gal酶活往往有巨大差异,因而对于不同单菌落扩增得到的体系,通过测定β-gal酶活来判断TolB蛋白和Pal蛋白的相互作用强度是不准确的。本实施例之中,验证了相对报告因子表达量RRPE是否适用于不同单菌落培养得到的体系中蛋白相互作用强度的检测。

[0056] 1)用接种环刮取少量实施例1中步骤2)得到的重组细胞E.coli BTH101pKT25-His-tolB/pUT18C-Flag-pal在抗性LB平板上划线,并于30℃培养48h。用灭菌牙签随机挑取若干个单菌落,分别接种于2mL含100μg/mL氨苄青霉素和50μg/mL卡那霉素的LB培养基中,30℃,250rpm摇床培养16h。将菌液的OD₆₀₀值调节至1.0待用。

[0057] 2)参照实施例1中步骤4)的方法,通过流式细胞仪检测本实施例步骤1)中由不同单菌落培养得到的体系中MF1_{β-gal}值和MF1_{His-TolB}值,计算得到检测相对报告因子表达量RRPE。理论上,即使在不同单菌落中,TolB蛋白和Pal蛋白的相互作用强度也都是有一定的,因而可以反过来验证用相对报告因子表达量RRPE来对蛋白相互作用强度进行定量是否有效。

[0058] 结果:图5显示了双参数流式检测所得的不同单菌落中β-gal表达与His-TolB表达的相关曲线,可见MF1_{β-gal}值和MF1_{His-TolB}值之间依然存在良好的线性关系($R^2=0.9789$),即相对报告因子表达量RRPE仍然保持恒定,与理论上“TolB蛋白和Pal蛋白在不同单菌落中的相互作用强度一定”相符合,表明RRPE不受不同单菌落的影响。因而也反过来验证了本发明的采用相对报告因子表达量RRPE来对蛋白相互作用强度进行定量的方法,可以排除不同单菌落这个因素的影响,是有效的。

[0059] 图6显示了β-gal酶活与相对报告因子表达量RRPE的相关性。β-gal酶活和RRPE的平均值分别为 255.11 ± 112.03 和 2.04 ± 0.16 ,各自的变异系数为44%和8%。结合图5中的线性拟合曲线判断,表明二者具有良好的相关性。

[0060] 此外,除了实施例2-4中提到的培养时间、诱导剂浓度和不同单菌落对报告因子表达和活性的影响之外,还有一些因素导致无法单独用报告因子的量来定量蛋白间的相互作

用强度。通过实验虽然可以排除细菌双杂交系统中质粒丢失的情况。然而基于单细菌水平的研究发现细菌双杂交系统中细菌个体存在明显的异质性。

[0061] 大肠杆菌中存在全或无的现象,即在乳糖操纵子的作用下,随着培养基中乳糖类似物(TMG)浓度的增加,不是所有大肠杆菌个体都线性地增加 β -半乳糖苷酶表达,而是有些个体完全高活性地表达lacZ基因,而另一部分个体则完全不表达。细菌双杂交系统中,报告基因和相互作用蛋白的表达受乳糖操纵子调控,因而蛋白的表达同样存在双稳态现象。并且,相互作用蛋白的表达、cAMP的生成、报告基因的表达形成更为复杂的三级正反馈调节系统。此外,两种质粒在转化以及细菌分裂时分配的随机性,会导致细菌个体间质粒拷贝数的不同,造成蛋白表达量的差异,最终影响到菌落中蛋白表达的比例。

[0062] 因而,单纯通过检测报告因子或相互作用蛋白的量,无法实现对蛋白相互作用强度的准确定量。但通过本发明的方法,引入相对报告因子表达量,结合流式细胞检测技术与细菌双杂交系统,能够排除各项细菌异质性、培养时间、诱导浓度等因素的影响,实现蛋白质相互作用强度的定量检测。

