



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20140062

一种基于荧光检测的 GST-pull down 改进方法的建立 及对 Atsttrin-TNFR2 相互作用的分析

王重喜¹, 罗学刚¹, 李朋彦¹, 陈小颖¹, 周浩¹, 张同存^{1,2}

(1. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 武汉科技大学生物医学研究院, 武汉 430000)

摘要: 创建一种基于荧光检测的 GST-pull down 改进方法, 用于蛋白质间相互作用分析. 利用已确定具有相互作用的 Atsttrin 和 TNFR2 蛋白对作为实验对象, 分别构建 GST-Atsttrin 和 TNFR2-EYFP 融合蛋白的原核和真核表达体系. 将纯化的 GST-Atsttrin 与 TNFR2-EYFP 蛋白孵育后, 经离心收集复合物, 通过酶标仪检测其荧光值, 从而分析 Atsttrin 和 TNFR2 间的相互作用. 通过荧光值的检测成功分析了 Atsttrin 和 TNFR2 间的相互作用, 荧光值的检测可代替传统方法中的 Western blot 分析, 从而简化 GST-pull down 分析步骤、降低操作难度、并可对缺乏特异性抗体的靶蛋白进行有效地分析.

关键词: 蛋白质相互作用; 荧光检测; GST-pull down

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2015)01-0034-07

An Improved Method of GST-pull Down Based on Fluorescence Detection and its Application to the Analysis of the Interaction between Atsttrin and TNFR2

WANG Chongxi¹, LUO Xuegang¹, LI Pengyan¹, CHEN Xiaoying¹,
ZHOU Hao¹, ZHANG Tongcun^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Institute of Biology and Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430000, China)

Abstract: An improved method of GST-pull down based on fluorescence detection was developed and could be applied to analyzing protein interaction. Based on the confirmed interaction between TNFR2 and Atsttrin, recombinant expression vectors pGEX-Atsttrin and pEYFP-TNFR2 were constructed. GST-Atsttrin fusion proteins were purified by affinity chromatography, and then incubated with TNFR2-EYFP fusion proteins. After centrifugation, the complex was collected, and the interaction between Atsttrin and TNFR2-EYFP was analyzed through measuring the fluorescence intensity with multifunctional microplate reader. The interaction between Atsttrin and TNFR2 was verified by the detection of the fluorescence after the GST-pull down. Compared with the traditional method, the new method was more convenient and could be used to analyze the target protein without specific antibodies.

Key words: protein interaction; fluorescence detection; GST-pull down

蛋白质间的相互作用在生物细胞的生命活动中发挥着重要作用, 研究蛋白质间的相互作用, 对于蛋白质功能的分析、疾病机理的阐明和新药的研发具有十分重要的意义^[1-2]. 目前常用的研究蛋白质间相互

收稿日期: 2014-04-19; 修回日期: 2014-06-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2012AA021505); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助项目(IRT1166)

作者简介: 王重喜(1989—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 罗学刚, 副教授, luoxuegang@hotmail.com.

作用的方法主要有酵母双杂交、GST-pull down、免疫共沉淀 (Co-IP) 和荧光能量共振转移 (FRET) 等^[3]。其中, GST-pull down 技术是利用谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 与谷胱甘肽间的特异性结合, 研究蛋白质体外直接相互作用的重要手段^[2,4]。其基本原理^[3,5]是将目的蛋白与 GST 标签融合表达, 将得到的融合蛋白亲和固定到谷胱甘肽树脂上当作“诱饵蛋白”, 加入另一种蛋白溶液后, 由于蛋白质间的相互作用, 可从中捕获出能与目的蛋白相互作用的“靶蛋白”, 而形成 GST-诱饵蛋白-靶蛋白的复合物。收集复合物后通过 SDS-PAGE 或 Western blot 检测靶蛋白的存在, 从而分析证实目的蛋白和靶蛋白间的相互作用。然而, SDS-PAGE 分析对靶蛋白的测定特异性较低, 而 Western blot 检测则步骤繁琐、操作难度较大、成本较高, 而且无法适用于缺乏特异性抗体的靶蛋白 (如新发现的蛋白质或免疫原性较弱的蛋白质) 的分析, 因此该方法需进一步改良。

