

蛋白-蛋白相互作用检测技术-双分子荧光互补法

Protein-Protein Interaction Detection Method-BiFC

岳丽云^{1, \$a, #}, 李露^{1, \$b, #}, 陈晓慧¹, 兰姝珏^{1, *}

¹中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 中国科学院, 中国科学院大学, 上海; ^{\$a} 新技术开发部, 上海恒瑞医药有限公司, 上海; ^{\$b} 广州市第一人民医院, 华南理工大学, 广州市, 广东省

*通讯作者邮箱: sjlan@sibcb.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

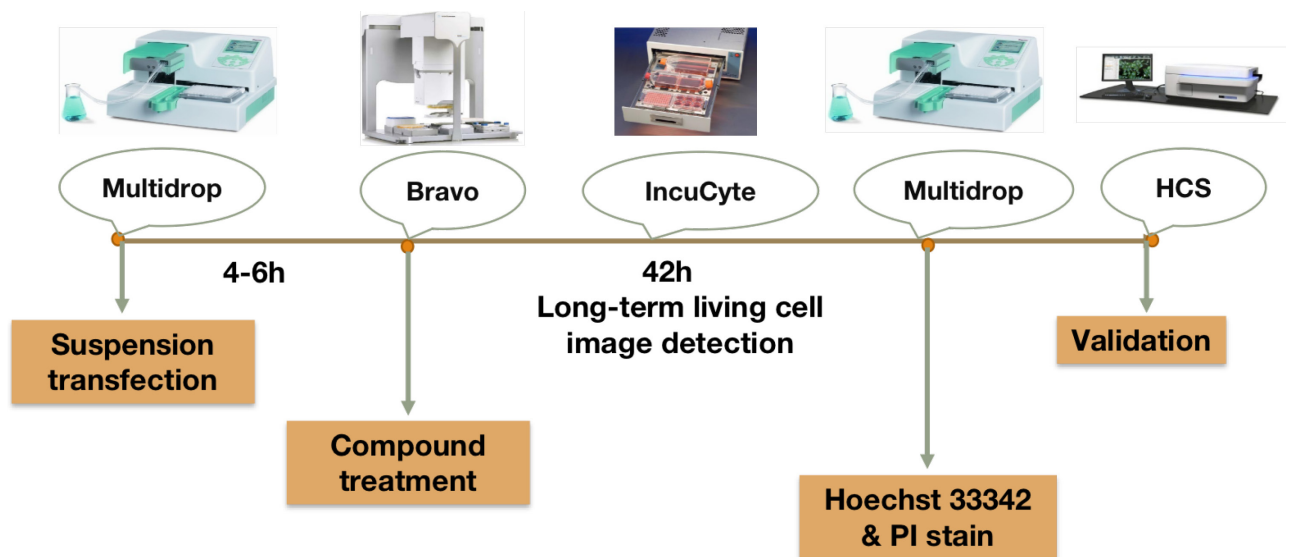
引用格式: 岳丽云, 李露, 陈晓慧, 兰姝珏. (2021). 蛋白-蛋白相互作用检测技术-双分子荧光互补法.

***Bio-101* e1010875. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010875.**

How to cite: Yue, L. Y., Li, L., Chen, X. H. and Lan, S. J. (2021). Protein-Protein Interaction Detection Method-BiFC. *Bio-101* e1010875. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010875. (in Chinese)

摘要: 双分子荧光互补 (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) 分析技术是在细胞水平检测蛋白-蛋白相互作用的一种方法, 应用该方法可以高通量地筛选蛋白-蛋白相互作用的抑制剂。具体的原理是将荧光蛋白在特定的位点切开, 形成不发荧光的 N 端肽段和 C 端肽段, 称为 N 片段(N-fragment)和 C 片段(C-fragment)。这两个片段在细胞内共表达或体外混合时, 不能自发地组装成完整的荧光蛋白, 此时在该荧光蛋白的激发光激发下不能产生荧光。但是, 当这两个荧光蛋白的片段分别连接到一对有相互作用的目标蛋白上, 在细胞内共表达或体外混合这两个融合蛋白时, 由于目标蛋白质的相互作用, 原本不发光的 N 片段和 C 片段在目标蛋白质的牵引下在空间上相互靠近, 使其空间距离远小于在未牵引条件下的距离。二者在空间上相互靠近使其有机会重新构建成完整的具有活性的荧光蛋白分子, 并在该荧光蛋白的激发光激发下发射荧光。简言之, 如果目标蛋白之间有相互作用, 则在激发光的激发下, 产生该荧光蛋白的荧光; 反之, 若蛋白质之间没有相互作用, 则不能被激发产生荧光 (图 1)。需要说明的是荧光蛋白的构建是不可逆的, 一旦荧光产生后不会消失, 因此该方法不能用于实时监测蛋白-蛋白相互作用的情况。

