

相符。Brundel 等研究显示,在人心房组织中 I_{KATP} 下调与 Kir6.2 的改变有关,因而 Kir6.2 mRNA 水平的改变可能是房颤患者心房肌 I_{KATP} 改变的分子基础。心肌细胞可能通过减少 Kir6.2 基因的表达,以阻止电重构和 ADP 及 AERP 缩短,这实际上是心肌细胞对快频率心房收缩的一种适应性反应。Gao F 的研究结果显示,PAF 组 Kir6.2 的 mRNA 表达较 SR 组显著升高,可能是房颤时心房肌缺血,ATP 消耗增加,细胞内 ADP 产生增多,可激活 Kir6.2 通道,使外向钾电流短期内增加,导致 ADP 和 AERP 缩短,从而参与电重构的形成。

心房电重构的发生与心房肌钾离子通道 5 种亚型的电流的变化、通道蛋白合成、通道 mRNA 表达的改变密切相关,因此,研究钾离子通道与心房电重构的关系有利于明确房颤的发生机制。

参考文献

- [1] Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*, 1995, 92(7): 1954 - 1968.
- [2] Kouni S, Sato R, Nagasawa K, et al. On the mechanism of cAMP - dependent modulation of single inward - rectifier K^+ channel kinetics in the mammalian heart. *Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 1997, 64(3): 275 - 277.
- [3] Yue L, Melnyk P, Gaspo R, et al. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res*, 1999, 84(7): 776 - 784.
- [4] Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, et al. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1999, 44(1): 121 - 131.
- [5] Dobrev D. Electrical remodeling in atrial fibrillation. *Herz*. 2006, 31(2): 108 - 112.
- [6] Olgin JE, Sih HJ, Hanish S, et al. Heterogeneous atrial denervation creates substrate for sustained atrial fibrillation. *Circulation*, 1998, 98(23): 2608 - 2614.
- [7] Koor P, Wickman K, Maguire CT, et al. Evaluation of the role of $I(K_{ACH})$ in atrial fibrillation using a mouse knockout model. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37(8): 2136 - 2143.
- [8] Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, et al. Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation*, 2001, 103(5): 684 - 690.
- [9] Brandt MC, Priebe L, Böhle T, et al. The ultrarapid and the transient outward $K(+) current in human atrial fibrillation. Their possible role in postoperative atrial fibrillation. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(10): 1885 - 1896.$
- [10] Grammer JB, Bosch RF, Kühlkamp V, et al. Molecular remodeling of $Kv4.3$ potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2000, 11(6): 626 - 633.
- [11] Everett TH 4th, Wilson EE, Hulley GS, et al. Transmural characteristics of atrial fibrillation in canine models of structural and electrical atrial remodeling assessed by simultaneous epicardial and endocardial mapping. *Heart Rhythm*, 2010, 7(4): 506 - 517.
- [12] Tan XQ, Yang Y, Liu ZF, et al. Atrial myocytes KCHIP2 mRNA expression in rheumatic heart disease patients with atrial fibrillation. *Zhong hua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2009, 37(6): 509 - 513.
- [13] Burashnikov A, Antzelevitch C. Can inhibition of I_{Kur} promote atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 2008, 5(9): 1304 - 1309.
- [14] Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, et al. Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K^+ channels. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37(3): 926 - 932.
- [15] Gao F, Zhou YJ, Wang ZJ, et al. Comparison of different antithrombotic regimens for patients with atrial fibrillation undergoing drug - eluting stent implantation. *Circ J*, 2010, 74(4): 701 - 708.

【收稿日期】 2010 - 12 - 31

(本文编辑:陈春梅)

蛋白质相互作用的研究方法

张成林 李建远

烟台毓璜顶医院(山东 烟台 264000)

【摘要】 通过研究蛋白质 - 蛋白质的相互作用,能够更好地注释蛋白质功能,解码生命现象。蛋白质相互作用研究方法的快速发展与不断完善为蛋白质间相互作用的研究奠定了坚实基础。本文对当前研究蛋白质相互作用的主要技术方法,包括酵母双杂交技术, GST pull - down 技术,免疫共沉淀技术、串联亲和纯化技术等多种研究方法进行综述。

【关键词】 蛋白质; 蛋白质相互作用; 蛋白质功能

Research techniques for protein - protein interactions ZHANG Cheng - lin, LI Jian - yuan. Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China

【Abstract】 Protein function can be identified and some phenomena of life can be elucidated by the study of protein-protein interaction. The techniques on protein-protein interactions have been developed and improved. The subject of this paper is to review the class I_{CaL} and especially recent methods of study protein-protein interactions such as Yeast Two-Hybrid System, GST pull-down, co-immunoprecipitation, tandem affinity purification.