EYFP 作为 EGFP 蛋白的改进型, 可在 500 nm 的激发光激发下产生 528 nm 的发射光, 因其易于检测, 荧光强、发光稳定、没有细胞种类和位置上的限制且载体易于构建, 在生物大分子标记和蛋白间相互作用中都有重要应用^[6-7]。实验示意图如图 1 所示。

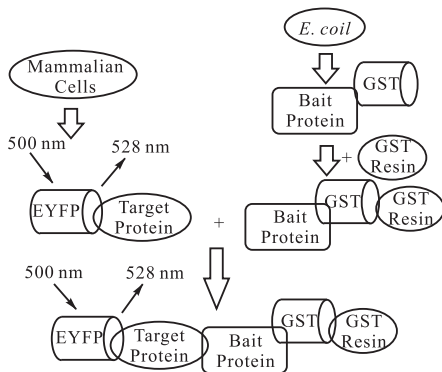


图 1 基于荧光检测的 GST-pull down 方法示意图

Fig. 1 Schema of the GST-pull down based on fluorescence detection

本实验选用已确定能发生相互作用的蛋白对 Atsttrin 和肿瘤坏死因子受体 2 (Tumor necrosis factor receptor 2, TNFR2)^[8-9] 作为实验对象, 分别构建 GST-Atsttrin 原核表达载体和 TNFR2-EYFP 真核表达载体, 并在大肠杆菌及哺乳动物细胞中进行表达。将原核表达的 GST-Atsttrin 融合蛋白亲和固定到 GST 树脂上, 再向其中加入含有 TNFR2-EYFP 融合蛋白的细胞裂解液。因 Atsttrin 和 TNFR2 间的相互作用而形成树脂-GST-Atsttrin-TNFR2-EYFP 复合物, 在

GST 树脂的重力作用下瞬时离心可以得到该复合物。最后利用 EYFP 的荧光特性, 在多功能酶标仪上用 500 nm 的激发光激发, 检测 528 nm 发射光的荧光值, 即可实现对蛋白质间相互作用的分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒及菌株

人正常乳腺细胞 (HBL100)、非洲绿猴肾成纤维细胞 (COS-7)、质粒 pGEX-6p-3 及 pEYFP-N1 均为本实验室保存; 质粒 pMD18T-Atsttrin 为实验室前期构建; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 和 BL21 (DE3) 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

Pfu DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶, TaKaRa 公司; 核酸 Marker、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 北京康为世纪公司; High-Affinity GST Resin, 南京金斯瑞生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒和 IPTG, 北京索莱宝公司; 细胞培养基, Gibco 公司; 细胞胎牛血清, 杭州四季青公司; 核酸限制性内切酶、蛋白 Marker、TuroFect 细胞转染试剂, Fermentas 公司; 实验所用其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。引物合成及序列测序由北京英潍捷基公司完成。

NETN 细胞裂解液: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 体积分数为 0.5% 的 NP-40。

1.2 方法

1.2.1 质粒 pEYFP-TNFR2 构建及鉴定

根据 Uniprot 提供的 TNFR2 胞外域蛋白序列 (P20333) 和 NCBI 提供的 TNFR2 基因序列 (Gene ID: 7133), 克隆其胞外域 23 到 257 位部分。利用 Primer 5.0 软件设计引物扩增 TNFR2, 酶切位点用下划线表示, P₁: 5'-TAGGAATTCGCCACCATGTTGCCCGCCAGGTG-3' (*EcoR* I), P₂: 5'-GGAGGATCCGAGTCGCCAGTGCTCCCTTCAG-3' (*Bam* H I)。实验中选用人正常乳腺细胞 (HBL100) 的 cDNA 作为模板, 扩增目的基因 TNFR2。将 PCR 产物和载体 pEYFP-N1 分别双酶切, 切胶回收, 经 T4 DNA 连接酶连接后转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。经卡那霉素抗性筛选, 挑取单克隆进行菌落 PCR 及双酶切验证, 验证正确后经测序鉴定。

