

Protein
PROTEIN

分子克隆手册

A Molecular Cloning Manual

*Protein-Protein
Interactions*

蛋白质—蛋白质

相互作用

〔美〕 Erica Golemis 编著

贺福初 钱小红 张学敏 等 译
夏寿萱 薛沿宁 周永新 朱云平 主审

中国农业出版社

分子克隆手册

A Molecular Cloning Manual

蛋白质—蛋白质相互作用

Protein-Protein Interactions

[美] Erica Golemis 编著

贺福初 钱小红 张学敏等 译

夏寿萱 薛沿宁 周永新 朱云平 主审

中国农业出版社

Protein - Protein Interactions
A Molecular Cloning Manual

Copyright © 2002 by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
本书由美国 COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS 授权中国农业出版社独家出版发行。

图书在版编目 (CIP) 数据

分子克隆手册: 蛋白质-蛋白质相互作用/ (美) 戈
莱米斯 (Golemis, E.) 编著; 贺福初等译. —北京:
中国农业出版社, 2004. 8
ISBN 7-109-09158-9

I. 分... II. ①戈...②贺... III. 蛋白质-相互作用-研究 IV. Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 077496 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 傅玉祥

责任编辑 张洪光 石飞华

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2004 年 10 月第 1 版 2004 年 10 月北京第 1 次印刷

开本: 889mm×1194mm 1/16 印张: 36.5

字数: 1061 千字 印数: 1~3 000 册

定价: 120.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

译校者名单

主 译 贺福初 钱小红 张学敏

主 审 夏寿萱 薛沿宁 周永新 朱云平

参 译 (按姓氏笔画排序)

万 平 万晶宏 王 妍 王 建 王兆卿

王京兰 王清明 王清清 毛建平 邓彬蔚

田春艳 曲秋莲 朱云平 刘 刚 刘尚义

刘琼明 孙 薇 杨何义 李 力 李 栋

李 蕾 李英贤 李晓海 吴松锋 应万涛

张 杰 张令强 张英鸽 张养军 邵宁生

周 涛 周永新 赵志虎 郝运伟 钟 凡

姜 颖 高 雪 郭立海 蔡 耘 薛沿宁

魏开华

译者序

人类基因组计划的基本完成是令生命科学工作者乃至整个人类兴奋的一件大事。然而，生物医学界还面临更大的挑战，即进一步研究人类基因组的功能，以深入揭示生命的奥秘。基因的功能主要通过其表达产物——蛋白质来实现，蛋白质几乎控制和调节细胞的一切生命活动。尽管有一些蛋白质以单体形式发挥作用，但绝大多数蛋白质主要通过与其他的配体分子结合，或形成生物复合体来参与细胞的生命活动。蛋白质—蛋白质相互作用控制着生命的各个过程，是整个生命体结构和生命活动的基础和特征。研究蛋白质—蛋白质相互作用，不仅可从分子水平揭示蛋白质的功能，而且对于揭示生长、发育、分化和凋亡等生命活动规律至关重要，为探讨重大疾病的机理、疾病治疗、疾病预防和新药开发提供重要的理论基础。

长期以来的科学研究积累了诸多与细胞蛋白质相关的遗传学和生物化学方面的信息，然而蛋白质间相互作用的研究比较零散，获得的数据也比较有限，因此系统地分析蛋白质—蛋白质相互作用就显得越来越重要。这方面的研究已引起生物科学界的关注，如在病毒、细菌、真菌（酵母）、线虫和果蝇中都已有大规模分析蛋白质相互作用的报道。然而，对蛋白质—蛋白质相互作用的研究还缺乏一本行之有效的实验指南。不久前，美国冷泉港实验室在《分子克隆实验指南》（第三版）的基础上，有针对性地出版了《分子克隆手册·蛋白质—蛋白质相互作用》。该书提供了许多用于鉴定、分析蛋白质—蛋白质相互作用的技术，并从分子生物学和生物化学标准技术出发，阐述了生物物理方法和计算方法，还对蛋白质—蛋白质相互作用在临床治疗及其他后基因组时代的应用进行了展望。该实验指南是对《分子克隆实验指南》的有益补充，与《分子克隆实验指南》一样，本书具有条理清晰、使用界面友好的特点，可以为从事蛋白质相互作用研究的研究生和各个层次的研究人员提供参考。

