

学校编码: 10384
学号: 20620141151480

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

超高灵敏流式结合 GFP 报告因子对蛋白相互
作用的快速高通量分析

High-throughput Analysis of Protein-Protein Interaction by
High Sensitivity Flow Cytometry Combined with GFP
Reporter

张健强

指导教师姓名: 吴丽娜 副教授

颜晓梅 教授

企业导师姓名: 朱少彬 博士

企业导师单位: 厦门福流生物科技有限公司

专 业 名 称: 化学工程

论文提交日期: 2017 年 月

论文答辩时间: 2017 年 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘要	I
Abstract	III
第一章 绪论	1
1.1 蛋白质的相互作用	1
1.1.1 蛋白质相互作用简介	1
1.1.2 研究蛋白质相互作用的意义	1
1.2 蛋白质相互作用的研究方法	2
1.2.1 生物物理学方法	3
1.2.2 分子生物学方法	8
1.2.3 遗传学的方法	10
1.3 双杂交系统研究蛋白质的相互作用	10
1.3.1 酵母双杂交系统	10
1.3.2 细菌双杂交系统 (BACTH)	13
1.4 超高灵敏流式检测技术在生化分析中的应用	16
1.4.1 流式细胞术简介及应用	16
1.4.2 超高灵敏流式检测装置简介	18
1.4.3 超高灵敏流式检测仪在生化分析中的应用	19
1.5 本论文的选题思路以及研究内容	20
1.6 参考文献	22
第二章 串联表达载体的构建	33
2.1 引言	33
2.2 实验部分	34
2.2.1 仪器与设备	34
2.2.2 材料与试剂	35
2.2.3 实验方法	38
2.3 实验结果与讨论	48
2.3.1 单质粒型相互作用蛋白对的构建	48

2.3.2 蛋白质相互作用的检测.....	53
2.4 本章小结	57
2.5 参考文献	58
第三章 单细菌水平蛋白相互作用 HSFCM 检测方法的建立 ...	66
3.1 引言	66
3.2 实验部分	67
3.2.1 仪器与设备.....	67
3.2.2 材料与试剂.....	69
3.2.3 实验方法.....	70
3.3 实验结果与讨论	71
3.3.1 改进型细菌双杂交系统中 GFP 的 HSFCM 检测原理.....	71
3.3.2 HSFCM 检测阴性对照组的本底表达	73
3.3.3 采用 HSFCM 单细菌水平上检测蛋白相互作用的可行性考察	73
3.3.4 GFP 表达条件的优化	76
3.3.5 表达比例相关问题的研究.....	81
3.4 本章小结	82
3.5 参考文献	83
第四章 单细菌水平蛋白相互作用 HSFCM 检测方法的应用 ...	85
4.1 引言	85
4.2 实验部分	87
4.2.1 仪器与设备.....	87
4.2.2 材料与试剂.....	87
4.2.3 实验方法.....	89
4.3 实验结果与讨论	89
4.3.1 荧光显微镜检测 GFP 的表达	89
4.3.2 不同单菌落荧光信号之间的关系.....	91
4.3.3 突变型与野生型表达比例之间的关系.....	92
4.3.4 不同相互作用强度蛋白对的对比.....	97
4.4 本章小结	98

4.5 参考文献	98
第五章 总结与展望	101
5.1 总结	101
5.2 展望	102
在校期间发表论文	104
致谢.....	105

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract (In Chinese) I

Abstract(In English) III

Chapter 1. Preface1

1.1 Protein interactions.....1

 1.1.1 Introduction of protein interactions 1

 1.1.2 The significance of research on protein interactions 1

1.2 Research methods2

 1.2.1 Biophysical methods3

 1.2.2 Molecular biology methods8

 1.2.3 Genetics methods 10

1.3 Two-hybrid system for studying protein-protein interactions.....10

 1.3.1 Yeast two-hybrid system 10

 1.3.2 Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System (BACTH) ..13

1.4 Applications of HSFCM in biochemical analysis16

 1.4.1 Introduction and application of flow cytometry 16

 1.4.2 Introduction of HSFCM..... 18

 1.4.3 Applications of HSFCM in biochemical analysis 19

1.5 Objective and main contents of this dissertation20

1.6 References22

Chapter 2. Construction of tandem expression vector.....33

2.1 Introduction.....33

2.2 Experimental section34

 2.2.1 Instruments and equipments34

 2.2.2 Materials and reagents35

 2.2.3 Experiment methods38

2.3 Results and discussion	48
2.3.1 Construction of interaction protein gene in the same plasmid.....	48
2.3.2 Detection of protein interactions.....	53
2.4 Conclusion	57
2.5 References	58
Chapter 3. Establishment of HSFCM detection method for single bacterial cell level protein interaction.....	66
3.1 Introduction.....	66
3.2 Experimental section	67
3.2.1 Instruments and equipments	67
3.2.2 Materials and reagents	69
3.2.3 Experimental methods	70
3.3 Results and discussion	71
3.3.1 HSFCM Detection Principle of the improved BACTH.....	71
3.3.2 The background expression of the negative control group.....	73
3.3.3 Feasibility of studying on protein interactions by HSFCM at single bacteria.....	73
3.3.4 Optimization of GFP expression conditions	76
3.3.5 Study on the correlation of expression.....	81
3.4 Conclusion	82
3.5 References.....	83
Chapter 4. Application of HSFCM detection method for protein interaction analysis	85
4.1 Introduction.....	85
4.2 Experimental section	87
4.2.1 Instruments and equipments	87
4.2.2 Materials and reagents	87
4.2.3 Experimental methods.....	89

