

# GFP 报告因子结合流式细胞术的蛋白-蛋白 相互作用单细菌水平分析

苏柳钦, 张健强, 何盛斌, 吴丽娜\*, 颜晓梅

(厦门大学化学化工学院, 谱学分析与仪器教育部重点实验室,

化学生物学福建省重点实验, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 本文在基于腺苷酸环化酶功能重构的细菌双杂交 (BACTH) 系统中引入 *lac* 启动子控制的 *gfp* 基因作为蛋白质相互作用的报告因子, 采用实验室自行研制的超高灵敏流式检测装置 (HSFCM) 建立了一种单细菌水平简单, 快速, 高通量的蛋白-蛋白相互作用分析新方法。将分别携带有相互作用蛋白对和 *gfp* 报告基因的质粒共转化至报告菌株, 利用 HSFCM 对单个细菌的荧光和散射光同时进行检测。结果表明蛋白-蛋白相互作用激活了 GFP 荧光蛋白的表达, 并存在双稳态现象: 即一部分细菌的 *gfp* 报告基因被激活, 细菌荧光信号明显高于阴性对照组, 而另一部分细菌 *gfp* 报告基因未被激活, 细菌其荧光信号分布与阴性对照组重叠。利用 HSFCM 在单细菌水平对荧光信号强度和表达 GFP 荧光蛋白的细菌比例分析, 能有效的区分表达 *gfp* 报告基因的阳性菌和报告基因未被激活表达的阴性菌, 揭示了细菌个体蛋白的异质性表达。本研究将为相互作用蛋白对的检测及筛选提供一种快速的分析方法。

**关键词:** 蛋白-蛋白相互作用; BACTH 系统; GFP 报告因子; 单细菌水平; 超高灵敏流式检测技术

中图分类号: O 657.3

文献标志码: A

蛋白-蛋白相互作用是细胞生化反应网络的重要组成部分, 参与了各种代谢途径和生理过程<sup>[1,2]</sup>。对蛋白-蛋白相互作用进行分析有助于解析疾病的发生机制, 对药物的设计筛选具有重要指导意义<sup>[3]</sup>。基于腺苷酸环化酶功能重构的细菌双杂交 (BACTH) 系统是蛋白-蛋白相互作用经典技术酵母双杂交 (Y2H) 系统的衍生, 具有实验周期短、转化率高、蛋白无需核定位等优点<sup>[4]</sup>。BACTH系统利用了百日咳博代杆菌中的腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC) 催化域由两个互补片段T25和T18组成的特点, 当T25和T18分别与可发生相互作用的多肽或者蛋白质融合表达时, 嵌合蛋白的二聚化可以导致AC片段功能性的互补以及环腺苷酸

收稿日期: 2018-03-19 录用日期: 2018-04-25

基金项目: 国家自然科学基金(21472158, 21105082, 21225523, 21475112, 216278111)

\* 通信作者: [alina1222@xmu.edu.cn](mailto:alina1222@xmu.edu.cn)

(cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的生成。cAMP与分解代谢激活蛋白 (catabolite activator protein, CAP) 结合, 从而调控报告基因的表达<sup>[5]</sup>。目前, BACTH系统已被广泛应用于特定蛋白对的相互作用鉴定以及蛋白质相互作用文库的筛选<sup>[6, 7]</sup>。在生命医学研究方面, BACTH系统也发挥了重要的作用。Abdelrahim等对细菌VI型分泌系统的收缩鞘中各组件相互作用分析, 揭示其聚合的操纵机制以及内管装配的协调机制<sup>[8]</sup>。Tao等利用BACTH系统对肉毒毒素B进行饱和诱变筛选, 增强工程型肉毒毒素B特异性地靶向人类突触结合蛋白II, 提高了肉毒毒素B对神经性疾病的治疗效果<sup>[9]</sup>。

BACTH系统主要以*lacZ*为报告基因, 对于报告基因所表达的 $\beta$ -半乳糖苷酶, 传统的检测方法主要是通过测定邻-硝基酚- $\beta$ -D-半乳糖苷 (ONPG) 或者4-甲基伞形酮酰- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 (MUG) 这类特异性底物水解产生的分子的吸光度或荧光的变化对酶活性进行检测<sup>[4, 10]</sup>。这类方法得到的是大量细菌中 $\beta$ -半乳糖苷酶表达量及活性的平均结果, 掩盖了细菌个体间 $\beta$ -半乳糖苷酶表达量的差异。在单细菌水平考察 $\beta$ -半乳糖苷酶的表达有利于更好地解析基因表达的随机性、基因调控以及微生物的生理过程, 对深入理解BACTH系统的工作机理从而针对性地改进实验方法也有极大帮助。并且, 单细菌水平的蛋白-蛋白相互作用研究有助于更准确地考察蛋白在细菌介导的活细胞中相互作用的状况, 对于揭示蛋白相互作用相关信号转导的分子机制具有明显优势<sup>[11]</sup>。流式细胞术是一种功能强大的单细胞分析手段, 具有检测速度快、精度高和多参数分析等特点, 已在蛋白质组学和系统生物学中发挥着重要的作用<sup>[12]</sup>。然而, 由于细菌个体微小, 传统的流式细胞仪难以在单个细菌水平对其内部的蛋白质进行定量分析并考察蛋白-蛋白相互作用。结合瑞利散射和鞘流单分子荧光检测技术, 本课题组自行研制的超高灵敏流式检测装置 (HSFCM) 散射光通道可实现粒径为24 nm的二氧化硅纳米颗粒和粒径为7 nm的纳米金颗粒的检测, 荧光通道的检测灵敏度为3个Alexa Fluor 532分子<sup>[13]</sup>, 较传统流式细胞仪的散射和荧光检测灵敏度分别提升4~5个数量级和1~2个数量级, 已被开发应用于细菌生化体系的分析<sup>[14-18]</sup>。