1.2.2 质粒 pGEX-Atsttrin 构建及鉴定

以 pMD18T-Atsttrin 为模板,通过 PCR 方法扩增 *Atsttrin* 基因. 所用引物为 P₃: 5'-TCGGGATCCGAAAA TCTGTATTTTCAGGGCCCGCAGGCTTCCTGCTGT G-3'(BamH I), P₄: 5'-CCGCTCGAGTTATGGGATT GGACAGCAGC-3'(Xho I). 为方便在今后的引物中切割去除 GST 标签,在上游引物中引入 TEV 蛋白酶的切割位点(斜体部分). 将 PCR 产物和 pGEX-6p-3 载体分别双酶切,切胶回收,连接转化 *E. coli* JM109 感受态细胞. 经氨苄青霉素(Amp)抗性筛选后,利用菌落 PCR、双酶切及测序鉴定阳性克隆.

1.2.3 GST-Atsttrin 融合蛋白的诱导表达和优化

重组质粒 pGEX-Atsttrin 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 将转化后的重组表达菌株接种于含 Amp (100 μg/mL) 的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜后以 2% 接种量接种于 50 mL 含 Amp (100 μg/mL) 的新鲜 LB 液体培养基中 (250 mL 摇瓶), 于 37 °C 培养至 A₆₀₀ 为 0.6 ~ 0.8 时 (约 2 h), 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 30 °C 诱导培养 4 h. 同时以空质粒 pGEX-6P-3 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 诱导培养作为阴性对照.

诱导时间优化: 在 30 °C 条件下, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导培养, 分别诱导 1、2、4、6、8 h 后取样用于 SDS-PAGE 分析.

诱导剂浓度优化: 分别加入终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG, 30 °C 诱导培养, 用 SDS-PAGE 分析目的蛋白表达情况.

1.2.4 GST-Atsttrin 融合蛋白纯化

诱导完毕, 4 °C 离心收集菌体, 用 PBS 洗涤 3 次. 每 100 mg 湿菌体加 3.3 mL PBS 将菌体重悬并超声破碎, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 收集上清液, 并用 0.45 μm 滤膜过滤. 用 4 °C 预冷的 PBS 平衡 GST 树脂后, 将上清液蛋白上柱纯化. 再次用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤杂蛋白后, 取少量与 GST-Atsttrin 融合蛋白结合的 GST 树脂用于 SDS-PAGE 分析, 其余 4 °C 储存用于后续实验.

1.2.5 细胞转染及 TNFR2-EYFP 融合蛋白的制备

按照脂质体转染试剂说明书操作, 将质粒 pEYFP-TNFR2 转染 COS-7 细胞. 培养 24 h 后, 弃培养基, 用 PBS 洗涤细胞两次, 加入 1.0 mL 细胞裂解液 (4 °C 预冷), 置于冰上裂解 30 min 后, 13 000 r/min 离心 10 min 收集上清液蛋白.

1.2.6 GST-Atsttrin 和 TNFR2-EYFP 相互作用

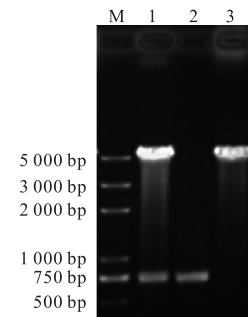
将 50 μL 1.2.4 节所得 GST 树脂加入到 500 μL

1.2.5 节所得上清液蛋白中, 置于旋转摇床, 4 °C 孵育 12 h. 800 r/min 短暂离心 20 s 后弃上清液蛋白, 用 1 mL NETN 细胞裂解液 (4 °C 预冷) 重复洗涤 3 次, 用 200 μL PBS 吹悬树脂. 将所得树脂加入到 96 孔荧光检测板中, 在多功能酶标仪 (Bioteck) 上用 500 nm 的激发光激发, 检测 528 nm 发射光的荧光值.