【Key words】 Protein; Protein-protein interaction; Protein function

随着生命科学研究的快速进展,人们发现基因组的序列信息并不能完整解释各种生命过程及现象,而蛋白质作为细胞活性及功能的主要参与者,在生命过程中具有不可替代作用。随着蛋白质研究的逐步深入,人们对蛋白质与蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)的研究也越来越引起广泛兴趣。蛋白质作为参与生命活动的主要物质,在生命个体生长繁殖、细胞凋亡与坏死及新陈代谢等生命过程中,均发现蛋白质相互作用起到了重要作用。因此,研究蛋白质相互作用具有重要的生物学意义。有助于从系统角度全面理解各种生物学过程,有助于探索疾病的发生发展,预测和评价相应疾病的治疗技术,同时还有助于寻找新的药物靶标,为新药研发开展新的通路。迄今已发展了包括酵母双杂交系统, GST pull-down 技术,免疫共沉淀技术、串联亲和纯化联合质谱分析等多种研究方法,为蛋白质相互作用的研究提供了有效的技术工具^[1,2]。

1 酵母双杂交技术(yeast two-hybrid system)

1989年, Fields^[3]根据转录激活因子 GAL4 的特性建立了酵母双杂交技术,用于研究蛋白质-蛋白质的相互作用。转录激活因子 GAL4 的 N 端是 DNA 结合域(DNA binding domain, DNA-BD),可以与 DNA 分子的上游激活序列结合;C 端是转录激活域(activation domain, AD),用于激活下游基因的转录。当 DBD 与 AD 结构域在细胞内充分接近时,呈现 GAL4 转录因子活性启动下游基因的转录过程,而两个结构域单独分别作用不能够激活完整转录反应。在酵母细胞内将诱饵蛋白与猎物蛋白的核酸序列分别同 DNA-BD 和 AD 的核酸序列融合表达,如果目的蛋白在细胞内存在相互作用,则转录激活因子 GAL4 启动报告基因的转录表达,通过被调控表达的半乳糖苷酶的活性检测目的蛋白相互作用关系。

酵母双杂交系统在蛋白质-蛋白质相互作用研究方面,具有非常高的灵敏度,特别是在用于研究蛋白质间微弱的、瞬时的相互作用时都能够通过报告基因的表达产物敏锐地进行捕获。Reddi 等^[4]利用酵母双杂交技术研究肝炎 B 病毒反式作用因子 HBx 蛋白,结果表明 HBx 蛋白可以通过其 C 末端区域产生自我偶联作用。Shi Y 等^[5]2009 年利用酵母双杂交系统从分子水平研究了酪蛋白激酶 2 (CK2) 与有丝分裂原和应激活化型蛋白激酶 (MSK1) 的相互作用关系。发现 MSK1 蛋白既与 CK2 β 调节亚基相互作用,也与 CK2 α 催化亚基相互作用;而 CK2 α 催化亚基只与 MSK1 蛋白 C 端激酶区相互作用。

人们在利用酵母双杂交技术进行蛋白质相互作用研究中,也同时发现酵母双杂交技术存在不足。一是要求发生相互作用蛋白在细胞内的定位较严格,对于存在于胞浆内、细胞膜和通过分泌泡分泌到细胞外的蛋白,酵母双杂交均不能检测;二是融合表达蛋白存在着影响目的蛋白折叠和修饰不确定性,特别是在研究异源蛋白相互作用时,融合表达蛋白如果不能正确折叠和

