

专题译述

Worthy Issues

新型蛋白标签概述

前言

protein tag

蛋

白标签 (protein tag) 是指利用DNA体外重组技术, 与目的蛋白一起融合表达的一种多肽或者蛋白, 以便于目的蛋白的表达、检测、示踪和纯化等。随着技术的不断发展, 研究人员相继开发出了具有各种不同功能的蛋白标签。目前, 这些蛋白标签已在基础研究和商业化产品生产等方面得到了广泛的应用。尤其近年来, 科研领域及商业领域涌现出了多种新型的多功能蛋白标签。

本文将主要讨论新型的多功能蛋白标签。

一、新型蛋白标签

蛋白标签应用极为广泛, 但仍有两个问题不容忽视: (1) 蛋白标签以DNA形式编码, 它需要转录并翻译成蛋白后才能发挥作用, 而这种作用方式本身就是一种缺陷。例如, 常用的荧光蛋白标签, 在显微镜下观察时, 其显像不如人工合成的荧光基因好, 但是这种人工合成的荧光基因却无法通过遗传学操作与目的蛋白进行融合表达; (2) 每一种标签一般只适用于一种用途, 蛋白的纯化、检测、定位等往往需要不同的蛋白标签。对此问题有一种解决办法, 那就是开发一种标签, 使其再与各种人工合成的“二级标签”结合, 例如荧光基因或亲和基团等等, 以实现多种不同的应用。

特约编辑: 李华平

李华平, 男, 博士; 研究方向: 生化与分子生物学

现在已经出现了多种新型蛋白标签，它们都可以与一系列人工合成的配体形成共价键。这些配体包含两种关键结构：（1）反应连接体，即一个蛋白标签反应连接部位，其作用是启动与蛋白标签的共价键的形成；（2）功能报告体，即一个功能报告基团，如荧光染料或亲和反应基团等，通过不同的功能报告基团这种“二级标签”形式，以实现不同的功能（图1）。

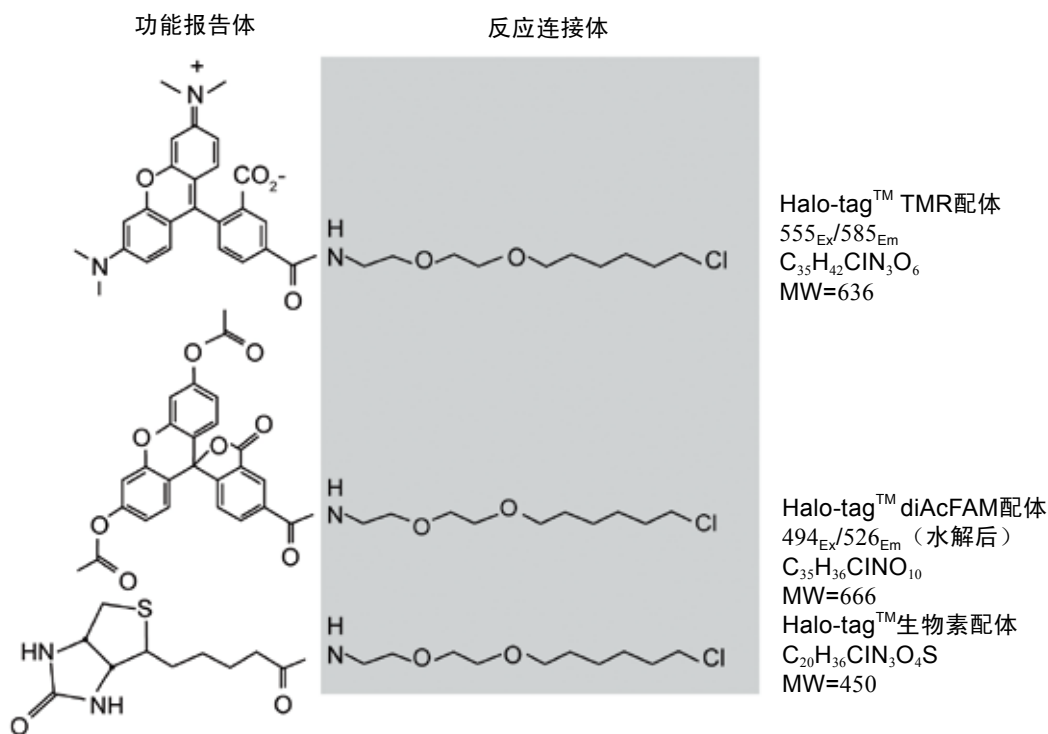


图1 Halo-tag™的配体结构。所有Halo-tag™的配体都具有共同的反应连接体结构，以实现与标签的共价键结合；另外，还有功能报告体，实现不同的功能。图片显示Halo-tag™ TMR配体、Halo-tag™ diAcFAM配体以及Halo-tag™生物素配体的结构。

图片来源：www.promega.com

随着这类新型蛋白标签及其相应配体的出现，研究人员可选择具有不同荧光的配体对胞内蛋白进行特异性标记。因此，活细胞内的世界逐渐变得更为清晰和丰富多彩；而且与其它标签技术同时使用，可以同时两个或两个以上的不同蛋白进行标记，从而实现可视化监测。此外，新型蛋白标签的出现，还有助于人们鉴别某一活细胞内的新老蛋白。

接下来，本专题主要介绍几种常用的新型蛋白标签：SNAP-tag™、CLIP-tag™、ACP-tag™、MCP-tag™以及Halo-tag™。

1. SNAP-tag™——一种新型的自我标记标签蛋白

1.1 SNAP-tag™简介

O6-鸟嘌呤烷基-DNA烷基转移酶（O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, AGT）是一种核蛋白，它通过把烷基化DNA链上鸟嘌呤O6-位的烷基转移至自身活性中心的半胱氨酸上，来行使DNA修复功能。严格来讲，AGT不算是一种酶，因为在生理条件下，转移反应只能进行一次，且不可逆。洛桑理工学院（Ecole

Polytechnique Fédérale de Lausanne) Kai Johnsson博士科研小组发现, AGT可以特异性并快速地与苯甲基鸟嘌呤 (benzylguanine, BG) 衍生物发生反应, 以共价键结合。随后, 通过对AGT进行突变改造, 研究人员获得了一种不与DNA链上的鸟嘌呤进行反应的蛋白, 该蛋白不再定位于细胞核中, 但与小分子BG衍生物的亲和力却大大提高, 而且只有22kDa大小。现在, 研究人员赋予了它一个广为人们接受的名字——SNAP-tag™。

1.1.1 SNAP-tag™的优点

SNAP-tag™无论在体内还是体外都可以特异性并快速与其配体, 即BG衍生物发生特异性反应, 以共价键结合。由于BG可带各种不同的其它化学基团, 如生物素、荧光素 (fluorescein)、若丹明 (rhodamine) 等, 从而实现一种标签蛋白可以被多种配体标记, 是一种具有革命性意义的自我标记蛋白标签。

SNAP-tag™大小为22kDa, 在很多常见表达系统中都能够良好表达。目前为止, 已有相当数量和种类的蛋白质作为N末端和C末端SNAP-tag™融合蛋白被成功表达出来。SNAP-tag™在蛋白质标记中具有三大优势 (表1), 可以广泛应用于蛋白标签的各个应用领域, 是一种非常理想的蛋白标签。此外, 反应的基本原理决定了SNAP-tag™具有三大优点 (表2)。

表1 SNAP-tag™在蛋白标记中的三大优势

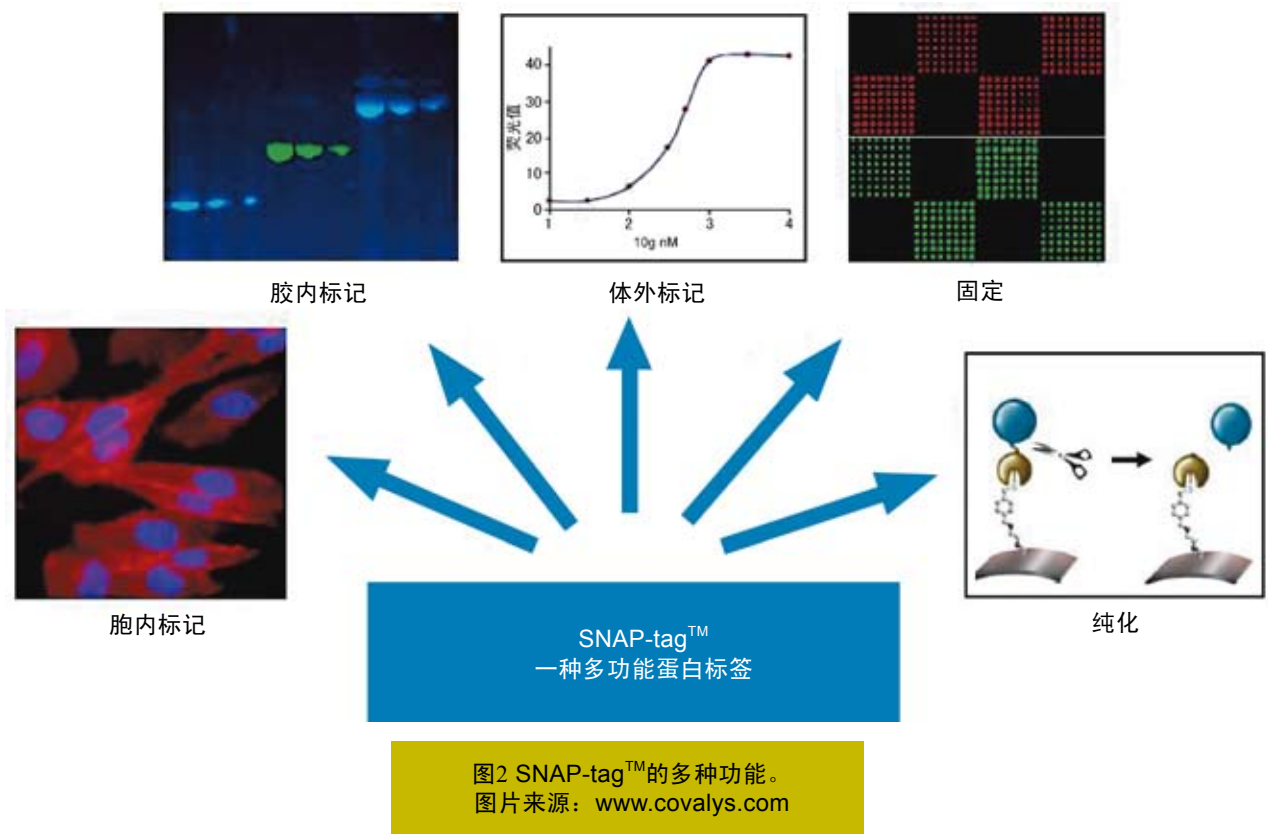
优势	详细内容
一个标签, 多种标记	免去了构建融合蛋白的繁复操作流程;
实验环境多样化	可以在活细胞或除去细胞的混合物中进行蛋白标记, 然后在SDS-PAGE胶上直接检测;
实验进展可实时监测	可以依据自身实验要求添加探针, 进行脉冲追踪成像监测。