2 结果

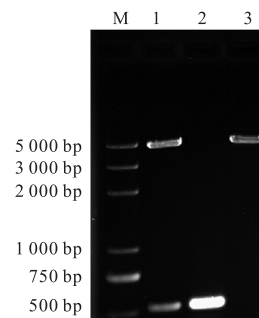
2.1 重组质粒 pEYFP-TNFR2 和 pGEX-Atsttrin 的构建及鉴定

以 HBL100 细胞的 cDNA 为模板, 用引物 P₁ 和 P₂ 扩增 TNFR2 基因, 并定向克隆到载体 *EcoR* I 和 *BamH* I 之间. PCR 后可扩增出与预期大小相符的目的条带, 且重组质粒经双酶切可检测到目的条带 (图 2(a)). 另一方面, 以 pMD18T-Atsttrin 为模板, 用引物 P₃ 和 P₄ 扩增 *Atsttrin* 基因并亚克隆到 pGEX-6P-3 质粒中. 重组质粒经 *Xho* I 和 *BamH* I 双酶切后可检测到与预期大小相符的目的条带 (图 2(b)). 进一步通过测序证实, 重组质粒 pEYFP-TNFR2 和 pGEX-Atsttrin 均构建成功.



M. DNA marker; 1. pEYFP-TNFR2 质粒 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切产物; 2. PCR 产物; 3. pEYFP-N1 质粒 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切产物

(a) pEYFP-TNFR2 质粒的构建



M. DNA marker; 1. pGEX-Atsttrin 质粒 *Xho* I 和 *BamH* I 双酶切产物; 2. PCR 产物; 3. pGEX-6p-3 质粒 *Xho* I 和 *BamH* I 双酶切产物

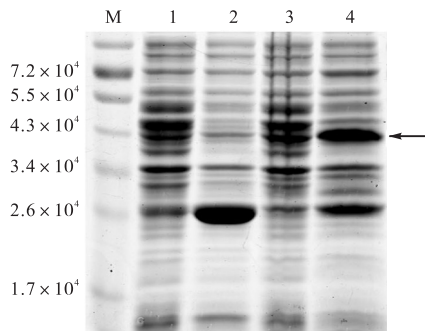
(b) pGEX-Atsttrin 质粒的构建

图 2 质粒构建

Fig. 2 The construction of recombinant vectors

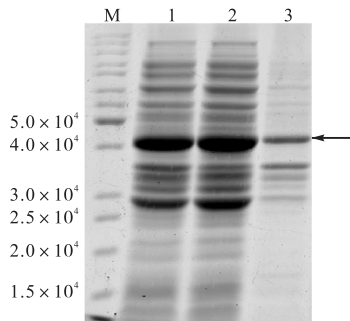
2.2 GST-Atsttrin 融合蛋白的诱导表达

质粒 pGEX-6p-3 和 pGEX-Atsttrin 分别转化 *E. coli* BL21 (DE3), IPTG 诱导表达, GST-Atsttrin 融合蛋白诱导表达与可溶性分析如图 3 所示. 重组菌株经 IPTG 诱导后在相对分子质量 4.3×10^4 处可见 GST-Atsttrin 融合蛋白条带(GST 蛋白相对分子质量约 2.6×10^4 , Atsttrin 蛋白相对分子质量约 1.7×10^4). 进一步对菌体超声破碎后所获得的上清和沉淀进行电泳分析, 结果显示目的蛋白可溶率达 90%.



M. 蛋白 marker; 1, 2. 分别为菌体 *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-6p-3 IPTG 不诱导和诱导; 3, 4. 分别为菌体 *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-Atsttrin 融合蛋白 IPTG 不诱导和诱导; 箭头所指为 GST-Atsttrin 融合蛋白