4.3 Results and discussion	89
4.3.1 The expression of GFP was detected by fluorescence microscopy	89
4.3.2 The relationship between different single colony fluorescence signals	91
4.3.3 The relationship between mutant and wild-type expression ratios	92
4.3.4 Comparison of protein pairs with different interaction levels	97
4.4 Conclusion	98
4.5 References	98
Chapter 5. Summary and prospects.....	101
5.1 Summary.....	101
5.2 Prospects	102
Publications	104
Acknowledgements	105

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

蛋白质相互作用伴随着生命活动的整个过程, 是任何生命体结构和生命活动的基础。研究蛋白的相互作用有助于蛋白质功能的分析、相互作用网络的构建以及药物的开发等问题的解决。人们通常采用免疫共沉淀法、表面等离子体共振法以及荧光共振能量转移等方法研究蛋白的相互作用, 然而这些方法通常在体外进行试验, 需要对蛋白质进行提取、纯化等繁琐步骤, 在一定程度上影响了蛋白的正常生理状态, 不能反映蛋白的真实情况。近年来随着生物技术的发展, 酵母双杂交系统得到了广大研究者的青睐, 该系统采用分子生物学的方法将所需研究的蛋白质基因片段构建到相应的质粒中, 蛋白质在细胞内表达, 通过相互作用激发报告基因的转录表达, 进而通过分析报告基因来判断蛋白的相互作用。然而该方法存在试验周期长、假阳性率高等缺点。在此基础上, 人们开发了一种基于腺苷酸环化酶重构的细菌双杂交 (Bacterial adenylate cyclase-based two hybrid, BACTH) 系统, 该系统与酵母双杂交系统相比具有不需要所研究的蛋白定位于细胞核、实验周期短、假阳性率低等优点。该系统用于研究蛋白的相互作用具有较大的优势, 然而现有的检测方法, 只能对蛋白的相互作用进行定性分析, 无法做到定量检测, 而且这些方法均是基于大量细胞的集权平均得出的检测结果, 无法区分细胞之间的异质性。超高灵敏流式检测装置 (High sensitivity flow cytometry, HSFCM) 能在单颗粒水平上对细胞进行快速、多参数、定量的分析, 结合绿色荧光蛋白 (GFP) 报告因子无需进行细胞膜处理, 以及抗体孵育等繁琐步骤, 且具有荧光稳定、无毒害、共用性和通用性强且可以直接检测等特点, 本论文发展了一种基于 BACTH 系统, 单细菌水平上高通量、快速的检测蛋白质相互作用的新方法。

论文第一章为文献综述。主要对蛋白质相互作用的意義和主要研究方法进行介绍, 并着重介绍了酵母双杂交系统和 BACTH 系统。明确了 BACTH 系统研究蛋白相互作用的优势, 在本章末尾介绍了超高灵敏流式检测装置及其在生化分析中的应用。

论文第二章为串联表达载体的构建, 为了往 BACTH 系统引入含有报告基因 *gfp* 的质粒 pTW2, 需将一对相互作用蛋白的基因构建在同一个质粒上, 以与细

菌外膜稳定性相关的蛋白对 Pal 和 TolB 以及 TolB 的两个突变体 TolB Δ^{22-25} 和 TolB Δ^{22-33} 为研究对象, 将 *pal* 构建到质粒 pKT25-His-*tolB*、pKT25-His-*tolB* Δ^{22-25} 以及 pKT25-His-*tolB* Δ^{22-33} 的 *Xho* I 酶切位点中, 然后将构建好的质粒转入到报告细菌 *E.coli* BTH101 感受态细胞中, 通过测定 β -半乳糖苷酶酶活的方法判断相互作用蛋白对的表达。

论文第三章以质粒 pKT25-*zip-lac-T18-*zip** 为研究对象, 将其与质粒 pTW2 共转到报告细菌 *E.coli* BTH101 感受态细胞中, 通过 Zip-Zip 的相互作用, 能够激发报告基因 *gfp* 的表达, 结合超高灵敏流式检测装置 (High sensitivity flow cytometry, HSFCM) 建立了单细菌水平检测绿色荧光强度的超高灵敏分析法, GFP 可以在液体培养中检测分析, 且检测灵敏度很高, 很大程度提高了实验的准确性, 大大的降低了假阳性率。

第四章主要采用第三章中建立的检测改进型 BACTH 系统的方法, 检测不同相互作用强度的蛋白对, 选择构建好的单质粒型串联表达载体 pKT25-His-*tolB-lac-T18-pal* 和 pKT25-His-*tolB* Δ^{22-33} -*lac-T18-pal*, 研究同一体系中不同单菌落之间的关系, 以及不同相互作用强度的蛋白对之间的关系。

论文第五章为总结和展望。总结了本论文的研究工作和成果, 并对未来进一步的研究工作进行了展望。

关键词: 蛋白质相互作用; BACTH 系统; GFP; 单细菌水平; 超高灵敏流式技术。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库