表2 SNAP-tag™在反应过程中的三大优点

优点	详细内容
高稳定性	SNAP-tag™对侧面基团替代的苯甲基鸟嘌呤进行剪切, 将替代性的苯甲基基团转移至其活性位点并释放出自由鸟嘌呤, 如此获得的硫醚键具有高稳定性;
高特异性	因为苯甲基鸟嘌呤在生化环境中十分稳定, 而且没有其它蛋白质会与此类物质发生反应, 因此这种自我标记反应具有很高的特异性;
标记的多样性	SNAP-tag™对于可以连接的化合物的性质, 没有严格的限制, 即SNAP-tag™与苯甲基鸟嘌呤衍生物之间的结合反应不受苯甲基鸟嘌呤是具有哪种“二级标签”的影响。因此, SNAP-tag™可以有多种配体, 从而轻松实现了标记的多样性。

1.1.2 SNAP-tag™功能

SNAP-tag™功能多样, 可以应用于各种不同的研究, 主要包括: 可在活细胞或细胞提取物中快速标记融合蛋白; 可将蛋白质共价固定于固相介质表面, 而无需进行之前的纯化工作; 可与蛋白酶配合, 在把融合蛋白固定化后, 纯化目的蛋白, 捕获蛋白复合物; 可直接在SDS-PAGE胶中检测SNAP-tag™融合蛋白 (图2)。



1.2 SNAP-tag™技术原理

1.2.1 SNAP-tag™自我标记反应

通过SNAP-tag™ (图3所示土黄色) 与底物——苯甲基鸟嘌呤的特异性作用实现标记过程。SNAP-tag™所带的活性巯基位点接受了苯甲基鸟嘌呤所携带的侧链苯甲基基团, 释放出了鸟嘌呤。这种新型硫醚键共价结合使SNAP-tag™所携带的目标蛋白 (图3所示蓝色) 间接携带上了苯甲基基团所带的标记物 (图3所示绿色)。

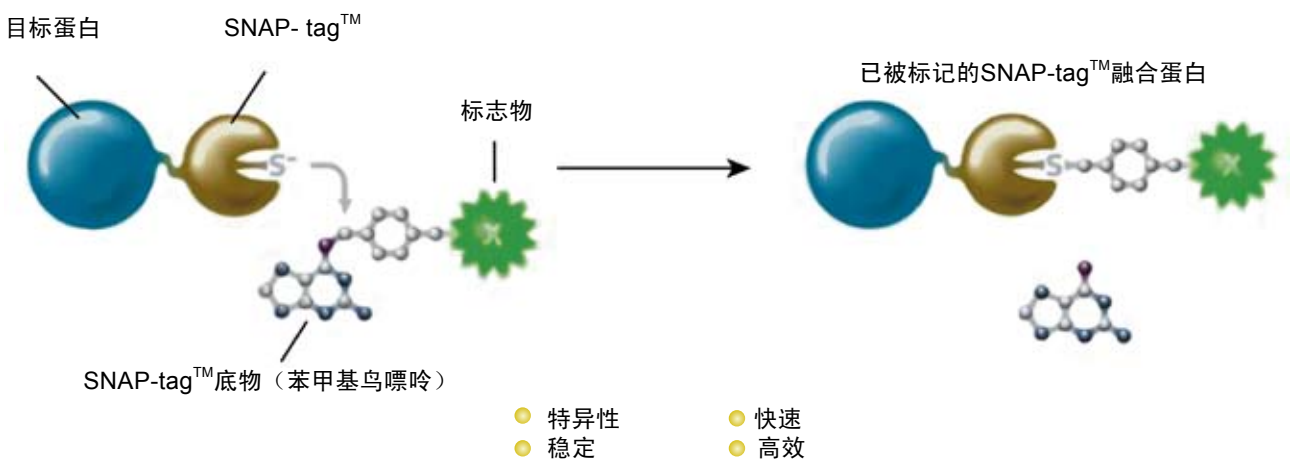


图3 SNAP-tag™自我标记反应。
图片来源: www.covalys.com

1.2.2 SNAP-tagTM融合蛋白快速固相化反应

SNAP-tagTM的底物——苯甲基鸟嘌呤，可事先固定在基质表面（图4所示褐色），然后混合提取液中的融合蛋白——SNAP-tagTM融合蛋白即可特异性地与底物作用，形成共价键，从而使得融合蛋白间接固定在基质表面。SNAP-tagTM融合蛋白快速固相化反应能快速固化蛋白，而无需纯化。

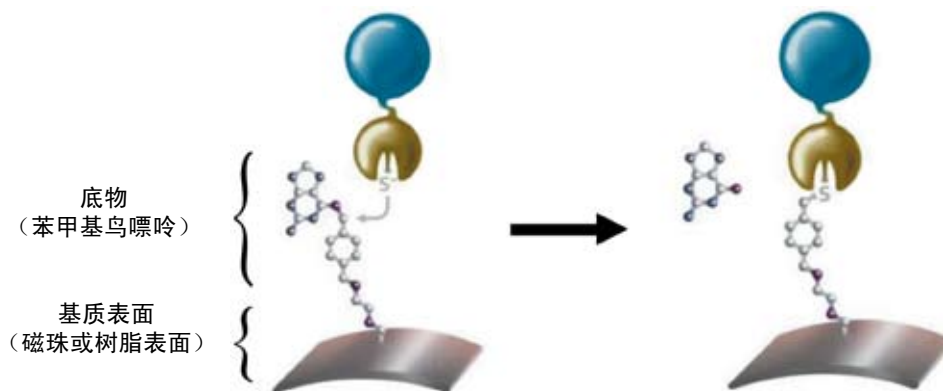


图4 SNAP-tagTM自我固定反应。
图片来源: www.covalys.com

1.3 SNAP-tagTM的配体

在与底物发生反应的过程中，SNAP-tagTM的活性半胱氨酸和O6替代性鸟嘌呤之间形成了稳定的硫醚键。每一个SNAP-tagTM只与单个底物分子反应一次，SNAP-tagTM可与相当多种类的底物作用，不同的配体可以实现不同的功能和应用（表3）。

表3 SNAP-tagTM的配体及其功能

配体名称	功能
荧光配体	苯甲基鸟嘌呤带有不同荧光基团，可产生从300~800nm不同波长的荧光（图5），可在溶液中或者活细胞中特异性标记SNAP-tag TM 融合蛋白；
生物素标记的配体（BG-Biotin）	苯甲基鸟嘌呤与生物素共价标记，可灵活地用于现有的Streptavidin-Biotin技术；
阻碍配体（Blocking liangd）	非可逆地阻碍SNAP-tag TM 的活性；
捕获配体	是用苯甲基鸟嘌呤偶联于磁珠或者琼脂糖凝胶（Sepharos）等介质，以便进行选择性和共价性及定向性的SNAP-tag TM 融合蛋白的固定。

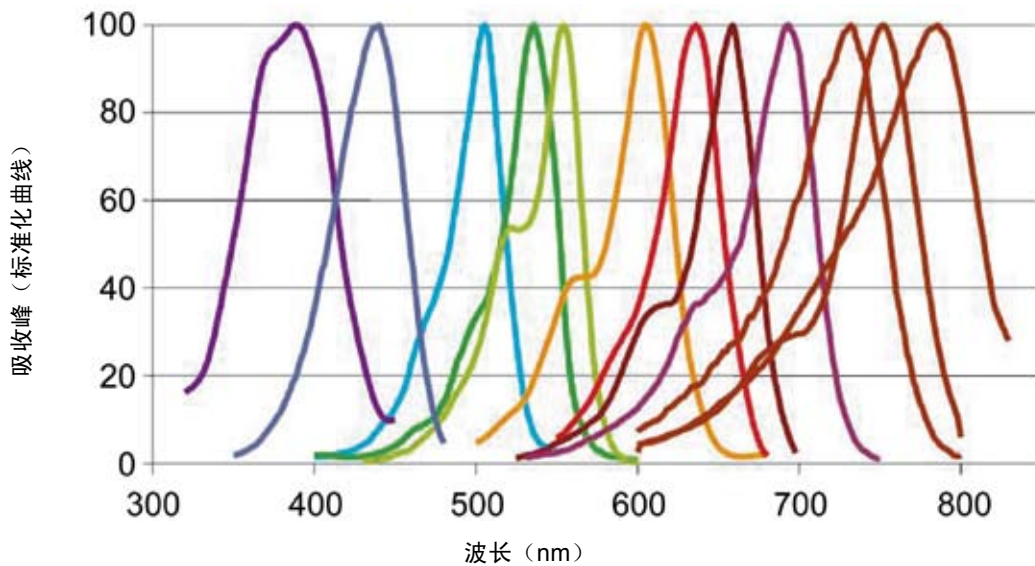


图5 各种SNAP-tagTM荧光配体的吸收峰。
图片来源: www.covalys.com

1.4 SNAP-tagTM的应用

1.4.1 SNAP-tagTM在蛋白质相互作用研究领域的应用

SNAP-tagTM可通过种类繁多的配体，轻松实现低通量的蛋白相互作用研究（pull down）和高通量的蛋白相互作用研究（均相时间分辨荧光分析法，Homogenous Time Resolved Fluorescence, HTRF），并且可用于高亲和力和低亲和力的蛋白质相互作用研究。

