

蛋白相互作用检测方法综述

随着生命科学研究的不断发展，人们逐渐意识到基因组信息已经不能完全解释和预测各种生命过程及现象，而蛋白质作为细胞活性和功能的执行者，越来越受到人们的关注。然而，蛋白质功能的发挥不是凭借单个蛋白质独立执行，而是依靠蛋白间相互作用(protein-protein interaction, PPI)执行其功能。因此，蛋白质相互作用出现异常将会影响细胞活性和功能的发挥，从而引发许多疾病，如神经退行性疾病、癌症等。抑制这些异常的蛋白质相互作用对临床治疗具有重要意义。

检测范围	检测方法
In vivo 体内方法	免疫共沉淀 (Co-IP)
	荧光共振能量转移 (FRET)
	邻近蛋白标记 BioID
	酵母双杂交 (Yeast Two-hybrid)
In vitro 体外方法	融合蛋白沉降技术 (GST Pull down)
	生物膜干涉技术 (BLI)
	表面等离子共振 (SPR)
	Far-Western
	TAP 串联亲和纯化技术
	蛋白质芯片技术 (Protein microarrays)

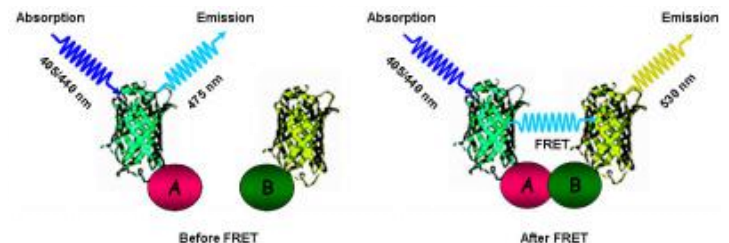
体内检测方法免疫共沉淀

免疫共沉淀以抗原抗体间的特异性为基础，检测分子间的相互作用，实验操作简便。利用蛋白 X 的抗体去免疫沉淀（通过琼脂糖微珠）蛋白 X，这样在蛋白 X 所在的环境中与其有相互作用的分子（Y）会被一起沉淀下来，在通过 Western Blot 去检测免疫沉淀的结果。

该技术是研究蛋白质相互作用的经典技术，应用广泛且可信度较高。它利用特异性抗体从细胞抽提物中分离目的蛋白和相互作用蛋白的复合物，之后通过 [Western blot](#) 及质谱法确定相互作用蛋白。如果在非变性的条件下裂解细胞，蛋白间相互作用可以保持，所以就可利用免疫共沉淀方法找出相互作用的蛋白质。免疫共沉淀既可以用于检验已知的两个蛋白质在体内的相互作用，也可以找出未知的蛋白质相互作用，不管是哪个，其原则都是一样的，都需要用特异性的抗体与其中的一种蛋白质结合，之后通过蛋白质 A 或蛋白质 G 琼脂糖微珠将复合物沉淀下来，然后用 SDS PAGE 鉴定。免疫共沉淀中设置正确的对照非常重要，因为该方法可能出现假阳性的概率比较高。设置的对照包括：在对照组中使用对照抗体，以缺失目的蛋白的细胞系作为阴性对照等等。（详细[免疫共沉淀实验](#)介绍）

荧光共振能量转移 (FRET)

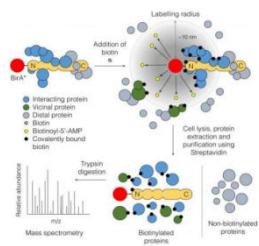
原理：荧光能量共振转移是距离很近的两个荧光分子间产生的一种能量转移现象。当供体荧光分子的发射光谱与受体荧光分子的吸收光谱重叠，并且两个分子的距离在 10nm 范围以内时，就会发生一种非放射性的能量转移，



即 FRET 现象，使得供体的荧光强度比它单独存在时要低的多（荧光猝灭），而受体发射的荧光却大大增强（敏化荧光）。

荧光共振能量转移(FRET)是用于对生物大分子之间相互作用定性、定量检测的一种有效方法。根据所基于的荧光显微镜配置不同而有不同的应用侧重，可在溶液，细胞悬液，多细胞，单细胞，细胞膜，细胞器等不同层次对生物大分子间的相互作用距离，动力学特性等进行研究。在生命科学领域，FRET 技术是检测活体中生物大分子纳米级距离和纳米级距离变化的有力工具，可用于检测某一细胞中两个蛋白质分子是否存在直接的相互作用。正如前述，当供体发射的荧光与受体发色团分子的吸收光谱重叠，并且两个探针的距离在 10nm 范围以内时，就会产生 FRET 现象。而在生物体内，如果两个蛋白质分子的距离在 10nm 之内，一般认为这两个蛋白质分子存在直接相互作用。（详细 [FRET 荧光共振能量转移](#)介绍）

