



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111198272 B

(45) 授权公告日 2023.09.08

(21) 申请号 201811388110.4

G01N 33/58 (2006.01)

(22) 申请日 2018.11.20

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 101287750 A, 2008.10.15

申请公布号 CN 111198272 A

JP 2004536553 A, 2004.12.09

(43) 申请公布日 2020.05.26

US 6270964 B1, 2001.08.07

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

CN 106916795 A, 2017.07.04

EP 1156103 A2, 2001.11.21

地址 518057 广东省深圳市南山区高新园

南区粤兴一道18号香港理工大学产学

研大楼205室

审查员 孙源华

(72) 发明人 马聪

(74) 专利代理机构 深圳中一专利商标事务所

44237

专利代理师 高星

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

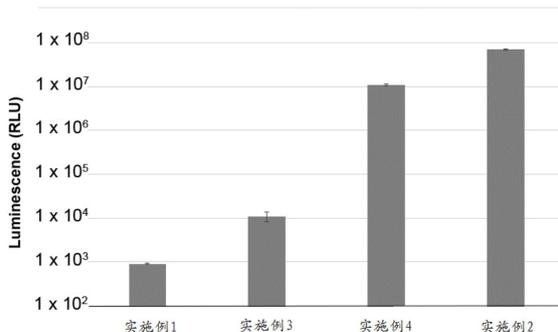
权利要求书3页 说明书17页 附图5页

(54) 发明名称

体外检测蛋白间相互作用的方法和检测试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明提供了体外检测蛋白间相互作用的方法和检测试剂盒及其应用。在细胞外采用双分子荧光互补技术进行检测,包括:S01、构建第一重组质粒,第一重组质粒中包含第一检测蛋白基因、荧光素酶基因片段和蛋白纯化标签基因;然后,将第一重组质粒载体进行过表达,得到第一融合蛋白;第一融合蛋白中含第一检测蛋白和荧光素酶蛋白片段;S02、构建第二重组质粒,第二重组质粒中含第二检测蛋白基因、荧光素酶互补基因片段和蛋白纯化标签基因;将第二重组质粒载体进行过表达,得到第二融合蛋白;第二融合蛋白中含第二检测蛋白和荧光素酶互补蛋白片段;S03、将第一融合蛋白和第二融合蛋白在细胞外孵育,加入荧光素酶底物,观察是否发射荧光,并检测发光强度。



1. 一种非疾病诊断目的的体外检测蛋白间相互作用的方法,其特征在于,在细胞外采用双分子荧光互补技术进行检测,包括:

S01、构建第一重组质粒,所述第一重组质粒中包含第一检测蛋白基因、荧光素酶基因片段和蛋白纯化标签基因;然后,将所述第一重组质粒载体进行过表达,纯化,得到第一融合蛋白;

其中,构建第一重组质粒pCU231:*bla*  $P_{\phi_{10}}$ -6×*His*-*smBiT*-*nusB*- $T_{\phi}$ 的过程如下:

选择pETMCSIII作为质粒载体,用于过表达N-端组氨酸标记的重组蛋白;

采用引物*N\_smbit\_F*和*N\_lg/smbit\_R*从质粒pBiT2.1-N [TK/SmBiT]上扩增含荧光素酶基因片段*smBiT*的*smBiT-linker*片段;

使用*NdeI*-*NcoI*酶切,在pETMCSIII的*NdeI*-*NcoI*酶切位点上插入*smBiT-linker*片段,得到质粒载体pCU180;

采用引物*smbit\_nusB\_F*和*smbit\_nusB\_R*从质粒pNG130扩增枯草芽孢杆菌*nusB*基因,得到含第一检测蛋白基因的*nusB*片段;使用*EcoRI*和*Acc65I*酶切,将*nusB*片段插入pCU180的*EcoRI*和*Acc65I*酶切位点位点上,得到含荧光素酶基因*smBiT*和第一检测蛋白基因*nusB*的重组质粒载体pCU231;

所述第一融合蛋白中含所述第一检测蛋白基因表达的第一检测蛋白,以及所述荧光素酶基因片段表达的荧光素酶蛋白片段;

S02、构建第二重组质粒,所述第二重组质粒中包含第二检测蛋白基因、荧光素酶互补基因片段和蛋白纯化标签基因;然后,将所述第二重组质粒载体进行过表达,纯化,得到第二融合蛋白;

其中,构建质粒pCU235:*bla*  $P_{\phi_{10}}$ -*lgBiT*-*nusE*-6×*His*- $T_{\phi}$ 的过程如下:

选择pNG209作为质粒载体,用于过表达C-端组氨酸标记的重组蛋白;

采用引物对*C\_hisoligo\_1*和*C\_hisoligo\_2*扩增寡聚核苷酸接头片段,得到寡聚核苷酸接头片段*hisoligo*;将pNG209的限制性内切酶*NdeI*-*NcoI*片段进行酶切,在该酶切片段接上退火的寡聚核苷酸接头片段*hisoligo*,得到pCU198;

采用引物*N\_lgbit\_F*和*N\_lg/smbit\_R*从质粒pBiT1.1-N[TK/LgBiT]上扩增含荧光素酶互补基因*lgBiT*的*lgBiT-linker*片段;在pCU198的*NdeI*-*NcoI*位点上插入*lgBiT-linker*片段,得到质粒载体pCU202;

取枯草芽孢杆菌*nusE*基因,采用引物*N\_nusE\_F*和*N\_nusE\_R*从载体pNG134进行扩增,得到含第二检测蛋白基因的*nusE*片段;将*nusE*片段插入pCU202的克隆位点上,得到含荧光素酶互补基因片段*lgBiT*和第二检测蛋白基因*nusE*的重组质粒载体pCU235;

所述第二融合蛋白中含所述第二检测蛋白基因表达的第二检测蛋白,以及所述荧光素酶互补基因片段表达的荧光素酶互补蛋白片段;所述荧光素酶互补蛋白片段与所述荧光素酶蛋白片段互补结合,能够形成一个完整的且能催化荧光素酶底物发光的荧光素酶;

S03、将所述第一融合蛋白和所述第二融合蛋白在细胞外孵育,加入所述荧光素酶底物,检测荧光发射情况;

当出现荧光发射现象时,指示所述第一检测蛋白与所述第二检测蛋白之间存在相互作用;当没有出现荧光发射现象时,指示所述第一检测蛋白与所述第二检测蛋白之间不存在相互作用;

引物*N\_smbit\_F*的序列为TGGTAAAGCCCATATGGTCTTCACACTC;

引物*N\_lg/smbit\_R*的序列为AGCGGCCCCATGGGGTACCTCTAGAAG  
ATCTGCTAG;

引物*C\_hisoligo\_1*的序列为TATGCCATGGGGGCCCCACCATCACCAT  
CACCATTAA;

引物*C\_hisoligo\_2*的序列为CATGTTAATGGTGATGGTGATGGTGGG  
GCCCCATGGCA;

引物*N\_lgbit\_F*的序列为GGTAAAGCCCATATGGTGACCGGCTACC;

引物*N\_lg/smbit\_R*的序列为AGCGGCCCCATGGGGTACCTCTAGAAG  
ATCTGCTAG;

引物*N\_nusE\_F*的序列为GGCTAATCGAATTCAGTCATGGCAAAC;

引物*N\_nusE\_R*的序列为TCCGCAGGTACCTTACAGTTTGATCTC  
AAC;

引物*smbit\_nusB\_F*的序列为CGGCGAGAATTCAGTCATGAAAGAAG;

引物*smbit\_nusB\_R*的序列为GGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG。

2. 一种检测试剂盒,其特征在于,至少包括:第一融合蛋白和第二融合蛋白;

所述第一融合蛋白至少包括:第一检测蛋白和萤光素酶蛋白片段,所述第一检测蛋白与  
所述萤光素酶蛋白片段相互连接或间接连接;

所述第二融合蛋白至少包括:第二检测蛋白和萤光素酶互补蛋白片段,所述第二检测  
蛋白与所述萤光素酶互补蛋白片段相互连接或间接连接;

所述第一检测蛋白能与所述第二检测蛋白之间能相互作用,所述萤光素酶蛋白片段与  
所述萤光素酶互补蛋白片段能相互结合形成完整的萤光素酶,且当所述第一检测蛋白与所  
述第二检测蛋白相互作用时,所述萤光素酶蛋白片段与所述萤光素酶互补蛋白片段结合;

在所述第一融合蛋白中,所述第一检测蛋白为NusB蛋白,所述萤光素酶蛋白片段为  
LgBiT,所述第一检测蛋白的N端连接所述萤光素酶蛋白片段;

在所述第二融合蛋白中,所述第二检测蛋白为NusE蛋白,所述萤光素酶蛋白互补片段  
为SmBiT;

其中,采用引物*smbit\_nusB\_F*和*smbit\_nusB\_R*从质粒pNG130扩增枯草芽孢杆菌*nusB*基  
因,得到含第一检测蛋白基因的*nusB*片段;使用*EcoRI*和*Acc65I*酶切,将*nusB*片段插入  
pCU180的*EcoRI*和*Acc65I*酶切位点位点上,得到含萤光素酶基因*smBiT*和第一检测蛋白基因  
*nusB*的重组质粒载体pCU231,由所述重组质粒载体pCU231得到所述NusB蛋白;

取枯草芽孢杆菌*nusE*基因,采用引物*N\_nusE\_F*和*N\_nusE\_R*从载体pNG134进行扩增,得  
到含第二检测蛋白基因的*nusE*片段;将*nusE*片段插入pCU202的克隆位点上,得到含萤光素  
酶互补基因片段*lgBiT*和第二检测蛋白基因*nusE*的重组质粒载体pCU235,由所述重组质粒  
载体pCU235得到NusE蛋白;

引物*N\_nusE\_F*的序列为GGCTAATCGAATTCAGTCATGGCAAAC;

引物*N\_nusE\_R*的序列为TCCGCAGGTACCTTACAGTTTGATCTCAA

C;

引物*smbit\_nusB\_F*的序列为CGGCGAGAATTCAGTCATGAAAGAAG;

引物*smbit nusB\_R*的序列为GGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG。

3. 根据权利要求2所述的检测试剂盒,其特征在于,所述第一检测蛋白为NusB蛋白,所述第二检测蛋白为NusE蛋白;

所述荧光素酶蛋白片段为SmBiT,所述荧光素酶互补蛋白片段为LgBiT;或,所述荧光素酶蛋白片段为LgBiT,所述荧光素酶互补蛋白片段为SmBiT。

4. 权利要求1所述的方法或权利要求2或3所述的检测试剂盒在高通量筛选靶向蛋白间相互作用的活性分子中的应用。

## 体外检测蛋白间相互作用的方法和检测试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于活性药物筛选技术领域,具体涉及体外检测蛋白间相互作用的方法和检测试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 随着生命科学研究的不断发展,通过蛋白与蛋白间的相互作用在生物学上的功能逐渐被发现出来,蛋白间的相互作用能影响细胞的活性,部分蛋白间的相互作用对生物体保持正常功能和状态有着决定性的影响,甚至可用来解释和预测各种生命过程及现象。近年来,通过检测蛋白间的相互作用来辅助新药研发,已经成为相关研究工作者关注的焦点。