1.4.1.1 通过pull down进行蛋白相互作用研究

(1) FKBP-FRB相互作用——高亲和力

雷帕霉素（Rapamycin）是一种重要的免疫抑制剂，可用于抗癌治疗，同时也可广泛应用于研究领域。

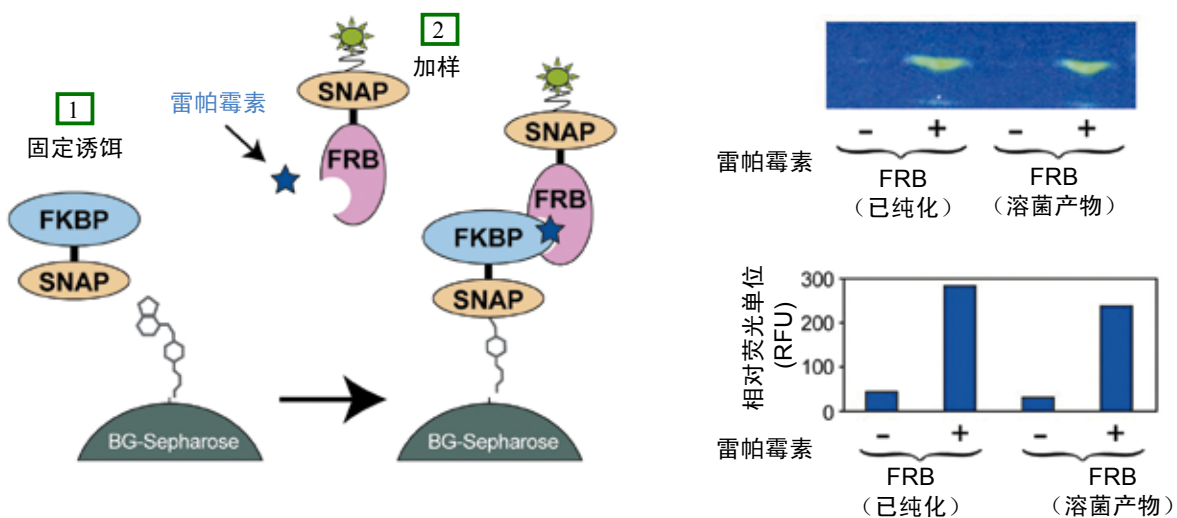


图6 将SNAP-tagTM用于沉降试验以确定FKBP-FRB之间的相互作用。图示说明，把SNAP-FKBP融合蛋白固定于BG-Sepharose上，在有雷帕霉素和无雷帕霉素存在的情况下，从细胞裂解液中通过pull down方法对荧光标记的SNAP-FRB融合蛋白进行捕获，随后进行SDS-PAGE分析和荧光强度检测。

图片来源: www.covalys.com

雷帕霉素可以抑制来自雷帕霉素蛋白（TOR）靶标的下游信号。在雷帕霉素的各功能中，最为重要的是，它可以同时与两种不同的蛋白质——FKBP和mTOR的FRB结构域结合。

当FKBP-SNAP与BG-琼脂糖凝胶共价结合后，遇上被荧光探针标记的FRB-SNAP时，如果雷帕霉素存在，FRB和FKBP之间就会发生特异性相互作用；如果雷帕霉素缺失，FRB与FKBP只能发生较弱的相互作用（图6）。

(2) MDM2-p53相互作用——低亲和力

肿瘤蛋白MDM2是一种E3泛素连接酶，也是p53肿瘤抑制蛋白最重要的细胞拮抗剂。同时，它还是肿瘤药物研发中一个已被验证过的靶标。MDM2与p53结合，并通过蛋白酶促进p53降解。已有研究表明，抑制p53与MDM2的相互作用，可致使某些癌细胞死亡（图7）。

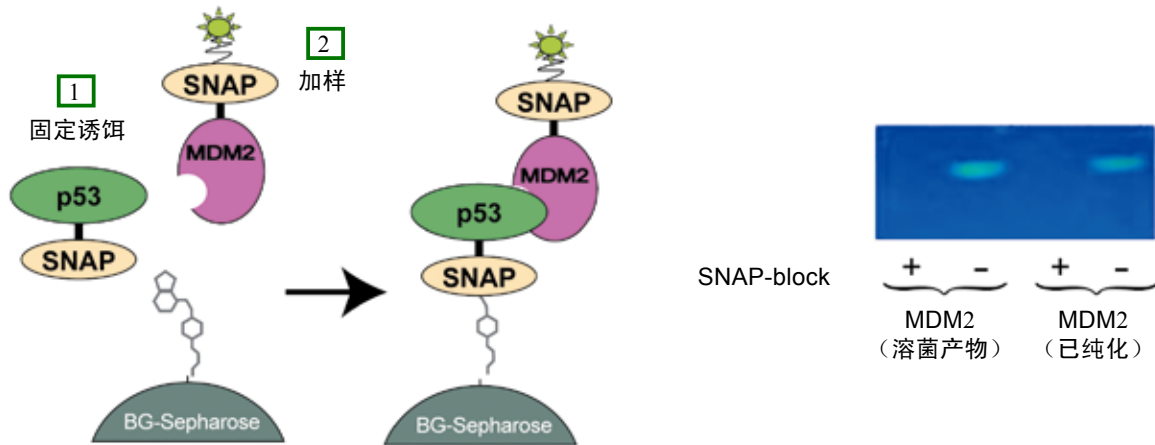


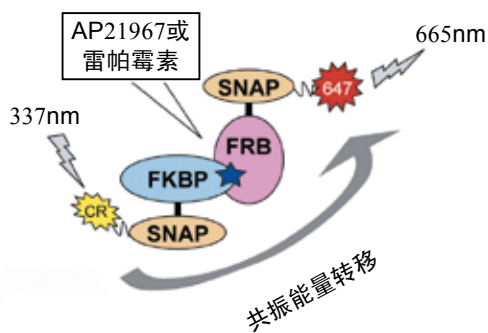
图7 将SNAP-tag™用于沉降试验以确定MDM2-p53之间的相互作用。1. 将SNAP-p53选择性地以共价键定向固定于BG-Sepharose；2. 将SNAP-MDM2与SNAP-tag™底物携带的荧光标记物结合；无需预先进行蛋白纯化工作，可直接在SDS-PAGE胶上检测相互作用的蛋白质；p53可从复杂混合物中特异性捕获。

图片来源：www.covalys.com

1.4.1.2 通过HTRF进行蛋白相互作用研究

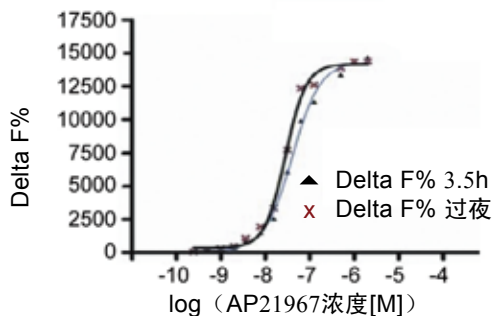
SNAP-tag™易于标记带有HTRF荧光基团的蛋白质。HTRF促进了以时间分辨能量转移为基础的高敏感性近似检测的发展。

(1) 通过HTRF进行FKBP-FRB相互作用研究——高亲和力

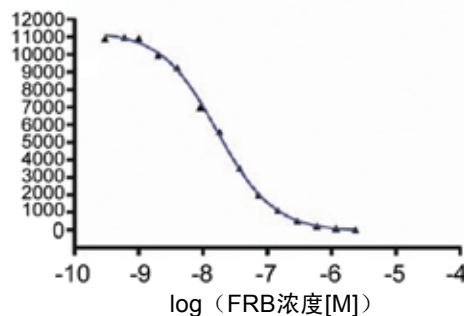


- 在雷帕霉素类似物AP21967存在时，被BG-穴状化合物（BG-Cryptate）（供体）修饰的FKBP与被BG-647标记的FRB（受体）发生相互反应

- HTRF实验法非常有效并可靠：Z'因子>0.7



● AP21967的剂量反应曲线



● 未标记的FRB对FKBP-FRB异二聚体形成的竞争性抑制

图8 将SNAP-tag™用于均相时间分辨荧光分析以确定FKBP-FRB之间的相互作用。

图片来源：www.covalys.com

(2) 通过HTRF进行MDM2-p53相互作用研究——低亲和力

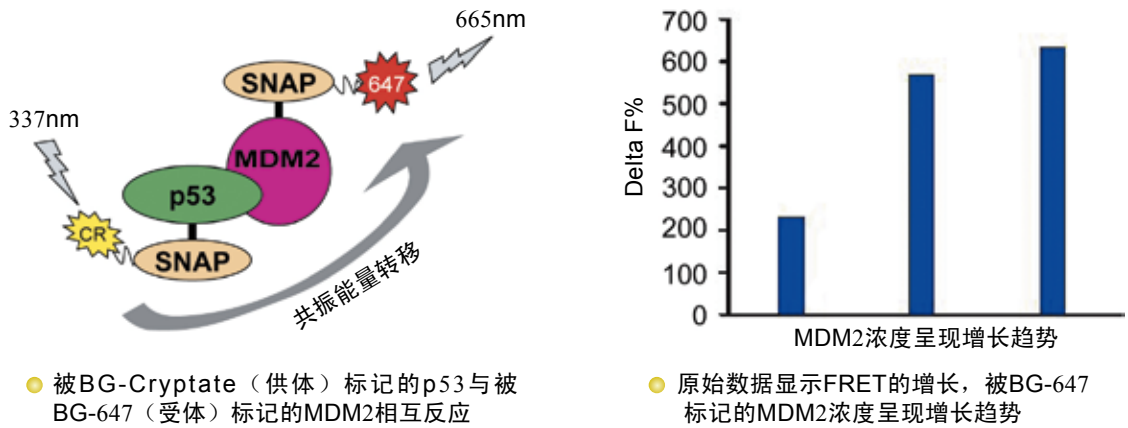


图9 将SNAP-tag™用于均相时间分辨荧光分析以确定MDM2-p53之间的相互作用。
图片来源：www.covalys.com

1.4.2 将SNAP-tag™用于融合蛋白的生物素化和固相化

SNAP-tag™的融合蛋白可通过共价键结合BG-biotin，从而在生理条件下实现生物素（酰）化。生物素化后的蛋白可轻松固定于链霉抗生物素包被的微孔板上（图10）。