[0063] 实施例5:本发明的定量检测方法的验证之四:对具有不同相互作用强度的蛋白对的有效性验证

[0064] 本实施例之中,验证了本发明的定量检测方法是否适用于不同相互作用强度的蛋白对的检测。

[0065] TolB-Pal蛋白对中,TolB由N端的 α/β 型结构域以及C端与Pal相互作用的 β -propeller型结构域两部分组成。TolB是一个周质蛋白,含有一段21个氨基酸的信号肽,并能够在蛋白进入周质空间时裂解。有文献指出,TolB蛋白N端不同长度的敲除会对与Pal的相互作用产生影响,使二者的亲和力下降(Bonsor D A,Hecht O,Vankemmelbeke M,et al.Allosteric beta-propeller signalling in TolB and its manipulation by translocating colicins[J].Embo Journal,2009,28(18):2846-2857.)。因此,本实施例之中,对TolB蛋白N端进行不同长度的敲除(分别为22-25和22-33号氨基酸残基缺失),利用其与Pal亲和力的变化,得到具有不同相互作用强度的蛋白对,采用本发明的方法检测,可以反过来验证本发明的定量检测方法是否适用于各种蛋白对。

[0066] 1)质粒pKT25-His-tolB Δ^{22-25} 和pKT25-His-tolB Δ^{22-33} 的构建:

[0067] 以质粒pEB362为模板,利用SEQ 1D No.5至SEQ 1D No.7所示的引物tolB Δ^{22-25} -F、tolB Δ^{22-33} -F和tolB-R,通过PCR反应分别获得两端带有限制性酶切位点EcoR 1和Xho 1的tolB Δ^{22-25} 和tolB Δ^{22-33} 的基因,设置PCR反应体系如下:

[0068]

反应组份	用量
引物 F (正向)	100 nM
引物 R (反向)	100 nM
<i>TransTaq</i> [®] DNA polymerase	1 μ L
10 $\times$ <i>TransTaq</i> [®] HiFi Buffer II	5 μ L
dNTPs	4 μ L
模板	1 μ L
dd H ₂ O	补足至 50 μ L

[0069] 以上体系混匀后平均分成两管,按如下程序进行PCR反应:

[0070]

循环数	温度	时间
1	95 °C	3 min
35	95 °C	30 s
	60 °C	30 s
	72 °C	30 s
	72 °C	5 min

[0071] PCR反应结束后,首先对产物进行琼脂糖凝胶电泳验证,之后利用DNA片段纯化试剂盒对PCR产物进行纯化回收。

[0072] 对质粒pKT25-His-to1B和以上PCR产物分别按如下反应体系进行双酶切:

[0073]

反应组份	用量
10 $\times$ H Buffer	8 μ L
质粒或 PCR 产物	约 2000 ng
限制性内切酶 <i>EcoR</i> I	4 μ L
限制性内切酶 <i>Xho</i> I	4 μ L
ddH ₂ O	补足至 80 μ L

[0074] 以上体系混匀后分成4管,于37℃反应3h。质粒的酶切产物采用切胶回收;PCR产物酶切后用DNA片段纯化试剂盒回收。所有纯化回收后的产物均用琼脂糖凝胶电泳验证,并用NANO-DROP测定DNA浓度。

[0075] 利用T4连接酶将以上双酶切后的质粒载体与PCR产物连接,设置体系如下:

[0076]

反应组份	用量
10× T4 DNA Ligase Buffer	1 μ L
T4 DNA Ligase	0.5 μ L
质粒载体	0.03-0.1 pmol
PCR 产物	0.3 pmol
ddH ₂ O	补足至 10 μ L

[0077] 连接体系于16℃反应过夜,之后转化至E.coli ER2738感受态细菌中。在含有卡那霉素的平板上挑取单菌落进行PCR验证,将阳性克隆扩大培养后送测序公司测序。

[0078] 如图7所示,A为目的片段PCR后琼脂糖凝胶电泳的结果,tolB Δ^{22-25} 和tolB Δ^{22-33} 基因的理论长度分别为1218bp和1194bp,对照DNA marker可知两者的条带位置正确。B为质粒载体pKT25-His-tolB和PCR产物双酶切纯化后的电泳结果,其中质粒载体的理论长度约为3400bp,三者的条带位置均接近理论值。C为菌落PCR验证的电泳结果,几个单菌落均有PCR产物,且条带位置正确,说明质粒载体中成功插入了目的基因片段。进一步的测序结果证明插入基因片段的序列完全正确。表明pKT25-His-tolB Δ^{22-25} 和pKT25-His-tolB Δ^{22-33} 质粒成功构建。

