

# 免疫系统蛋白质相互作用的研究方法

徐 锋, 唐 丽\*, 贺福初\*

(蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 102206)

[关键词] 免疫系统; 蛋白质相互作用; 研究方法

[中图分类号] R392-3 [文献标识码] A

对于相互作用蛋白的研究, 有助于了解蛋白在细胞内如何发挥其生理功能。在人类基因组计划草图公布以后, 基于蛋白质组学的蛋白谱研究逐渐得到重视, 在此背景下, 蛋白质相互作用的研究也逐步受到关注。对于蛋白质组学研究范围内所有蛋白质的相互作用的研究, 被称作“相互作用组”<sup>[1]</sup>。相互作用组学研究正在成为继基因组学, 蛋白质组学研究之后又一个通往生命奥秘道路上的里程碑。人类基因组包括有大约 30 000 个基因, 通过一系列的基因剪接和翻译后修饰, 理论上可以产生  $10^6$  种蛋白质。在这些蛋白质中, 虽然有一小部分不需要与其他蛋白质相互作用就可以单独发挥其生理功能, 但是绝大多数的蛋白质必须与其他蛋白质发生相互作用, 形成一个复杂的相互作用网络, 参与到无数个影响细胞结构和功能的生理过程中, 这些生理过程包括: 细胞周期调控、细胞分化、蛋白质折叠、信号通路、转录、翻译和翻译后修饰以及物质运输等。因此, 传统的孤立的研究蛋白质的结构和功能已经很难全面地揭示生命现象中生物功能的精确调控过程和影响生命变化的分子基础。

在免疫系统里, 因为各种免疫器官、免疫组织、免疫细胞都是散布在不同的空间, 免疫分子的表达也具有时相性, 细胞之间的接触不可能是持久的, 所以在免疫系统的进化过程中, 形成了很多由受体和配体等蛋白质相互作用所触发的信号通路, 这些信号通路网络直接参与调控免疫反应的发生、发展和结束。

近 20 年来, 通过将分子生物学、生物化学、免疫学以及生物信息学和蛋白质组学理论和研究成果的有机结合, 发展出了许多有效地研究蛋白质相互作用的方法。我们拟从免疫学研究的角度, 从近些年的经典免疫学文献着手, 对免疫系统中蛋白质相互作用的研究方法进行综述, 主要包括免疫共沉淀技术, pull-down 技术, 表达克隆, Far Western blot, 酵母双杂交系统和蓝色温和胶技术。

收稿日期: 2009-09-03; 接受日期: 2009-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30730050, 30621063); 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2006CB910800, 2009CB522506); 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2009ZX09103-631, 2009ZX09503-002)

作者简介: 徐 锋(1986-), 男, 湖北黄石人, 硕士生

\*Corresponding authors, Tel: 010-80727777-1242

## 1 免疫共沉淀技术

免疫共沉淀技术是以抗体和抗原之间的专一性为基础的用于研究蛋白质相互作用的经典方法, 是确定两种蛋白质在完整细胞内生理性相互作用的有效方法。其原理是: 当细胞在非变性条件下被裂解时, 完整细胞内存在的许多蛋白质-蛋白质间的相互作用被保留了下来。如果用蛋白质 X 的特异抗体免疫沉淀 X, 那么与 X 在体内结合的蛋白质 Y 也能沉淀下来, 随后可以通过双向电泳以及生物质谱技术对目的蛋白进行鉴定。这种方法常用于确认两种蛋白是否在体内结合, 也可用于寻找新的相互作用蛋白。免疫共沉淀技术的优点为: (1)相互作用的蛋白质都是经翻译后修饰的, 处于天然状态, 可以分离得到天然状态的相互作用蛋白复合物; (2)蛋白的相互作用是在自然状态下进行的, 可以避免人为的影响。缺点为: (1)可能检测不到低亲和力或者瞬间的蛋白质-蛋白质相互作用; (2)两种蛋白质的结合可能不是直接结合, 而可能有第三者在中间起桥梁作用; (3)必须在实验前预测目的蛋白, 以选择最后检测的抗体, 所以, 若预测不正确, 实验就得不到结果。