在本课题组的前期研究中, 采用双色免疫荧光染色法对相互作用蛋白和 $\beta$ -半乳糖苷酶同时荧光标记, 并提出相对报告因子表达量 (RRPE) 实现了单细菌水平蛋白-蛋白相互作用定量分析<sup>[19]</sup>。然而免疫荧光标记需要对细菌进行固定、破膜和染色处理, 操作相对复杂。发展一种简单、快速的蛋白-蛋白相互作用检测方法, 将有效推进蛋白质相互作用研究的进展。基于荧光蛋白的分子探针和标记方法已成为活细胞内研究生物大分子或细胞功能的重要手段。荧光蛋白能形成内部发色团, 无需添加任何辅助因子, 不需要对细胞进行处理, 可直接对其荧光表征, 实现天然状态下的细胞生化分析<sup>[20]</sup>。本文引入*lac*启动子控制的*gfp*作为蛋白

质相互作用的报告基因，采用实验室自行研制的超高灵敏流式检测装置（HSFCM）建立了一种单细菌水平简单、快速、高通量的蛋白-蛋白相互作用检测新方法。利用HSFCM在单细菌水平对GFP荧光信号强度和表达GFP荧光蛋白的细菌比例分析，分别考察了培养时间和诱导剂浓度对*gfp*报告基因表达情况的影响，进一步的对不同单菌落*gfp*报告基因表达异质性分析，为相互作用蛋白对的检测及筛选提供了有效的分析手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

菌株：大肠杆菌 *E. coli* ER2738。大肠杆菌 *E. coli* BTH101（基因型：*F*, *cya-99*, *araD139*, *galE15*, *galK16*, *rpsL1*, *hsdR2*, *mcrA1*, *mcrB1*），由法国地中海微生物研究中心 Emmanuelle Bouveret 博士惠赠，为 BACTH 系统的报告菌株。

质粒：pEB354（pKT25-linker）、pEB355（pUT18C-linker）、pEB356（pUT18C-*pal*），以上质粒均由 Emmanuelle Bouveret 博士惠赠。pTW2（含 *lac* 启动子调控的 *gfp* 基因）由中国科学院微生物研究所杨克迁博士惠赠。质粒 pKT25-His-*tolB*、pKT25-*lac*-T18、pKT25-His-*tolB*-*lac*-T18-*pal* 为本课题构建。

#### 1.1.2 试剂

限制性内切酶 *Xho*I、Takara MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0 均购自宝生物工程(大连)有限公司、TransStart FastPfu DNA Polymerase (AP221-01)、5× TransStart FastPfu Buffer、dNTP mixture 均购自北京全式金公司；Seamless Assembly and cloning kit 购自北京艾德莱生物科技有限公司；5-溴-4-氯-3-吡啶-口杂- $\beta$ -D-半乳糖 (X-gal)、异丙基- $\beta$ -D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自上海生工生物工程有限公司；本实验所涉及的引物由上海生工生物工程有限公司合成。本研究所用引物如表 1 所示。

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 The primers used in present study

引物	序列 (5'→3')
lac-T18-F	GCTTATCGATACCGTCGACCATTAATGCAGCTGGCACGAC
lac-T18-R	GTAAAACGACGGCCGAATTGCGGAGCAGACAAGCCCGTCAG

lac-T18-pal-F

GCTTATCGATAACCGTCGACCATTAATGCAGCTGGCACGAC

lac-T18-pal-R

GTAAAACGACGGCCAGTGAATTGCGGAGCAGACAAGCCCGTCAG

### 1.1.3 主要仪器

超净工作台（Airtech公司）；DYCP-31F琼脂糖水平电泳仪（北京六一仪器厂）；SKY 200B小型全温恒温培养摇床（上海苏坤实业有限公司）；DHP-9162电热恒温培养箱（上海一恒科技有限公司）；Beckman低温冷冻离心机Allegra X-15R Centrifuge（美国贝克曼库尔特有限公司）；T100™ Thermal Cycler基因扩增仪（BIO-RAD公司）；IX73型倒置荧光显微镜（Olympus公司）；自行研制的超高灵敏流式检测装置（HSFCM）。

## 1.2 方法

### 1.2.1 质粒的构建

质粒pKT25-lac-T18的构建：以质粒pEB355为模板，用表1中引物lac-T18-F/lac-T18-R扩增基因片段lac-T18，同时，用限制酶XhoI对质粒pEB354进行单酶切，扩增出的基因片段和酶切产物经过琼脂糖凝胶电泳分析后，用Takara MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0试剂盒进行纯化，最后两个片段采用Gibson组装连接<sup>[21]</sup>。