[0003] 目前,对蛋白与蛋白间的相互作用的检测与分析方法包括:酵母双杂交系统、串联亲和纯化技术、凝胶过滤层析、酶联免疫吸附试验、表面等离子体共振、等温量热滴定和荧光共振能量转移技术等,这些方法都能较好地检测蛋白与蛋白间的相互作用。但这些方法或检测时间较长,或需要昂贵的专用科学仪器,或需要购买较多的费用不菲的材料。因而,一种简单实用、高效灵敏且时间与费用花费较少的检测方法是目前亟需的。

[0004] Promega公司开发了使用萤光素酶开发了一种产品NanoBiT,利用双分子萤光互补系统在细胞内检测蛋白与蛋白间的相互作用,适用于多种生物学实验。然而,目前的双分子萤光互补系统均应用于细胞内检测,其具体过程为:构建两个重组质粒A和B,重组质粒A包含目标检测蛋白A基因和萤光素酶基因片段,重组质粒B包含目标检测蛋白B基因和萤光素酶互补基因片段;然后,将这两个重组质粒转染至细胞内用于表达融合蛋白;之后,加入萤光素酶底物后,通过观察是否出现萤光来判断目标检测蛋白A和目标检测蛋白B之间是否发生相互作用。由于在细胞内进行实验,将上述双分子萤光互补系统应用于高通量筛选靶向蛋白间相互作用的活性分子时,存在多种局限性:需要孵育细胞,花费时间长;在细胞内融合表达,无法定量把控融合蛋白的表达效率;由于细胞膜的透膜率、外排泵的效率 and 代谢酶的水平不确定,活性分子和萤光素酶底物在细胞内的浓度无法定量,导致较高的假阴性概率。因而,现有双分子萤光互补系统在细胞内检测蛋白与蛋白间的相互作用,不适用于靶向蛋白间相互作用的活性分子的高通量筛选。

### 发明内容

[0005] 本发明的主要目的在于提供一种体外检测蛋白间相互作用的方法,旨在解决现有技术所存在的花费时间长、假阴性概率高等技术问题。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种检测试剂盒,用于体外检测蛋白间相互作用,旨在简化操作过程,简单实用、高效灵敏。

[0007] 本发明的又一目的在于提供上述体外检测蛋白间相互作用的方法和检测试剂盒在高通量筛选靶向蛋白间相互作用的活性分子中的应用。

[0008] 为了实现上述发明目的,本发明的一方面,提供了一种体外检测蛋白间相互作用的方法,在细胞外采用双分子萤光互补技术进行检测,包括:

[0009] S01、构建第一重组质粒,所述第一重组质粒中包含第一检测蛋白基因、萤光素酶基因片段和蛋白纯化标签基因;然后,将所述第一重组质粒载体进行过表达,纯化,得到第一融合蛋白;

[0010] 所述第一融合蛋白中含由所述第一检测蛋白基因表达的第一检测蛋白,以及由所述萤光素酶基因片段表达的萤光素酶蛋白片段;

[0011] S02、构建第二重组质粒,所述第二重组质粒中包含第二检测蛋白基因、萤光素酶互补基因片段和蛋白纯化标签基因;然后,将所述第二重组质粒载体进行过表达,纯化,得到第二融合蛋白;

[0012] 所述第二融合蛋白中含所述第二检测蛋白基因表达的第二检测蛋白,以及所述萤光素酶互补基因片段表达的萤光素酶互补蛋白片段;所述萤光素酶互补蛋白片段与所述萤光素酶蛋白片段互补结合,能够形成一个完整的且能催化萤光素酶底物发光的萤光素酶;

[0013] S03、将所述第一融合蛋白和所述第二融合蛋白在细胞外孵育,加入萤光素酶底物,检测萤光发射情况;

[0014] 当出现萤光发射现象时,指示所述第一检测蛋白与所述第二检测蛋白之间存在相互作用;当没有出现萤光发射现象时,指示所述第一检测蛋白与所述第二检测蛋白之间不存在相互作用。

[0015] 与现有技术相比,本发明构建的重组质粒中同时包含检测蛋白基因、萤光素酶基因片段和蛋白纯化标签基因等三种基因片段,不仅将检测蛋白和萤光素酶融合连接的同时,还带有蛋白纯化标签,促进融合蛋白的分离纯化,进而获得纯化的融合蛋白,且不影响蛋白活性;进一步的,将纯化后的两种能相互作用的融合蛋白于细胞外混合,处于同样的生理环境下的两个检测蛋白相互作用,从而促使萤光素酶蛋白片段与萤光素酶互补蛋白片段结合形成完整的萤光素酶,进而催化萤光素酶底物反应发光,实现了在细胞外采用双分子萤光互补技术检测蛋白间相互作用。本发明检测蛋白间相互作用的方法在细胞外进行,一方面,无需转化或转染细胞,简化操作过程,大大节约了细胞培养的时间和成本;另一方面,没有细胞膜和代谢酶等因素的干扰,待测的活性分子可100%与蛋白相互作用,萤光素酶底物可100%与结合完整的萤光素酶接触反应,降低假阴性概率,可快速、准确检测蛋白间相互作用,能够广泛应用于实验室高通量活性筛选或工业化应用。

[0016] 本发明的另一方面,提供了一种检测试剂盒,包括:第一融合蛋白和第二融合蛋白;

[0017] 所述第一融合蛋白至少包括:第一检测蛋白和萤光素酶蛋白片段,所述第一检测蛋白与所述萤光素酶蛋白片段相互连接或间接连接;

[0018] 所述第二融合蛋白至少包括:第二检测蛋白和萤光素酶互补蛋白片段,所述第二检测蛋白与所述萤光素酶互补蛋白片段相互连接或间接连接;

[0019] 所述第一检测蛋白与所述第二检测蛋白之间能相互作用,所述萤光素酶蛋白片段与所述萤光素酶互补蛋白片段能相互结合形成完整的萤光素酶,且当所述第一检测蛋白与所述第二检测蛋白相互作用时,所述萤光素酶蛋白片段与所述萤光素酶互补蛋白片段结合。

[0020] 本发明检测试剂盒提供高纯度的第一融合蛋白和第二融合蛋白,检测时,可直接将第一融合蛋白和第二融合蛋白与待检测分子混合,加入萤光素酶底物后进行孵育后,即

可从发光情况直接判断第一融合蛋白中的第一检测蛋白是否与第二融合蛋白中的第二检测蛋白发生相互作用,简化操作过程,使用方便,灵敏高效,可直接应用于细胞外检测实验。

[0021] 本发明的又一方面,提供了一种上述体外检测蛋白间相互作用的方法和检测试剂盒在高通量筛选靶向蛋白间相互作用的活性分子中的应用。

[0022] 在细胞外检测蛋白间相互作用,可大大节约细胞培养的时间和成本,且萤光素酶底物可100%与结合完整的萤光素酶接触反应,且待测的活性分子也可100%与蛋白接触反应,假阴性概率低,结果准确,可应用于实验室活性分子的高通量筛选或工业化应用。

### 附图说明

[0023] 图1为本发明体外检测蛋白间相互作用的方法应用在高通量筛选具有靶向蛋白间相互作用抑制活性的活性分子中的原理示意图;

[0024] 图2为实施例1至实施例4中通过蛋白间相互作用检测到的萤光发光强度;

[0025] 图3为测试例中检测实施例1的融合蛋白B与不同浓度的融合蛋白A在体外相互作用的萤光滴定曲线;

[0026] 图4为测试例中检测实施例2的融合蛋白D与不同浓度的融合蛋白C在体外相互作用的萤光滴定曲线;

[0027] 图5为实施例5中融合蛋白A、融合蛋白B与不同浓度的化合物MC4在体外相互作用下的萤光滴定曲线;

[0028] 图6为实施例6中融合蛋白C、融合蛋白D与不同浓度的化合物MC4在体外相互作用下的萤光滴定曲线;

[0029] 图7为测试例中采用PyMoL软件实施例1的第一融合蛋白与第二融合蛋白进行预测的蛋白分子对接模型;

[0030] 图8为测试例中采用PyMoL软件实施例2的第一融合蛋白与第二融合蛋白进行预测的蛋白分子对接模型。

### 具体实施方式

[0031] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0032] 一方面,本发明实施例提供了一种体外检测蛋白间相互作用的方法,在细胞外采用双分子萤光互补技术进行检测,包括:

[0033] S01、构建第一重组质粒,第一重组质粒中包含第一检测蛋白基因、萤光素酶基因片段和蛋白纯化标签基因;然后,将第一重组质粒载体进行过表达,纯化,得到第一融合蛋白;

[0034] 第一融合蛋白中含第一检测蛋白基因表达的第一检测蛋白,以及萤光素酶基因片段表达的萤光素酶蛋白片段;

[0035] S02、构建第二重组质粒,第二重组质粒中包含第二检测蛋白基因、萤光素酶互补基因片段和蛋白纯化标签基因;然后,将第二重组质粒载体进行过表达,纯化,得到第二融合蛋白;

[0036] 第二融合蛋白中含第二检测蛋白基因表达的第二检测蛋白,以及萤光素酶互补基因片段表达的萤光素酶互补蛋白片段;萤光素酶互补蛋白片段与萤光素酶蛋白片段互补结合,能够形成一个完整的且能催化萤光素酶底物发光的萤光素酶;

[0037] S03、将第一融合蛋白和第二融合蛋白在细胞外孵育,加入萤光素酶底物,检测萤光发射情况;

[0038] 当出现萤光发射现象时,指示第一检测蛋白与第二检测蛋白之间存在相互作用;当没有出现萤光发射现象时,指示第一检测蛋白与第二检测蛋白之间不存在相互作用。

[0039] 具体的,在步骤S01中,构建第一重组质粒,这一步骤可参考本领域技术人员的常规做法,最终使得该第一重组质粒中包含第一检测蛋白基因、萤光素酶基因片段和蛋白纯化标签基因这三种基因片段即可,本发明实施例不作具体限定。

[0040] 作为优选,构建第一重组质粒的方法,具体包括:提供质粒载体和寡聚核苷酸接头片段,采用限制性内切酶对质粒载体进行酶切形成酶切片段,并将寡聚核苷酸接头片段连接酶切片段,寡聚核苷酸接头片段含有至少一个限制酶内切位点;扩增萤光素酶基因片段,将萤光素酶基因片段从限制酶内切位点插入质粒载体;扩增第一检测蛋白基因片段,将第一检测蛋白基因片段从限制酶内切位点插入质粒载体。

[0041] 质粒载体含蛋白纯化标签基因,且蛋白纯化标签基因位于质粒载体的C端或N端。在一实施例中,蛋白纯化标签基因位于该质粒载体的C端;在另一实施例中,蛋白纯化标签基因位于该质粒载体的N端。

[0042] 蛋白纯化标签基因为组氨酸His标签、谷胱甘肽巯基转移酶GST标签、麦芽糖结合蛋白MBP标签、人流感病毒血凝素抗原HA标签、Myc标签、FLAG标签、小分子泛素样修饰蛋白SUMO标签、Protein A标签,或其他抗原标签、抗体标签、免疫亲和吸附标签中的至少一种。

[0043] 进一步的,蛋白纯化标签基因为组氨酸His标签。第一重组质粒使用包含组氨酸His标签的质粒载体,插入一个精心设计的多克隆位点接头后具有进行复杂克隆的能力,可选择多个不同位点引入不同的蛋白基因插入N端或C端的不同位置,如nusB与lgBiT的组合。