本书共 35 章。首先介绍了信号转导和人类遗传学/药物基因组学等问题，并强调蛋白质—蛋白质相互作用在其中发挥关键作用。然后分三部分介绍如下内容：6 个基于标准分子生物学、生物化学和微生物学技术建立起来的、用于分析蛋白质—蛋白质相互作用的方法；6 种鉴定和识别蛋白质—蛋白质相互作用的生物物理学方法；近期改进过的与 GST 沉降和免疫沉淀相关的技术、两个补体系统、渐增截断方法、蛋白成束、高通

量方法。最后讨论蛋白质—蛋白质相互作用数据的整合及模型构建，以及这些模型在临床治疗方面的应用。

本书内容详尽、具体，为蛋白质—蛋白质相互作用研究的关键技术提供操作指南，并提供大量识别和操作蛋白质的技术和相关综述，覆盖了迄今最完全、最有效的分析蛋白质—蛋白质相互作用的技术及原理，从理论的阐述到相关方案的列举和比对，包括经典的分子生物学、生物化学和微生物学方法、生物物理学方法、计算分析和相互作用模型的构建等；系统性好，浏览方便，读者易于从中寻找到切合自己研究实际的技术方案；在设计方案中常附有补充材料，指出可能遇到的问题及相应的解决困难的建议，必要时还加以直观的图解；参考资料也十分详尽，更加强了实用性，是生命科学研究者很好的工具书。

本书的译者主要是军事医学科学院从事肝脏蛋白质组研究工作的专家、教授和一线研究人员，大家在繁重的工作之余，抽出时间翻译这本书，希望能给国内同行提供从事蛋白质研究的指导，为蛋白质组学研究提供理论和技术参考，促进我国蛋白质组学研究。

贺福初

2004年5月于北京五棵松

前 言

在第三版《分子克隆实验指南》基础上，冷泉港实验室出版社在 Joe Sambrook 主编的指导下，正在出版一系列新的生物学研究高级实验室手册。

《分子克隆手册》的主要目的是为研究者提供可重复使用的实验方案及灵活运用这些方案所需的背景知识。《分子克隆手册·蛋白质—蛋白质相互作用》是第一批出版的新系列高级实验室手册之一，本书也具有跟《分子克隆手册》类似的目的：为进行蛋白质相互作用研究提供一个当前较为完整的技术和理论指导，其读者可包括从研究生到经验丰富的研究者等生物学研究群体。

本书得以出版要感谢很多人的无私贡献。首先我要感谢冷泉港实验室出版社，由于他们有兴趣出版蛋白质相互作用研究的高级实验手册，使我有机会在这个项目中扮演主编的角色。在这里，我衷心地感谢 Patricia Barker、Mary Cozza、Judy Cuddihy，特别要感谢 Kaaren Janssen。他们在完成本书的工作中各方面的协作是功不可没的。另外，我还要感谢 Jan Argentine、John Inglis 和 Joe Sambrook，是他们出版《分子克隆手册》为我们开了一个鼓舞人心的先例。

能和参与本书撰写的许多作者合作，我感到十分荣幸，我非常欣赏他们在以创造性和条理性为特征的、充满思想深度的贡献方面所作出的努力。我由衷地感谢我以前的导师：Nacy Hopkins 和 Roger Brent。几年来，他们在生物体复杂性、蛋白质相互作用以及这两者之间关系等方面和我就相关问题进行过很多有益的探讨，使我受益匪浅。我要感谢我实验室过去和现在的所有成员，他们进行的科学讨论使我获益颇深。我尤其要感谢 Ilya Serebriiskii，由于他对正在进行的蛋白质相互作用研究工作的监管，使得我有时间专心于本书的撰写。