质粒pKT25-His-tolB-lac-T18-pal的构建：以质粒pEB356为模板，用表1中引物lac-T18-pal-F/lac-T18-pal-R扩增基因片段lac-T18-pal，同时，用限制酶XhoI对质粒pKT25-His-tolB进行单酶切，扩增出的基因片段和酶切产物经过琼脂糖凝胶电泳分析后，用Takara MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0试剂盒进行纯化，最后两个片段采用Gibson组装连接<sup>[21]</sup>。

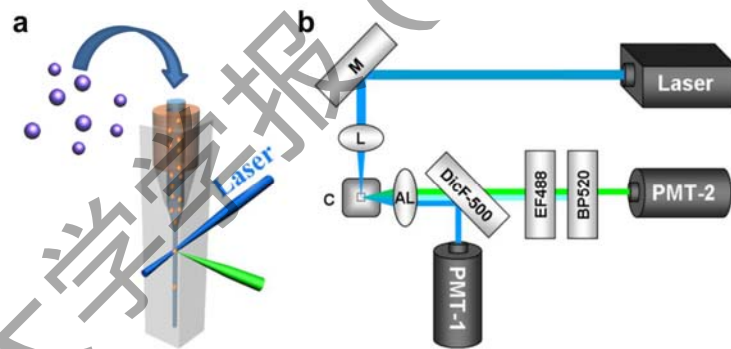
### 1.2.2 细菌样品制备

提取质粒pKT25-lac-T18、pKT25-His-tolB-lac-T18-pal，以*E. coli* BTH101作为报告菌株，按pKT25-lac-T18/pTW2、pKT25-His-tolB-lac-T18-pal/pTW2的组合进行共转化。共转化时两种质粒依次加入，细菌复苏后涂布于含氨苄青霉素和卡那霉素的LB/IPTG/X-gal固体培养基上，于30 °C培养48 h。随后从平板上随机挑取单菌落，接种于LB培养基中，培养22 h。移取50 μL菌液离心，PBS洗涤一次后弃上清，保存于4 °C，待后续检测。

### 1.2.3 单细菌水平*gfp*报告基因表达分析

**HSFCM检测：**将待测样品用PBS调节至 $10^9 \text{ mL}^{-1}$ 后上机检测，同时收集散射光信号和绿色荧光信号（BP 520/35）。所用的HSFCM分为四部分，分别为激光光源和光束形成系统、流动室及液流驱动系统、光路系统（包括各种滤光片、二向色等）以及信号检测、存储、显示和分析系统<sup>[22-24]</sup>。如图1所示，它的工作原理为：分散在溶液中的细菌与溶液一起由氮气驱动进入毛细管，从毛细管流出后，溶液在鞘液作用下被聚焦形成直径很小的液流，保证样品以单个细菌通过激光探测区。激光器发出的488 nm激光经反射镜（M）反射后，被消色差胶合透镜（L）聚焦为直径约 $10 \mu\text{m}$ 的激光光斑，激光光斑与被鞘液流聚焦后的样品流正交于石英流动室（C）的中心处。样品由激光照射后发出的光信号经非球面透镜（AL）收集，被二向色滤光片（DicF-500）分成两束，波长小于500 nm的光信号（散射光）被 $90^\circ$ 反射入第一个光电倍增管中检测（PMT-1），大于500 nm的光信号经过边缘滤光片（EF488）后，经过带通滤光片（BP520/35）滤除杂散光进入第二个光电倍增管（PMT-2）检测。

**荧光显微镜成像：**待检测样品用PBS调节至 $10^{10} \text{ mL}^{-1}$ ，吸取 $10 \mu\text{L}$ 样品于载玻片上，洗耳球吹干后，滴加适量抗荧光猝灭剂，小心盖上盖玻片，并用指甲油将盖玻片固定。然后，在 $100\times$ 放大的油镜上滴加少量Nikon专用镜油，放上制备好的玻片观察。



(a) 为流体动力学聚焦样品流与激光光斑正交于流动室示意图；(b) 为超高灵敏流式检测装置光路图。

图1 实验室自行研制的双通道超高灵敏流式检测装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of the laboratory-built high sensitivity dual-channel flow cytometer (HSFCM)

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛋白质相互作用的HSFCM检测原理

如图2所示，在BACTH-GFP系统中，质粒pKT25-X-lac-T18-Y能同时独立表达融合蛋白T25-X和T18-Y。质粒pTW2中含有一段从大肠杆菌*E. coli* BTH101基因组中截取的*lac*启动子

序列，用以启动下游 $gfp$ 基因的表达<sup>[25]</sup>。将以上两种质粒共转到报告菌株*E. coli* BTH101中，X和Y蛋白表达并相互作用会诱发T25和T18功能性互补继而催化ATP生成cAMP，cAMP与CAP结合，激活 $gfp$ 报告基因的表达，所发出的绿色荧光可以通过HSFCM检测。HSFCM每分钟可以对高至10000个颗粒的信号进行检测，应用HSFCM对单个细菌散射和荧光信号的同时检测可以实现蛋白质相互作用的单细菌水平快速高通量分析。