图文摘要



关键词: 蛋白-蛋白相互作用, BIFC, 高通量筛选

材料与试剂

1. 15/50 mL 离心管
2. 384 孔板 (Corning, 产品目录号: 3712)
3. 96 孔板 (Corning, 产品目录号: 3879)
4. Fugene HD (Promega, 产品目录号: E2311)
5. Opti-MEM™ I 减血清培养基, 无酚红 (Gibco, 产品目录号: 11058021)
6. 胰蛋白酶-EDTA (0.25%), 含酚红 (GIBCO, 产品目录号: 25200056)
7. DMEM, 高糖 (Gibco, 产品目录号: 11965092)
8. DPBS, 无钙、无镁 (Gibco, 产品目录号: 14190250)
9. DMSO (Sigma, 产品目录号: 276855)
10. Hoechst 33342 (Invitrogen, 产品目录号: H3570)
11. Propidium Iodide (Invitrogen, 产品目录号: P1304MP)
12. DMEM 完全培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. Multidrop 自动分液器 (Thermofisher, model: Multidrop Combi)

2. Bravo 自动化液体处理平台(Agilent, model: Bravo)
3. Incucyte 活细胞长时间动态影像成像分析仪(Essen BioScience, model: Incucyte FLR)
4. Operetta 高内涵成像分析仪 (PerkinElmer, model: Operetta)
5. 96 孔板离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
6. 细胞计数仪 (Beckman Coulter)

实验步骤

A. 质粒构建

本实验中以 Venus (EYFP 的一种突变体) 为指示蛋白-蛋白相互作用的荧光蛋白。本例中以 Venus 蛋白的第 157 位氨基酸为截点用限制性内切酶 Xho I 和 Xba I 将 Venus N 端 1-157 个氨基酸的 DNA 序列构建到原核表达载体 pcDNA™3.1/Hygro (-)(V870-20, invitrogen) 上, 并命名为 NV-157; 用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 将 Venus C 端 158-239 个氨基酸的 DNA 序列构建到原核表达载体 pcDNA™3.1/myc-His(-) A 上, 并命名为 CV-158, 得到了基于 Venus 的互补片段的两个空载蛋白质粒 NV-157 和 CV-158, 空载蛋白质粒可无偿提供给科研单位或非盈利机构。

构建 BiFC 系统还需要将有相互作用的一对蛋白分别插入到空载蛋白质粒 NV-157 和 CV-158 中。本例中分别将 Protein A 和 Protein B 插到 NV-157 的 N 端和 CV-158 的 C 端, 构成 Protein A-NV-157 和 CV-158-Protein B 两种质粒。这两种质粒可共转染构成检测相互作用的 BiFC 系统。

质粒构建步骤参照《分子克隆实验指南》。

说明: 两种蛋白由于和 Venus 的片段的组合以及在 Venus 片段的 N 端或 C 端位置的不同可以有 8 种组合方式 (图 2): 1) Protein A-NV-157 和 CV-158-Protein B, 2) Protein A-NV-157 和 Protein B-CV-158, 3) NV-157-Protein A 和 CV-158-Protein B, 4) NV-157-Protein A 和 Protein B-CV-158, 5) Protein B-NV-157 和 CV-158-Protein A, 6) Protein B-NV-157 和 Protein A-CV-158, 7) NV-157-Protein B 和 CV-158-Protein A, 4) NV-157-Protein B 和 Protein A-CV-158。在实际操作中要根据自己课题中蛋白在细胞中的定位或结合后的功能实验来选择合适的组合方式, 保证荧光蛋白

可以发出荧光且不影响目的蛋白之间的相互作用及二者结合后功能的发挥。

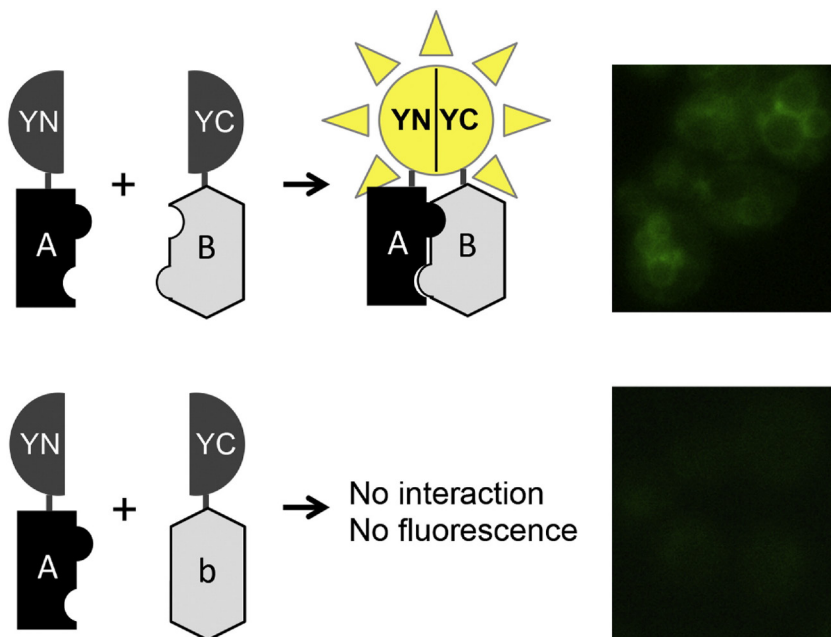


图 1. BiFC 的原理 (Miller *et al.*,2015)