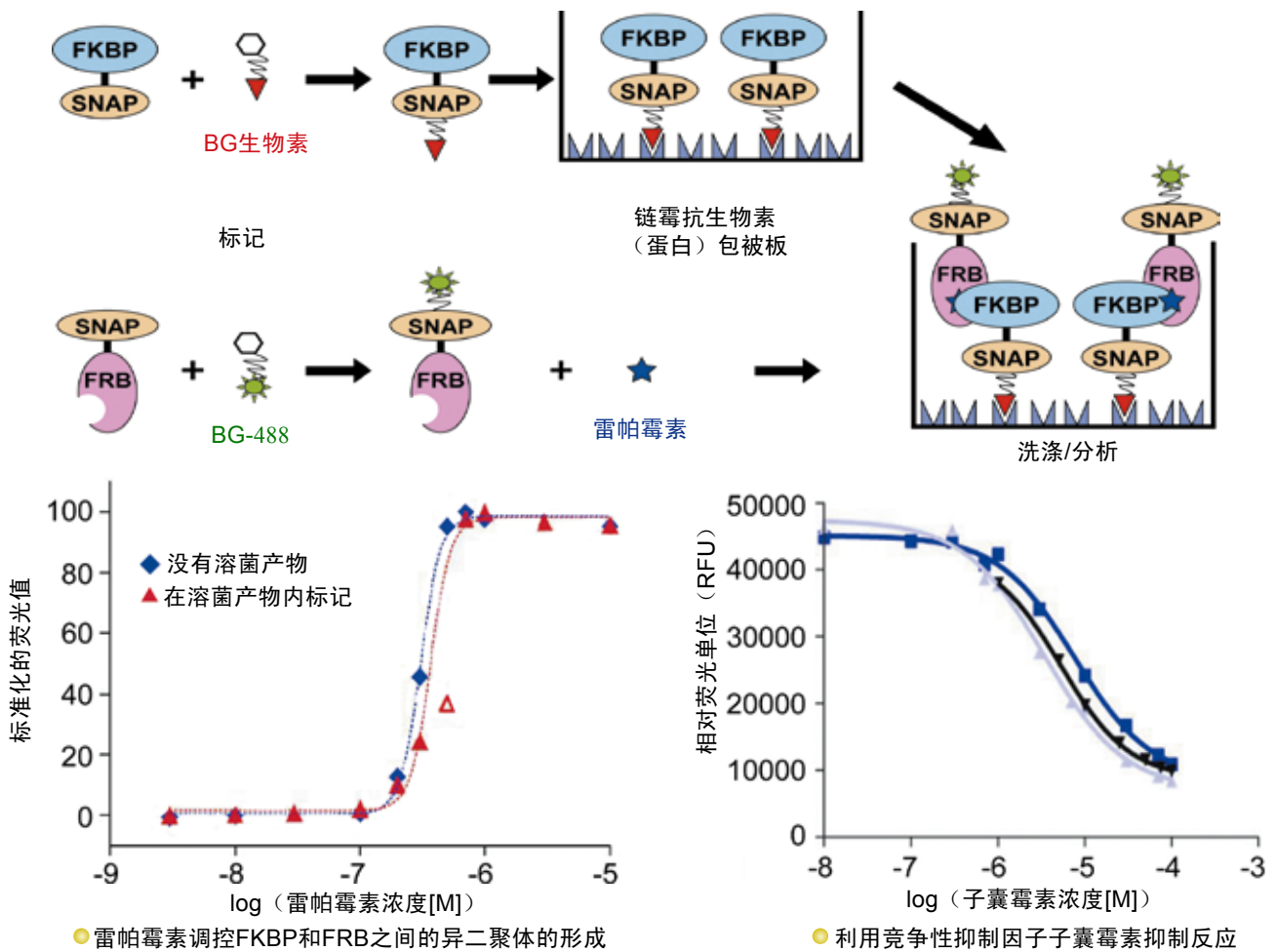


图10 将SNAP-tag™用于FKBP-FRB微板固相化。FKBP-SNAP与BG-Biotin共价结合后，可固定于链霉抗生物素包被的微孔板上，在有雷帕霉素情况下，则可以被荧光探针标记的FRB-SNAP实现包被板上的结合。
图片来源：www.covalys.com

1.4.3 将SNAP-tag™用于蛋白固相化和纯化

传统的蛋白纯化方法是基于标签蛋白与纯化基质之间不稳定的相互作用（亲和力），这就导致很多的融合蛋白由于结合力不够，没有结合在基质，损失了蛋白产量。此外，由于不能够用很严谨的条件进行清洗，又导致了很高的背景。而SNAP-tag™用于纯化则可克服上述缺点（图11、12）。

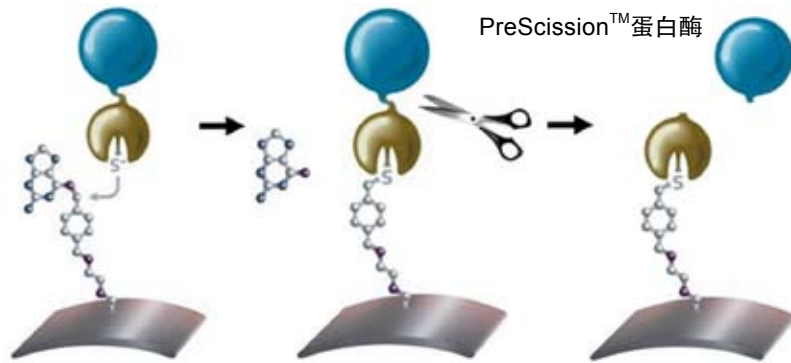


图11 首先将SNAP-tag™的配体（苯甲基鸟嘌呤）偶联到Sepharose或Agrose等基质上，由于SNAP-tag™可与配体形成稳定的共价键，因此可以从细胞裂解液中，直接把SNAP-tag™融合蛋白固定于基质上，随后用很严谨的条件进行清洗以除去其它杂蛋白，最后用蛋白酶把目的蛋白从SNAP-tag™融合蛋白切下，从而纯化目的蛋白。图中土黄色表示SNAP-tag™，蓝色表示目的蛋白。

图片来源:www.covalys.com

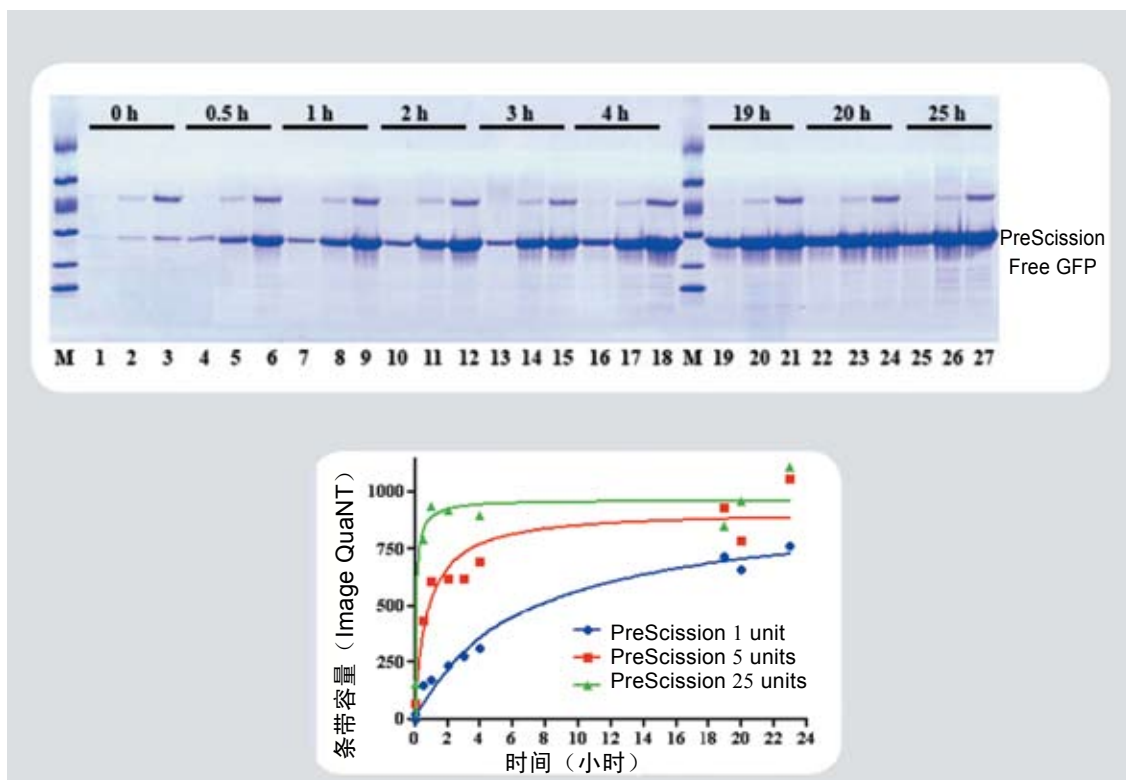


图12 SNAP-GFP融合蛋白固定后，使用1、5和25 Unit的PreScission™蛋白酶进行切割，于不同时间的取样分析。A: SDS-PAGE后的Coomassie染色；B: SDS-PAGE后的密度扫描数据。

图片来源: www.covalys.com

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

职位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

联系人：陈小姐

1.4.4 将SNAP-tag™用于活细胞中融合蛋白的标记

将SNAP-tag™用于活细胞中融合蛋白标记技术的特点是：生物素、荧光素以及若丹明标记的底物，可渗入细胞，有利于进行体内蛋白标记；可应用于多种实验，例如蛋白定位、蛋白动力学以及脉冲追踪实验等；SNAP-tag™配体都是小分子化合物，它们容易进入细胞，且对细胞没有毒害，因此带有各种荧光基团的配体就非常适用于细胞成像。目前商业化的荧光标记配体见表4。

表4 目前商业化的SNAP-tag™荧光标记配体

应用	激发光谱 (nm)	发射光谱 (nm)	
		主峰	次峰
细胞渗透性			
SNAP-Cell 360	357	437	Blue
SNAP-Cell 430	421	444,484	Blue
SNAP-Cell 505	504	532	Green
SNAP-Cell Oregon Green	490	514	Green
SNAP-Cell Fluorescein	500	532	Green
SNAP-Cell TMR-Star	554	580	Yellow
非细胞渗透性			
SNAP-Surface 425	438	489	Blue
SNAP-Surface Alexa Flur® 488	496	520	Green
SNAP-Surface 488	506	526	Green
SNAP-Surface 532	536	554	Green
SNAP-Surface Alexa Flur® 546	558	574	Green
SNAP-Surface 549	560	595	Yellow
SNAP-Surface 600	606	626	Orange
SNAP-Surface 632	637	657	Red
SNAP-Surface Alexa Flur® 647	636	670	Red
SNAP-Surface 647	660	673	Red
SNAP-Surface 682	693	708	Dark Red
SNAP-Surface 732	732	747	Black
SNAP-Surface 747	752	763	Black
SNAP-Surface 782	784	789	Black

1.4.5 SNAP-tag™ ORF表达克隆及其应用

在生物学条件下，通过SNAP-tag™进行共价标记，是一种精确的、高特异性的、可替代抗体捕获或标记及化学法标记的新技术。这使得快速有效的蛋白质与蛋白质相互作用研究领域的工作成为可能，同时也促进了对于蛋白质通过共价键特异性地固定于细胞表面方面的研究。但是，SNAP-tag™必须与目的基因构建融合表达克隆才能发挥其威力。广州复能基因有限公司对SNAP-tag™的融合表达载体进行了优化，并构建了人类、小鼠的编码基因ORF与SNAP-tag™融合表达克隆 (<http://www.genecopoeia.com/product/snap-tag/>) (图13)，研究人员可选购各种SNAP-tag™ ORF融合表达克隆，直接进行下游的研究工作。