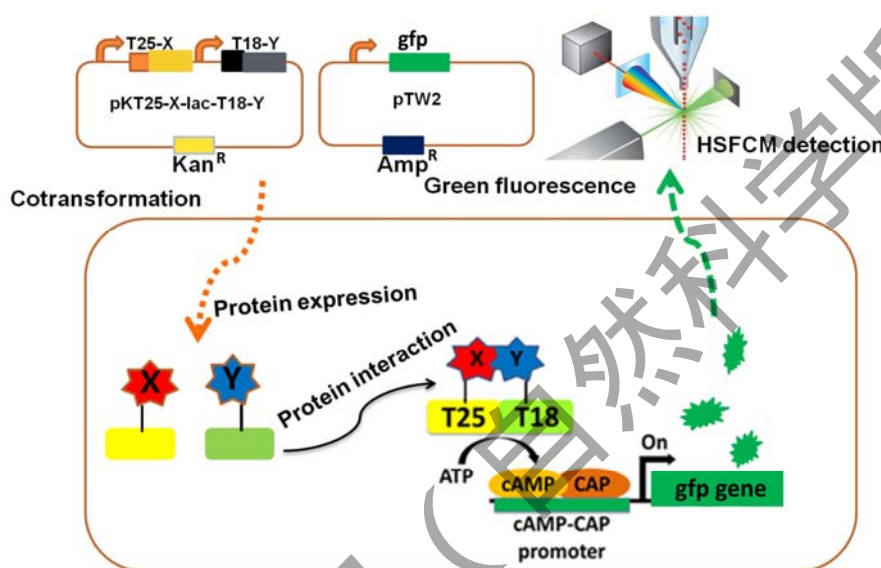


图2 基于 GFP 报告因子蛋白-蛋白相互作用的 HSFCM 检测原理

Fig.2 Schematic of GFP-based reporter system for protein-protein interactions study by HSFCM

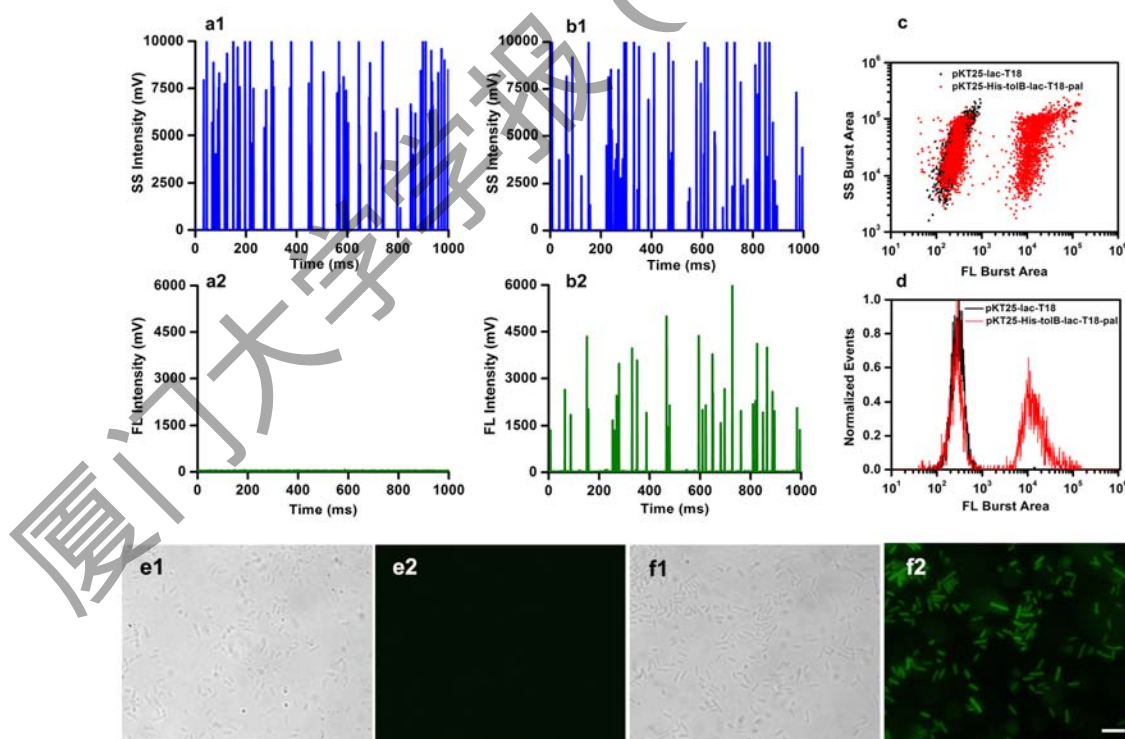
## 2.2 单细菌水平蛋白质相互作用检测方法的建立

Tol-Pal系统是革兰氏阴性细菌高度保守的膜蛋白系统之一，主要由转运蛋白TolB、TolA、TolR、TolQ和脂蛋白Pal之间相互作用组成。其中TolB蛋白和Pal蛋白组成了细菌外膜复合体，它们之间的相互作用对于维持革兰氏阴性菌细胞膜的完整性和稳定性至关重要<sup>[26]</sup>。本研究以Pal和TolB为模型，将它们克隆到双杂交质粒载体上，使它们分别与T18和T25片段融合表达，并以不含相互作用蛋白的质粒pKT25-lac-T18为阴性对照。如图3所示，细菌*E. coli* BTH101 pKT25-lac-T18/pTW2经过22 h培养后在绿色荧光检测通道只有微弱的背景荧光信号（a2），不含相互作用蛋白的细菌无法激活 $gfp$ 报告基因表达。而*E. coli* BTH101 pKT25-His-tolB-lac-T18-pal/pTW2在绿色荧光通道有强的荧光信号（b2），但是发现荧光信号与散射信号并非一一对应，部分细菌只有散射信号。根据两者的散射信号与荧光信号峰面积