修饰,则影响蛋白的活性,干扰蛋白质相互作用。

2 GST pull-down 技术

GST pull-down 技术是通过以亲和标签与目的基因进行融合表达作诱饵蛋白,从细胞或组织抽提液中钓出与诱饵蛋白相互作用的猎物蛋白。GST 融合蛋白 pull-down 技术在蛋白质相互作用研究中主要用于两个方面:一是用于鉴定能与已知融合蛋白质相互作用的未知蛋白质;二是用于鉴定两个已知蛋白质之间是否存在相互作用。除 GST 融合标签外,人们还开发其他许多蛋白标签,如与蛋白 A 融合的诱饵蛋白用固定有 IgG 的亲和柱进行纯化;与寡聚组氨酸融合的诱饵蛋白用结合金属镍离子的色谱柱进行纯化。Huang 等^[6]利用融合表达 GST-p16INK4a 蛋白,结合 GST pull-down 技术,发现了与 p16INK4a 相互作用的新蛋白质-ISOC2 蛋白。NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) 序列是蛋白质受体内构化基本信号。2009 年 Guttman M 等^[7]利用 pull-down 技术研究低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (LRP1) 胞质区 NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) 序列与阿尔茨海默病患者脑部蛋白相互作用,发现 NPXY (4507) 序列与蛋白质相互作用位于磷酸化与非磷酸化酪氨酸位点,且结合蛋白质种类多,而 NPXY (4473) 序列只与少量蛋白质磷酸化的酪氨酸位点结合。Ku70 蛋白具有修补双链 DNA 断裂和端粒调节功能, Hong JP 等^[8]利用 pull-down 在体外证明 Ku70 蛋白与 Ku80 蛋白具有相互作用,并进一步证明 Ku70 蛋白在稻类植物保持染色体稳定性与正常生长发育方面是必需的。

GST pull-down 技术具有融合标签蛋白的多样性、可选择表达体系的多样性(如细菌、酵母、哺乳动物等)及高通量、高选择性的特点,使 pull-down 技术能够研究复杂体系中的蛋白质相互作用。但该方法的成功应用需要获得足量的且能够保持蛋白质活性的重组融合蛋白,而且避免内源性诱饵蛋白的干扰。

3 免疫共沉淀技术(co-immunoprecipitation)

免疫共沉淀(co-immunoprecipitation)是确定蛋白质在完整细胞内生理性相互作用的有效技术,是利用抗原抗体的特异性结合特点来鉴定蛋白质相互作用的方法。在非变性温和条件下裂解细胞,可保持细胞内蛋白质间的相互作用,再加入诱饵蛋白抗体产生免疫沉淀反应,则与诱饵蛋白稳定结合的猎物蛋白也共同沉淀下来,再通过电泳分离、质谱鉴定具有相互作用的猎物蛋白。Operana 等^[9]利用免疫共沉淀技术研究 UGT1A 蛋白之间的相互作用,发现 UGT1A 家族蛋白在膜上可形成寡聚体,推测寡聚体可能影响蛋白质功能与底物选择性。Walker 等^[10]利用免疫共沉淀技术研究发现死亡蛋白和 p53 蛋白在白血病的血细胞的细胞质中具有相互作用,而在正常血细胞中则没有。

免疫共沉淀研究的是存在于正常生理条件下蛋白质间的相互作用,可以排除蛋白质过量表达所引起的假阳性,是确定蛋白质在完整细胞内生理性相互作用的有效方法。但该方法也存在

几个缺点,一是制备抗体过程比较繁杂,二是免疫共沉淀的灵敏度不高,受到细胞内诱饵蛋白质浓度限制,只有较高浓度诱饵蛋白质才能与抗体结合形成沉淀。三是在验证蛋白质相互作用过程中需要进行一系列的清洗操作,因此该方法不能检测到细胞中的低亲和与瞬间的相互作用,仅适用于在细胞裂解液中保持完整生理复合体的蛋白质。

4 串联亲和纯化技术(tandem affinity purification,TAP)

1999年 Rigaut 等^[11]提出了一种新的分离蛋白质复合体的方法—串联亲和纯化技术。该方法利用基因技术在融合蛋白一端加入 TAP 标签,即钙调蛋白结合肽(calmodulin-binding peptide,CBP)和蛋白 A 的 IgG 结合域,用烟草蚀纹病毒(tobacco etch virus,TEV)蛋白酶切位点将二者连在一起。将目的蛋白与 TAP 标签 CBP 端相连,转入细胞内融合表达。在非变性温和条件下裂解完整细胞,保持在生理条件下目的蛋白与内源相互作用蛋白质复合体稳定。用 IgG 为配基的亲合柱分离纯化,初步洗脱杂蛋白后,用含有 TEV 蛋白酶的洗脱液将蛋白质复合体切割洗脱下来,获得含有 CBP 的目的蛋白复合体;再与偶联钙调素的亲和柱结合,充分洗脱纯化得到复合体,经过凝胶电泳、质谱分析鉴定相互作用蛋白质。TAP 技术具有融合蛋白亲和层析和免疫共沉淀两种技术的优点:细胞内融合表达蛋白质复合体避免了非自然条件下的蛋白质相互作用,两次特异性亲和层析去除了杂蛋白的干扰,提高了研究结果的真实性。而且操作过程中洗脱纯化及酶切条件温和,很好地维持了蛋白质复合体的结构,有利于研究蛋白质相互作用的关系。