[0044] 更进一步的,质粒载体为含序列SEQ ID NO.5的pETMCSIII或含序列SEQ ID NO.6的pNG209。pETMCSIII和pNG209是两个具有多克隆位点的质粒载体,分别已经在N端和C端包含组氨酸His标签基因,适合具有复杂的克隆设计并使用镍亲和层析纯化方法来获得的蛋白的质粒构建。

[0045] 寡聚核苷酸接头片段,为人工合成的一个基因片段,其上含有多个单一酶切位点,作为外源基因的插入部位。在本发明实施例中,引入寡聚核苷酸接头片段的目的在于提供酶切位点,使得第一检测蛋白基因、萤光素酶基因片段能够重组到质粒载体上。

[0046] 作为优选的实施方式,寡聚核苷酸接头片段含序列SEQ ID NO.7,且其至少包括XbaI、Acc65I、NcoI和ApaI等酶切位点。通过这些酶切位点与pETMCSIII和pNG209上的克隆位点组合,可进行复杂的克隆设计。

[0047] 采用限制性内切酶对质粒载体进行酶切形成酶切片段,并将寡聚核苷酸接头片段连接酶切片段,这一步骤可参考本领域技术人员的常规操作,本发明实施例不作具体限定。

[0048] 扩增萤光素酶基因片段,将萤光素酶基因片段从寡聚核苷酸接头片段插入质粒载体的克隆位点上。这一步骤可参考本领域技术人员的常规操作,本发明实施例不作具体限定。

[0049] 扩增第一检测蛋白基因片段,将第一检测蛋白基因片段从寡聚核苷酸接头片段插入质粒载体的克隆位点上。这一步骤可参考本领域技术人员的常规操作,本发明实施例不作具体限定。

[0050] 第一重组质粒中的第一检测蛋白基因、萤光素酶基因片段和蛋白纯化标签基因在进行过表达后,分别表达为第一检测蛋白、萤光素酶蛋白片段和蛋白纯化标签;第二重组质粒中的第二检测蛋白基因、萤光素酶互补基因片段和蛋白纯化标签基因在进行过表达后,分别表达为第二检测蛋白、萤光素酶互补蛋白片段和蛋白纯化标签。其中,第一检测蛋白与萤光素酶蛋白片段相互连接或间接连接;第二检测蛋白与萤光素酶互补蛋白片段相互连接或间接连接。

[0051] 将第一重组质粒载体进行过表达,纯化;以及,将第二重组质粒载体进行过表达,纯化;其实施步骤可参考本领域技术人员的常规操作。

[0052] 作为优选,进行过表达的表达式为原核表达式或真核表达式。在本发明实施例中,表达式为原核表达式,具体的,采用大肠杆菌进行过表达。使用原核表达式,特别是大肠杆菌进行过表达,具有细菌生长迅速,基因表达可控,蛋白表达量高,纯化技术简单等优点。

[0053] 作为优选,纯化采用亲和纯化。具体的,采用镍亲和层析。镍等金属离子可与N、S和O等供电原子产生配位键,因此可与蛋白质表面的组氨酸(His)的咪唑基、半胱氨酸(Cys)的巯基和色氨酸(Trp)的吲哚基发生亲和结合作用,其中以His的咪唑基的结合作用最强。

[0054] 理论上,第一检测蛋白和第二检测蛋白可选为原核生物蛋白、真核生物蛋白、动物蛋白或植物蛋白中的一种。作为优选,第一检测蛋白和第二检测蛋白为原核生物蛋白。

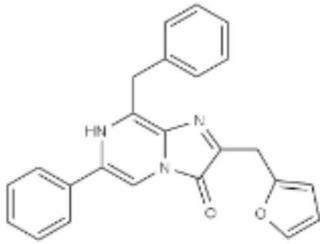
[0055] 作为优选的实施方式,第一检测蛋白为由包含序列SEQ ID NO.3的枯草芽孢杆菌nusB基因片段表达的细菌转录因子NusB蛋白;第二检测蛋白为由包含序列SEQ ID NO.4的枯草芽孢杆菌nusE基因片段表达的细菌转录因子NusE蛋白。

[0056] 萤光素酶蛋白片段和萤光素酶互补蛋白片段单独与萤光素酶底物接触时,都不能够催化萤光素酶底物反应,发生化学发光现象。只有萤光素酶蛋白片段和萤光素酶互补蛋白片段在同一生理环境下、且空间上相互接近时,才能互补结合,并形成一完整的萤光素酶,完整的萤光素酶才能催化底物发光。

[0057] 作为优选,萤光素酶互补蛋白片段为SmBiT,为含序列SEQ ID NO.2的smBiT基因片段的表达蛋白;萤光素酶蛋白片段为LgBiT,为含序列SEQ IDNO.1的lgBiT基因片段表达蛋白;或,萤光素酶蛋白片段为SmBiT,为序列SEQ ID NO.2的表达蛋白;萤光素酶互补蛋白片段为LgBiT,为序列SEQ IDNO.1的表达蛋白。

[0058] 在本发明的优选实施方式,萤光素酶底物选自furimazine。当萤光素酶底物为furimazine时,萤光素酶SmBiT-LgBiT催化furimazine转化为furimamide,同时释放出萤光。其中,furimazine的化学结构如下:

[0059]



[0060] 在步骤S02中,构建第二重组质粒,其具体操作过程与构建第一重组质粒的基本相同,此处不再一一赘述。

[0061] 在步骤S03中,将第一融合蛋白和第二融合蛋白在细胞外孵育,其目的在于将第一融合蛋白和第二融合蛋白在同一生理环境中混合。当第一检测蛋白与第二检测蛋白之间存在相互作用时,萤光素酶蛋白片段与萤光素酶互补蛋白片段在空间上相互接近并互补结合,形成一完整的萤光素酶蛋白;当第一检测蛋白与第二检测蛋白之间不存在相互作用时,萤光素酶蛋白片段与萤光素酶互补蛋白片段不能够互补结合。

[0062] 加入萤光素酶底物,如果体系中存在完整的萤光素酶,萤光素酶底物就会在萤光素酶的催化作用下反应发光,进而发射萤光。当出现萤光发射现象时,说明第一检测蛋白与第二检测蛋白之间必然存在相互作用;当没有出现萤光发射现象时,第一检测蛋白与第二检测蛋白之间不存在相互作用。

[0063] 另一方面,基于上述体外检测蛋白间相互作用的方法,本发明实施例还提供了一种检测试剂盒,包括:第一融合蛋白和第二融合蛋白;

[0064] 第一融合蛋白至少包括:第一检测蛋白、萤光素酶蛋白片段和蛋白纯化标签,第一检测蛋白与萤光素酶蛋白片段相互连接或间接连接;

[0065] 第二融合蛋白至少包括:第二检测蛋白、萤光素酶互补蛋白片段和蛋白纯化标签,第二检测蛋白与萤光素酶互补蛋白片段相互连接或间接连接;

[0066] 第一检测蛋白能与第二检测蛋白之间能相互作用,萤光素酶蛋白片段与萤光素酶互补蛋白片段能相互结合形成完整的萤光素酶,且当第一检测蛋白与第二检测蛋白相互作用时,萤光素酶蛋白片段与萤光素酶互补蛋白片段结合。

[0067] 作为优选,第一检测蛋白为NusB蛋白,第二检测蛋白为NusE蛋白。NusB蛋白与NusE蛋白均为细菌转录因子蛋白,在相同的生理环境下,NusB蛋白与NusE蛋白之间能够相互作用,从而促进细菌的生长繁殖。因而,通过本发明检测试剂盒,可用于检测具有靶向特定蛋白间相互作用活性的活性分子。该活性分子可表现为促进靶向特定蛋白间相互作用,也可表现为抑制靶向特定蛋白间相互作用。在本发明实施例中,该活性分子表现为抑制靶向特定蛋白间相互作用。当该活性分子与第一融合蛋白和第二融合蛋白混合时,该活性分子抑制第一融合蛋白和第二融合蛋白之间的相互作用,进而抑制萤光素酶底物化学发光。在一发明实施例中,该活性分子抑制NusB蛋白与NusE蛋白相互作用,从而抑制萤光素酶蛋白片段与萤光素酶互补蛋白片段互补结合形成完整的萤光素酶分子,使得萤光素酶底物不能够被催化发生化学发光。

[0068] 进一步的,NusB蛋白为序列SEQ ID NO.3的表达蛋白,NusE蛋白为序列SEQ ID NO.4的表达蛋白,LgBiT为序列SEQ ID NO.1的表达蛋白,SmBiT为序列SEQ ID NO.2的表达蛋白。

[0069] 作为优选, 荧光素酶蛋白片段为SmBiT, 荧光素酶互补蛋白片段为LgBiT; 或, 荧光素酶蛋白片段为LgBiT, 荧光素酶互补蛋白片段为SmBiT。

[0070] 进一步的, SmBiT-LgBiT这一双分子荧光互补系统选为Promega公司的 Nanoluc® 荧光素酶。SmBiT和LgBiT为 Nanoluc® 荧光素酶经过重组表达成的两部分肽段, 其中, LgBiT为大片段肽段, 含17674Da; SmBiT为小片段肽段, 含1340Da。

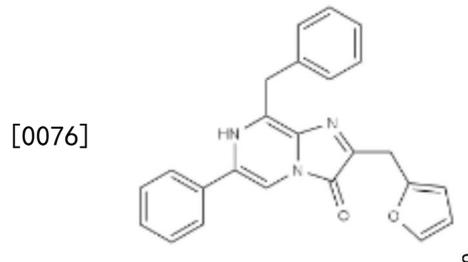
[0071] 值得注意的是, 除了SmBiT-LgBiT这一双分子荧光互补系统, 其他能够与NusB蛋白与NusE蛋白融合重组的双分子荧光互补系统均能应用于本发明实施例中。

[0072] 第一融合蛋白中的第一检测蛋白、荧光素酶蛋白片段和蛋白纯化标签的具体选择及其连接顺序, 以及第二融合蛋白中的第二检测蛋白、荧光素酶互补蛋白片段和蛋白纯化标签的具体选择及其连接顺序, 对融合蛋白的表达效率、溶解度和发光效率均存在不同程度的影响。

[0073] 作为优选的实施方式, 在第一融合蛋白中, 第一检测蛋白为NusB蛋白, 荧光素酶蛋白片段为LgBiT, 第一检测蛋白的N端连接荧光素酶蛋白片段; 在第二融合蛋白中, 第二检测蛋白为NusE蛋白, 荧光素酶互补片段为SmBiT。

[0074] 经过实验检测, 当表达第一融合蛋白的质粒构建为:  $bla P_{\phi 10}\text{-lgBiT-nusB-6}\times His\text{-}T_{\phi}$ , 表达第二融合蛋白的质粒构建为:  $bla P_{\phi 10}\text{-nusE-smBiT -6}\times His\text{-}T_{\phi}$  时; 或者, 当表达第一融合蛋白的质粒构建为:  $bla P_{\phi 10}\text{-lgBiT-nusB-6}\times His\text{-}T_{\phi}$ , 表达第二融合蛋白的质粒构建为:  $bla P_{\phi 10}\text{-smBiT-nusE-6}\times His\text{-}T_{\phi}$  时, 其发光强度高达  $1\times 10^7\sim 1\times 10^8$  RLU。在本发明实施例中, 通过采用PyMoL软件分别对上述构建的质粒过表达获得的第一融合蛋白和第二融合蛋白间的相互作用进行模拟预测, 当第一检测蛋白为NusB蛋白, 荧光素酶蛋白片段为LgBiT, 第一检测蛋白的N端连接荧光素酶蛋白片段; 且在第二融合蛋白中, 第二检测蛋白为NusE蛋白, 荧光素酶互补片段为SmBiT时, 连接在NusE蛋白上的SmBiT才能和连接在NusB上的LgBiT更好地结合。