的二维散点图 (c) 以及荧光信号峰面积统计分布直方图 (d), 可以发现实验组样品在荧光通道分成了两群: 66.1%的细菌荧光信号明显高于阴性对照组, 蛋白相互作用激活了GFP荧光蛋白表达; 另外33.9%的细菌其荧光信号分布与阴性对照组样品重叠, 这部分细菌*gfp*报告基因未被激活。造成这一现象的可能原因: 在BACTH系统中相互作用蛋白和报告基因的表达都受乳糖操纵子的调控, 蛋白发生相互作用后生成cAMP, cAMP激活报告基因表达, 生成的cAMP同样也能激活相互作用蛋白的表达<sup>[4]</sup>。所以, 相互作用蛋白的表达、cAMP的生成、报告基因的表达形成了复杂的正反馈调节系统造成了BATCH系统报告因子的异质性表达, 部分细菌被完全激活而高表达蛋白, 另外部分细菌未被激活只有本底表达<sup>[19]</sup>。这种蛋白表达的差异容易被集权平均的检测方法所掩盖, 因此, 需要从单细菌水平分析才能揭示BACTH系统中蛋白表达存在的这种双稳态现象, 更准确的分析蛋白质之间的相互作用。

采用荧光显微镜进一步对 *gfp* 报告的蛋白相互作用进行表征。如图 3 所示, (e1) 和 (f1) 分别为 *E.coli* BTH101 pKT25-lac-T18/pTW2 和 *E.coli* BTH101 pKT25-His-tolB-lac-T18-pal/pTW2 的明场视野, 在荧光场视野下只有 *E.coli* BTH101 pKT25-His-tolB-lac-T18-pal/pTW2 可以观察到菌体发出明亮的荧光(f2)。对比明场下的细菌, 可发现仍有部分细菌没有荧光, 显微镜观察到的现象与 HSFCM 检测结果相一致。



(a1) 和 (a2) 分别为 *E.coli* BTH101 pKT25-lac-T18/pTW2 的散射信号和 GFP 荧光信号的代表性脉冲信号图; (b1) 和 (b2) 分别为 *E.coli* BTH101 pKT25-His-tolB-lac-T18-pal/pTW2 的散射信号和 GFP 荧光信号的代表性脉冲信号图; (c) 为 *E.coli* BTH101 pKT25-lac-T18/pTW2 和 *E.coli* BTH101

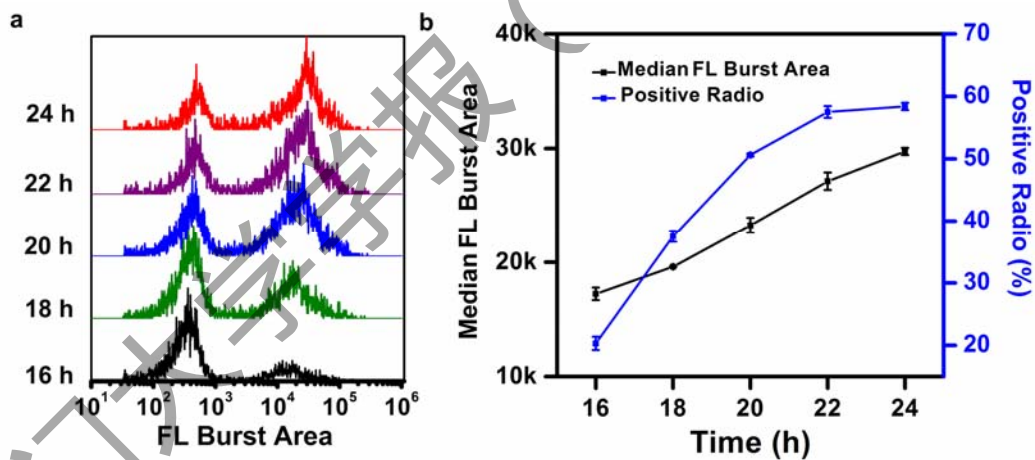
pKT25-His-*tolB*-lac-T18-*pal*/pTW2 的散射信号与荧光信号峰面积的二维散点图；(d) 为 *E. coli* BTH101 pKT25-lac-T18/pTW2 和 *E. coli* BTH101 pKT25-His-*tolB*-lac-T18-*pal*/pTW2 的荧光信号峰面积统计分布直方图；(e1) 和 (e2) 分别为 *E. coli* BTH101 pKT25-lac-T18/pTW2 显微镜成像的明场和荧光场；(f1) 和 (f2) 分别为 *E. coli* BTH101 pKT25-His-*tolB*-lac-T18-*pal*/pTW2 显微镜成像的明场和荧光场，标尺为 5  $\mu\text{m}$ 。