邻近蛋白标记 BioID



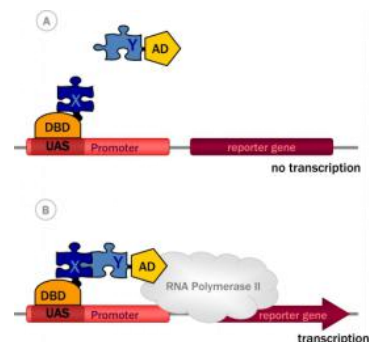
原理：邻近蛋白标记，顾名思义就是将靠近某一被标记的物质的蛋白或分子标记。例如，A 是重组表达获得的带有 BirA*生物素连接酶的蛋白，BirA*是 BirA 的一种突变体，BirA 需要特异性识别一段 15AA 的氨基酸序列，才能将靠近其的蛋白生物素化，经过突变的 BirA* 不需识别特定的氨基酸也能使其周围的分子生物素化

应用：

- 1) 已经被成功地运用到研究哺乳动物细胞和单细胞原核生物的各种各样的蛋白中；
- 2) 特别适用于研究不易溶解或者很难得到的亚细胞结构蛋白；
- 3) 能够检测弱的，瞬时的蛋白相互作用。

酵母双杂交 (Yeast Two-hybrid)

原理：待研究的蛋白分别融合到 Gal4p 转录因子的独立 DNA 结合域及转录激活结构域，如果这两种蛋白本身有相互作用，它们便可重组成一个功能性的 Gal4p，从而诱导报告基因的表达。该方法可测定两种蛋白相互作用的能力，转录报告系统可用来评价此相互作用。此外，使用这种方法还可以从蛋白库中筛选与未知的相互作用蛋白，这也是酵母双杂交系统的另外一特点。

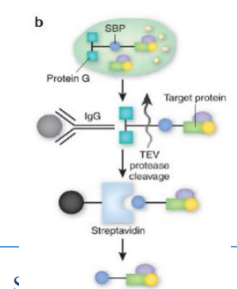


酵母双杂交是一种在酵母中利用转录激活物的重组来鉴定蛋白质之间相互作用的方法。简言之，就是诱饵蛋白质基因与一个报道基因 DNA 结合区融合表达，而在目的蛋白质基因上融合表达报道基因的激活区，如果这两个蛋白质间有相互作用，则可以激活报道基因的表达，从而从文库中钓出特异作用的蛋白质。后来又有研究者在细菌中进行双杂交。这个方法的优点是（1）细菌双杂交比酵母的文库更大，可以大于 10^8 ；（2）细菌双杂交可以鉴定一些在酵母中无法进行操作的蛋白质。

体外检测方法

融合蛋白沉降技术 (GST Pull-down)

利用重组蛋白表达技术将 GST 与目的蛋白融合，利用 GST 和谷胱甘肽偶联球珠的亲合力，从非相互作用蛋白的溶液中纯化相互作用蛋白。GST 与谷胱甘肽之间的亲合力较高，不是一般

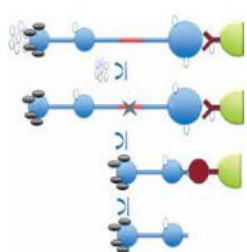


的缓冲液可以解离，大量的 GST 融合蛋白就能与固定在基质上的谷胱甘肽结合。GST 与嵌合的蛋白质之间有一段长的柔性连接段，使得 GST 和目的蛋白形成两个各自独立的功能域，因此 GST 并不阻碍其他蛋白质与融合蛋白的相互作用。利用这些特点，可以利用谷胱甘肽简单、高效的亲和纯化出相互作用的蛋白。