[0075] 作为优选, 检测试剂盒还包括: 荧光素酶底物。在本发明实施例中, 荧光素酶底物选自furimazine。其中, furimazine的化学结构如下:



[0077] 作为优选, 蛋白纯化标签为组氨酸His标签。

[0078] 基于上述技术方案, 本发明实施例还提供了前述方法或上述检测试剂盒在高通量筛选靶向蛋白间相互作用的活性分子中的应用。

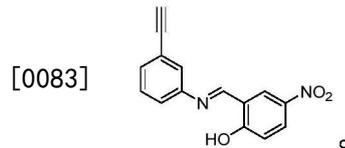
[0079] 其中, 活性分子为能够抑制或促进靶向特定蛋白间相互作用的生物分子或化学分子。在本发明应用实施例中, 该活性分子表现为抑制靶向特定蛋白间相互作用。进一步的, 本发明应用实施例通过观察该活性分子的靶向特定蛋白间相互作用的行为, 可预测该活性

分子是否具备抗菌活性、抗病毒活性、抗真菌活性和抗肿瘤活性的任一种。

[0080] 在具体应用过程中,将活性分子、第一融合蛋白和第二融合蛋白混合,孵化,加入萤光素酶底物,检测发光强度。通过观察有无发射萤光,从而判断该活性分子是否能抑制靶向目标蛋白间的相互作用;通过发光强度的大小,从而评估该活性分子对靶向目标蛋白间相互作用的抑制活性大小。

[0081] 具体的,在本发明实施例中,第一融合蛋白中含有NusB蛋白和萤光素酶蛋白片段LgBiT,第二融合蛋白中含有NusE蛋白和萤光素酶蛋白互补片段SmBiT。

[0082] 根据在先的研究分析证实,化合物MC4的能够抑制NusE蛋白与NusB蛋白相互结合,具备优异的抗菌活性。其中,化合物MC4的化学结构为:



[0084] 本发明实施例采用化合物MC4作为活性分子,用于抑制NusB蛋白和NusE蛋白这两个蛋白间的相互作用,进行验证本发明实施例所提供的方法可应用于体外检测靶向蛋白间相互作用。

[0085] 图1所示,体系中不存在抑制剂时,第一融合蛋白和第二融合蛋白混合后,NusB蛋白与NusE蛋白之间相互作用,萤光素酶蛋白片段LgBiT与萤光素酶互补蛋白片段SmBiT在空间上相互接近并互补结合,形成一完整的萤光素酶蛋白,加入萤光素酶底物之后,萤光素酶底物被催化发光。体系中存在抑制剂如化合物MC4时,抑制剂抑制NusB蛋白与NusE蛋白之间相互作用,萤光素酶蛋白片段与萤光素酶之间不能够结合形成完整的萤光素酶,无法催化萤光素酶底物化学发光。

[0086] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合具体实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0087] 以下实施例中采用的萤光素酶底物购自Promega公司的Furimazine。

[0088] 实施例1

[0089] 本实施例提供了一种体外检测蛋白间相互作用的方法,实现在细胞外采用双分子萤光互补技术进行检测蛋白间的相互作用。表1为本实施例采用的质粒载体,表2为本实施例采用的引物信息

[0090] 本实施例体外检测蛋白间相互作用的方法,具体包括以下步骤:

[0091] 1、制备含萤光素酶蛋白片段SmBiT和NusB蛋白的融合蛋白A

[0092] 1) 构建质粒pCU231:  $bla P_{\phi 10-6} \times His-smBiT-nusB-T_{\phi}$

[0093] 选择pETMCSIII作为质粒载体,用于过表达N-端组氨酸标记的重组蛋白;

[0094] 采用引物N smbit\_F和N lg/smbit\_R(表2)从质粒pBiT2.1-N[TK/SmBiT]上扩增含萤光素酶基因片段smBiT的smBiT-linker片段;

[0095] 使用NdeI-NcoI酶切,在pETMCSIII的NdeI-NcoI酶切位点上插入smBiT-linker片段,得到质粒载体pCU180。

[0096] 采用引物smbit nusB\_F和smbit nusB\_R从质粒pNG130(表1)扩增枯草芽孢杆菌

nusB基因,得到含第一检测蛋白基因的nusB片段;使用EcoRI和Acc65I酶切,将nusB片段插入pCU180的EcoRI和Acc65I酶切位点位点上,得到含萤光素酶基因smBiT和第一检测蛋白基因nusB的重组质粒载体pCU231。

[0097] 2) 融合蛋白A的表达、纯化

[0098] 将重组质粒载体pCU231转化到大肠杆菌BL21 (DE3) 菌株中,使用含氨苄西林的LB培养基在37°C过夜培养。将长成的菌体置于自动诱导培养液中于37°C震荡培养12h,取培养液离心收集细菌,加入裂解液后冰浴超声裂解细胞,然后采用镍亲和层析法对细菌蛋白混合物进行亲和纯化,得到过表达的融合蛋白A。

[0099] 在融合蛋白A中,含有第一检测蛋白基因nusB表达的第一检测蛋白NusB蛋白,以及萤光素酶基因smBiT片段表达的萤光素酶蛋白片段SmBiT;

[0100] 2、制备含萤光素酶互补蛋白片段LgBiT和NusE蛋白的融合蛋白B

[0101] 1) 构建质粒pCU235: *bla P<sub>φ10</sub>-lgBiT-nusE-6×His-T<sub>φ</sub>*

[0102] 选择pNG209(表1)作为质粒载体,用于过表达C-端组氨酸标记的重组蛋白。

[0103] 采用引物对C\_hisoligo\_1和C\_hisoligo\_2扩增寡聚核苷酸接头片段,得到寡聚核苷酸接头片段hisoligo;将pNG209的限制性内切酶NdeI-NcoI片段进行酶切,在该酶切片段接上退火的寡聚核苷酸接头片段hisoligo(表1),得到pCU198(表1)。

[0104] 采用引物N\_lgbit F和N\_lg/smbit R(表2)从质粒pBiT1.1-N[TK/LgBiT]上扩增含萤光素酶互补基因lgBiT的lgBiT-linker片段;在pCU198的NdeI-NcoI位点上插入lgBiT-linker片段,得到质粒载体pCU202。

[0105] 取枯草芽孢杆菌nusE基因,采用引物N\_nusE\_F和N\_nusE\_R从载体pNG134(表1)进行扩增,得到含第二检测蛋白基因的nusE片段;将nusE片段插入pCU202的克隆位点上,得到含萤光素酶互补基因片段lgBiT和第二检测蛋白基因nusE的重组质粒载体pCU235。

[0106] 2) 融合蛋白B的表达、纯化

[0107] 将重组质粒载体pCU235采用大肠杆菌过表达,采用镍亲和层析法对过表达的蛋白产物进行纯化,得到融合蛋白B。

[0108] 在融合蛋白B中,含有第二检测蛋白基因nusE表达的第二检测蛋白NusE蛋白,以及萤光素酶互补基因lgBiT表达的萤光素酶互补蛋白片段LgBiT。

[0109] 3、检测蛋白间的相互作用

[0110] 在Pierce™96孔White Opaque微孔板中,将融合蛋白A采用PBS缓冲液稀释,加入融合蛋白B,混合,常温孵化30min后分别加入萤光素酶底物,同时启用微孔板检测仪读数,记录发光强度(RLU);其中,融合蛋白A的浓度为5μM,融合蛋白B的浓度为15μM。同时,设置只有融合蛋白B和萤光素酶底物的实验组作为阴性对照组。

[0111] NusE蛋白与NusB蛋白是一组能相互结合的细菌转录因子蛋白,当融合蛋白A中的第一检测蛋白NusB蛋白与融合蛋白B中的第二检测蛋白NusE蛋白处于同一生理环境中时,NusE蛋白与NusB蛋白相互结合,且带动萤光素酶蛋白片段SmBiT与萤光素酶互补蛋白片段LgBiT结合,形成完整的萤光素酶。加入萤光素酶底物furimazine,萤光酶能催化furimazine发生化学反应转化为furimamide,并发射出萤光。

[0112] 图2为检测结果,在扣除阴性对照组的发光强度后,本实施例的发光强度接近 $1 \times 10^3$ RLU,说明本发明实施例的方法能够成功将双分子萤光互补系统应用在细胞外检测蛋白

间相互作用。

[0113] 表1质粒载体

质粒载体	DNA 序列	来源/构建方法
pETMCSIII	<i>bla P<sub>φ10</sub>-6×His'-MCS-T<sub>φ</sub></i>	Neylon et al., 2000
pBiT2.1-N [TK/SmBiT]	<i>bla P<sub>HSV-TK</sub>-SmBiT-linker-polyA</i>	Promega
pCU180	<i>bla P<sub>φ10</sub>-6×His-smBiT-linker-T<sub>φ</sub></i>	将 <i>smBiT-linker</i> 片段克隆到 pETMCSIII 载体的 <i>NdeI-NcoI</i> 位点中, 作为 N-端 <i>smBiT</i> 与 N-端组氨酸标记的连接载体
pCU231	<i>bla P<sub>φ10</sub>-6×His-smBiT-nusB-T<sub>φ</sub></i>	<i>nusB</i> 基因克隆进载体 pCU180 的 <i>EcoRI</i> 和 <i>Acc65I</i> 酶切位点
pNG130	<i>bla P<sub>φ10</sub>-6×His-nusB-T<sub>φ</sub></i>	Yang et al., 2017
pNG209	<i>bla P<sub>φ10</sub>-MCS-'6×His-T<sub>φ</sub></i>	Yang et al., 2009
pBiT1.1-N[TK/LgBiT]	<i>bla P<sub>HSV-TK</sub>-lgBiT-linker-polyA</i>	Promega
pCU198	<i>bla P<sub>φ10</sub>-C-hisoligo-'6×His-T<sub>φ</sub></i>	将退火的寡核苷酸 <i>hisoligo</i> 取代 pNG209 载体的 <i>NdeI-NcoI</i> 位点, 用于 C-端组氨酸标记
pCU202	<i>bla P<sub>φ10</sub>-lgBiT-linker-'6×His-T<sub>φ</sub></i>	将 <i>lgBiT-linker</i> 片段克隆进载体 pCU198 的 <i>NdeI-NcoI</i> 位点, 用于 N-端 <i>lgBiT</i> 与 C-端组氨酸标记的载体
pCU235	<i>bla P<sub>φ10</sub>-lgBiT-nusE-6×His-T<sub>φ</sub></i>	<i>nusE</i> 基因克隆进载体 pCU202 的 <i>EcoRI</i> 和 <i>Acc65I</i> 酶切位点
pNG134	<i>bla P<sub>φ10</sub>-6×His-nusE-T<sub>φ</sub></i>	Yang et al., 2017

