

# 荧光素酶酶活恢复法检测体内蛋白质互作

王磊, 鄢文豪, 欧阳亦聃\*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

\*通讯作者邮箱: [diana1983941@mail.hzau.edu.cn](mailto:diana1983941@mail.hzau.edu.cn)

引用格式: 王磊, 鄢文豪, 欧阳亦聃. (2018). 荧光素酶酶活恢复法检测体内蛋白质互作. *Bio-101* e1010134. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010134.

**实验原理:** 来自萤火虫的荧光素酶 (Firefly luciferase, LUC) 可以分成 N 和 C 两段蛋白质而没有酶活, 将 N 和 C 端各融合另外的两个蛋白质, 如果这两个蛋白质在体内可以互作的话, 那么 LUC 的 N 和 C 端将在空间上靠近而恢复酶活, 因此可以通过检测分段的 LUC 可否恢复酶活而判断两个蛋白质之间在体内是否存在相互作用。

**实验目的:** 检测蛋白质之间的体内相互作用。

**关键词:** 蛋白质互作, 荧光素酶, 体内验证

## 材料与试剂

1. 酶标板 (Corning, catalog number: 3197)
2. 原生质体转化相关试剂 (参阅“水稻原生质体转化”程珂等, 2018)
3. 质粒抽提试剂盒 QIAGEN Plasmid Kits (QIAGEN, catalog number: 10043)
4. 酶活检测试剂盒 Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega, catalog number: E1910)

## 仪器设备

1. 酶标仪
2. 分光光度计

## 实验步骤

1. 载体构建: 本操作系统的载体 PUC19-nLUC 和 PUC19-cLUC 基本结构如图所示 (图 1) (Chen 等, 2008)。

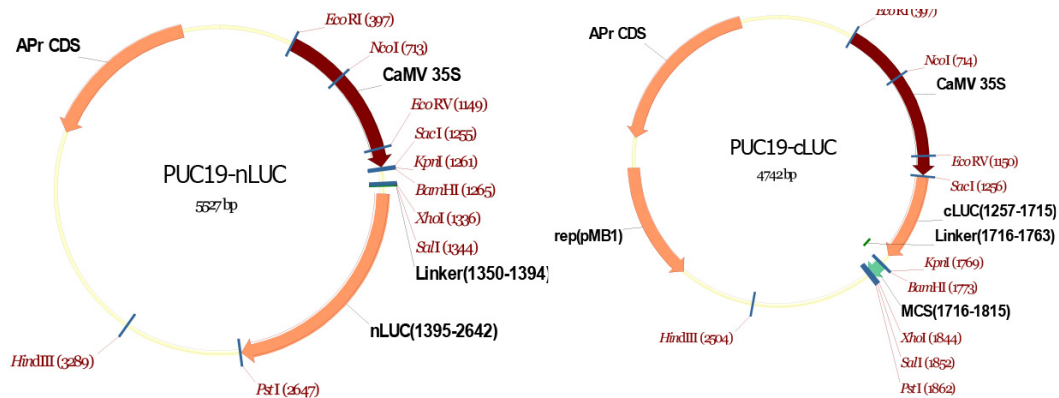


图 1. 载体 PUC19-nLUC 和 PUC19-cLUC 基本结构图

按照多克隆位点酶切位点信息，将两个待检测蛋白质分别与 PUC19-nLUC 和 PUC19-cLUC 进行融合连接。

2. 抽提质粒：按质粒提取试剂盒 QIAGEN Plasmid Kits 的说明书进行高纯度质粒提取，并测定浓度。
3. 原生质体转化：制备原生质体并通过 PEG 介导的方法转化质粒(参见“水稻原生质体的分离及转化”，程珂等，2018)，nLUC 和 cLUC 的质粒各用 10 μg 进行转化，同时共转化 2 μg 35S:REN (*Renilla luciferase*)质粒作为内参对照，转化完成后室温培养 16-20 h。
4. 将培养完毕的原生质体 150 g 离心 1 min，弃上清。
5. 加入 100 μl 裂解缓冲液 Passive Lysis Buffer (Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 提供)，混匀 30 s,12,000 rpm，室温离心 5 min。
6. 取 50 μl 细胞裂解物到酶标板中，加入 100 μl 底物 Luciferase Assay Reagent II，10 s 后用酶标仪测量 LUC 催化底物发出的荧光信号值。
7. 加入 100 μl 底物 Stop & Glo<sup>®</sup> Substrate，10 s 后用酶标仪测量 REN 催化底物发出的荧光信号值。
8. 计算 LUC 和 REN 的比值，统计分析实验组和对照组之间是否存在显著差异，从而判断所检测蛋白质之间是否存在相互作用。

## 注意事项

1. 本实验必须要设计严谨的对照。连有目的基因的载体必须分别和另外一个空载体共转化，同时需要两个空载体之间共转化，以排除背景信号的影响。同时可以转化一对确定互作的蛋白质来评价系统的有效性。
2. 必须共转化一个恒定表达的报告基因（如 35S:REN）来平衡化各个转化之间的系统误差和转化效率的差别。
3. 高纯度的质粒和高效的原生质体转化体系是保证实验成功的关键所在。
4. 可以将相关元件连接改造到可以进行农杆菌介导的转化的载体上去，从而可以在体内稳定检测蛋白质之间的相互作用。

## 致谢

感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所周俭民研究员提供载体 PUC19-nLUC 和 PUC19-cLUC；感谢中国科学院植物研究所林荣呈研究员在荧光素酶活测定体系建立方面所提供的帮助。

## 参考文献

1. Chen, H., Zou, Y., Shang, Y., Lin, H., Wang, Y., Cai, R., Tang, X. and Zhou, J. M. (2008). [Firefly luciferase complementation imaging assay for protein-protein interactions in plants](#). *Plant Physiol* 146(2): 368-376.
2. 程珂等. (2018). 水稻原生质体的分离及转化. *Bio-101* e1010125. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010125. (in press)