Far-western blotting

Far-western blotting 该技术是由 Western blotting 衍生而来研究蛋白质相互作用的方法，它运用经标记的或可被抗体检测的“诱饵”蛋白检测转移膜上的“猎物”靶蛋白。如果诱饵蛋白与靶蛋白存在相互作用，那么利用该诱饵蛋白的特异性即可检测出相应条带。利用该技术检测了 DNA 复制和修复相关蛋白质之间的相互作用，认为这是一种快速有效、可重复的蛋白质相互作用研究方法。该方法检测两种蛋白质是否发生直接的相互作用，如果相互作用是间接的，可以用候补蛋白进行进一步检测。由于该方法灵敏度较高，现已得到广泛的应用。

TAP 串联亲和纯化技术

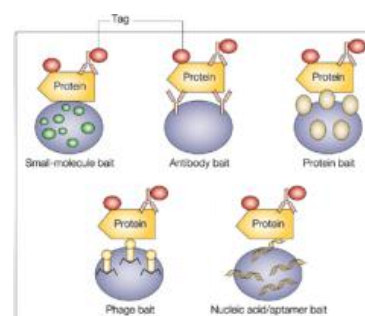


该技术是研究生理条件下蛋白质相互作用的方法，它利用特殊设计的蛋白标签，经过连续的亲和纯化得到接近自然状态的蛋白复合物。该方法假阳性率和假阴性率低，可分析稳定复合物中蛋白质相互作用及瞬时相互作用，采用两步亲和纯化使特异性得到提高，具备通用性及自动化等优势；但 TAP 标签可能会影响靶蛋白与亲和柱的结合，以及纯化中使用的

螯合剂有时会干扰蛋白质复合物的完整性和活性。

蛋白质芯片技术 (protein microarrays)

蛋白质芯片是将各种蛋白质有序地固定于固相支持物表面制成芯片，然后将带有特殊标记(如荧光染料)的样品蛋白质与芯片上的探针蛋白杂交，漂洗未能与芯片上的探针蛋白结合的蛋白，再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，通过荧光强度分析蛋白质相互作用，最终确定蛋白质功能。该方法快速、简便、高通量，可检测出一些通常难以鉴定的低丰度、小相对分子质量蛋白，但与靶蛋白结合的特异性有待提高。



更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

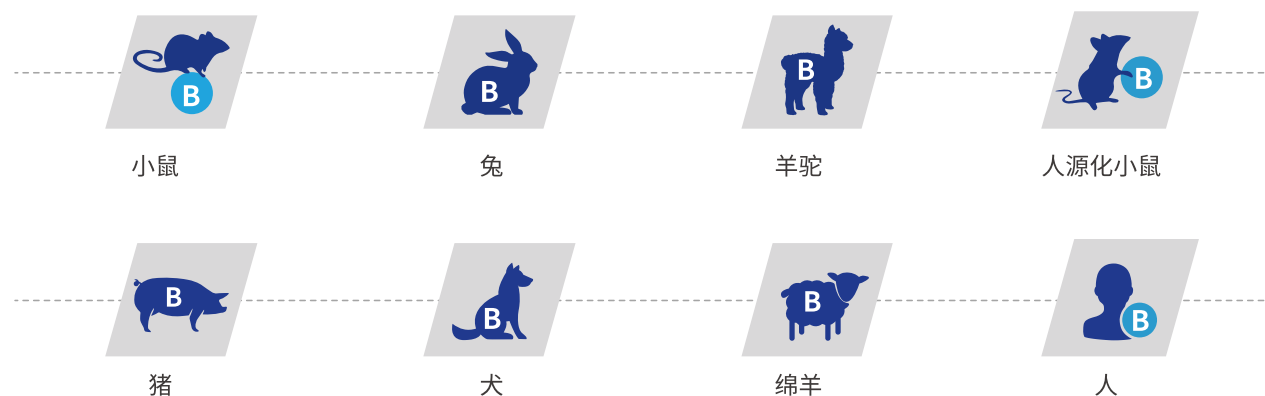
SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