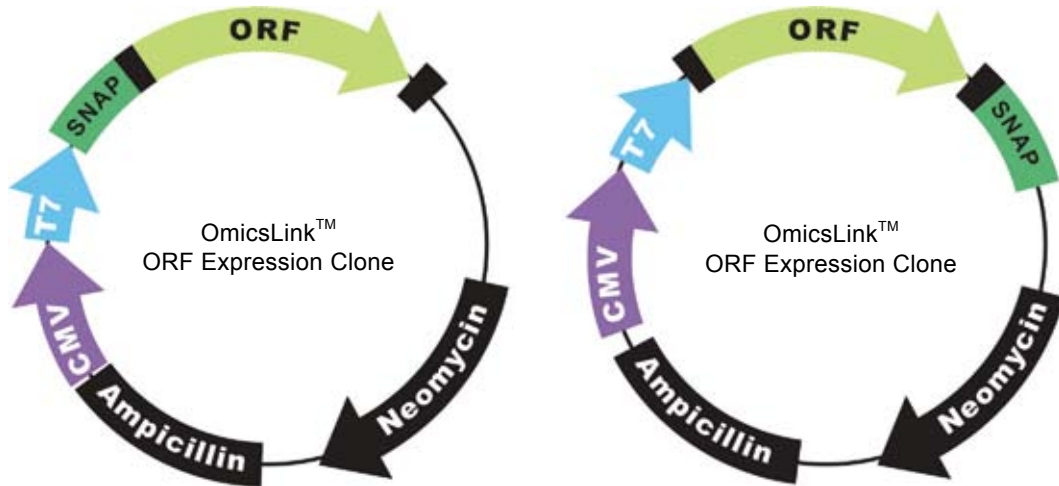


图13 OmicsLink™ SNAP-tag™ ORF融合表达克隆。
图片来源: www.genecopoeia.com

总之, SNAP-tag™技术中可用于标记的底物的广泛程度及应用范围是其它技术方法无可比拟的。

原文检索:

<http://www.covalys.com/>

<http://www.fulengen.com/>

<http://www.sciencedaily.com/releases/2008/02/080222143826.htm>

Keppler A, Pick H & Arrivoli C et al. (2004) Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(27): 9955-9.

小词典

Z'因子

Z'因子是一个关于信号区间和变异的组合, 它已成为评估测试方法质量的主要参数。

Z'因子于1999首次发表以来, 已被视为一个非常有益的评估试验的统计学方法。

$Z' = 1 - 3 \times (SD_s + SD_b) / [MS - MB]$ (SD=标准、s=信号、b=背景)

Z'因子的值是一个用于区分信号与背景群体的相对指标。

Z'因子是一个没有量度的参数, 其范围可以从1到小于0。

当Z'因子等于零时, 信号与背景开始重叠。一般而言, 可以接受的Z'因子应大于0.4。此时, S/B是3、CV是4%。S/B越高, 变异也越大。通常CVs必须小于20%, 尽管转化的S/B与较小的变异相关, 但通常为了保证低于5%的CVs, S/B不应低于2。

为了评价分配质量和取消一些带明显误差的数据, 在测试方法的建立、确证和高通量筛选的过程中, Z'因子都应在单个反应板基础上进行评估。

(<http://zh.wikipedia.org/wiki/Z%E2%80%99%E5%9B%A0%E5%AD%90>)

2. CLIP-tag™——SNAP-tag™的变体

2.1 CLIP-tag™与SNAP-tag™的异同

洛桑联邦理工学院 (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, EPFL) 蛋白质工程实验室Kai Johnsson博士的研究小组对SNAP-tag™进行修饰, 构建出新型的以AGT为基础的标签, 并将其命名为CLIP-tag™。

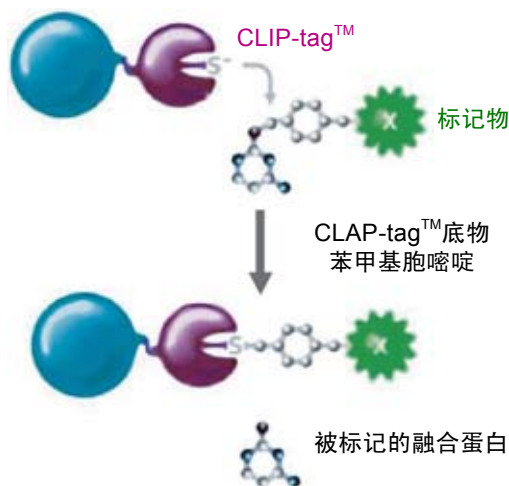


图14 与目标蛋白（蓝色）融合的CLIP-tagTM（紫色）用标签X（绿色）进行自我标记。
图片来源:www.covalys.com

CLIP-tagTM是一种与SNAP-tagTM紧密相关，但却与完全不同的另一类底物发生相互反应的蛋白标签。SNAP-tagTM与苯甲基鸟嘌呤衍生物（benzylguanine derivatives）发生反应，而CLIP-tagTM则与苯甲基胞嘧啶衍生物（benzylcytosine derivatives）反应。由于上述两种标签分别识别不同的底物，因此可在同一细胞或细胞群中对两类不同底物进行标记，并且保留SNAP-tagTM所有的优点。

CLIP-tagTM和SNAP-tagTM都是新型的自我标记蛋白标签，它们都可以特异性地以共价键与各自底物进行结合。CLIP-tagTM和SNAP-tagTM都是22kDa大小的蛋白标签，能够在常见表达系统中表达。CLIP-tagTM可以作为N末端或C末端CLIP-tagTM融合蛋白行使功能。

CLIP-tagTM对侧面替代基团的苯甲基胞嘧啶进行剪切，将替代性苯甲基基团转移至其活性位点并释放自由胞嘧啶（图14）。由此而得到的硫醚键具有高度稳定性。对于与CLIP-tagTM连接的化合物的性质，并没有严格限制。上述自我

标记反应具有高特异性，因为苯甲基胞嘧啶在生化环境中是稳定的，并且没有其它类似的蛋白质会与这一类底物反应。

研究表明，SNAP-tagTM和CLIP-tagTM与目前存在的蛋白标记方法相比，在对活细胞内的多蛋白研究方面具有明显优势。两种标签都可对任何一种细胞环境内的蛋白质进行标记，并且对于其相应底物具有高度特异性，而与其它苯甲基鸟嘌呤或苯甲基胞嘧啶衍生物只有很弱的反应性。

此外，两种标签还具有许多相似特性，可以在融合蛋白比较方面进行应用。不仅如此，化学标记方法可以用于对那些组织内无法采用自身荧光表达的蛋白质进行直观研究，并且也适用于那些在显像观察后再采取其它生化特性鉴定的实验。

2.2 SNAP-tagTM与CLIP-tagTM的双重标记

CLIP-tagTM是与SNAP-tagTM类似的另一种蛋白标签，不过它的底物不是SNAP-tagTM的底物BG，而是BC——苯甲基胞嘧啶（benzylcytosine）衍生物。正是由于CLIP-tagTM和SNAP-tagTM的底物不同，因此，在细胞中结合使用CLIP-tagTM和SNAP-tagTM，可以同时为一种蛋白质标记上不同的蛋白标签。这也正是CLIP-tagTM的主要作用，即和SNAP-tagTM一起，对蛋白质进行双重标记（图15）。此外，人们还可在细胞膜上对融合蛋白进行选择检测，并在SDS-PAGE胶内对CLIP-tagTM融合蛋白进行直接检测。

Johnsson博士表示：“将SNAP-tagTM和CLIP-tagTM联合使用，可以对活细胞内由不同分子探针标记的蛋白进行同时标记，从而对活细胞内的细胞功能进行多参数可视化监测。”

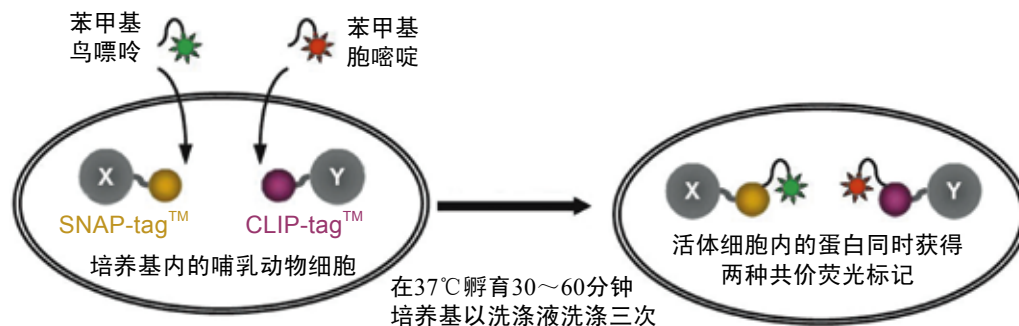


图15 采用SNAP-tagTM和CLIP-tagTM系统对活体细胞内蛋白进行双重标记。
图片来源:www.covalys.com

2.3 CLIP-tag™的荧光标记配体

与SNAP-tag™配体类似，CLIP-tag™的标记配体都是小分子化合物，它们容易进入细胞，且对细胞没有毒害，同时，带有各种荧光基团的配体非常适用于细胞成像。目前，商业化的CLIP-tag™荧光标记配体见表5。

表5 商业化的CLIP-tag™荧光标记配体

CLIP-tag	应用	激发光谱 (nm)	发射光谱 (nm)	
	细胞渗透性			
	CLIP-Cell 360	357	437	■
	CLIP-Cell 430	421	444,484	■
	CLIP-Cell 505	504	532	■
	CLIP-Cell Fluorescein	500	532	■
	CLIP-Cell TMR-Star	554	580	■
非细胞渗透性				
	CLIP-Surface 488	506	526	■
	CLIP-Surface 547	554	568	■
	CLIP-Surface 647	660	673	■

对于CLIP-tag™，Johnsson博士如此总结：“CLIP-tag™的标记具有高度特异性，是在改良其它现存蛋白标记方法的基础上得到的方法。该方法已成为化学生物学中一项具有重要价值的研究工具。另外，我们采用该方法，首次进行了同步脉冲追踪实验，对同一样本中两类不同蛋白的不同代蛋白质进行了观察，使我们对细胞内两个不同的动态过程进行了同步研究。”

2.4 SNAP-tag™和CLIP-tag™技术与GFP技术的比较

应用SNAP-tag™和CLIP-tag™这类自我标记的标签实现目的蛋白的荧光标记，相比较通过GFP等荧光蛋白的标记技术，是可以相互补充的，但在某些应用领域，SNAP-tag™和CLIP-tag™自我标记技术具有自身的优势（表6）。