TAP 技术操作方便、结果真实等优点使其在蛋白质相互作用研究中应用获得极大发展。Rohila 等^[12]利用 TAP 技术研究水稻蛋白激酶的相互作用蛋白,结果表明 56% 的具有 TAP 标签的蛋白激酶发生了蛋白质相互作用,证明了 TAP 技术在水稻植物中研究蛋白的相互作用是有效的。酪氨酸磷酸酶非受体型底物 1 (Tyrosine phosphatase non-receptor type substrate-1, SHPS-1) 是一个跨膜蛋白,在细胞迁移与增殖中具有重要作用。SHPS-1 蛋白质磷酸化受到胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-I, IGF-I)调节。Shen X 等^[13]利用 TAP 技术研究发现一些与磷酸化的 SHPS-1 蛋白质相互作用新蛋白质,包括热激蛋白、蛋白激酶、磷酸酯酶和一些调节转录与翻译蛋白质。其中大多数蛋白质在胰岛素样生长因子(IGF-I)调节下表达量上调,少量蛋白质表达量下调。

5 展望

随着蛋白质相互作用研究技术发展,用于蛋白质-蛋白质相互作用研究的方法越来越多。总的来说,选择一种合适的蛋白质相互作用研究方法主要从下面几个方面考虑:(1)研究方法具有特异性,可以鉴定特异的相互作用蛋白质;(2)尽量避免假阳性和假阴性的结果;(3)尽量地研究蛋白质在生理状态下的相互作用。随着计算机技术的发展,许多研究者通过计算机模拟蛋白质相互作用网络,发现了更多有相互作用的蛋白质,但这仍然需要利用以上提到的实验方法进行充分验证。相信在今后很长一段时间内,各种方法技术并存,相互间交叉互补,将成

为蛋白质相互作用研究的主要特点。

参考文献

- [1] Drewes G, Bouwmeester T. Global approaches to protein-protein interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(2): 199-205.
- [2] Bauer A, Kuster B. Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem*, 2003, 270(4): 570-578.
- [3] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340(6230): 245-246.
- [4] Reddi HV, Kumar V. Self-association of the hepatitis B virus X protein in the yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(4): 1017-1022.
- [5] Shi Y, Han G, Wu H, et al. Casein kinase 2 interacts with human mitogen- and stress-activated protein kinase MSK1 and phosphorylates it at multiple sites. *BMB Rep*, 2009, 42(12): 840-845.
- [6] Huang X, Shi Z, Wang W, et al. Identification and characterization of a novel protein ISOC2 that interacts with p16 (INK4a). *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(2): 287-293.
- [7] Guttman M, Betts GN, Barnes H, et al. Interactions of the NPXY microdomains of the low density lipoprotein receptor-related protein 1. *Proteomics*, 2009, 9(22): 5016-5028.
- [8] Hong JP, Byun MY, An K, et al. OsKu70 is associated with developmental growth and genome stability in rice. *Plant Physiol*, 2010, 152(1): 374-387.
- [9] Operana TN, Tukey RH. Oligomerization of the UDP-glucuronosyltransferase 1A proteins: homo- and heterodimerization analysis by fluorescence resonance energy transfer and co-immunoprecipitation. *J Biol Chem*, 2007, 282(7): 4821-4829.
- [10] Walker C, Bottger S, Low B. Mortalin-Based Cytoplasmic Sequestration of p53 in a Nonmammalian Cancer Model. *Am J Pathol*, 2006, 168(5): 1526-1530.
- [11] Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 1030-1032.
- [12] Rohila JS, Chen M, Chen S, et al. Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. *Plant J*, 2006, 46(1): 1-13.
- [13] Shen X, Xi G, Radhakrishnan Y, et al. Identification of novel SHPS-1-associated proteins and their roles in regulation of insulin-like growth factor-dependent responses in vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(7): 1539-1551.

【收稿日期】 2010-12-17

(本文编辑:陈春梅)