图3 单细菌水平 *gfp* 报告基因表达分析

Fig.3 Analysis of the expression of GFP reporter protein at single-cell level

### 2.3 培养时间对GFP荧光蛋白表达的影响

为考察不同培养时间下 BATCH-GFP 系统报告因子表达量的变化。随机挑取共转化后在相应抗性筛选平板上形成的单菌落于 LB 培养基中培养 16 h 后，每隔 2 h 取样分析。如图 4 所示，随着培养时间的增加，表达 GFP 荧光蛋白的细菌比例逐渐增加（从 16 h 的 20.3% 升高至 24 h 的 58.4%），这部分细菌的荧光信号中位值也随培养时间增加逐渐递增（从 16 h 的 17 224.5 增加到 24 h 的 29 740.6），说明单个细菌 GFP 荧光蛋白表达量随培养时间的增加不断提高。当培养时间达到 22 h 之后，表达蛋白的细菌比例以及单个细菌蛋白表达量逐渐趋于稳定，因此选择培养 22 h 的细菌进行 HSFCM 检测。



(a) 为 *E. coli* BTH101 pKT25-His-*tolB*-lac-T18-*pal*/pTW2 在不同培养时间下荧光信号峰面积统计分布直方图；(b) 为 *E. coli* BTH101 pKT25-His-*tolB*-lac-T18-*pal*/pTW2 在不同培养时间下表达 GFP 荧光蛋白阳性

菌的荧光信号强度中位值和表达蛋白的阳性菌所占比例做折线图。

图4 培养时间对GFP荧光蛋白表达的影响

Fig.4 Influence to the expression of GFP reporter protein in response to cultivation times



## 2.4 IPTG对GFP荧光蛋白表达的影响

在BACTH系统中报告基因的表达受乳糖操纵子的调控，而乳糖操纵子存在正负调控机制。cAMP-CAP是一个重要的正调控物质，cAMP-CAP与操纵子上的启动区结合，激活下游基因转录。另外，乳糖操纵子也受*lacI*基因编码的阻遏蛋白的负调控，阻遏蛋白通过与操纵子结合，阻止RNA聚合酶起始转录下游基因。当向体系中加入诱导剂时，诱导剂会优先与阻遏蛋白结合，使其结构发生变化，不再与操纵子上的DNA序列相结合，从而使RNA聚合酶能够起始转录下游基因<sup>[27]</sup>。异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷（IPTG）是一种作用极强的乳糖操纵子诱导剂，不被细菌代谢且性质稳定，被广泛应用于诱导 $\beta$ -半乳糖苷酶的表达。因此，考察了IPTG不同浓度诱导下，*gfp*报告基因的表达情况。分别用0, 50, 200, 500  $\mu\text{mol/L}$ 的IPTG对*E.coli* BTH101 pKT25-His-*tolB-lac-T18-pal*/pTW2进行诱导培养，测定培养16, 18, 20, 22, 24 h的细菌GFP荧光蛋白表达情况。如图5所示，随着培养时间的增加，表达GFP荧光蛋白的阳性菌的荧光信号不断增加，然而在同一培养时间下，不同浓度的IPTG对*gfp*报告基因的表达几乎没有影响。这可能是由于*E.coli* BTH101基因组中*lacI*基因表达的阻遏蛋白量较少，引入的多拷贝质粒中的*lac*启动子削弱了阻遏蛋白的负调节作用，导致IPTG无法发挥诱导作用<sup>[28]</sup>。

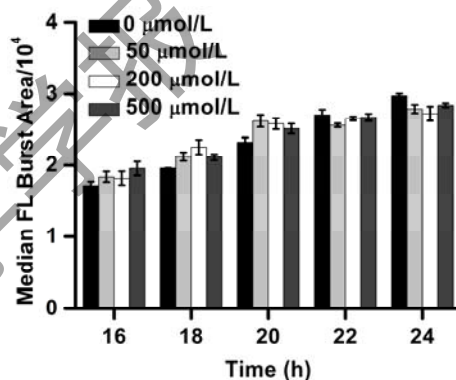


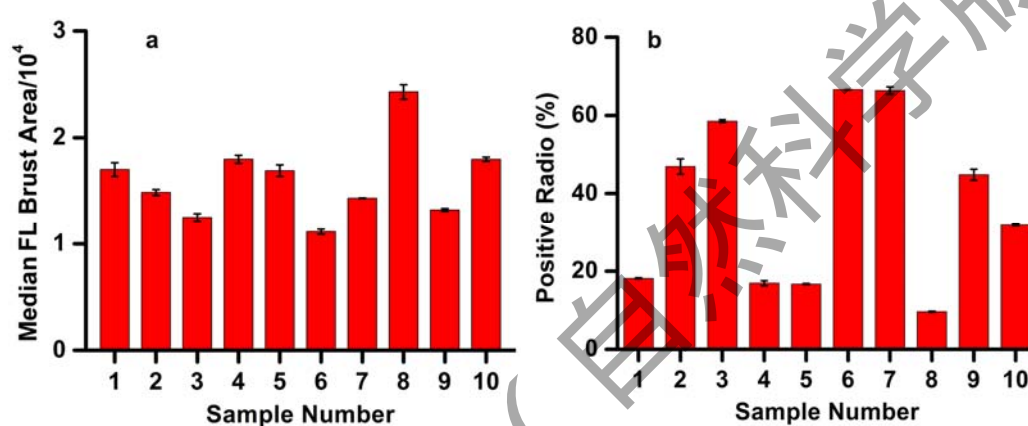
图5 在不同培养时间及不同IPTG浓度作用下表达GFP荧光蛋白阳性菌的荧光信号强度中位值