[0079] 2)参照实施例1中的步骤,将构建成功的质粒pKT25-His-tolB Δ^{22-25} 和pKT25-His-tolB Δ^{22-33} ,以及pKT25-His-tolB,分别和质粒pUT18C-Flag-pal共转化至报告菌株E.coli BTH101中,接着各自挑取3个单菌落培养;之后进行免疫荧光双染,并用流式细胞仪检测。

[0080] 图8显示了三种不同相互作用强度蛋白对双杂交细菌某一单菌落样品的双荧光散点图以及它们对应荧光通道的信号分布直方图。三者的蛋白表达比例各异。但是通过计算各自的相对报告因子表达量可以看出该参数与蛋白的相互作用强度有很好的相关性。如图9所示,Pal与TolB、TolB Δ^{22-25} 和TolB Δ^{22-33} 各自构成的双杂交细菌的相对报告因子表达量分别为 2.04 ± 0.21 、 0.88 ± 0.07 和 0.91 ± 0.06 ,而文献报道的三者的解离常数分别为 38 ± 3 nM、 313 ± 15 nM和 337 ± 18 nM,而解离常数越小,相互作用越强。有上述结果可知,当蛋白对的相互作用越强,相对报告因子表达量则越大。以上实验结果,一方面验证了本发明的定量方法在不同相互作用强度蛋白对中的有效性,也进一步说明了相对报告因子表达量能用于细菌双杂交系统中各种蛋白对相互作用强度的评估。

[0081] 附:

[0082] 本发明实施例中,涉及的引物如下所示(同时记载在说明书核苷酸和氨基酸序列表):

[0083]

名称	编号	序列	用途
T25-F	SEQ ID No.1	5'-TGTCGAAAGAGCGGCTTGACT-3'	用于含 T25 基因片段的质粒的 荧光定量 PCR。
T25-R	SEQ ID No.2	5'-AGTCG CGGAAGTTGGACAGATG-3'	
lacZ-F	SEQ ID No.3	5'-GTTTACAGGGCGGCTTCGT-3'	用于 <i>E. coli</i> BTH101 基因组中 <i>lacZ</i> 基因的荧光定量 PCR
lacZ-R	SEQ ID No.4	5'-TGCGGGTCGCTTCAC TTA-3'	
tolB ^{A22-25} -F	SEQ ID No.5	5'-CGGGAATTCGTGATCG ACAGCGGTGTAGATTCC-3'	用于获得两端带有酶切位点的 <i>tolB</i> ^{A22-25} 和 <i>tolB</i> ^{A22-23} 基因
tolB ^{A22-33} -F	SEQ ID No.6	5'-CGGG AATTCGGTTCGT CCTATTGGTGTGTTTCCT-3'	
tolB-R	SEQ ID No.7	5'-CCGCTCGAGTCACA GATACGGCGACCAGGCAGG-3'	

[0084] 本发明实施例中,除有特别说明外,其余的PCR反应体系如下所示:

[0085]

反应组份	用量
2× Premix	10 μL
引物 F	100 nM
引物 R	100 nM
模板	1 μL
dd H ₂ O	补足至 20 μL

[0086] 本发明实施例中,除有特别说明外,其余的PCR反应进程如下所示:

[0087]

循环数	温度	时间
1	95 °C	2 min
40	95 °C	20 s
	55 °C	20 s
	72 °C	30 s
	72 °C	5 min

[0088] 将质粒、细菌基因组或者菌液(重悬于超纯水中,95℃加热处理10min)样品与PCR反应的其他组份按4倍用量混合均匀后,分装至荧光定量PCR专用的PCR管中,每管20μL,共3管,作为平行样进行PCR反应。