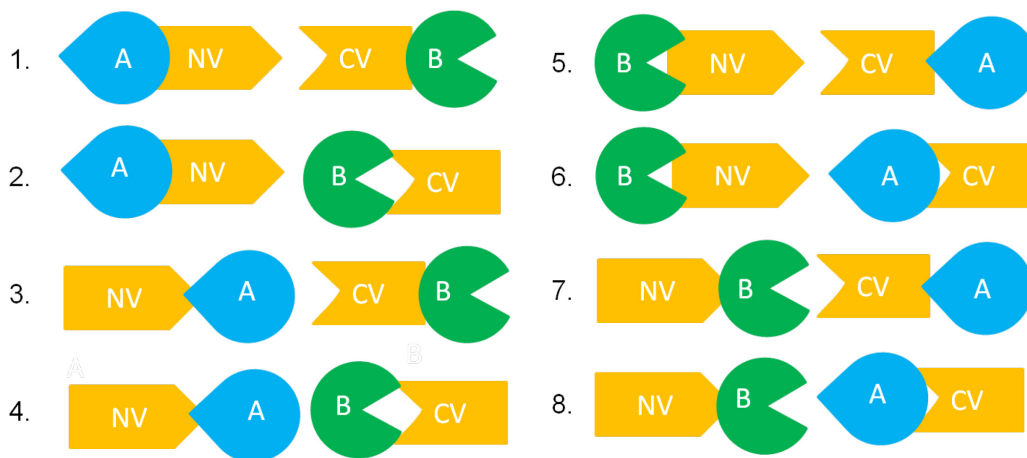


图 2. 目的蛋白与荧光蛋白片段间不同的排列方式示意图

B. 细胞转染（以 HEK293T 细胞为例）

本实验采用悬浮转染的方式进行转染铺板，此处所示的实验步骤仅适用于以悬浮转染的方式瞬时转染两种质粒的情况，下面以一块 384 孔板的情况为例介绍实验步骤。

在实验设计中，384 孔板的 1 - 2 列为阳性对照，即共转 Protein A-NV-157 和 CV-158- Protein B 两种质粒的 HEK293T 细胞用 2% DMSO（稀释液为 DMEM 完全培养基，DMSO 是化合物的溶剂，作为无化合物处理的对照同化合物以相同的体积百分比

添加) 进行处理; 3 - 22 列为实验组, 即共转 Protein A-NV-157 和 CV-158- Protein B 两种质粒的 HEK293T 细胞以 10 μ M 待筛选的化合物 (化合物最终在培养基中的体积百分比为 2%) 处理; 23 - 24 列为阴性对照, 即共转 NV-157 和 CV-158 两种质粒的 HEK293T 细胞用 2% DMSO 进行处理。铺板时每孔的细胞数为 8000 个, 体积为 30 μ L, 细胞浓度为 2.67×10^5 个/mL。一块 384 孔板需准备 15 mL 共转 Protein A-NV-157 和 CV-158-Protein B 两种质粒的 HEK293T 细胞以及 5 mL 共转 NV-157 和 CV-158 两种质粒的 HEK293T 细胞。

1. 转染前一天对 HEK293T 细胞进行传代, 保证第二天细胞活率大于 95% 且有 5.5×10^6 个的细胞用于转染。
2. 制备转染复合物。

转染复合物中质粒的含量与细胞溶液体积的比例是 1 μ g : 1 mL。

- a. Protein A-NV-157 和 CV-158-Protein B 共转的转染复合物制备:

质粒: 15 μ g, 其中 Protein A-NV-157 质粒 5 μ g, CV-158- Protein B 质粒 10 μ g;

Fugene HD: 45 μ L;

OPTI-MEM: 200 μ L。

- b. NV-157 和 CV-158 共转的转染复合物制备:

质粒: 5 μ g, 其中 NV-157 质粒 1.67 μ g, CV-158 质粒 3.33 μ g;

Fugene HD: 15 μ L;

OPTI-MEM: 100 μ L。

说明: 1) 本次实验中 Protein A-NV-157 和 CV-158- Protein B 两种质粒的比例为 1:2; 质粒总量和转染试剂的比例是 1 μ g : 3 μ L。