[0115] 表2引物

引物/ 接头名称	序列 (5' - 3')	酶切位点
<i>N_smbit_F</i>	TGGTAAAGCCCATATGGTCTTCACACTC	<i>NdeI</i>
<i>N_lg/smbit_R</i>	AGCGGCCCCATGGGGTACCTCTAGAAGATCTGCTAG	<i>NcoI</i>
<i>C_hisoligo_1</i>	TATGCCATGGGGGCCCCACCATCACCATCACCATTAA	<i>NdeI</i> , <i>NcoI</i> <i>ApaI</i> , 6x His, stop codon
<i>C_hisoligo_2</i>	CATGTTAATGGTGATGGTGATGGTGGGGCCCCCATGGCA	Same as above

[0116]

	<i>N_lgbit F</i>	GGTAAAGCCCATATGGTGACCGGCTACC	<i>NdeI</i>
	<i>N_lg/smbit R</i>	AGCGGCCCCATGGGGTACCTCTAGAAGATCTGCTAG	<i>NcoI</i>
	<i>N_nusE_F</i>	GGCTAATCGAATTCAGTCATGGCAAAAC	<i>EcoRI</i>
[0117]	<i>N_nusE_R</i>	TCCGCAGGTACCTTACAGTTTGATCTCAAC	<i>Acc65I</i>
	<i>smbit nusB F</i>	CGGCGAGAATTCAGTCATGAAAGAAG	<i>EcoRI</i>
	<i>smbit nusB R</i>	GGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG	<i>Acc65I</i>

[0118] 实施例2

[0119] 本实施例提供了一种体外检测蛋白间相互作用的方法,实现在细胞外采用双分子荧光互补技术进行检测蛋白间的相互作用。表3为本实施例采用的质粒载体,表4为本实施例采用的引物信息

[0120] 本实施例体外检测蛋白间相互作用的方法,具体包括以下步骤:

[0121] 1、制备含荧光素酶蛋白片段LgBiT和NusB蛋白的融合蛋白C

[0122] 1) 构建质粒pCU250: *bla P<sub>φ10</sub>-lgBiT-nusB-6×His-T<sub>φ</sub>*

[0123] 选择pNG209(表3)作为质粒载体,用于过表达C-端组氨酸标记的重组蛋白;然后,依次制备质粒载体pCU198和pCU202,具体过程如实施例1步骤1所述,其中,pCU202包括荧光素酶基因lgBiT-linker片段。

[0124] 采用引物lgbit nusB\_F和lgbit nusB\_R(表4)从质粒pNG130(表3)上扩增枯草芽孢杆菌nusB基因,得到含第一检测蛋白基因的nusB片段;

[0125] 使用EcoRI和Acc65I酶切,将nusB片段插入pCU202的EcoRI和Acc65I酶切位点位点上,得到含荧光素酶基因lgBiT和第一检测蛋白基因nusB的重组质粒载体pCU250(表3)。

[0126] 2) 融合蛋白C的表达、纯化

[0127] 将重组质粒载体pCU250转化到大肠杆菌BL21(DE3)菌株中进行过表达,提取蛋白,采用镍亲和层析法对细菌蛋白混合物进行亲和纯化,得到过表达的融合蛋白C。

[0128] 在融合蛋白C中,含有第一检测蛋白NusB蛋白,以及荧光素酶蛋白片段LgBiT。

[0129] 2、制备含荧光素酶互补蛋白片段SmBiT和NusE蛋白的融合蛋白D

[0130] 1) 构建质粒pCU247: *bla P<sub>φ10</sub>-nusE-smBiT-6×His-T<sub>φ</sub>*

[0131] 选择pNG209作为质粒载体,用于过表达C-端组氨酸标记的重组蛋白;然后,制备质粒载体pCU198(表3);接着,采用引物C-lg/smbit\_F和C\_smbit\_R(表4)扩增linker-smBiT片段,插入pCU198,制备pCU203(表3)。

[0132] 采用引物C\_nusE\_F和C\_nusE\_R(表4)从载体pNG134(表1)上扩增枯草芽孢杆菌nusE基因得到nusE片段,将nusE片段插入pCU203,得到含荧光素酶互补基因片段smBiT和第二检测蛋白基因nusE的重组质粒载体pCU247(表3)。

[0133] 2) 融合蛋白D的表达、纯化

[0134] 将重组质粒载体pCU247采用大肠杆菌过表达,采用镍亲和层析法对过表达的蛋白产物进行纯化,得到融合蛋白D。

[0135] 在融合蛋白D中,含有第二检测蛋白NusE蛋白,以及荧光素酶互补蛋白片段SmBiT。

## [0136] 3、检测蛋白间的相互作用

[0137] 在Pierce™96孔White Opaque微孔板中,将融合蛋白C采用PBS缓冲液稀释,加入融合蛋白D,混合,常温孵化30min后分别加入荧光素酶底物furimazine,同时启用微孔板检测仪读数,记录发光强度(RLU);其中,融合蛋白C的浓度为5 $\mu$ M,融合蛋白D的浓度为15 $\mu$ M。同时,设置只有融合蛋白C和荧光素酶底物的实验组作为阴性对照组。

[0138] 图2为检测结果,在扣除阴性对照组的发光强度后,本实施例的发光强度接近 $1 \times 10^8$ RLU。

[0139] 图7为采用PyMoL软件对实施例1的第一融合蛋白和第二融合蛋白间的相互作用进行模拟预测的蛋白分子对接模型,图8为采用PyMoL软件对实施例2的第一融合蛋白和第二融合蛋白间的相互作用进行模拟预测的蛋白分子对接模型。对比结果显示,当第一检测蛋白为NusB蛋白,荧光素酶蛋白片段为LgBiT,第一检测蛋白的N端连接荧光素酶蛋白片段;且在第二融合蛋白中,第二检测蛋白为NusE蛋白,荧光素酶蛋白互补片段为SmBiT时,连接在NusE蛋白上的SmBiT才能和连接在NusB上的LgBiT更好地结合。

## [0140] 表3 质粒载体

质粒载体	DNA 序列	来源/构建方法
pBiT1.1-N [TK/LgBiT]	<i>bla P<sub>HSV-TK</sub>-LgBiT-linker-polyA</i>	Promega
pNG209	<i>bla P<sub><math>\phi</math>10</sub>-MCS-6<math>\times</math>His-T<sub><math>\phi</math></sub></i>	Yang et al., 2009
pCU198	<i>bla P<sub><math>\phi</math>10</sub>-C-hisoligo-6<math>\times</math>His-T<sub><math>\phi</math></sub></i>	将退火的寡核苷酸 hisoligo 取代 pNG209 载体的 NdeI-NcoI 位点, 用于 C-

		端组氨酸标记
pCU202	<i>bla P<sub><math>\phi</math>10</sub>-lgBiT-linker-6<math>\times</math>His-T<sub><math>\phi</math></sub></i>	将 <i>lgBiT-linker</i> 片段克隆进载体 pCU198 的 NdeI-NcoI 位点, 用于 N-端 <i>lgBiT</i> 和接头片段与 C-端组氨酸标记的载体
pNG130	<i>bla P<sub><math>\phi</math>10</sub>-6<math>\times</math>His-nusB-T<sub><math>\phi</math></sub></i>	Yang et al., 2017
pCU250	<i>bla P<sub><math>\phi</math>10</sub>-lgBiT-nusB-6<math>\times</math>His-T<sub><math>\phi</math></sub></i>	<i>nusB</i> 基因克隆进载体 pCU202 的 EcoRI 和 Acc65I 酶切位点
pBiT2.1-C[TK/SmBiT]	<i>bla P<sub>HSV-TK</sub>-linker-smBiT-polyA</i>	Promega
pCU203	<i>bla P<sub><math>\phi</math>10</sub>-linker-smBiT-6<math>\times</math>His-T<sub><math>\phi</math></sub></i>	将 <i>linker-smBiT</i> 片段克隆进载体 pCU198 的 NdeI-ApaI 位点, 用于 N-端 <i>linker-smBiT</i> 片段与 C-端组氨酸标记的载体
pNG134	<i>bla P<sub><math>\phi</math>10</sub>-6<math>\times</math>His-nusE-T<sub><math>\phi</math></sub></i>	Yang et al., 2017
pCU247	<i>bla P<sub><math>\phi</math>10</sub>-nusE-smBiT-6<math>\times</math>His-T<sub><math>\phi</math></sub></i>	<i>nusE</i> 基因克隆进载体 pCU203 的 Acc65I 和 EcoRI 酶切位点

## [0143] 表4引物

引物/ 接头 名称	序列 (5' - 3')	酶切位点
<i>N_lg/smbit_R</i>	AGCGGCCCCATGGGGTACCTCTAGAAGATCTGCTAG	<i>NcoI</i>
<i>N_lgbit_F</i>	GGTAAAGCCCATATGGTGACCGGCTACC	<i>NdeI</i>
<i>C_lg/smbit_F</i>	GCTAGCGCCATGGTAAGTGGGAGCTCAGG	<i>NcoI</i>
<i>C_smbit_R</i>	TAATCGGGGCCCCAGAATCTCCTCGAACAGC	<i>ApaI</i>
[0144] <i>C_hisoligo_1</i>	TATGCCATGGGGGCCCCACCATCACCATCACCATTAA	<i>NdeI, NcoI ApaI, 6x His, stop codon</i>
<i>C_hisoligo_2</i>	CATGTTAATGGTGATGGTGATGGTGGGGCCCCCATGGCA	Same as above
<i>C_nusE_F</i>	TGTACGAGGGTACCAAGTTTAATTTTCG	<i>Acc65I</i>
<i>C_nusE_R</i>	TGTACGAGGAATTCAAGTTTAATTTTCG	<i>EcoRI</i>
<i>lgbit_nusB_F</i>	CGGCGAGAATTCAGTCATGAAAAGAAG	<i>EcoRI</i>
<i>lgbit_nusB_R</i>	TCAGTTAGGGTACCTGATTGTCCAATATC	<i>Acc65I</i>

## [0145] 实施例3

[0146] 本实施例提供了一种体外检测蛋白间相互作用的方法,实现在细胞外采用双分子荧光互补技术进行检测蛋白间的相互作用。表5为本实施例采用的质粒载体,表6为本实施例采用的引物信息

[0147] 本实施例体外检测蛋白间相互作用的方法,具体包括以下步骤:

[0148] 1、制备含荧光素酶蛋白片段SmBiT和NusB蛋白的融合蛋白E

[0149] 构建重组质粒载体pCU231: *bla P<sub>φ10</sub>-6×His-smBiT-nusB-T<sub>φ</sub>*,采用大肠杆菌过表达,纯化,得到融合蛋白E。

[0150] 2、制备含荧光素酶蛋白片段LgBiT和NusE蛋白的融合蛋白F

[0151] 构建重组质粒载体pCU236: *bla P<sub>φ10</sub>-nusE-lgBiT-6×His-T<sub>φ</sub>*,采用大肠杆菌过表达,纯化,得到融合蛋白F。

[0152] 3、检测蛋白间的相互作用

[0153] 在Pierce™96孔White Opaque微孔板中,将融合蛋白E采用PBS缓冲液稀释,加入融合蛋白F,混合,常温孵化30min后分别加入荧光素酶底物furimazine,同时启用微孔板检测仪读数,记录发光强度(RLU);其中,融合蛋白E的浓度为5μM,融合蛋白F的浓度为15μM。同时,设置只有融合蛋白F和荧光素酶底物的实验组作为阴性对照组。