[0089] 以上所述,仅为本发明较佳实施例而已,故不能依此限定本发明实施的范围,即依

本发明专利范围及说明书内容所作的等效变化与修饰,皆应仍属本发明涵盖的范围内。

序列表

<110>厦门大学

<120>一种定量检测蛋白质相互作用强度的方法

<160>7

<210>1

<211>21

<212>DNA

<213>人工序列

[0001] <400>1

tgtcgaaaga gcggcttgac t 21

<210>2

<211>22

<212>DNA

<213>人工序列

<400>2

agtcgcggaa gttggacaga tg 22

<210>3

<211>19

<212>DNA

<213>人工序列

<400>3

gtttacaggg cggttcgt 19

<210>4

<211>18

[0002]

<212>DNA

<213>人工序列

<400>4

tgcgggtcgc ttactta 18

<210>5

<211>33

<212>DNA

<213>人工序列

<400>5

cgggaattcg tgatcgacag cgggttagat tcc 33

<210>6

<211>33

<212>DNA

<213>人工序列

<400>6

[0003]

cgggaattcg gtcgtcctat tgggtgtgtt cct 33

<210>7

<211>33

<212>DNA

<213>人工序列

<400>7

ccgctcgagt cacagatacg gcgaccaggc agg 33

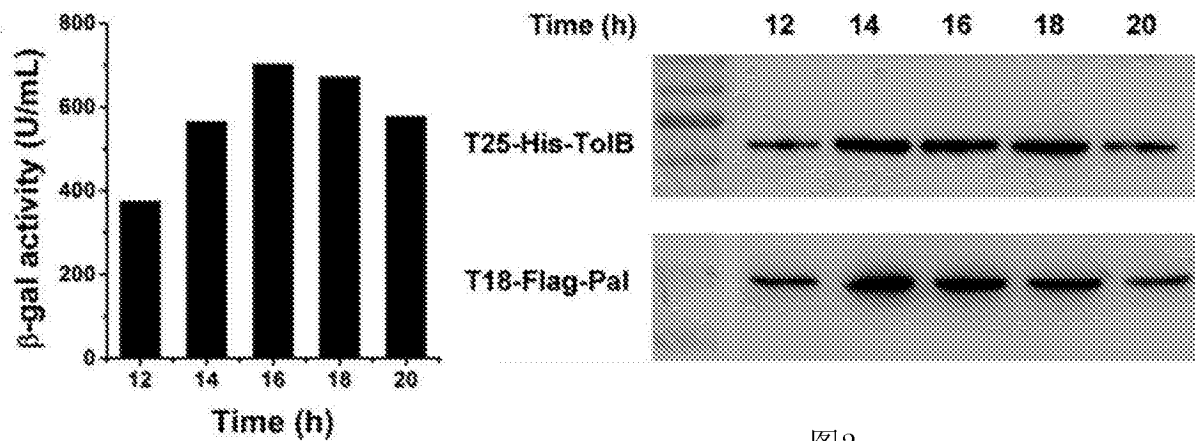


图2

图1

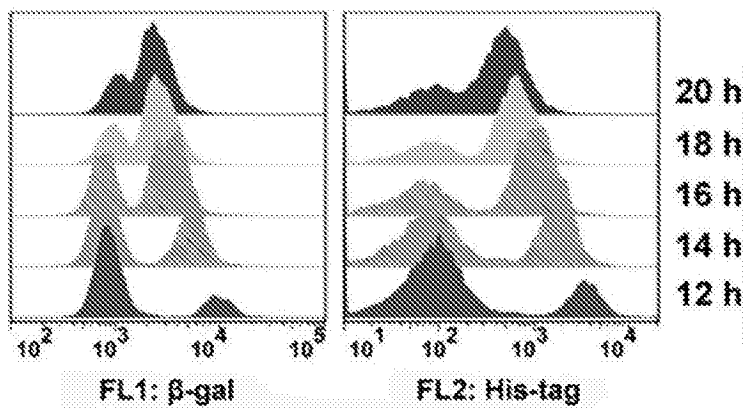


图3

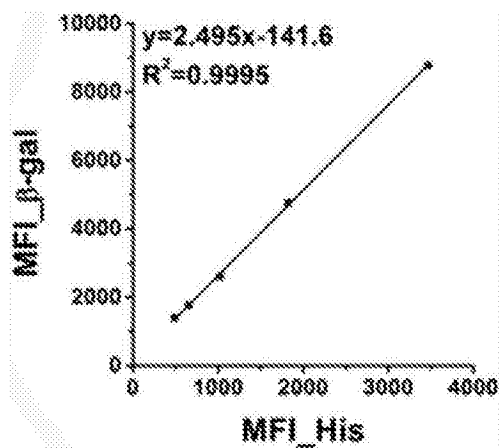


图4

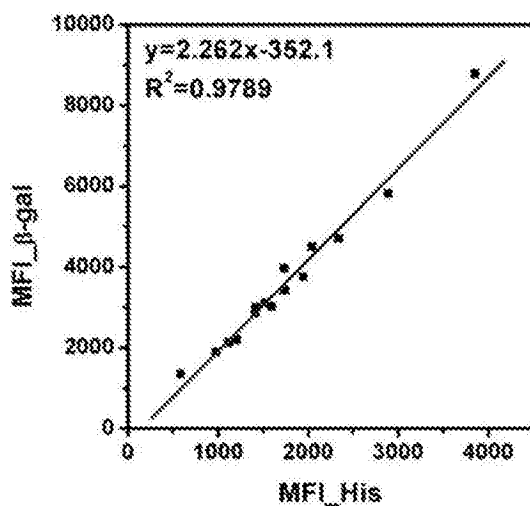


图5

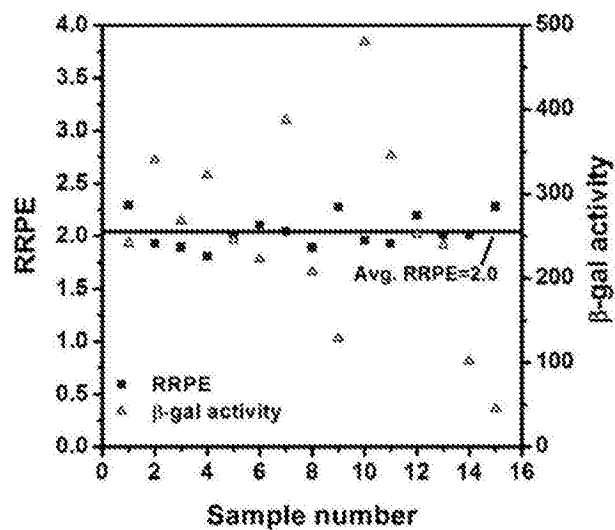


图6

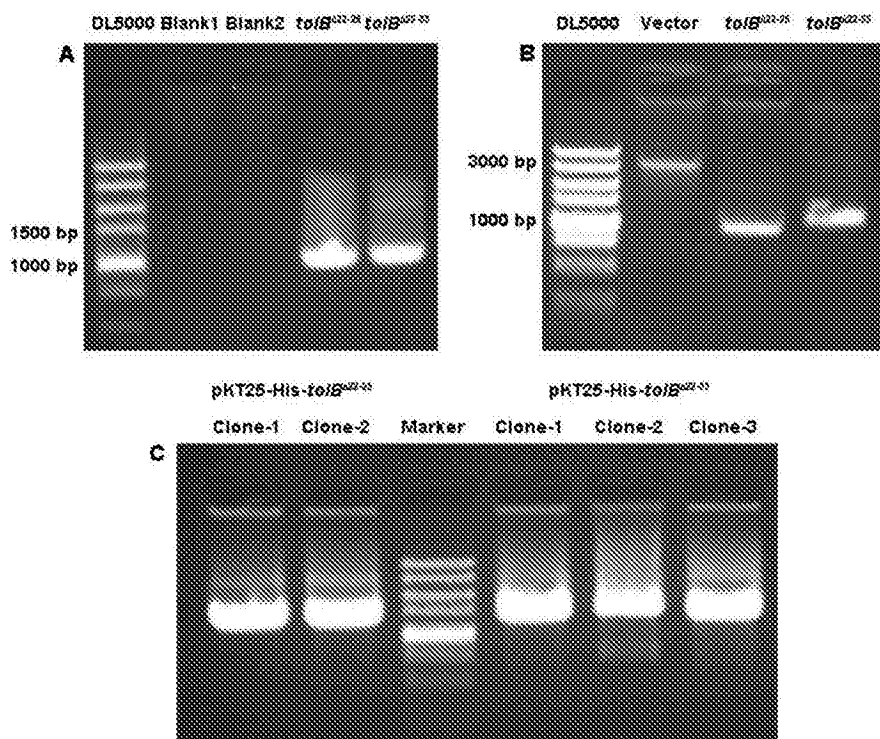


图7

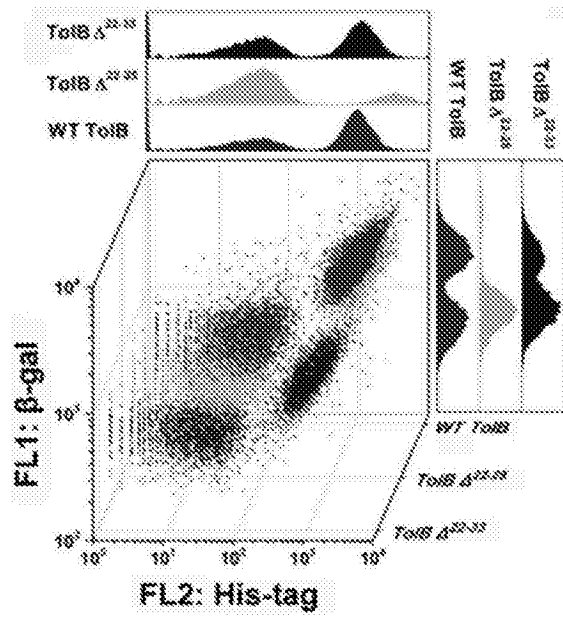


图8

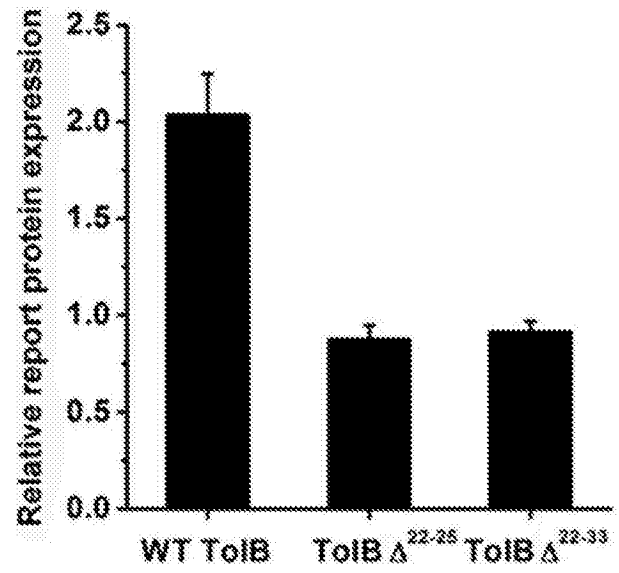


图9

专利名称(译)	一种定量检测蛋白质相互作用强度的方法		
公开(公告)号	CN105891462A	公开(公告)日	2016-08-24
申请号	CN201610474048.5	申请日	2016-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学		
[标]发明人	吴丽娜 汪旭 颜晓梅		
发明人	吴丽娜 汪旭 颜晓梅		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	张松亭		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测蛋白质相互作用强度的方法，引入相对报告因子表达量，结合流式细胞检测技术与细菌双杂交系统，实现了蛋白质相互作用强度的定量检测。

反应组份	用量
引物 F (正向)	100 nM
引物 R (反向)	100 nM
<i>TransTaq</i> [®] DNA polymerase	1 μL
10× <i>TransTaq</i> [®] HiFi Buffer II	5 μL
dNTPs	4 μL
模板	1 μL
dd H ₂ O	补足至 50 μL