Fig. 5 The median fluorescence intensities of positive cells with expression of GFP reporter protein induced with various concentrations of IPTG for different cultivation time

## 2.5 不同单菌落*gfp*报告基因表达异质性分析

随机挑取了10个共转化后在相应抗性筛选平板上形成的单菌落，扩大培养22 h后采用HSFCM对细菌GFP荧光蛋白表达情况进行分析。如图6所示，不同单菌落培养得到的菌液中表达GFP荧光蛋白的阳性菌之间表现出较大的荧光信号强度差异（a），且表达GFP荧光

蛋白的细菌比例也呈现明显的差别 (b), 它们的平均值分别为  $16\ 022.9 \pm 3\ 742.8$  和  $(37.5 \pm 21.9)\%$ , 各自的变异系数为 23.4% 和 58.1%。这种异质性现象是由于细菌内质粒拷贝数不同导致蛋白表达量存在较大的差异, 这些差异随着细菌的增殖被逐渐的放大, 最终导致单菌落之间蛋白表达的异质性<sup>[4]</sup>。此外, 在 BACTH 系统中, 双稳态现象也会造成单菌落之间蛋白表达的巨大差异。传统表征方法获得的是众多细菌蛋白表达集权平均的结果, 掩盖了个体蛋白表达的异质性, 基于 *gfp* 报告基因结合超高灵敏流式检测技术建立的研究方法在单细菌水平分析, 真实地反映了报告基因的表达水平以及表达 GFP 荧光蛋白的细菌所占的比例, 为蛋白质相互作用研究提供了更加直观准确的分析方法。



(a) 为不同单菌落表达GFP荧光蛋白的阳性菌荧光信号强度中位值做柱状图; (b) 为不同单菌落表达GFP荧光蛋白的细菌比例做柱状图。

图6 不同单菌落*gfp*报告基因表达异质性分析

Fig.6 Heterogeneity analysis of the expression of GFP reporter protein among different colonies

### 3 结论

本文引入*lac*启动子控制的*gfp*作为蛋白质相互作用的报告基因, 采用实验室自行研制的超高灵敏流式检测装置建立了一种单细菌水平高通量、快速的蛋白-蛋白相互作用分析新方法。实验结果表明: 蛋白-蛋白相互作用激活了GFP荧光蛋白的表达, 并存在双稳态现象。单细菌水平的HSFCM分析真实的反映了蛋白质相互作用报告基因的表达水平以及表达GFP荧光蛋白的细菌所占的比例, 相对传统集权平均的表征方法更准确, 简单。基于该方法, 本研究发现不同单菌落GFP荧光蛋白表达量和表达蛋白的细菌比例都存在较大的异质性。以上结果表明建立的单细菌水平BATCH-GFP分析方法能够揭示蛋白质相互作用报告因子表达的个体差异, 有效的区分表达*gfp*报告基因的阳性菌和报告基因未被激活表达的阴性菌, 为相互作用蛋白对的检测及筛选提供了有效的分析手段, 将有助于对蛋白质结构和功能的解析。