同时我要感谢福克斯癌症中心提供的充满智慧和学术氛围的环境，这为本书背后的思考作出了不可估量的贡献。我要感谢 Kathy Buchheit 和 Sarah Costello-Berman，他们在本书整个编辑过程中的有关组织方面给予了很大的帮助，没有他们的努力，这些工作将会更加困难。最后，我尤其要感谢 Michael 和 Ian Ochs，以及 Marion 和 Emanuel Golemis，他们一直给予我很大的精神支持。

Erica Golemis

目 录

译者序

前言

1 了解蛋白质相互作用的意义	1
详细说明	1
背景	3
参考文献	4
2 信号转导和哺乳动物细胞生长：问题及范例	5
前言	5
信号转导框架	6
蛋白质-蛋白质相互作用和信号转导交叉点的调控	8
信号转导和技术——对未来的一种看法	8
参考文献	9
3 蛋白质相互作用技术对肿瘤生物学与药物遗传学的影响	12
序列变异：肿瘤易感性及基于遗传特异型蛋白相互作用的肿瘤治疗	12
肿瘤与基因组	13
遗传危险因子	13
癌基因	15
原癌基因	15
抑癌基因	16
DNA 修复基因	17
药物遗传学：当前的状态与未来的目标	20
抗肿瘤治疗的反应	21
运用蛋白质相互作用研究手段去分析遗传变异的功能意义	22
标签融合蛋白	22
免疫共沉淀	22
酵母双杂交	24
荧光共振能量转移技术	24
表面等离子共振技术	25
原子力显微镜技术	25
结论	26
参考文献	26

4 用 GST 融合蛋白鉴定蛋白质—蛋白质相互作用	32
前言	32
Far western 印迹和 pull-down 技术的优点	33
替代方法, 类似范例	33
程序纲要	33
Far western 印迹分析	33
GST 沉降分析	35
方案	37
方案 1: GST 融合蛋白的制备	37
方案 2: Far western 印迹: 标记 GST 融合蛋白	40
方案 3: Far western 印迹: 探测膜	41
方案 4: GST 沉降	43
参考文献	45
5 通过免疫共沉淀法鉴定相互作用蛋白质	47
前言	47
已知蛋白质间相互作用的检测	48
新蛋白质间相互作用的鉴定	48
程序纲要	48
细胞裂解与免疫沉淀	49
缔合蛋白的检测	49
优化与对照	50
蛋白质鉴定	51
方案	54
方案 1: pVHL 结合蛋白 Cul2 的鉴定	54
致谢	56
参考文献	56
6 化学交联技术在研究蛋白质相互作用中的应用	60
前言	60
体内与体外交联反应的区别	61
交联的步骤	62
蛋白质作为交联反应物的作用	62
pH 的影响	63
交联剂的类型	63
交联的特异性及选择性	65
交联的特异性及间距 (分子标尺及近邻法)	66
一般步骤	66
交联蛋白的纯化及检测	68
可裂变交联剂	69
标记的交联剂	69
亲和检测及交联蛋白的纯化	70