2) Protein A-NV-157 和 CV-158- Protein B 两种质粒的比例、以及质粒和转染试剂的比例在方法开发阶段需要通过测试不同比例下的荧光强度与阴性对照的荧光强度的差异, 选择荧光强度差异最大且最经济的比例进行实验。

3. 消化细胞并计数。

- a. 弃掉旧培养液, 在培养皿中加入 5 ml DPBS, 晃动培养皿使 DPBS 均匀覆盖整个培养皿后弃掉 DPBS 以去除残留培养液;

- b. 培养皿中加入 1 mL 胰蛋白酶-EDTA (0.25%) 溶液, 37 $^{\circ}$ C 静置 1 min, 使细胞

从培养皿上解离下来；

- c. 培养皿中加入 4 mL DMEM 完全培养液，终止胰蛋白酶的消化，反复吹打细胞成单个细胞。
- d. 另取一只 1.5 mL EP 管加入 900 μ L DMEM 完全培养液，向其中加入 100 μ L 细胞反复吹打混匀，用细胞计数仪进行细胞计数。（细胞计数的方式可应用实验室现有计数方法）

4. 细胞转染。

- a. 根据细胞计数的结果调整细胞浓度为 2.67×10^5 个/mL，总体积为 20 mL。
- b. 取 15 mL 细胞于 50 mL 离心管中，将制备好的 Protein A-NV-157 和 CV-158-Protein B 共转的转染复合物全部转移至 50 mL 离心管中，上下颠倒混匀，标记为样品细胞。
- c. 取 5 mL 细胞于 50 mL 离心管中，将制备好的 NV-157 和 CV-158 共转的转染复合物全部转移至 50 mL 离心管中，上下颠倒混匀，标记为阴性对照细胞。

5. 细胞铺板

细胞铺板借助于 Multidrop Combi，选用 standard cassette，每孔 30 μ L 细胞。

- a. 准备 Multidrop（需在超净台中操作）

Multidrop 安装好 standard cassette 后，先将 standard cassette 的进液端放入含 10% bleach 的容器中 prime 50 mL bleach，之后将 standard cassette 的管路在充满 10% bleach 的状态下浸泡 5 min，随后将 standard cassette 的进液端转移至含 ddH₂O 的容器中 prime 200 mL ddH₂O 以除去 10% bleach。

- b. 细胞铺板

将 standard cassette 的进液端转移至含 DPBS 的容器中 Prime 50 mL DPBS 后进行细胞铺板。将 384 孔细胞培养板放置到 Multidrop 的载板架上，其中 384 孔板的 23-24 列每孔加入 30 μ L 阴性对照细胞，加好后将 standard cassette Prime 50ml DPBS 之后再向 384 孔板的 1-22 列中每孔加入 30 μ L 样品细胞。

- c. 将 384 孔板 800 rpm 离心 1 min，置于 37 °C 培养箱中

C. 化合物处理

化合物母液以 1 mM 的浓度保存于 DMSO 中，储存于 96 孔母液板的第 2-11 列。细

胞板中化合物的最终浓度为 10 μ M，总共需要 100 倍稀释。

1. 化合物 50 倍稀释

a. 准备 Multidrop（需在超净台中操作）。

Multidrop 安装好 standard cassette 后，先将 standard cassette 的进液端放入含 10% bleach 的容器中 prime 50 mL bleach，之后将 standard cassette 的管路在充满 10% bleach 的状态下浸泡 5 min，随后将 standard cassette 的进液端转移至含 ddH₂O 的容器中 prime 200 mL ddH₂O 以除去 10% bleach。

b. 分配 DMEM 完全培养液。

将 standard cassette 的另一端转移至含 DPBS 的容器中 Prime 50 mL DPBS 后，转移 standard cassette 的另一端至装有 DMEM 完全培养液的容器中 Prime 少量体积后，向 96 孔板（Corning.3879）的 2-11 列中每孔加入 100 μ L 培养液，之后向 96 孔板的第一列及第 12 列中加入含 2% DMSO 的 DMEM 完全培养液。

c. 化合物 50 倍稀释

应用 Bravo 自动移液工作站，从 96 孔化合物母液板中的 2-11 列中吸取 2 μ L 化合物转移到含 100 μ L DMEM 完全培养液的工作板中，以 30 μ L 的体积吹打混匀 10 次。

2. 化合物 2 倍稀释

应用 Bravo 自动移液工作站，从 50 倍稀释后的化合物板中吸取 30 μ L 液体整板转移至细胞板中。

3. 将化合物处理过的细胞板 800 rpm 离心 1 min，置于 37 °C 培养箱中。

D. 细胞培养及 IncuCyte 拍照检测

将化合物处理过的 384 孔细胞板放入 IncuCyte 的放置微孔板的卡槽中，每两小时拍照一次，检测荧光的表达，37 °C 培养 42h，具体参数见图 3 - 4 所示：