(a) GST-Atsttrin 融合蛋白表达分析



M. 蛋白 marker; 1. 全菌体; 2. 菌体超声破碎后上清液; 3. 菌体超声破碎后沉淀; 箭头所指为 GST-Atsttrin 融合蛋白

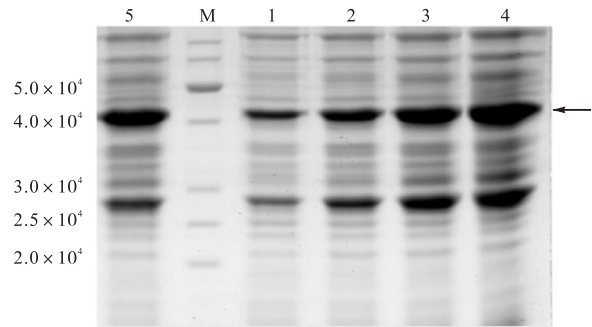
(b) GST-Atsttrin 融合蛋白可溶性分析

图 3 GST-Atsttrin 融合蛋白诱导表达与可溶性分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression and solubility of GST-Atsttrin fusion protein

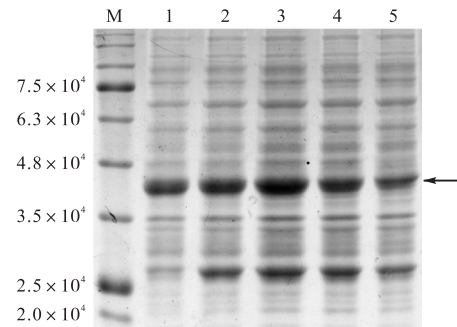
为进一步优化诱导表达条件, 首先将重组菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-Atsttrin 以 1.0 mmol/L 的 IPTG 30 °C 诱导培养 8 h, 每 2 h 取样分析. SDS-PAGE 电泳结果显示重组蛋白的可溶性表达量随诱导时间延长而增加, 诱导 6 h 时融合蛋白有最大的表达量 (图 4(a)). 进而分别在 30 °C 以终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG 条件下诱导培养 6 h, 结果表明 0.6 mmol/L 的 IPTG 对菌体诱导效果最好 (图

4(b)). 对优化后融合蛋白的可溶性进行分析, 结果显示目的蛋白依然具有很好的可溶性 (图 5). 因而确定 GST-Atsttrin 融合蛋白诱导表达的最优条件为 30 °C, 以 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h. Quantity one 软件分析显示可溶性融合蛋白的量可占菌体总蛋白的 30% 以上.



M. 蛋白 marker; 1—5. 分别为诱导 1、2、4、6、8 h; 箭头所指为 GST-Atsttrin 融合蛋白

(a) 诱导时间优化

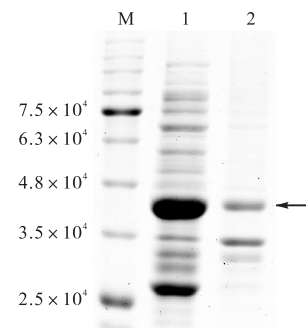


M. 蛋白 marker; 1—5. 分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导; 箭头所指为 GST-Atsttrin 融合蛋白

(b) IPTG 诱导剂浓度优化

图 4 诱导表达时间及 IPTG 浓度的优化

Fig. 4 Optimization of the induction time and concentration of IPTG



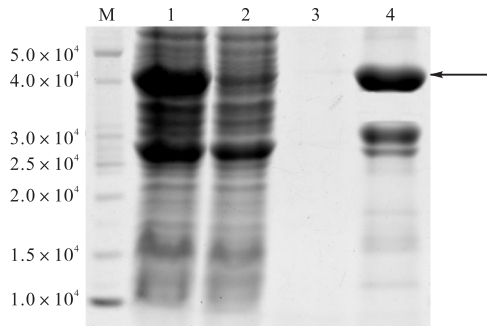
M. 蛋白 marker; 1. 菌体超声破碎后上清液; 2. 菌体超声破碎后沉淀; 箭头所指为 GST-Atsttrin 融合蛋白