交联残基的鉴定	70
高效液相色谱 (HPLC) 法分析肽图谱	70
质谱法肽制图	70
交联多肽的亲纯化	71
参考文献	71
7 研究蛋白质—蛋白质相互作用的酵母和细菌双杂交筛选系统	74
前言	74
方案	75
第一部分：一种基于转录激活的酵母双杂交系统	75
第二部分：一种基于转录激活的细菌双杂交系统	95
致谢	111
参考文献	111
8 利用噬菌体展示技术研究蛋白质—蛋白质相互作用	113
前言	113
程序纲要	115
噬菌体展示技术的生物学概论	115
噬菌体展示技术潜在的局限性	116
关于设计噬菌体展示文库方法的考虑	117
噬菌体展示技术和模建结构域	118
方案	120
方案 1：变异结构域文库的制备	120
致谢	130
参考文献	131
9 在出芽酵母中鉴定蛋白质—蛋白质相互作用的遗传学策略	135
前言	135
为什么使用遗传方法	136
程序纲要	137
抑制基因搜寻的准备	137
抑制基因搜寻的实施	139
抑制基因的分析	140
异源体系	141
方案	141
方案 1：诱变	141
方案 2：酵母菌总 DNA 的制备	142
方案 3：酵母菌的转化	143
参考文献	143
10 研究蛋白质相互作用的 FRET 显微成像技术	145
前言	146
GFP：对分子和细胞生物学的影响及在蛋白质相互作用研究中的应用	146
荧光共振能量转移	146

程序纲要	149
FRET 检测方法	149
受激发射过程测定	149
频率域 FLIM 数据分析	154
方案	155
方案 1: FRET 实验	155
致谢	170
参考文献	171
11 绿色荧光蛋白邻近成像法 (GFP-PRIM) 检测同型蛋白质间相互作用	174
前言	174
FRET 检测同型蛋白质间相互作用	175
GFP-PRIM 检测同型蛋白质间相互作用	175
PRIM 与 FRET 的差异	176
方案	176
方案 1: 体外 GFP-PRIM: 荧光分光光度法测量激发比率	176
方案 2: 活细胞 GFP-PRIM: 同型蛋白质相互作用成像	179
结论	181
参考文献	182
12 质谱表征多元蛋白质复合物	183
前言	183
两个复合物研究例子的背景介绍	184
程序纲要	185
制样与样品导入	185
单个蛋白质及其复合物的质谱	186
单个蛋白质及其复合物的电荷状态	188
复合物中亚基的排布	189
蛋白质复合物的热稳定性探测	189
多元蛋白质复合物的实时组装	190
展望	191
方案	191
方案 1: 质谱表征多元蛋白质复合物	191
参考文献	192
13 用原子力显微技术检测配体—受体间相互作用	194
前言	194
程序纲要	196
AFM 仪器	196
AFM 在配体—受体相互作用研究方面的应用	197
方案	198
方案 1: 悬臂功能基化	198
方案 2: 固定于琼脂糖珠上的配体的 AFM 检测	199

方案 3: 活细胞上的 AFM 测定	200
致谢	202
参考文献	202
14 Biacore 表面等离子体共振分析相互作用的蛋白质	205
前言	205
程序纲要	206
传感器芯片	206
芯片表面的再生	208
数据采集	208
动力学检测	209
浓度测定	210
设计方案	210
方案	211
方案 1: Biacore 表面等离子体共振使用	211
参考文献	219
15 石英晶体微平衡生物传感器在蛋白质相互作用分析中的应用	221
前言	221
程序纲要	223
方案	224
方案 1: 石英晶体微平衡分析	224
参考文献	228
16 蛋白酶足迹法	230
前言	230
优点与局限	231
蛋白质水解的类型	233
其他方法	234
程序纲要	235
末端标记	235
复合物的组装	237
蛋白质水解	238
断裂位点的鉴定	240
定量分析	240
方案	241
方案 1: 利用蛋白激酶 A 进行末端标记	241
方案 2: 铁-EDTA 蛋白酶足迹法反应	242
方案 3: 利用酶促蛋白酶进行蛋白质水解	244
方案 4: Tricine SDS-聚丙烯酰胺蛋白凝胶	245
方案 5: 通过溴化氰断裂蛋白质所产生的校准梯形条带	246
方案 6: 通过酶促断裂产生的校准梯形条带	247
参考文献	248