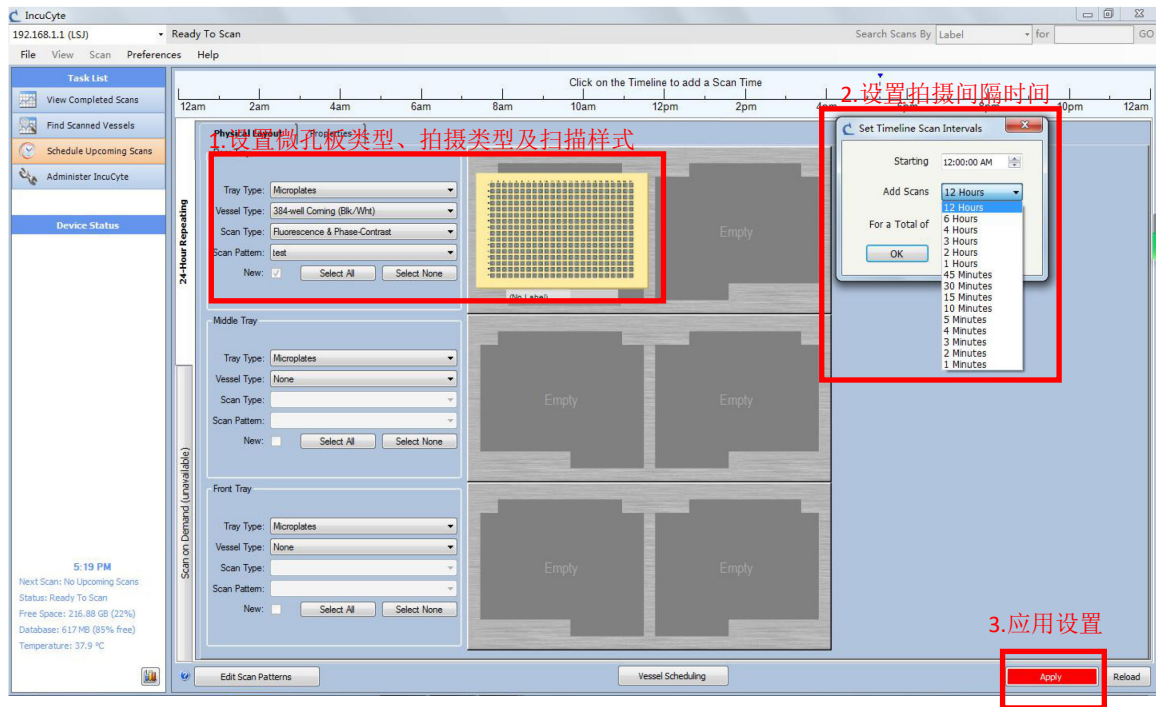


图 3. IncuCyte 拍照参数设置方法

Tray Type: 选择载体类型，如微孔板、载玻片

Vessel Type: 选择孔板类型，如 384 well plate

Scan Type: 选择拍照参数类型，如 fluorescence&Phase contrast

Scan Pattern: 选择微孔板需拍照的范围

Set Timeline Scan Intervals: 选择拍照开始时间以及间隔时间

设置好各参数一定点击 Apply 进行确认并开始。

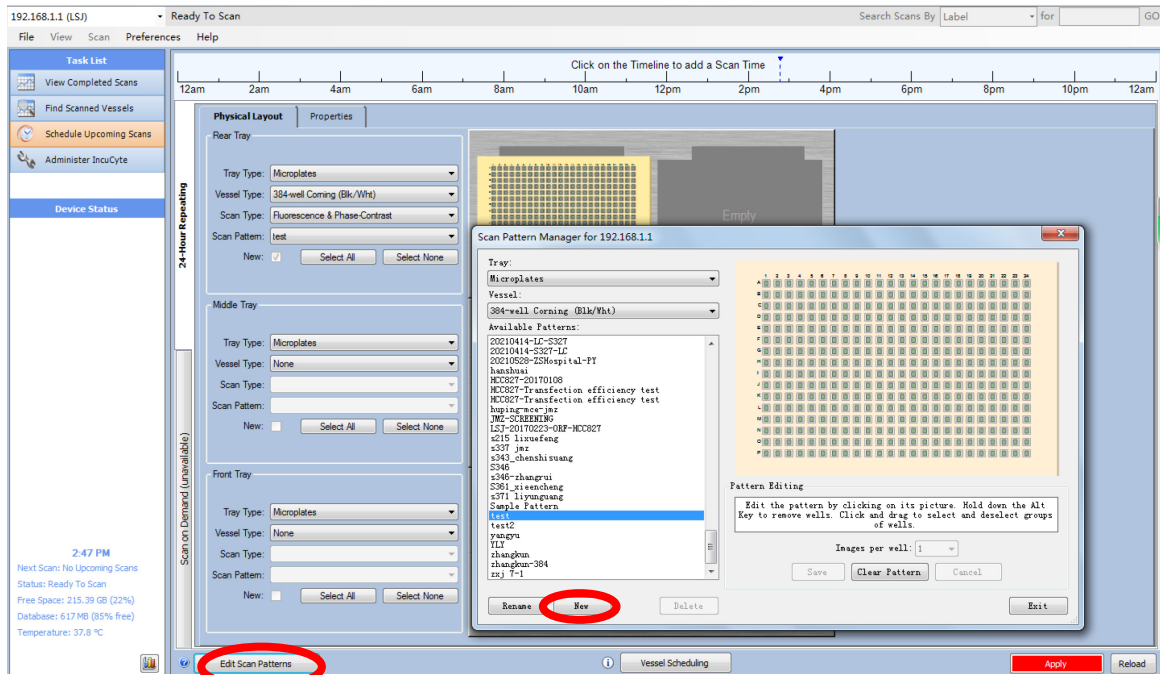


图 4. IncuCyte 拍照 Scan Pattern 设置方法

Scan Pattern 的设置：点击主界面左下角 Edit Scan Patterns，在弹出界面点击 New 新建一个拍照模式并命名，在右边选择要拍照的范围后点击 Save 保存。在主界面 Scan pattern 下拉菜单中选择刚刚新建的拍照模式。

E. 细胞核染色

实验中 Hoechst 33342 的稀释比例为 1:1000, Propidium Iodide 的稀释比例为 1:500, 每孔加入 20 μ L 稀释后的染料，一块 384 孔板需准备 25 mL 稀释后的染料。

1. 准备 Multidrop (需在超净台中操作)

Multidrop 安装好 standard cassette 后，先将 standard cassette 的进液端放入含 10% bleach 的容器中 prime 50 mL bleach，之后将 standard cassette 的管路在充满 10% bleach 的状态下浸泡 5 min，随后将 standard cassette 的进液端转移至含 ddH₂O 的容器中 prime 200 mL ddH₂O 以除去 10% bleach。