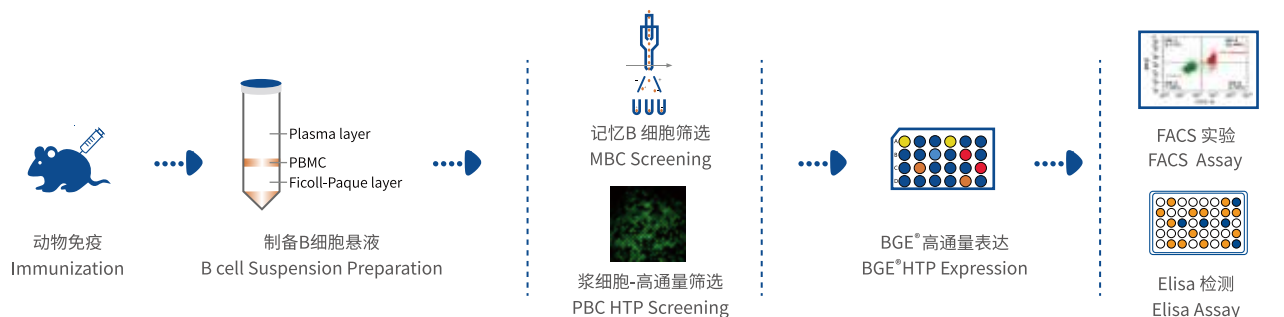
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

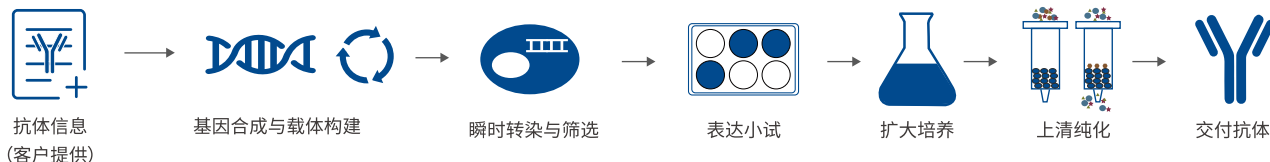
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

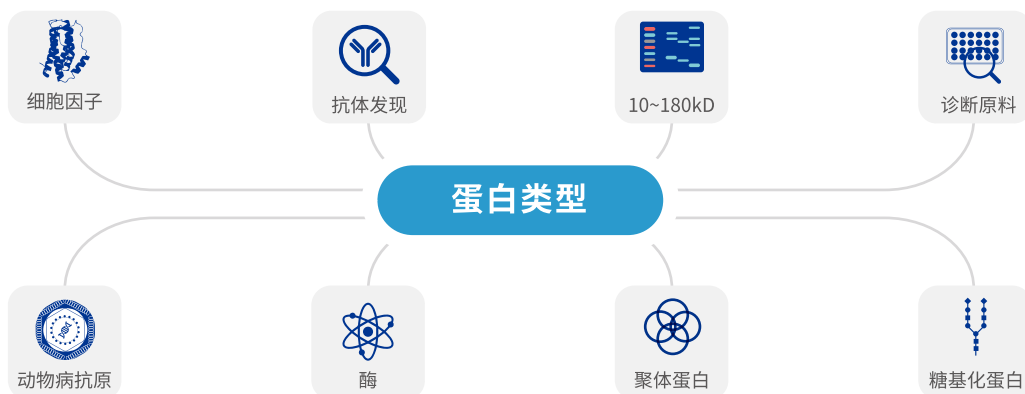


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

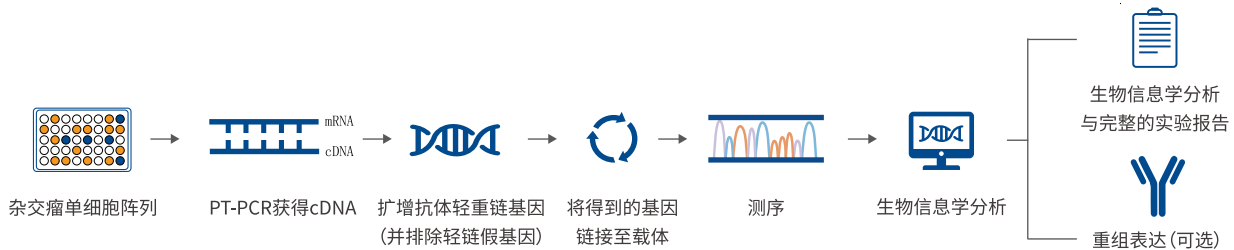
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



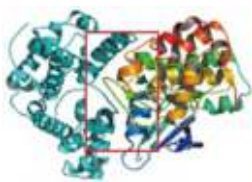
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

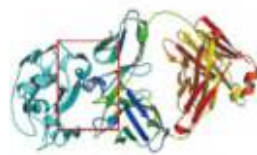
检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



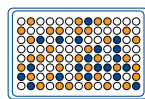
基因合成&质粒抽提



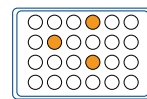
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L