17 串联亲和纯化提高相互作用蛋白质的识别	250
前言	250
标签的选择与设计	251
程序纲要	253
构建表达 TAP 标签蛋白的细胞或生物体	254
制备提取物	254
串联亲和纯化	255
分析纯化后物质	256
对照与确证	256
方案	256
方案 1: 制备用于纯化酵母 Lsm3 蛋白的提取物	256
方案 2: 利用 TAP 方法解析蛋白质相互作用	257
参考文献	260
18 逆转循环纯化蛋白质	262
前言	262
程序纲要	264
总述	264
融合蛋白的构建方案	266
ELP 标签和 ITC 条件的选择	266
方案	267
方案 1: 将 ELP 组分融合入靶蛋白	267
方案 2: 从细胞裂解液中纯化 ELP 融合蛋白	269
方案 3: ELP 融合蛋白的一般转移循环	271
结论	272
参考文献	272
19 利用体外表达克隆鉴定相互作用蛋白质	273
前言	273
方案	274
方案 1: 体外表达克隆	274
参考文献	280
20 用蟾蜍卵提取物修饰重组蛋白	281
前言	281
总则	281
用细胞提取液作为模型系统	282
蟾蜍卵提取物模型系统	283
程序纲要	283
蟾蜍卵提取物的制备	284
重组蛋白的修饰和再分离	285
修饰评价和修饰蛋白的利用	286
对照	288

方案	289
方案 1: 卵提取	289
方案 2: 修饰、再分离和评价	291
方案 3: 质谱	293
致谢	294
参考文献	294
21 采用 λ 阻遏物融合技术分离和鉴定自组装结构域	297
前言	297
程序纲要	299
文库的构建	300
挑选和筛选	303
自组装结构域的鉴定	305
寡聚化状态的检测	305
方案	306
方案 1: λ 阻遏物融合	306
致谢	310
参考文献	311
22 基于膜的酵母双杂交体系	314
前言	314
酵母双杂交体系的局限性	315
非传统的酵母双杂交体系——研究膜蛋白相互作用的工具	315
基于膜的酵母双杂交体系应用展望	319
筛选与 NubG 融合的 cDNA 库	319
酵母 <i>S. cerevisiae</i> 膜蛋白相互作用的基因组范围的分析	319
基于膜的酵母双杂交筛选与药物设计	320
基于膜的酵母双杂交体系的优点和缺点	320
致谢	322
参考文献	322
23 β-半乳糖苷酶互补实验对活细胞中蛋白质间相互作用的检测	324
前言	324
背景	325
程序纲要	327
构建和表达融合蛋白的策略	327
检测 β -gal 活性的方法	329
方案	330
方案 1: 逆转录病毒的准备与靶细胞的转染	330
方案 2: 化学发光法检测 β -gal 的活性	331
方案 3: 流式细胞法检测 β -gal 的活性	332
方案 4: X-Gal 实验检测 β -gal 的活性	333
方案 5: 荧光-X-Gal 实验检测 β -gal 的活性	334

参考文献	336
24 双杂交系统研究胞内蛋白质和单链抗体的相互作用	338
前言	338
应用酵母双杂交系统检测胞内单链抗体与抗原相互作用	340
应用酵母双杂交系统筛选单链抗体文库	342
双诱饵酵母双杂交系统一步法鉴定两种不同的单链抗体—抗原相互作用	342
哺乳动物细胞双杂交系统评价单链抗体和蛋白质在胞内的相互作用	345
程序纲要	346
方案	346
方案 1: 检测单链抗体—蛋白质相互作用的酵母双杂交系统	346
方案 2: 哺乳动物细胞瞬时转染实验	353
致谢	354
参考文献	354
25 利用蛋白质片段互补策略研究蛋白质相互作用和文库筛选	357
前言	357
程序纲要	359
基本概念	359
DHFR 蛋白质片段互补分析 (PCA)	360
以新霉素和潮霉素 B 为基础的 PCA	362
TEM β -内酰胺酶 PCA	362
PCA 研究的控制标准	363
在细菌体内应用 DHFR PCA 方法库对库筛选相互作用的蛋白质	363
方案	365
方案 1: 细菌 DHFR PCA 存活分析	365
方案 2: 在体内进行库对库的筛选相互作用蛋白质: 细菌中进行代谢竞争选择	365
方案 3: 哺乳动物细胞 DHFR PCA 存活分析	366
方案 4: 哺乳动物细胞 DHFR PCA 荧光分析	367
方案 5: GFP PCA 荧光分析	369
方案 6: 体外 β -内酰胺酶 PCA 比色分析	370
方案 7: 体内 β -内酰胺酶 PCA 酶活分析	371
方案 8: 新霉素和潮霉素 B 存活分析	373
参考文献	374
26 基于 cAMP 信号级联的一种细菌双杂交系统	376
前言	376
以细菌腺苷酸环化酶为基础的双杂交系统原理	377
程序纲要	378
杂合蛋白的表达载体	379
细菌菌株	380
试验细菌的转化	381
筛选相互作用子	381