2. 染料准备

取一只 50 mL 离心管用铝箔纸包裹避光，加入 25 mL DPBS 后向其中加入 100 μ L Hoechst 33342 和 200 μ L Propidium Iodide，上下颠倒混合均匀，配制的时候注意避光。

3. 细胞染色

将 standard cassette 的另一端转移至含 DPBS 的容器中 Prime 50 mL DPBS 后，转移 standard cassette 的另一端至装有稀释后染料的离心管中 Prime 少量体积后，向细胞培养板中整板加入 20 μ L 染料稀释液。细胞板 800 rpm 离心 1min，置于 37 °C 培养箱中孵育 10min。

F. Operretta 拍照检测

染色后的细胞板置于 Operretta 高内涵细胞分析仪中进行拍照分析，激光通道为：EGFP（460nm-490nm）、HOECHST33342（360nm-400nm）、Propidium Iodide（520nm-550nm）。

实验注意要点

1. 在使用 Multidrop Combi 自动分液器前注意观察各个分液头液体的分液速度是否相同，是否存在分液头堵塞的现象，最好每次使用前对每个分液头进行反冲，以确保分液头的通畅。
2. 应用移液工作站向细胞板中加化合物时，打液高度应在液面下 1-2 mm，打液速度要慢，防止打液位置的细胞被吹开。

结果与分析

1. IncuCyte 结果分析

IncuCyte 拍照的结果应用 IncuCyte 2011A 软件进行分析：
分析参数的设置如图 5 所示：

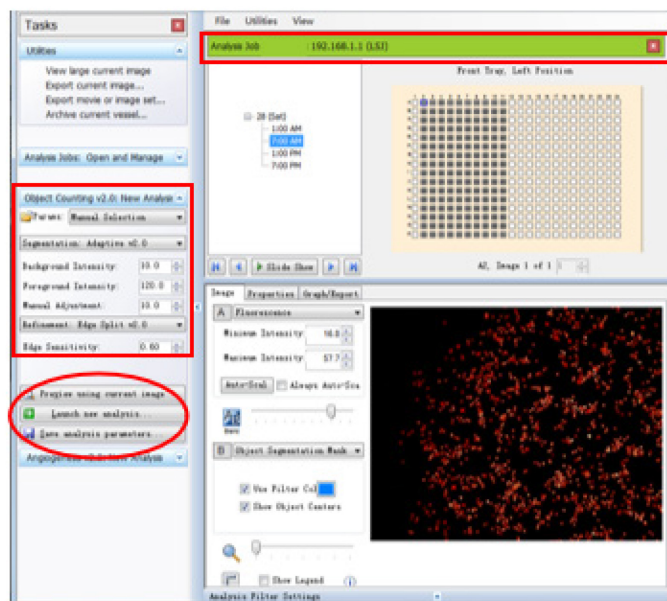


图 5. IncuCyte 分析方法设置方法

红色框为可调节参数，根据具体实验设置合适的分析方法，然后点击 Launch new analysis 对所有图像进行分析。上方出现绿色提示表明已经完成对实验结果的分析。