Hutloff 等<sup>[2]</sup>使用免疫共沉淀技术, 并结合亲和层析和双向电泳的方法, 鉴定出了 CD28 家族的一个新成员 ICOS, ICOS 是 T 细胞活化的一个共刺激分子; Geijtenbeek 等<sup>[3]</sup>通过免疫共沉淀技术, 鉴定出了 DC-SIGN (DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) 分子, 它能够与 ICAM-3 结合促进免疫突触的形成, 还可以与包括 HIV-1 在内的多种病毒和细菌等微生物结合, 是近些年研究比较热门的一种 C 型凝集素; 另外这个实验室还是通过免疫共沉淀技术筛选到了 MGL 在 T 细胞表面的受体 CD45<sup>[4]</sup>, MGL 通过改变 CD45 的活性, 来改变 T 细胞的功能, 从而实现对 T 细胞免疫反应的负调节。Zhu 等<sup>[5]</sup>运用免疫共沉淀技术鉴定出 galectin-9 作为 Tim-3 的配体, 与 Tim-3 相互作用, 诱导 Th1 细胞死亡, 从而负调节 TH1 细胞免疫反应; Chen 等<sup>[6]</sup>利用免疫共沉淀技术和生物质谱技术筛选到能够与 CD24 发生相互作用的 Siglec-10, 并进而发现 Siglec-10 与 CD24 的相互作用能够选择性抑制由损伤引起的免疫反应 (damage-induced immune responses), 从而使得机体能够区分 DAMPs (damage-associated molecular patterns) 和 PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)。

## 2 Pull-down 技术

Pull-down 技术是研究细胞内蛋白质与蛋白质之间相互作用的一个非常重要的工具, 能够在体外判定两个或者多个蛋白质之间的物理相互作用, 既可以被用来确证之前通过其他办法得到的相互作用蛋白 (例如酵母双杂交系统和免疫共沉

淀技术等等),也可以被用作筛选一些未知的相互作用蛋白。

Pull-down 技术的基本操作流程是先制备 GST 融合蛋白,然后将其亲和固着在谷胱甘肽亲和树脂上,作为与目的蛋白亲和的支持物,目的蛋白溶液过柱,可从中捕获与之相互作用的“捕获蛋白”(目的蛋白),洗脱结合物后通过 SDS-PAGE 或者生物质谱分析,从而证实两种蛋白间的相互作用或筛选相应的目的蛋白。

Yoneyama 等<sup>[7]</sup>为了验证 RIG-I 与 dsRNA 直接的相互作用,设计完成了 poly(I:C)-agarose pull-down 实验,检测到了 poly(I:C)与 RIG-I 的相互作用,以此说明 RIG-I 在病毒复制过程中能够起到监测和清除病毒基因组的功能;Brint 等<sup>[8]</sup>使用 GST-pull-down 技术,确定了在 IL-1 和 TLR4 信号通路中,ST2 的抑制效应是通过与 MyD88 和 Mal 相互作用来实现的,以此来维持对内毒素的免疫耐受。

### 3 表达克隆

表达克隆的基本原理是,根据生物信息学分析或者相关文献报道,使用表达载体构建一个克隆文库,每一个克隆表达一种蛋白,然后在这个克隆文库里筛选感兴趣的蛋白,例如相互作用蛋白的筛选,抗生素抗性的筛选等等。

表达克隆的目的是产生大量的特异的蛋白,因此在构建原核表达载体时,应该考虑核糖体结合位点,用以提高目的基因的表达式;在构建真核表达载体时,则应该考虑一些影响目的蛋白翻译后修饰的特异序列。

表达克隆在免疫学研究中应用比较广泛,常被用于鉴定未知的配体或者受体。Zhong 等<sup>[9]</sup>从人脾脏 cDNA 文库中大约  $2 \times 10^5$  个克隆里,筛选到了 7 个能够活化 IRF3 的克隆,进一步的序列分析表明在这 7 个克隆包括一种之前未见报道的蛋白,并将其命名为 MITA (Mediator of IRF3 Activation)。MITA 能够调节病毒感染引起的 IRF3 活化和 I 型干扰素的产生,从而在固有抗病毒免疫反应中发挥重要作用;Sedy 等<sup>[10]</sup>将淋巴细胞 cDNA 文库转化到 BJAB 和 NIH 3T3 细胞系,筛选到了能够与 BTLA 发生相互作用的蛋白 HVEM, HVEM 引起 BTLA 的磷酸化,抑制 T 细胞的增殖;Cai 等<sup>[11]</sup>使用 B 细胞 cDNA 文库克隆出了 CD160 的配体 HVEM, CD160 与 HVEM 发生相互作用,抑制 CD4<sup>+</sup> T 细胞的活化。