图 5 优化后蛋白可溶性分析

Fig. 5 Analysis of the solubility of GST-Atsttrin fusion protein

2.3 GST-Atsttrin 融合蛋白的纯化

将诱导菌体超声破碎后,离心取上清于 GST 亲和层析柱纯化融合蛋白. SDS-PAGE 分析结果显示:通过一次亲和层析可除去绝大多数的杂蛋白,但在相对分子质量为 2.8×10^4 的附近依然存在一条杂蛋白带,其位置与空质粒 pGEX-6P-3 诱导表达的 GST 产物相同(图 6,图 3(a)). 由此表明重组菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-Atsttrin 在表达融合蛋白的同时,也会产生一定的 GST 单独表达产物. 这很可能是由于人源基因 *Atsttrin* 密码子与 *E. coli* 偏爱性间所存在的差异造成翻译出现中断或外源基因 mRNA 不稳定发生断裂而造成的.



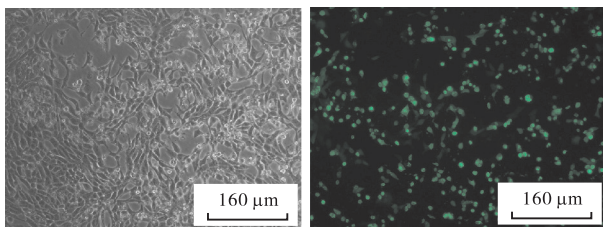
M. 蛋白 marker; 1. 菌体超声破碎后上清液蛋白; 2. 穿透液; 3. PBS 洗脱液; 4. GST 树脂与 GST-Atsttrin 融合蛋白结合复合物; 箭头所指为 GST-Atsttrin 融合蛋白.

图 6 GST-Atsttrin 融合蛋白的纯化

Fig. 6 Purification of the GST-Atsttrin fusion protein

2.4 细胞转染及 TNFR2-EYFP 融合蛋白的荧光检测

将质粒 pEYFP-TNFR2 转染 COS-7 细胞,培养 24 h 后,通过荧光显微镜分析 TNFR2-EYFP 目的蛋白的表达情况,结果如图 7 所示.



(a) 自然光下图片 (b) 荧光激发下图片

图 7 细胞转染 pEYFP-TNFR2 质粒后荧光图片

Fig. 7 Micrographs of cells transfected with pEYFP-TNFR2 vector

转染细胞可观测到明显的荧光,表明融合蛋白在细胞内可获得很好地表达. 进一步收集转染后的细胞,裂解收取上清获得 TNFR2-EYFP 样品,利用多功

能酶标仪对荧光信号进行定量分析,结果如图 8 所示. 结果显示细胞裂解液试剂对荧光值的测定没有影响;同时,荧光值与融合蛋白 TNFR2-EYFP 样品间具有良好的剂量依赖关系,表明荧光值的强弱可以很好地反映出 EYFP 融合蛋白的含量高低.

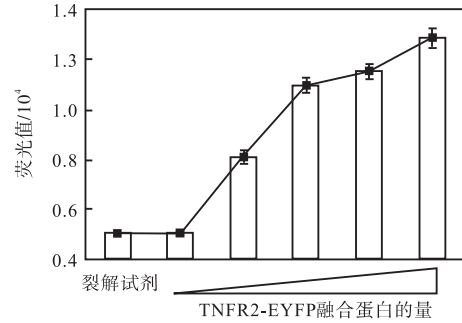
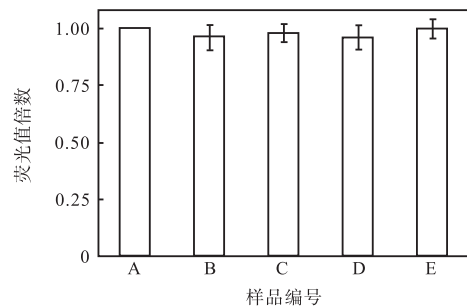


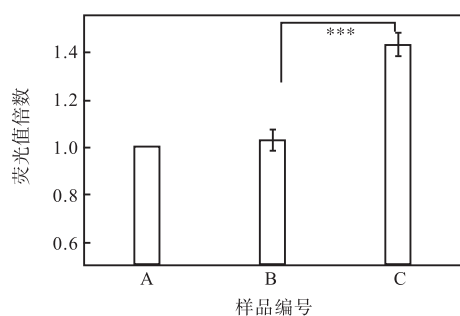
图 8 TNFR2-EYFP 融合蛋白的荧光值与其剂量间的关系
Fig. 8 Relationship between the fluorescence of TNFR2-EYFP fusion protein and its amount