[0154] 图2为检测结果,在扣除阴性对照组的发光强度后,本实施例的发光强度接近 $1 \times 10^4$ RLU。

[0155] 表5 质粒载体

	质粒载体	DNA 序列	来源/构建方法
	pETMCSIII	<i>bla P<sub>ϕ10</sub>-6×His'-MCS-T<sub>ϕ</sub></i>	Neylon et al., 2000
	pBiT2.1-N [TK/SmBiT]	<i>bla P<sub>HSV-TK</sub>-smBiT-linker-polyA</i>	Promega
	pCU180	<i>bla P<sub>ϕ10</sub>-6×His-smBiT-linker-T<sub>ϕ</sub></i>	将 <i>smBiT-linker</i> 片段克隆到 pETMCSIII 载体的 <i>NdeI-NcoI</i> 位点中, 用于 N-端 <i>smBiT</i> 与 N-端组氨酸标记的连接载体
[0156]	pCU231	<i>bla P<sub>ϕ10</sub>-6×His-smBiT-nusB-T<sub>ϕ</sub></i>	<i>nusB</i> 基因克隆进载体 pCU180 的 <i>EcoRI</i> 和 <i>Acc65I</i> 酶切位点
	pNG130	<i>bla P<sub>ϕ10</sub>-6×His-nusB-T<sub>ϕ</sub></i>	Yang et al., 2017
	pNG209	<i>bla P<sub>ϕ10</sub>-MCS-6×His-T<sub>ϕ</sub></i>	Yang et al., 2009
	pBiT1.1-C[TK/LgBiT]	<i>bla P<sub>HSV-TK</sub>-linker-LgBiT-polyA</i>	Promega
	pCU198	<i>bla P<sub>ϕ10</sub>-C-hisoligo-6×His-T<sub>ϕ</sub></i>	将退火的寡核苷酸 <i>hisoligo</i> 取代 pNG209 载体的 <i>NdeI-NcoI</i> 位点, 用于 C-端组氨酸标记
	pCU204	<i>bla P<sub>ϕ10</sub>-linker-lgBiT-6×His-T<sub>ϕ</sub></i>	将 <i>linker-lgBiT</i> 片段克隆到 pCU198 的 <i>NdeI-ApaI</i> 位点中. 用于 C-端 <i>smBiT</i> 与 C-端组氨酸标记连接的载体.
[0157]	pCU236	<i>bla P<sub>ϕ10</sub>-nusE-lgBiT-6×His-T<sub>ϕ</sub></i>	<i>nusE</i> 基因克隆进载体 pCU204 的 <i>EcoRI</i> 和 <i>Acc65I</i> 酶切位点
	pNG134	<i>bla P<sub>ϕ10</sub>-6×His-nusE-T<sub>ϕ</sub></i>	Yang et al., 2017

[0158] 表6 引物

引物/ 接头名称	序列 (5' - 3')	酶切位点
<i>N_smbit_F</i>	TGGTAAAGCCCATATGGTCTTCACACTC	<i>NdeI</i>
<i>N_lg/smbit_R</i>	AGCGGCCCATGGGGTACCTCTAGAAGATCTGCTAG	<i>NcoI</i>
<i>C_hisoligo_1</i>	TATGCCATGGGGGCCCCACCATCACCATCACCATTAA	<i>NdeI, NcoI, ApaI, 6x His, stop codon</i>
<i>C_hisoligo_2</i>	CATGTTAATGGTGATGGTGGTGGGGCCCCCATGGCA	Same as above
<i>C_lg/smbit_F</i>	GCTAGCGCCATGGTAAGTGGGAGCTCAGG	<i>NcoI</i>
<i>C_lgbit_R</i>	CGATTAGGGCCCACTGTTGATGGTCGTTAC	<i>ApaI</i>
<i>C_nusE_F</i>	TGTACGAGGGTACCAAGTTTAATTTTCG	<i>Acc65I</i>
<i>C_nusE_R</i>	TGTACGAGGAATCAAGTTTAATTTTCG	<i>EcoRI</i>
<i>lgbit_nusB_F</i>	CGGCGAGAATTCAGTCATGAAAAGAAG	<i>EcoRI</i>
<i>lgbit_nusB_R</i>	TCAGTTAGGGTACCTGATTGTCCAATATC	<i>Acc65I</i>

## [0160] 实施例4

[0161] 本实施例提供了一种体外检测蛋白间相互作用的方法, 实现在细胞外采用双分子荧光互补技术进行检测蛋白间的相互作用。表7为本实施例采用的质粒载体, 表8为本实施例采用的引物信息

[0162] 本实施例体外检测蛋白间相互作用的方法, 具体包括以下步骤:

[0163] 1、制备含萤光素酶蛋白片段LgBiT和NusB蛋白的融合蛋白G

[0164] 构建重组质粒载体pCU250:  $bla P_{\phi 10}-lgBiT-nusB-6\times His-T_{\phi}$ , 采用大肠杆菌过表达, 纯化, 得到融合蛋白G。

[0165] 2、制备含萤光素酶蛋白片段SmBiT和NusE蛋白的融合蛋白H

[0166] 构建重组质粒载体pCU246:  $bla P_{\phi 10}-smBiT-nusE-6\times His-T_{\phi}$ , 采用大肠杆菌过表达, 纯化, 得到融合蛋白H。

[0167] 3、检测蛋白间的相互作用

[0168] 在Pierce™96孔White Opaque微孔板中, 将融合蛋白G采用PBS缓冲液稀释, 加入融合蛋白H, 混合, 常温孵化30min后分别加入萤光素酶底物furimazine, 同时启用微孔板检测仪读数, 记录发光强度 (RLU); 其中, 融合蛋白G的浓度为5μM, 融合蛋白H的浓度为15μM。同时, 设置只有融合蛋白G和萤光素酶底物的实验组作为阴性对照组。

[0169] 图2为检测结果, 在扣除阴性对照组的发光强度后, 本实施例的发光强度接近 $1\times 10^7$ RLU。

[0170] 表7质粒载体

质粒载体	DNA 序列	来源/构建方法
pETMCSIII	$bla P_{\phi 10}-6\times His'-MCS-T_{\phi}$	Neylon et al., 2000
pBiT1.1-N [TK/LgBiT]	$bla P_{HSV-TK}-LgBiT-linker-polyA$	Promega
pCU198	$bla P_{\phi 10}-C-hisoligo-'6\times His-T_{\phi}$	将退火的寡核苷酸 hisoligo 取代 pNG209 载体的 <i>NdeI-NcoI</i> 位点, 用于 C-端组氨酸标记
pCU202	$bla P_{\phi 10}-lgBiT-linker-'6\times His-T_{\phi}$	将 <i>lgBiT-linker</i> 片段克隆进载体 pCU198 的 <i>NdeI-NcoI</i> 位点, 用于 N-端 <i>lgBiT</i> 和接头片段与 C-端组氨酸标记的载体
pCU250	$bla P_{\phi 10}-lgBiT-nusB-6\times His-T_{\phi}$	<i>nusB</i> 基因克隆进载体 pCU202 的 <i>EcoRI</i> 和 <i>Acc65I</i> 酶切位点
pNG130	$bla P_{\phi 10}-6\times His-nusB-T_{\phi}$	Yang et al., 2017
pNG209	$bla P_{\phi 10}-MCS-'6\times His-T_{\phi}$	Yang et al., 2009
pBiT2.1-N[TK/SmBiT]	$bla P_{HSV-TK}-smBiT-linker-polyA$	Promega
pCU201	$bla P_{\phi 10}-smBiT-linker-'6\times His-T_{\phi}$	将 <i>smBiT-linker</i> 片段克隆进载体 pCU198 的 <i>NdeI-NcoI</i> 位点, 用于 N-端 <i>smBiT</i> 和接头片段与 C-端组氨酸标记的载体
pCU246	$bla P_{\phi 10}-smBiT-nusE-6\times His-T_{\phi}$	<i>nusE</i> 基因克隆进载体 pCU201 的 <i>EcoRI</i> 和 <i>Acc65I</i> 酶切位点。
pNG134	$bla P_{\phi 10}-6\times His-nusE-T_{\phi}$	Yang et al., 2017

[0172] 表8引物

	引物/ 接头 名称	序列 (5' - 3')	酶切位点
[0173]	<i>N_lg/smbit_R</i>	AGCGGCCCCATGGGGTACCTCTAGAAGATCTGCTAG	<i>NcoI</i>
	<i>N_smbit_F</i>	TGGTAAAGCCCATATGGTCTTCACACTC	<i>NdeI</i>
	<i>C_hisoligo_1</i>	TATGCCATGGGGGCCCCACCATCACCATCACCATTAA	<i>NdeI, NcoI</i> <i>Apal, 6x</i> <i>His, stop</i> <i>codon</i>
	<i>C_hisoligo_2</i>	CATGTTAATGGTGATGGTGATGGTGGGGCCCCCATGGCA	Same as above
	<i>N_nusE_F</i>	GGCTAATCGAATTCAGTCATGGCAAAC	<i>N_nusE_F</i>
	<i>N_nusE_R</i>	TCCGCAGGTACCTTACAGTTTGATCTCAAC	<i>Acc65I</i>
[0174]	<i>lgbit_nusB_F</i>	CGGCGAGAATTCAGTCATGAAAAGAAG	<i>EcoRI</i>
	<i>lgbit_nusB_R</i>	TCAGTTAGGGTACCTGATTGTCCAATATC	<i>Acc65I</i>

## [0175] 测试例1

[0176] 本测试例选取实施例1的融合蛋白A和融合蛋白B,以及实施例2的融合蛋白C和融合蛋白D,进行荧光滴定曲线测试,考察滴定浓度对蛋白间相互作用的影响。

[0177] 设置实验组I和实验组II,其中,实验组I测试融合蛋白A和融合蛋白B,实验组II测试融合蛋白C和融合蛋白D。这两组测试过程基本一致,以下以实验组I为例,详细说明其具体测试过程:

[0178] 在Pierce™96孔White Opaque微孔板中,将融合蛋白B采用PBS缓冲液稀释,加入融合蛋白A,混合,常温孵化30min后分别加入荧光素酶底物furimazine,同时启用微孔板检测仪读数,记录读数;其中,在混合时,融合蛋白B的浓度为5μM,融合蛋白A的浓度分别设置为160μM、80μM、40μM、20μM、10μM。

[0179] 图3和图4为测试结果,将一组能相互作用的融合蛋白混合,当其中一个融合蛋白的浓度固定,逐渐增加另一个融合蛋白的浓度时,检测到的发光强度逐渐递增,发光强度与蛋白间相互作用的强度呈正相关。也就是,在实际应用过程中,可通过检测发光强度来分析研究蛋白间的相互作用,说明本发明方法能够实现在细胞外采用双分子荧光互补技术检测蛋白间的相互作用。

## [0180] 实施例5

[0181] 基于实施例1所提供的方法得到的融合蛋白A和融合蛋白B,本实施例提供了一种靶向蛋白间相互作用的活性分子的高通量筛选方法,具体包括以下步骤:

[0182] 1、选择化合物MC4作为活性抑制分子,根据前期的研究分析,已经证实该活性分子能够抑制NusE蛋白与NusB蛋白相互结合,具备优异的抗菌活性。

[0183] 2、在Pierce™96孔White Opaque微孔板中,将第二融合蛋白B采用PBS缓冲液稀释,加入不同剂量的MC4混合,随即加入25μL第一融合蛋白A,混合,得到混合液;其中,混合液中的第一融合蛋白A和第二融合蛋白B的浓度为5μM,化合物MC4的浓度分别设置为320μM、160μM、80μM、40μM、20μM。