### 4 酵母双杂交系统

酵母双杂交系统的基础是真核细胞转录激活因子的结构和活性特点。真核转录激活因子的结构都基本相似,由一个 DNA 结合结构域和一个转录激活结构域组成,其中酵母蛋白 GAL4 就是一个典型的转录激活因子,它由 881 个氨基酸组成, N 端 1-147 位氨基酸含细胞核定位序列和酵母启动子上游激活序列的结合结构域, C 端 768-881 位氨基酸含转录激活结构域,可激活转录。这两个结构域相互独立但功能上又互相依赖,他们之间只有通过某种方式结合在一起才具有完整的转录激活因子的活性。根据 GAL4 的这一特点,研究者需要分别构建包含有结合结构域和激活结构域的酵母融合蛋白表达质粒,将已知蛋白与激活结构域融合,将酵母的基因组

DNA 片段所编码的蛋白与结合结构域融合。当已知蛋白与基因组 DNA 编码的蛋白之间有相互作用时,就会导致一个含有 GAL4 结合位点的报告基因的表达。

虽然酵母双杂交技术在研究蛋白质相互作用中应用广泛,但是酵母双杂交技术也有其缺点:(1)对相互作用蛋白在细胞内的定位要求严格,传统的酵母双杂交技术不能检测定位于胞质内、细胞膜和通过分泌泡分泌到细胞外的蛋白,但是近来通过对传统酵母双杂交技术的改进,已经实现了对膜蛋白和胞质内蛋白的检测;(2)由于某些蛋白质本身具有转录激活功能,从而产生假阳性结果;(3)只能检测两个蛋白之间的相互作用。

Zhong 等<sup>[12]</sup>通过酵母双杂交的方法筛选与 MITA 相互作用的蛋白,发现了定位于线粒体的 E3 泛素连接酶 RNF5。进一步实验表明,病毒感染细胞后, RNF5 在线粒体外膜上泛素化修饰 MITA 并引起该蛋白降解,从而抑制了病毒感染诱导的 I 型干扰素表达以及细胞抗病毒天然免疫反应;Yu 等<sup>[13]</sup>使用酵母双杂交技术筛选到能够与抑制型 NK 细胞受体 KLR2DL1 相互作用的  $\beta$ -arrestin 2,  $\beta$ -arrestin 2 和 KLR2DL1 的结合招募 SHP-1 和 SHP-2 并触发下游的抑制性信号通路,从而降低 NK 细胞的毒性作用,揭示了 NK 细胞毒性作用的一个调控机制。

### 5 Far Western blot

在 Far western blot (Far WB) 技术中,含有目的蛋白的细胞裂解液先被 SDS-PAGE 或者 native PAGE 分离,然后转到硝酸纤维素膜 (PVDF)。膜上的蛋白在经历变性和复性之后,将膜封闭,接着使用纯化的诱饵蛋白作为探针与膜孵育。如果诱饵蛋白与目的蛋白有相互作用,那么膜上目的蛋白存在的位置也应该能够检测到诱饵蛋白的存在。

Far WB 的主要优点在于:(1)它允许目的蛋白内源性表达在细胞里,而不需要纯化;(2)它能够很好的判定两个蛋白之间是否存在直接的相互作用。Far WB 的主要缺点是它至少需要一种一定量的纯化蛋白,并且存在不可避免的非特异性结合。Far WB 主要应用于:(1)鉴定与已知蛋白发生相互作用的蛋白;(2)鉴定两个蛋白之间是否存在一对一的直接相互作用,通常是用其他方法筛选后的结果。Far WB 还能用于研究翻译后修饰对于蛋白之间相互作用的影响,确定发生相互作用的结构域。

Machida 等<sup>[14]</sup>介绍了一种快速并且简单的 Far WB 方法,使用 GST 标记的 SH2 结构域作为探针,检测在细胞信号传导磷酸化过程中与 SH2 结构域相互作用的蛋白分子。

### 6 蓝色温和胶技术

蓝色温和胶技术 (BN-PAGE) 最早被引入用于分析线粒体膜蛋白和蛋白复合体的技术,现在则常被用来分离和鉴定膜蛋白复合物。蓝色温和胶技术体系中各种试剂和溶液均非常温和,溶液中的蛋白始终保持非变性状态。由于考马斯亮蓝 G-250 的疏水性,使得其能够与体系中的膜蛋白结合,为蛋白质提供过量的负电荷,因此蛋白质能够根据形状大小,而不