2.5 Atsttrin 和 TNFR2 相互作用分析

为验证荧光测定方法是否可很好地用于蛋白质间相互作用的 GST-pull down 分析,首先对 GST-pull down 系统所涉及到的 COS-7 细胞及 *E. coli* 内源性杂蛋白、GST 标签蛋白及树脂对 EYFP 荧光测定是否会产生干扰进行了分析. 与对照组相比上述“杂质”均不会对 EYFP 荧光值的测定产生显著性的影响(图 9(a)). 在此基础上,分别将 Atsttrin-GST-树脂复合物、GST-树脂复合物与转染 pEYFP-TNFR2 的细胞裂解液共同孵育,短暂离心并用 PBS 清洗 GST 树脂后,于多功能酶标仪中测定 EYFP 的荧光值. 与 GST-树脂复合物相比,Atsttrin-GST-树脂复合物在与 pEYFP-TNFR2 细胞裂解液孵育后,可检测到明显的荧光信号(图 9(b)),表明 Atsttrin-GST-树脂复合物可将 TNFR2-EYFP 从细胞裂解液中捕获富集出来,且荧光检测法能够很好地检测这一过程. 改进后的方法可很好地用于蛋白质间相互作用的分析.



A. 对照(PBS); B. COS-7 细胞裂解液; C. 菌体 *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-Atsttrin 裂解液; D. GST 蛋白; E. GST 树脂
(a) 杂质对荧光值的影响



A. 对照(PBS); B. GST 蛋白和树脂结合复合物; C. GST-Atsttrin 融合蛋白和树脂结合复合物; ***表示 $P < 0.001$

(b) 相互作用分析

图 9 Atsttrin 和 TNFR2 相互作用分析

Fig. 9 Interaction analysis of Atsttrin and TNFR2

3 讨论

相比酵母双杂交、Co-IP、FRET 等方法, GST-pull down 简便易行、实验重现性好,因此在蛋白质相互作用分析方面得到了广泛的应用. 本研究在传统 GST-pull down 方法基础上,对其进行了改进. 通过将靶蛋白与 EYFP 融合表达,以 EYFP 荧光值的检测代替传统方法中的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析,从而大大简化了 GST-pull down 分析步骤、降低了操作难度、并可对缺乏特异性抗体的靶蛋白进行有效的分析. 本研究结果显示 EYFP 的荧光值与 EYFP 融合蛋白的含量间具有良好的剂量依赖关系,且整个实验体系中可能存在的真核细胞及 *E. coli* 的内源性物质、GST 蛋白、亲和树脂、细胞裂解液等“杂质”均不会对 EYFP 荧光测定产生显著性影响,因此本方法可很好地通过检测 EYFP 荧光值的大小实现对蛋白质间相互作用的分析.

正确空间结构的形成对于蛋白质相互作用的体外分析十分重要^[4]. GST 是 *E. coli* 天然高效、可溶性表达的蛋白质,在作为融合表达标签时可促进目的蛋白质二硫键的形成,从而使表达产物折叠形成正确的空间结构^[5,10]. 此外, GST 还有利于增强融合蛋白的翻译效率及稳定性,从而大大提高表达水平^[11]. 在本实验中,经过条件优化,在 30 °C、IPTG 浓度为 0.6 mmol/L 时诱导培养 6 h,可确保 GST-Atsttrin 融合蛋白的表达量达到最大(250 mg/mL),同时可溶性蛋白比率可高达 90%以上,确保了相互作用分析的正确性.