[0184] 3、将混合液于常温孵化30min,之后分别加入荧光素酶底物furimazine,同时启用微孔板检测仪读数,记录读数。

[0185] 图5为融合蛋白A、融合蛋白B与不同浓度的化合物MC4在体外相互作用下的荧光滴定曲线,融合蛋白A和融合蛋白B的浓度固定,随着加入的化合物MC4浓度增加,检测到的萤

光发光强度递减,且发光强度与化合物MC4的浓度呈负相关。说明本发明实施例采用双分子荧光互补系统在细胞外检测蛋白质间相互作用的方法,能够应用于研究活性分子关于靶向特定蛋白间相互作用的活性。

[0186] 实施例6

[0187] 基于实施例1所提供的方法得到的融合蛋白C和融合蛋白D,本实施例提供了一种靶向蛋白间相互作用的活性分子的高通量筛选方法,具体包括以下步骤:

[0188] 1、选择化合物MC4作为活性抑制分子,根据前期的研究分析,已经证实该活性分子能够靶向NusE蛋白与NusB蛋白之间相互结合,具备优异的抗菌活性。

[0189] 2、在Pierce™96孔White Opaque微孔板中,将第一融合蛋白C采用PBS缓冲液稀释,加入不同剂量的MC4混合,随即加入25 $\mu$ L第二融合蛋白D,混合,得到混合液;其中,混合液中的第一融合蛋白C和第二融合蛋白D的浓度为5 $\mu$ M,化合物MC4的浓度分别设置为3760 $\mu$ M、500 $\mu$ M、250 $\mu$ M、125 $\mu$ M、62.5 $\mu$ M、31.25 $\mu$ M、15.63 $\mu$ M。

[0190] 3、将混合液于常温孵化30min,之后分别加入荧光素酶底物furimazine,同时启用微孔板检测仪读数,记录读数。

[0191] 图6为融合蛋白C、融合蛋白D与不同浓度的化合物MC4在体外相互作用下的荧光滴定曲线,融合蛋白C和融合蛋白D的浓度固定,随着加入的化合物MC4浓度增加,检测到的荧光发光强度递减,且发光强度与化合物MC4的浓度呈负相关。说明本发明实施例采用双分子荧光互补系统在细胞外检测蛋白质间相互作用的方法,能够应用于研究活性分子关于靶向特定蛋白间相互作用的抑制活性。