是根据荷质比泳动, 蛋白复合体被分离而在胶上以复合体条带呈现。在泳动过程中, 蛋白质都带上了负电荷, 蛋白质之间互相排斥, 所以不容易聚集在一起。随后可将蛋白复合体条带中的蛋白变性处理后, 将蛋白组分利用 SDS-PAGE 分离出来, 进行下一步研究。

Liu 等<sup>[15]</sup>通过蓝色温和胶技术对肝癌细胞 HepG2 和整合有 HBV 全基因组的 HepG2.2.15 细胞同时进行分析, 发现了特异存在于 HepG2.2.15 细胞中的蛋白质复合体。通过对这一特异蛋白质复合体进行成分鉴定和进一步的功能验证, 筛选到新的潜在靶标蛋白, 这些潜在的靶标蛋白可能在 HBV 复制和分泌过程中发挥一定的功能; Swamy 等<sup>[16]</sup>使用蓝色温和胶技术对含有 SLP 家族(SH2 domain containing leukocyte protein)蛋白的数目、大小形状和相对丰度进行了高通量研究, 以此来揭示 SLP 蛋白在淋巴细胞活化过程中的作用。

## 7 结语

蛋白质之间相互作用的研究对于阐明蛋白质在细胞内的功能至关重要。虽然鉴定相互作用蛋白的研究方法很多, 但是各种技术方法都有它自身的局限性, 所以为了寻找一种恰当的实验方法, 必须仔细分析实验目的和实验室客观条件, 结合众多技术方法各自的优缺点进行综合考虑。由于蛋白质相互作用的研究很容易出现假阳性和假阴性的结果, 所以同时选择两种以上的研究方法进行结果的验证是十分必要的。另外, 在研究蛋白质相互作用过程中, 目的蛋白相互作用的性质(强相互作用, 弱相互作用, 暂时性相互作用)以及内源表达量高低的判定也相当关键。

在目前众多相互作用蛋白的研究方法当中, 依然有很多方面需要改进, 这其中包括: (1)如何最大限度的反映出生理条件下重要蛋白质之间的相互作用; (2)如何最大限度去除非特异的相互作用; (3)蛋白质的提取, 特别是膜蛋白的提取。因为免疫系统中重要蛋白质之间的相互作用常常涉及到膜蛋白之间的相互作用。

## 参考文献:

- [1] Sanchez C, Lachaize C, Janody F, *et al.* Grasping at molecular interactions and genetic networks in *Drosophila melanogaster* using FlyNets, an Internet database[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 89-94.
- [2] Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, *et al.* ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28[J]. *Nature*, 1999, 397(6716): 263-266.
- [3] Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, *et al.* Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses[J]. *Cell*, 2000, 100(5): 575-585.
- [4] van Vliet SJ, Si Gringhuis, Geijtenbeek TB, *et al.* Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(11): 1200-1208.
- [5] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(12): 1245-1252.
- [6] Chen GY, Tang J, Zheng P, *et al.* CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses[J]. *Science*, 2009, 323(5922): 1722-1725.
- [7] Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(7): 730-737.
- [8] Brint EK, Xu D, Liu H, *et al.* ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(4): 373-379.
- [9] Zhong B, Yang Y, Li S, *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation[J]. *Immunity*, 2008, 29(4): 538-550.
- [10] Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, *et al.* B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(1): 90-98.
- [11] Cai G, Anumanthan A, Brown JA, *et al.* CD160 inhibits activation of human CD4<sup>+</sup> T cells through interaction with herpesvirus entry mediator[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(2): 176-185.
- [12] Zhong B, Zhang L, Lei C, *et al.* The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA[J]. *Immunity*, 2009, 30(3): 397-407.
- [13] Yu MC, Su LL, Zou L, *et al.* An essential function for beta-arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(8): 898-907.
- [14] Machida K, Mayer BJ. Detection of protein-protein interactions by far-Western blotting[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 536: 313-329.
- [15] Liu K, Qian L, Li W, *et al.* Two-dimensional blue native/SDS PAGE analysis reveals HSPs chaperone machinery involved in HBV production in HepG2.2.15 cells[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2009, 8: 495-505.
- [16] Swamy M, Kulathu Y, Ernst S, *et al.* Two dimensional Blue Native-/SDS-PAGE analysis of SLP family adaptor protein complexes[J]. *Immunol Lett*, 2006, 104(1): 131-137.