左下方红色圈中 Preview using current image 为预览该分析方法产生的分析结果；Launch new analysis 为应用此分析方法分析微孔板所有孔的图像；Save analysis parameters 为保存此分析方法。

软件分析结束后，将 Confluence 和 object summed intensity per mm² 两个参数以 96 孔板排列的方式导出。导出操作如下（图 6）：

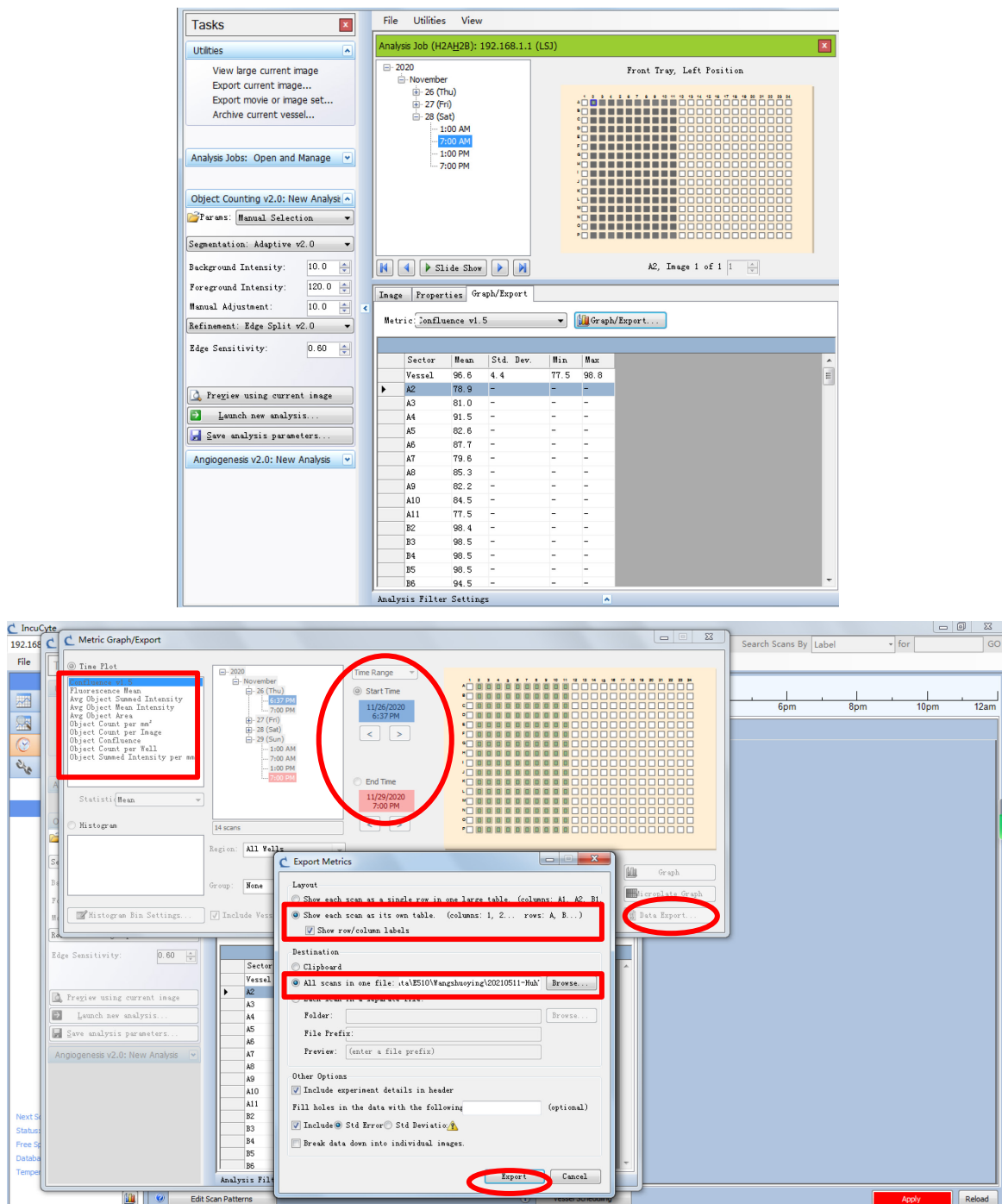


图 6. IncuCyte 分析结果导出参数设置方法

点击 Graph/Export，在弹出界面选择所需参数，不同时间点的图像分析，然后点击 Data Export，选择导出数据的排列方式以及储存路径后点击 Export。

$$\text{每孔的平均荧光强度 (X}_{\text{sample}}) = \frac{\text{object summed intensity per mm}^2}{\text{Confluence}}$$