在本实验中选用的研究对象 Atsttrin 是新近报道的 TNFR2 特异性拮抗蛋白^[8-9]. TNF α 作为促炎因

子,在类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、银屑病性关节炎(psoriasis arthritis, PA)、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)等免疫系统疾病过程中起着重要作用^[12-13]. 相比于 TNFR1, TNFR2 相对有限的细胞分布,使得 TNFR2 成为更为特异、安全的治疗靶点^[14-15]. Atsttrin 可与 TNF α 竞争对 TNFR2 的结合,从而有效发挥对类风湿性关节炎的高效抑制作用^[8-9]. 不仅如此,药物动力学分析表明 Atsttrin 在体内具有较为理想的消除半衰期和生物利用度,表明 Atsttrin 及其衍生物将是具有潜力的抗关节炎新药^[8-9]. 本文改进后的 GST-pull down 方法可为 Atsttrin 蛋白质序列的进一步优化以及新型抗关节炎新药的筛选提供一种新的有力手段. 此外,在质粒构建时,还在 GST 与 Atsttrin 之间添加了 TEV 蛋白酶的切割位点,后续亦可通过 TEV 酶切释放 Atsttrin,用于该蛋白质的制备生产.

参考文献:

- [1] Stelzl U, Worm U, Lalowski M, et al. A human protein-protein interaction network: A resource for annotating the proteome[J]. *Cell*, 2005, 122(6): 957-968.
- [2] Wissmueller S, Font J, Liew C W, et al. Protein-protein interactions: Analysis of a false positive GST pulldown result[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2011, 79(8): 2365-2371.
- [3] 沈瑶瑶, 严庆丰. 蛋白质相互作用研究进展[J]. *生命科学*, 2013, 25(3): 269-274.
- [4] Smith D B, Johnson K S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase[J]. *Gene*, 1988, 67(1): 31-40.
- [5] Vikis H G, Guan K L. Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions [J]. *Protein-Protein Interactions*, 2004, 261: 175-186.
- [6] Day R N, Davidson M W. The fluorescent protein palette: Tools for cellular imaging[J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(10): 2887-2921.
- [7] Truong K, Ikura M. The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes *in vivo*[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11(5): 573-578.
- [8] Tang W, Lu Y, Tian Q Y, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice[J]. *Science*, 2011,

- 332(6028):478-484.
- [9] Liu C J, Bosch X. Progranulin: A growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2012, 133(1):124-132.
- [10] Harper S, Speicher D W. Purification of proteins fused to glutathione *S*-transferase[J]. *Protein Chromatography*, 2011, 681:259-280.
- [11] Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, et al. Protein production and purification[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(2):135-146.
- [12] Aggarwal B B. Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3:745-756.
- [13] Thalayasingam N, Isaacs J D. Anti-TNF therapy[J]. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2011, 25(4):549-567.
- [14] Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: Drug target for autoimmune diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9(6):482-493.
- [15] Ban L Q, Zhang J, Wang L M, et al. Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(36):13644-13649.

责任编辑:周建军

(上接第33页)

- [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(16):7840-7843.
- [7] Kuratsune M, Masaki T, Hirai T, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2007, 12(6):565-571.
- [8] Pang M, Kothapally J, Mao H, et al. Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy[J]. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 2009, 66(4):F996-F1005.
- [9] Khalil N, O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: Current understanding of the pathogenesis and the status of treatment[J]. *Canadian Medical Association Journal*, 2004, 171(2):153-160.
- [10] Liao X H, Wang N, Liu Q X, et al. Myocardin-related transcription factor-A induces cardiomyocyte hypertrophy[J]. *IUBMB Life*, 2011, 63(1):54-61.
- [11] Huang W, Yu L F, Zhong J, et al. Stat3 is involved in angiotensin II-induced expression of MMP2 in gastric cancer cells[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2009, 54(10):2056-2062.
- [12] 梁君, 刘铭球, 谢梅, 等. 肺癌组织中 MMP-9 及 TIMP-1 的表达与转移、预后相关性研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2003, 6(1):46-50.
- [13] 刘金来, 关良劲, 谢旭晶, 等. 急性冠状动脉综合征患者血浆基质金属蛋白酶及其抑制因子的变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(10):1921-1922.

责任编辑:周建军