[0192] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

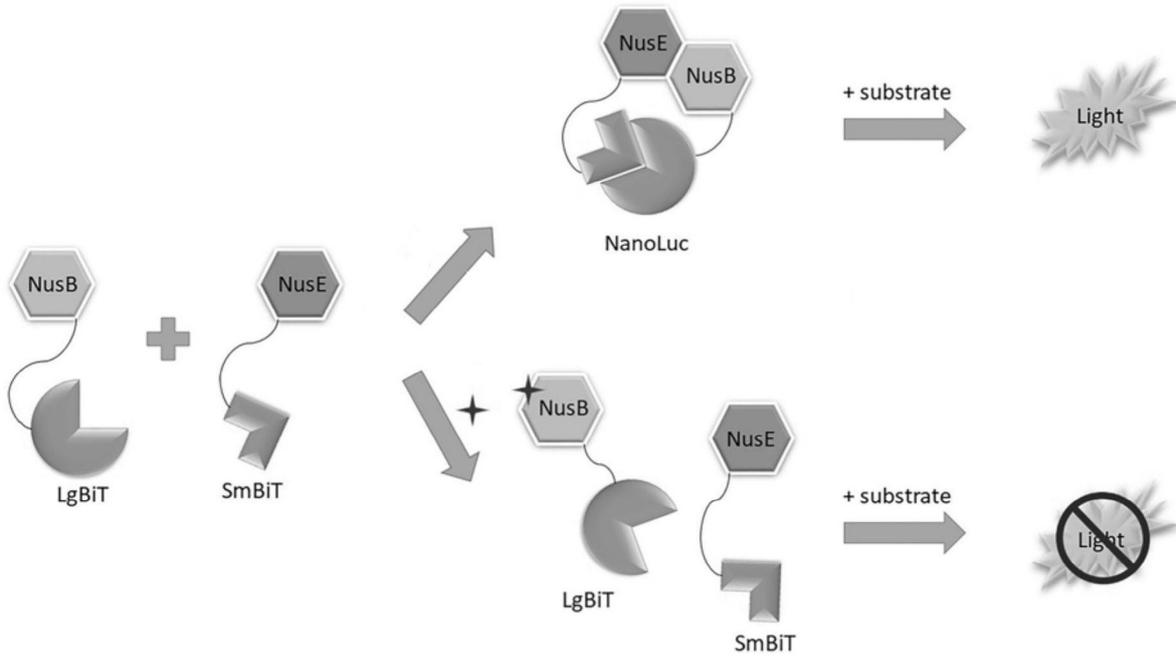


图1

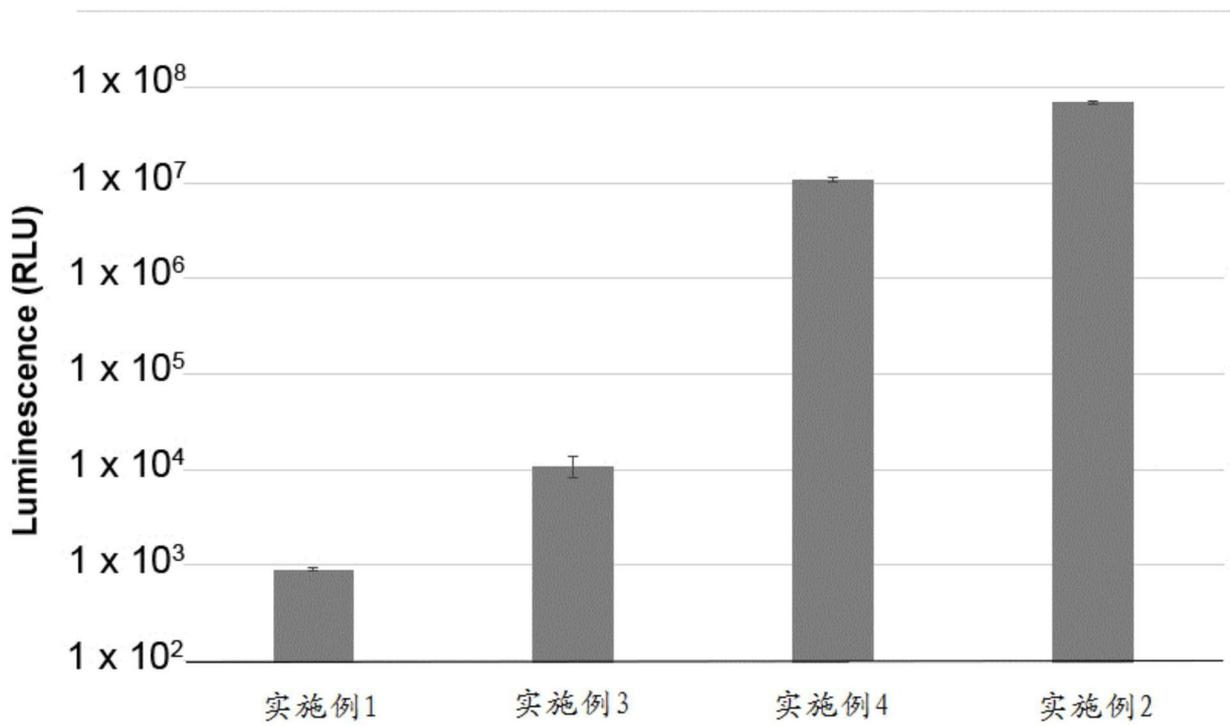


图2

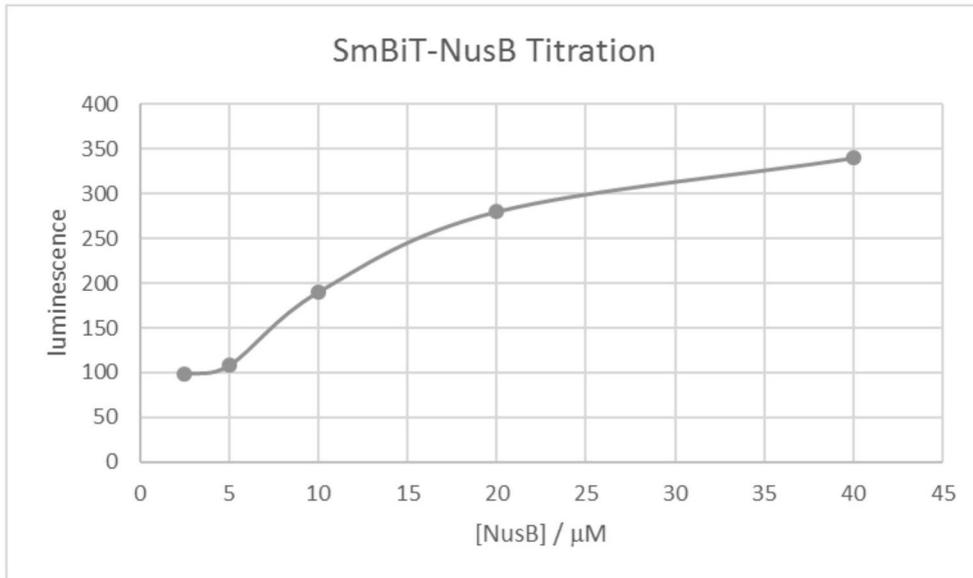


图3

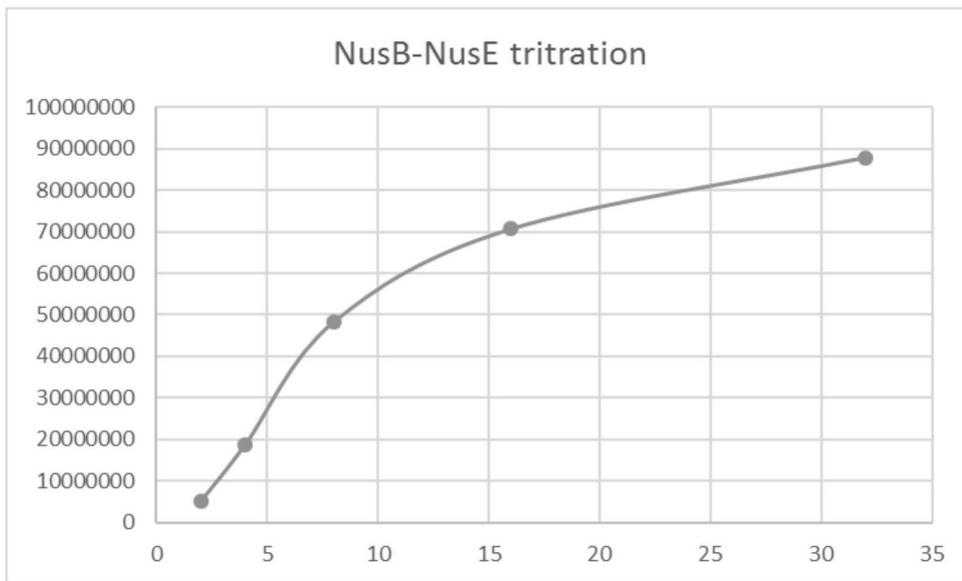


图4

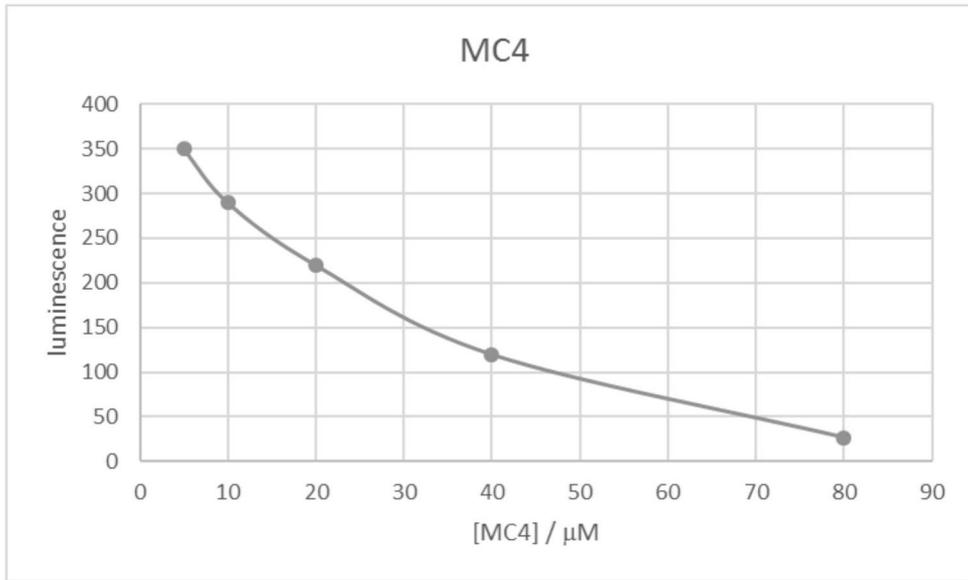


图5

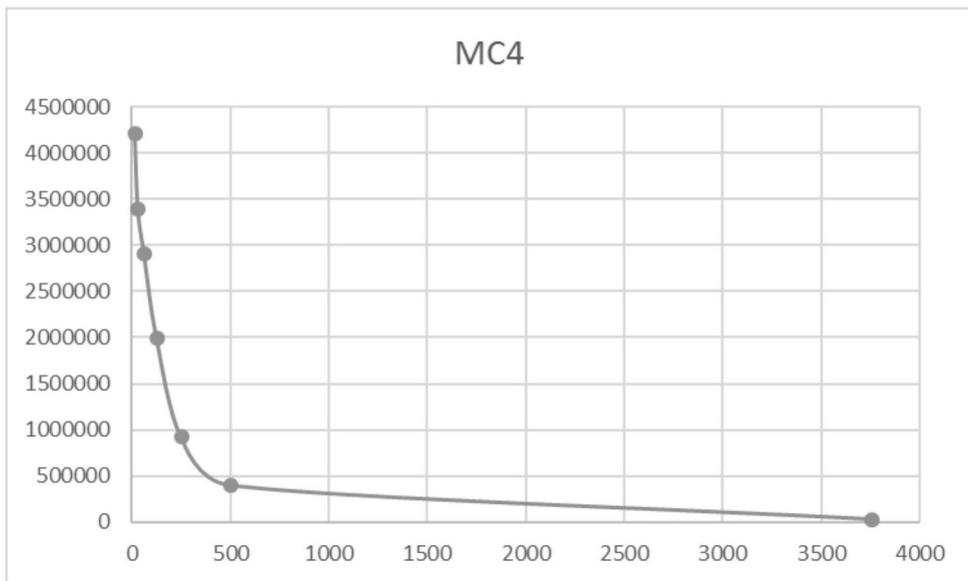


图6

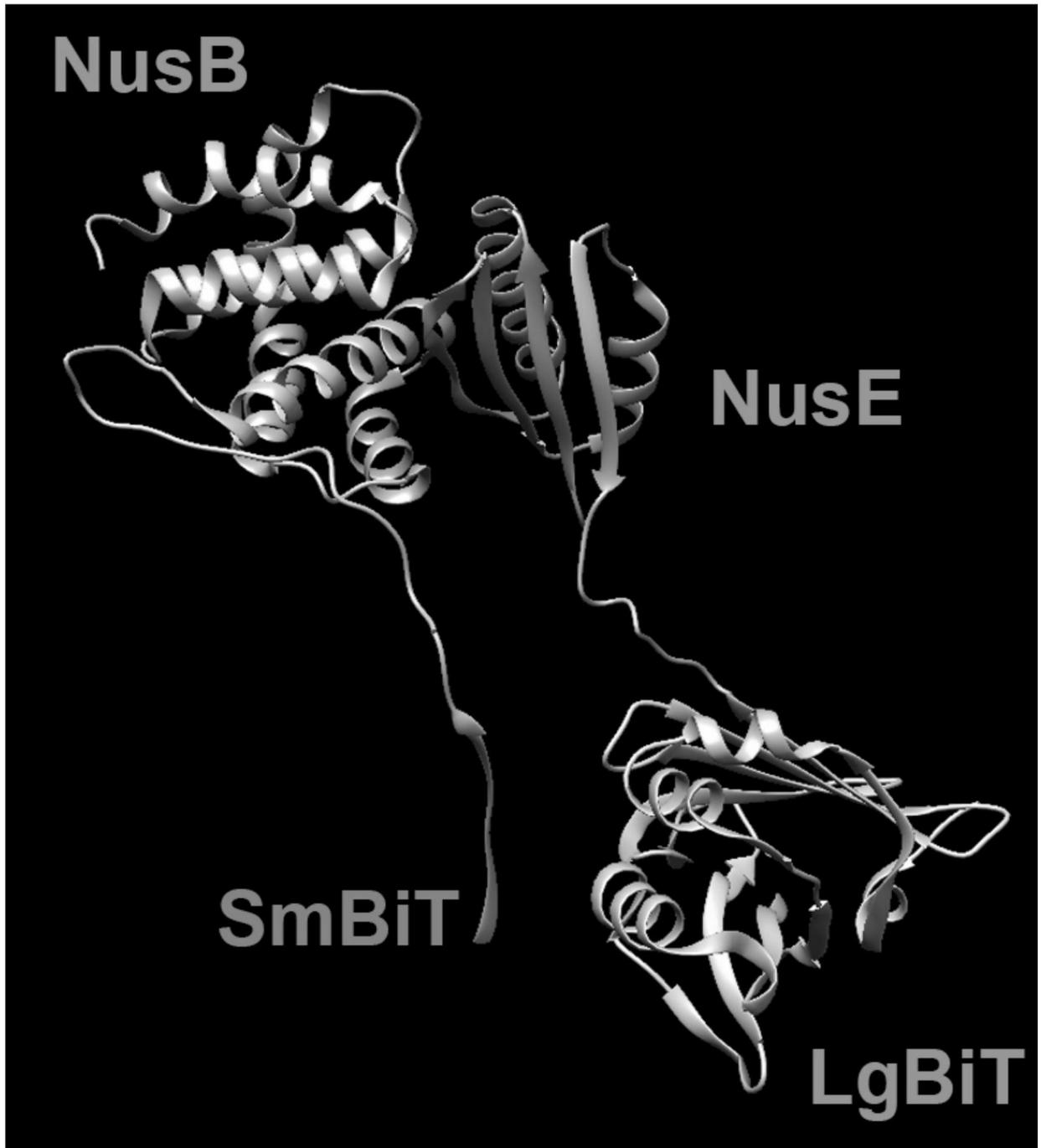


图7

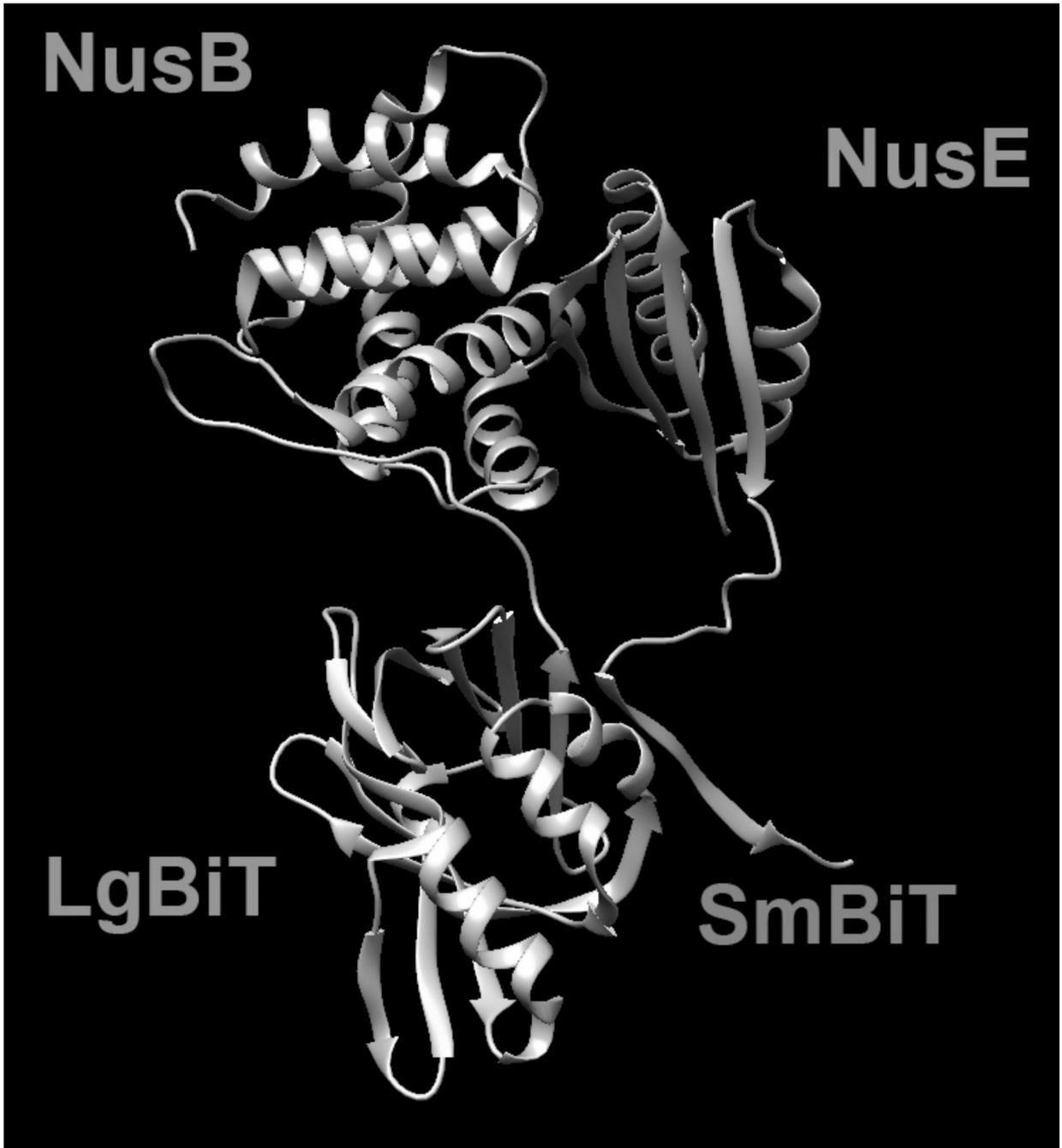


图8