表6 SNAP-tag™和CLIP-tag™自我标记技术的优势

应用领域	SNAP-tag™/ CLIP-tag™	GFP以及其它荧光蛋白
时间分辨荧光分析法	加入标记后，立刻发射出荧光	不同的荧光颜色由不同的基因编码。光敏荧光蛋白需要高强度的激光来激活，但这种强激光会激活其它细胞通路（如细胞凋亡）；
脉冲追踪分析	可以通过阻碍配体试剂（如SNAP-Cell™阻碍配体）来关闭新合成蛋白的标记	无法通过新合成蛋白的荧光猝灭来观察动态过程
改变荧光颜色	一次构建就可以与不同的染色底物结合，从而标记上多种颜色	每种颜色都需要有各自独立的表达克隆
表面特异性标记	可以采用非细胞渗透性底物特异性标记细胞表面表达的靶蛋白亚群	无法观察在细胞表面表达的靶蛋白亚群
对固定细胞的观察	对固定试剂不敏感、标记强度高	对固定试剂敏感、自身不稳定、标记强度弱
Pull-down研究	可在BG/BC磁珠上共价捕获“诱饵”蛋白	需要抗-GFP抗体来非共价捕获“诱饵”蛋白，从而令下游分析变得复杂
活体动物成像	采用近红外染色技术，可观察深层组织	几乎完全限于可见波长

原文检索：
<http://www.covalys.com/>
<http://www.fulengen.com/>
<http://www.physorg.com/news122908205.html>
<http://www.sciencedaily.com/releases/2008/02/080222143826.htm>

3. ACP-tag™及其变体MCP-tag™——酶促催化标记的标签

3.1 ACP-tag™及其变体MCP-tag™的异同

ACP-tag™来源于脂酰基携带蛋白，其作用机理是在磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶ACP合成酶（phosphopantetheinyl transferases ACP Synthase）或者SFP合成酶（SFP Synthase）的催化作用下，ACP-tag™与其配体—辅酶A（CoA）衍生物形成共价键。CLIP-tag™和SNAP-tag™的标记不需要额外的酶催化，是一种自我标记。相反，ACP-tag™标记需要由酶催化配体与之形成共价键，执行功能需要合成酶的参与，因此ACP-tag™是一种酶促催化标记的标签。

ACP-tag™技术也是由洛桑联邦理工学院（Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, EPFL）蛋白质工程实验室的Kai Johnsson教授开发的。它的一大优势是——小，分子量只有9kDa。Kai Johnsson还指出：“ACP-tag™的非自我标记特性在某些情况下具有很大优势。因为这一特点，使得该标签对细胞膜蛋白的膜外部分的标记具有严格的特异性。此外，由于ACP-tag™比SNAP-tag™更小，而且不包含胞嘧啶，这些特性都使得它更适合通过二硫桥标记抗体及其它分泌蛋白。”

ACP-tag™的另一种突变体MCP-tag™与ACP-tag™一样，也是一种新型的用于蛋白标记的小蛋白标签，作用方式也与SNAP-tag™和CLIP-tag™的作用方式完全不同。ACP-tag™以来自*E. coli*的酰基载体蛋白（ACP）为基础，并且可被ACP合成酶或者SFP合成酶标记。MCP-tag™同样也以ACP为基础，但它只能特异性地与SFP合成酶发生作用，而不能与ACP合成酶发生作用。

只要有合适的合酶，两种标签都可被CoA衍生物标记（图16）。因此，ACP-tag™和MCP-tag™融合蛋白都可以进行特异性、共价键的标记。

ACP-tag™和MCP-tag™可以序贯使用，执行双重功能。

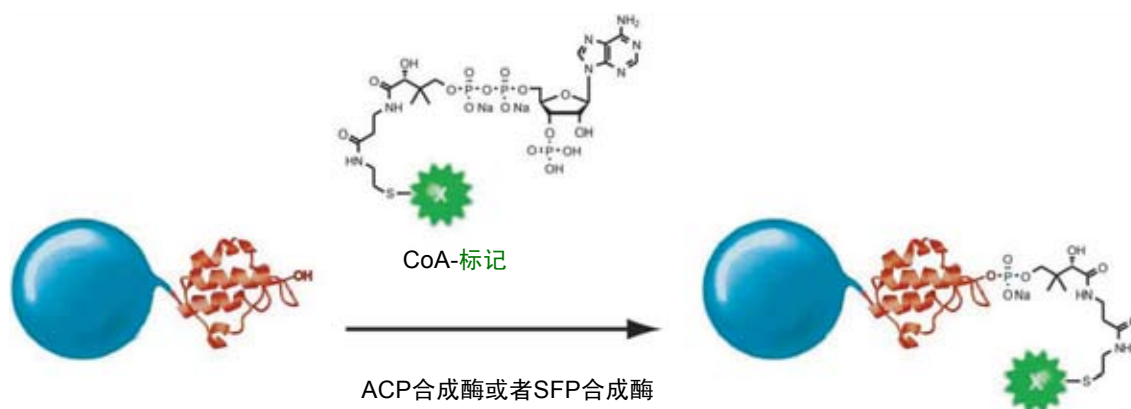


图16 ACP合成酶或SFP合成酶通过共价键将标记X（绿色）转移至与目标蛋白（蓝色）融合的ACP/MCP-tag™。

图片来源:www.covalys.com

3.2 ACP-tagTM和MCP-tagTM荧光标记配体

带有各种荧光基团的ACP-tagTM和MCP-tagTM配体非常适用于细胞成像。目前，商业化的ACP-tagTM和MCP-tagTM荧光标记配体见表7。

表7 商业化的ACP-tagTM和MCP-tagTM荧光标记配体

ACP-/MCP-tag	应用	激发光谱 (nm)	发射光谱 (nm)
	非细胞渗透性		
	CoA 488	506	526
	CoA 547	554	568
	CoA 647	660	673

原文检索:

<http://www.covalys.com/>

<http://www.fulengen.com/>

4. SNAP-tagTM、CLIP-tagTM、ACP-tagTM和MCP-tagTM在细胞成像中的应用

SNAP-tagTM、CLIP-tagTM、ACP-tagTM和MCP-tagTM在细胞成像中的应用分别见图17~21。

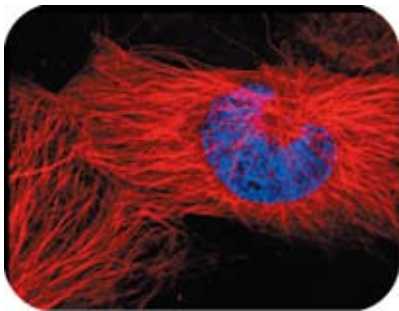


图17 pSNAP-Tubulin β 转染COS-7细胞后，用SNAP-Cell TMR-Star（红色）标记30min，同时用Hoechst33342（蓝色）对细胞核染色。

图片来源: www.neb.com

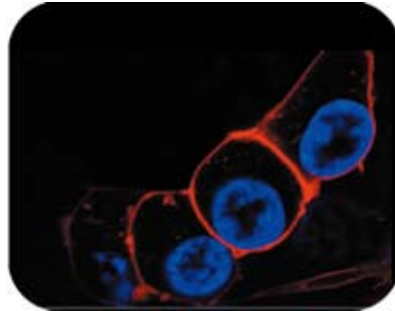


图18 pSNAP-ADRB2转染HEK293细胞后，用SNAP-SurfaceTM 549（红色）标记30min，同时用Hoechst33342（蓝色）对细胞核染色。

图片来源: www.neb.com

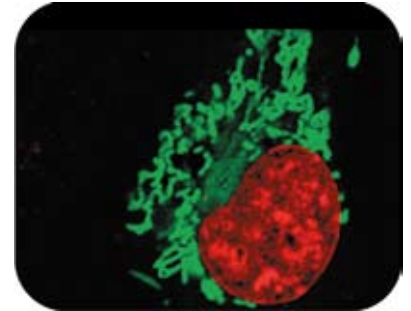


图19 pCLIP-H28（组蛋白H28）和pSNAP-Cox8A（线粒体细胞色素氧化酶8A）转染COS-7细胞后，用CLIP-CellTM TMR-Star（红色）和SNAP-CellTM Oregon Green（俄勒冈绿）标记30min。

图片来源: www.neb.com

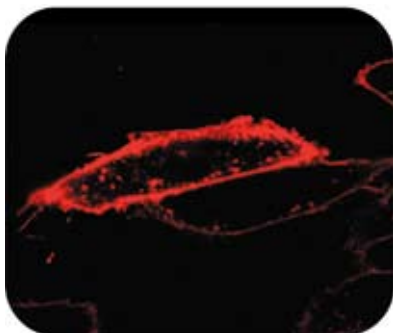


图20 pCLIP-GPI（组蛋白H28）转染CHO-K1细胞后，通过ACP合成酶标记CoA-547（红色）30min。

图片来源: www.neb.com

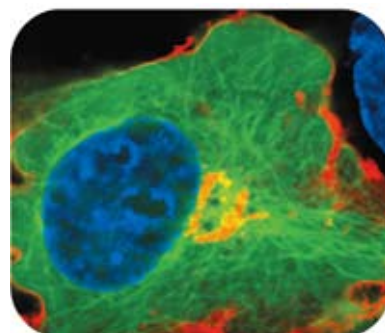
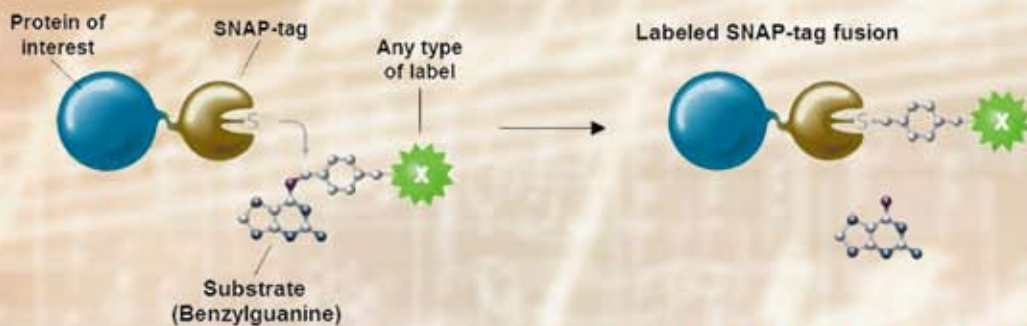