选择表达相互作用杂合蛋白的细胞	381
方案	381
方案 1: 功能互补的数量测定	381
结论	384
参考文献	385
27 肽适配子与蛋白质功能和蛋白质网络系统研究	387
前言	387
肽适配子作为表型分析试剂	388
应用酵母双杂交系统选取肽适配子	389
双杂交系统中应用的随机肽库	391
筛选随机肽库的双杂交策略	393
肽适配子获取方法改进	394
调节子和干扰子分析法	396
竞选高效作用的肽适配子	397
检验肽诱导表型的特异性	398
结论	398
参考文献	398
28 用渐增截断方法产生蛋白质片段文库	402
前言	402
程序纲要	403
基本概念	403
渐增截断用载体的描述	405
方案	405
方案 1: 渐增截断	405
结论	414
参考文献	414
29 蛋白质家族的新成员——催化抗体	416
前言	416
人工抗体酶的设计和潜能	417
天然催化抗体	417
抗体固有催化活性的质量控制标准	419
高催化活性的天然抗体酶的分离	420
抗体酶机制的研究	421
结论	422
参考文献	422
30 通过核糖体展示进行蛋白质—配体相互作用的体外筛选和进化	427
前言	428
核糖体展示的原理	428
核糖体展示的应用	429
程序纲要	430

用于核糖体展示的构建组分	430
核糖体展示构建组分的制备	431
体外转录	432
用大肠杆菌 S30 细胞提取物进行体外翻译	432
亲和筛选	433
通过适应筛选压力剪切分子	433
从筛选到进化	434
DNA 文库和单克隆的 RIA 分析	434
核糖体展示的优化	435
方案	435
方案 1: 通过连接制备核糖体展示构建组分	435
方案 2: 体外转录及 mRNA 的纯化	437
方案 3: 大肠杆菌 S30 细胞提取物的制备	439
方案 4: 体外翻译	440
方案 5: 亲和筛选	441
方案 6: mRNA 的纯化和 RT-PCR	443
方案 7: 进化: 引入额外的多样性	445
方案 8: 核糖体复合物与游离蛋白质及小分子化合物的分离	446
方案 9: 放射免疫分析 (RIA)	446
方案 10: Northern 印迹	447
参考文献	448
31 用膜上肽合成的方法分析蛋白质相互作用	451
前言	451
相互作用研究的肽合成策略	452
结合反应伴侣的检测	453
程序纲要	453
方案	455
方案 1	455
参考文献	459
32 蛋白成束增强蛋白质—蛋白质相互作用检测	461
前言	461
双杂交相互作用	462
双杂交实验存在的问题	462
蛋白成束对双杂交实验灵敏性的加强: 应用于哺乳动物细胞	462
杂交蛋白成束在双杂交实验中的优点	464
程序纲要	467
DNA 结合结构域和 DNA 结合结构域融合蛋白	467
激活结构域和激活结构域融合蛋白	467
成束结构域	468
报告基因和报告质粒	468
细胞系	468