将所有阳性对照孔的平均荧光强度求平均数，记为 X_{positive} 。

$$\text{每个化合物的荧光抑制率 (\%)} = 100 - \frac{X_{\text{sample}}}{X_{\text{positive}}} \times 100$$

设定某阈值如抑制率大于 50%作为阳性化合物的标准，则通过计算每个化合物的荧光抑制率，即可挑选出阳性化合物分子。

2. Operetta 结果分析

Operetta 拍照的结果应用 Harmony 软件进行分析：

分析参数的设置如图 7 所示：

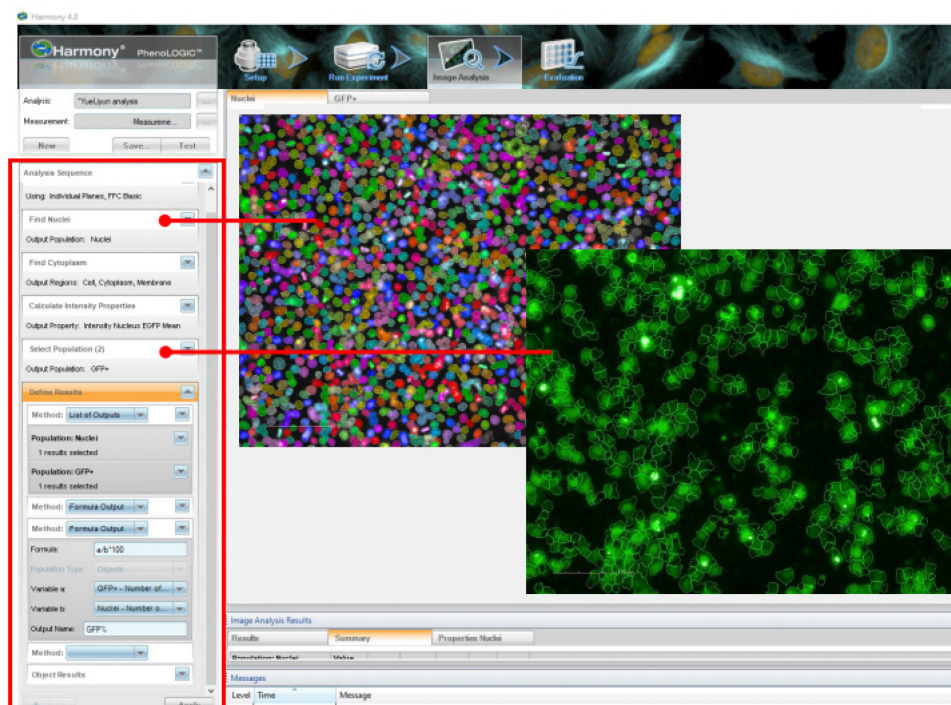


图 7. Operetta 分析参数设置方法

红色框为可调节参数，根据具体实验设置合适的分析方法。

软件分析结束后，将 Normalization fluorescent intensity 参数以 96 孔板排列的方式导出。

将所有阳性对照孔的平均荧光强度求平均数，记为 X_{positive} 。

$$\text{每个化合物的荧光抑制率 (\%)} = 100 - \frac{X_{\text{sample}}}{X_{\text{positive}}} \times 100$$

设定某阈值如抑制率大于 50%作为阳性化合物的标准，则通过计算每个化合物的荧光抑制率，即可挑选出阳性化合物分子。

溶液配方

1. DMEM 完全培养基:

DMEM 高糖培养基 + 10%胎牛血清

致谢

本课题得到了国家科技部(2014CB910601)、国家自然科学基金(31400796、31401206、31630044、31501111)、中国科学院青年创新促进会,上海市科学技术委员会(14XD1404200)的资助。

感谢中国科学院分子细胞科学卓越创新中心化学生物学平台提供的技术支持和指导。

参考文献

1. Yue, L., Li, L., Li, D., Yang, Z., Han, S., Chen, M., Lan, S., Xu, X. and Hui, L. (2017). [High-throughput screening for Survivin and Borealin interaction inhibitors in hepatocellular carcinoma](#). *Biochem Biophys Res Commun* 484(3): 642-647.
2. Miller, K. E., Kim, Y., Huh, W. K. and Park, H. O. (2015). [Bimolecular Fluorescence Complementation \(BiFC\) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies](#). *J Mol Biol* 427(11): 2039-2055.