图21 pSNAP-Tubulin β 和pCLIP-CaaX转染COS-7细胞后，用CLIP-CellTM TMR-Star（红色）和SNAP-CellTM Oregon Green（俄勒冈绿）标记30min，同时用Hoechst33342（蓝色）对细胞核染色。

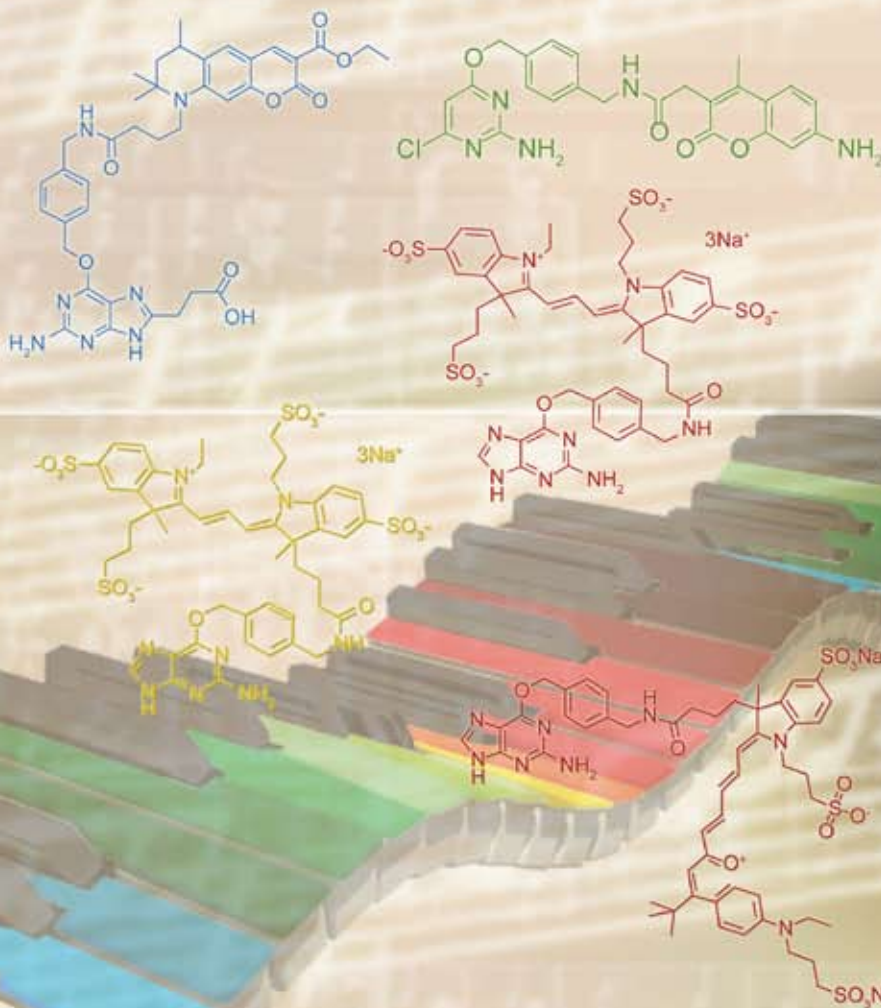
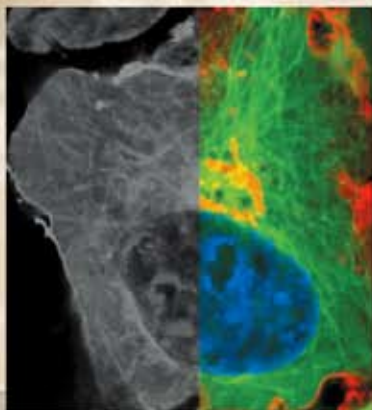
图片来源: www.neb.com

SNAP Tag 蛋白标签

——让蛋白在亚细胞结构上产生色彩



不同的担体显示不同的颜色



应用:

- ◆ 活细胞蛋白标记
- ◆ 亚细胞结构标记
- ◆ 蛋白质的细胞定位

5. Halo-tag™——多功能的蛋白标签

5.1 Halo-tag™简介

另外一种自我标记标签是Halo-tag™，它是由微生物紫红红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) 的脱卤素酶 (dehalogenase) 演化而来。该酶可把卤代烷烃 (haloalkanes) 中的卤素取代基去除，通过置换脱卤素酶活性中心的组氨酸，使得去卤素反应的第二步反应速度大大降低，从而令烷基残基可以有效地以共价键形式结合于蛋白上。Halo-tag™是分子量为33kDa的蛋白标签，可以在原核表达系统 (大肠杆菌表达系统) 或真核表达系统中与待研究蛋白的N端或C端融合表达。

当利用基因融合技术将目标蛋白和Halo-tag™融合表达后，在生理条件下就可以将Halo-tag™荧光配体或者生物素直接定点标记在融合蛋白的Halo-tag™上 (图22)。这种共价结合特异性高、不可逆且形成快速，生成的复合物稳定性强，甚至在变性条件下也能进行。因此，可以利用这个特性进行PAGE电泳胶显色以及亲和纯化等实验。而当融合表达载体转染到活细胞中表达融合蛋白，就可以进行活细胞中的蛋白荧光示踪——追踪某个蛋白质的产生、分布定位、甚至蛋白质的迁移等情况了。

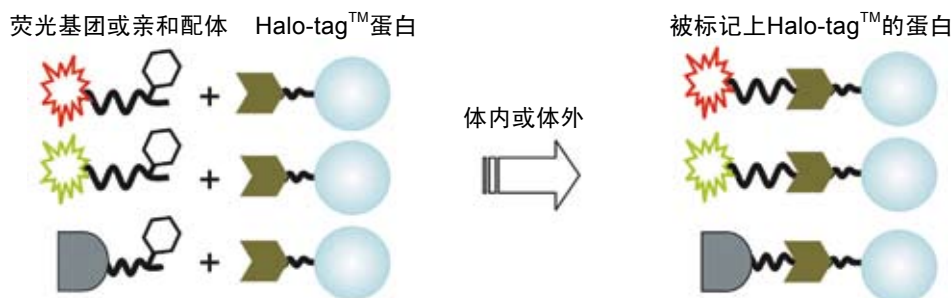


图22 能够共价和特异性结合多种合成的报告基团和亲和配体的特性，使得Halo-tag™蛋白可用于检测、亲和结合或固相化目的蛋白。

图片来源: www.genecopoeia.com

5.2 Halo-tag™的配体

Halo-tag™配体通常是一些可穿越细胞膜的小分子化合物。这些化合物主要包含两种关键成分：一个是通用的Halo-tag™蛋白反应连接部位，它的作用是启动与Halo-tag™蛋白的共价键的形成；另一个是功能报告基团，如红色荧光的TMR、绿色荧光的diAcFAM、蓝色荧光的Coumarin以及亲和反应基团，如生物素等。图23以Halo-tag™蛋白与TMR配体共价结合的分子模式为例，说明蛋白-配体的结合原理。Halo-tag™ TMR配体 (下图左下方放大部分红色区域为功能区，桔色的为反应连接部位)，配体上的苯丙氨酸残基 (蓝色) 替代了Halo-tag™蛋白的催化部位 (组氨酸)，使之失活而破坏了其水解酯类中间体最终形成稳定的共价键。

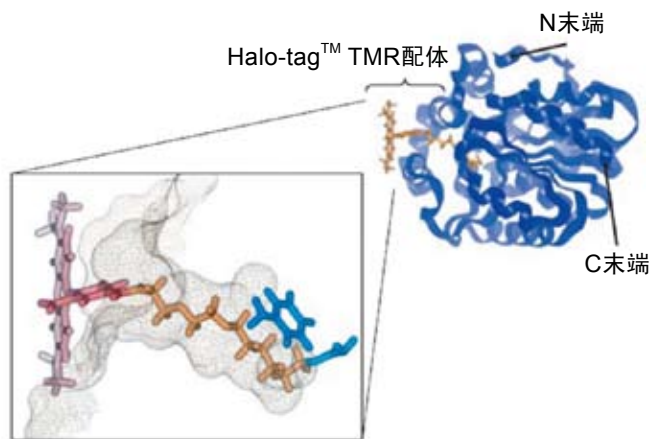


图23 通过共价键与Halo-tag™ TMR配体结合的Halo-tag™蛋白的分子模型。

图片来源: www.promega.com

在一般生理状态下，这种共价键结合是不可逆的，具有高度专一性，结合速度极快。由于Halo-tag™技术不需要将配体注入细胞，减少了对细胞的毒性；而且到目前为止，通过对TMR、diAcFAM和生物素等配体的细胞毒性检测也没有发现阳性反应，对细胞形态也无不良影响。Halo-tag™配体的多样性使得Halo-tag™融合蛋白具有多种功能和较宽的光学检测范围——无需改变基本的遗传结构就可在不同的波长下进行细胞成像或结合新的功能团。此外，Halo-tag™配体的多样性还为研究人员提供了多种选择，满足不同的研究需要，因而拓展了Halo-tag™的应用。

5.3 Halo-tag™技术的应用

Halo-tag™技术是为我们提供了一个有效且操作便捷的平台。Halo-tag™可以非常高效地通过共价键与几种不同的颜色配体或者生物素稳定结合，因此适合进行活体细胞或固定细胞的成像（图24）。通过与生物素形成稳定的结合，可以与磁珠或其它介质亲和吸附，用于纯化蛋白。此外，Halo-tag™也可以特异性地通过共价键与报告配体或固化配体（immobilization ligand）结合，来对融合蛋白进行荧光检测或固相吸附（solid-phase fixation）等试验操作。