## 参考文献:

- [1] KLINGSTROM T, PLEWCZYNSKI D. Protein-protein interaction and pathway databases, a graphical review[J]. *Brief Bioinform*, 2011, 12(6): 702-713.
- [2] WANG B, JIE Z, JOO D, et al. TRAF2 and OTUD7B govern a ubiquitin-dependent switch that regulates mTORC2 signalling[J]. *Nature*, 2017, 545(7654): 365-369.
- [3] MODELL A E, BLOSSER S L, ARORA P S. Systematic Targeting of Protein-Protein Interactions[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, 37(8): 702-713.
- [4] BATTESTI A, BOUVERET E. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*[J]. *Methods*, 2012, 58(4): 325-334.
- [5] KARIMOVA G, PIDOUX J, ULLMANN A, et al. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(10): 5752.
- [6] GAULIARD E, OUELLETTE S P, RUEDEN K J, et al. Characterization of interactions between inclusion membrane proteins from *Chlamydia trachomatis*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, 5: 13.
- [7] PASCHOS A, DEN HARTIGH A, SMITH M A, et al. An in vivo high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component VirB8 identified inhibitors of *Brucella abortus* 2308 proliferation[J]. *Infect Immun*, 2011, 79(3): 1033-1043.
- [8] ZOUED A, DURAND E, BRUNET Y R, et al. Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure[J]. *Nature*, 2016, 531(7592): 59-63.
- [9] TAO L, PENG L S, BERNTSSON R P, et al. Engineered botulinum neurotoxin B with improved efficacy for targeting human receptors[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 53-63.
- [10] VIDAL-AROCA F, GIANNATTASIO M, BRUNELLI E, et al. One-step high-throughput assay for quantitative detection of beta-galactosidase activity in intact gram-negative bacteria, yeast, and mammalian cells[J]. *Biotechniques*, 2006, 40(4): 433-438.
- [11] TANIGUCHI Y, CHOI P J, LI G W, et al. Quantifying E. coli Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells[J]. *Science*, 2010, 329(5991): 533-538.
- [12] NOLAN J P, YANG L. The flow of cytometry into systems biology[J]. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2007, 6(2): 81-90.
- [13] ZHU S B, MA L, WANG S, et al. Light-Scattering Detection below the Level of Single Fluorescent Molecules for High-Resolution Characterization of Functional Nanoparticles[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(10): 10998-11006.
- [14] HE S B, HONG X Y, HUANG T X, et al. Rapid quantification of live/dead lactic acid bacteria in probiotic products using high-sensitivity flow cytometry[J]. *Methods Appl Fluoresc*, 2017, 5(2): 024002.
- [15] WU L N, SONG Y Y, LUAN T, et al. Specific detection of live *Escherichia coli* O157:H7 using tetracysteine-tagged PP01 bacteriophage[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 102-108.
- [16] HUANG T X, ZHENG Y, YAN Y, et al. Probing minority population of antibiotic-resistant bacteria[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 323-330.
- [17] YU M X, WU L N, HUANG T X, et al. Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Drinking Water and Tea Beverages by a Laboratory-Built High-Sensitivity Flow Cytometer[J]. *Anal Methods*, 2015, 7(7): 3072-3079.
- [18] YANG L L, HUANG T X, ZHU S B, et al. High-throughput single-cell analysis of low copy number  $\beta$ -galactosidase by a laboratory-built high-sensitivity flow cytometer[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 48: 49-55.
- [19] WU L N, WANG X, ZHANG J Q, et al. Flow Cytometric Single-Cell Analysis for Quantitative in Vivo Detection of Protein-Protein Interactions via Relative Reporter Protein Expression Measurement[J]. *Anal Chem*,

2017, 89(5): 2782-2789.

[20] DAN Y, BAIRD M A, ALLEN J R, et al. A naturally monomeric infrared fluorescent protein for protein labeling in vivo[J]. Nat Methods, 2015, 12(8): 763-765.

[21] GIBSON D G, AL E. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 343-347.

[22] 杨玲玲, 朱少彬, 杭纬, 等. 单分子流式检测仪的研制[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(8): 1549-1551.

[23] YANG L L, ZHU S B, HANG W, et al. Development of an ultrasensitive dual-channel flow cytometer for the individual analysis of nanosized particles and biomolecules[J]. Anal Chem, 2009, 81(7): 2555-2563.

[24] ZHU S B, YANG L L, LONG Y, et al. Size Differentiation and Absolute Quantification of Gold Nanoparticles via Single Particle Detection with a Laboratory-Built High-Sensitivity Flow Cytometer[J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(35): 12176-12179.

[25] 王俊阳, 王为善, 赵华, 等. 细菌双杂交系统的改进[J]. 生物工程学报, 2016, 32(2): 231-240.

[26] BONSOR D A, GRISHKOVSKAYA I, DODSON E J, et al. Molecular mimicry enables competitive recruitment by a natively disordered protein[J]. J Am Chem Soc, 2007, 129(15): 4800-4807.

[27] SETTY Y, MAYO A E, SURETTE M G, et al. Detailed map of a cis-regulatory input function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(13): 7702-7707.

[28] STARK M J. Multicopy expression vectors carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli*[J]. Gene, 1987, 51(2-3): 255-267.

# A GFP-based Reporter System for Studying Protein-protein Interactions at the Single-cell Level by Flow Cytometry

SU Liuqin, ZHANG Jianqiang, HE Shengbin, WU Lina\*, YAN Xiaomei

(Key Laboratory of Spectrochemical Analysis & Instrumentation, Ministry of Education, The Key

Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and Chemical

Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** An analytical method for protein-protein interactions was developed by coupling a GFP reporter based BACTH system with flow cytometry. In this method, *E. coli* BTH101 was co-transformed with two compatible plasmids containing the interacting protein pair and the *gfp* gene, respectively. The GFP expression of the bacteria was determined by using a laboratory-built high sensitivity flow cytometer (HSFCM) through side scattering (SSC) and fluorescence (FL) analysis. Thus, the population heterogeneity of the bacteria can be revealed through high

throughput single-cell analysis. It is found that a fraction of the bacterial cell population highly express GFP (GFP+), whereas the remainder of the cells do not. The proportion of GFP+ population and their FL intensity are believed to be related to the association constant of the two proteins (pal-tolB). Hence, the flow cytometric assay may provide a powerful analytical tool for the screen of interacting protein pairs, and identify the binding sites in protein-protein interactions.

**Key words:** protein-protein interaction; the BACTH system; GFP; single-bacteria analysis; high sensitivity flow cytometry

厦门大学学报（自然科学版）