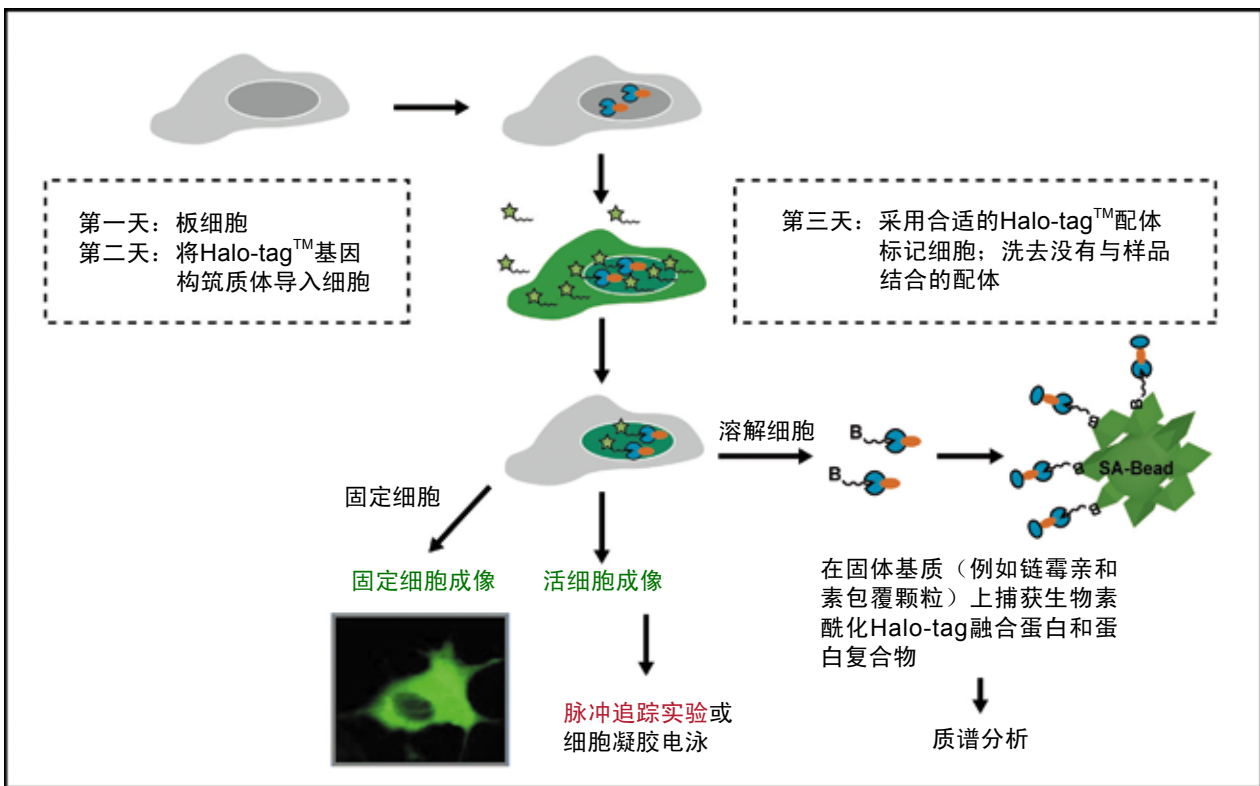


图24 Halo-tag™可互换标记技术实现多种应用。

图片来源：www.promega.com

5.3.1 蛋白定位

使用可渗透细胞膜的配体，例如TMR、diAcFAM、Coumarin和Oregon Green等标记胞内蛋白；以及使用不可渗透细胞膜的配体，如Alexa Fluor 488等标记胞膜蛋白；然后，研究人员就可以使用荧光显微镜观察标记蛋白了（图25）。如果将Halo-tag™融合蛋白进行改造使其表达在细胞膜上，这时不可渗透细胞膜的荧光染料就特别适合用于研究胞膜蛋白。

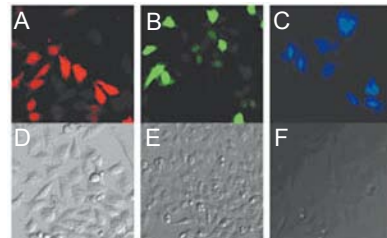
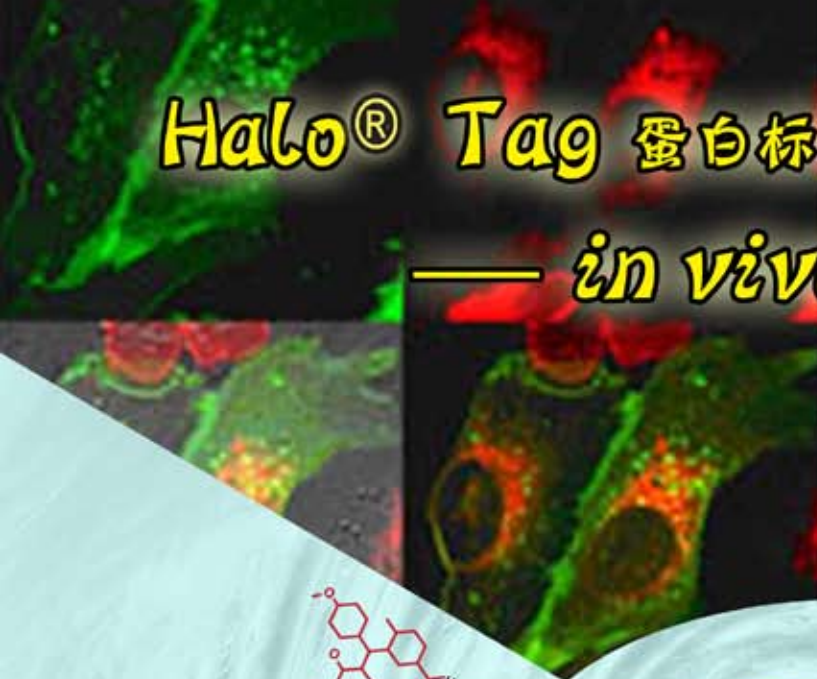


图25 瞬时转染Halo-tag™ pHT2表达载体的HeLa细胞，细胞内的Halo-tag™融合蛋白被三种不同配体所标记。A: 5 μM Halo-tag™ TMR配体标记；B: 10 μM Halo-tag™ diAcFAM配体标记；C: 25 μM Halo-tag™ Coumarin配体标记。

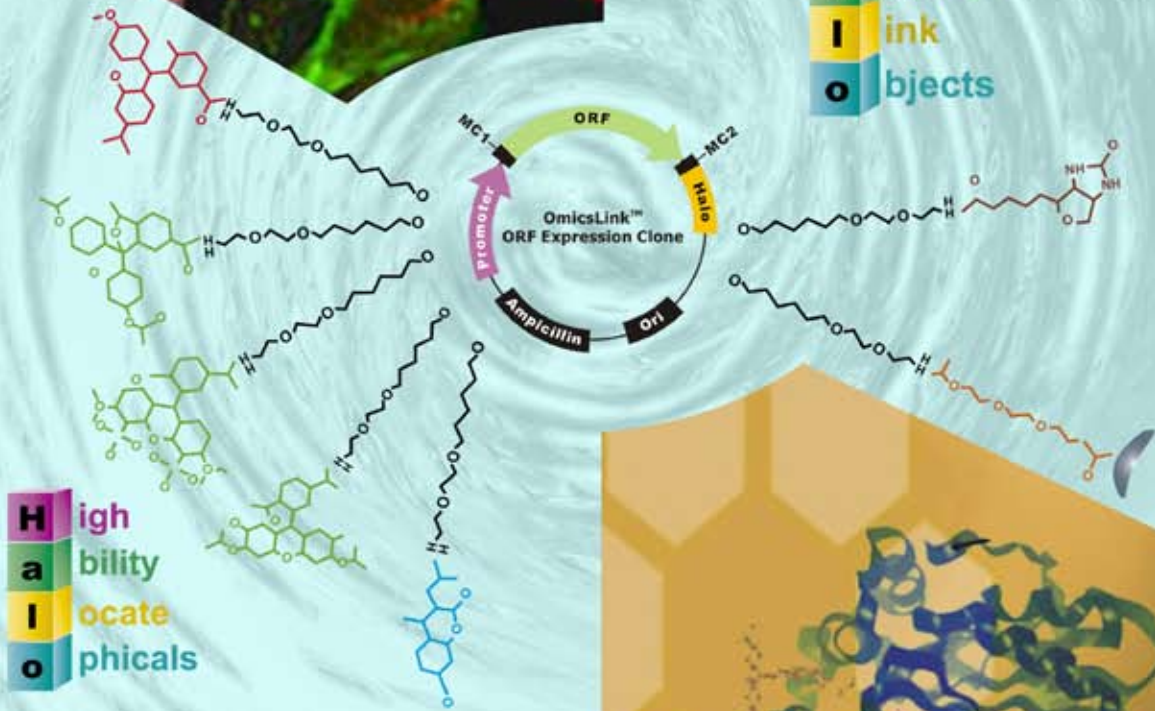
图片来源：www.promega.com

Halo® Tag 蛋白标签

—— *in vivo* 或 *in vitro* 都需要



High
affinity
link
objects



应用:

- ◆ 蛋白亚细胞标记
- ◆ 蛋白脉冲永踪
- ◆ 蛋白转位研究

应用:

- ◆ 蛋白互作研究
- ◆ 蛋白富集
- ◆ western blot 检测分析

GeneCopoeia™
Expressway to Discovery

GeneCopoeia, Inc.
Tel: 301-515-6982 (USA)
Fax: 301-515-6983 (USA)
Web: <http://www.genecopoeia.com>

复能基因
FulenGen

广州复能基因有限公司
电话: (020) 32052376、32052410、32290874
传真: (020) 32052877
公司网址: <http://www.fulengen.com>

5.3.2 蛋白共定位

将已标记的Halo-tagTM融合蛋白所在的细胞固定后，就可以使用针对另一种蛋白的抗体进行免疫细胞化学试验（immunocytochemistry (IC) assay），从而了解蛋白共定位的情况了（图26）。抗Halo-tagTM的多克隆抗体可以和另一种抗体一起进行蛋白共定位试验。

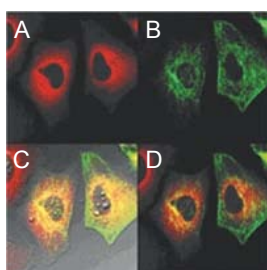


图26 表达有p65-Halo-tagTM融合蛋白的HeLa细胞在融合蛋白经TMR配体标记后使用抗微管蛋白的抗体进行蛋白共定位研究。HeLa细胞瞬时转染了表达载体p65-Halo-tagTM，融合蛋白表达后，细胞在37°C下与TMR配体作用15分钟。然后固定细胞，再与Alexa FluorTM 488共孵育进行二次染色，最后与1μg/ml的鼠源抗β III微管蛋白抗体共孵育。

A: TMR红色荧光;
B: Alexa Fluor 488绿色荧光;
C: Alexa Fluor 488荧光信号与TMR荧光信号以及透射光信号叠加图;
D: Alexa Fluor 488荧光信号与TMR荧光信号叠加图。

图片来源: www.promega.com

5.3.3 用于研究蛋白与DNA之间的相互作用

固化配体，例如HaloLink树脂可以被用来沉淀Halo-tagTM融合蛋白——DNA交联复合物。使用这种方法就不再需要像传统的染色质免疫共沉淀试验（ChIP）那样使用抗体了。

5.3.4 使用多脉冲追踪标记技术研究蛋白质转运机制

使用不同的荧光标记配体可以在活体细胞内不同的时间点来标记Halo-tagTM融合蛋白，这样就能方便、清楚地观察到蛋白质在胞内转运的全过程了（图27）。

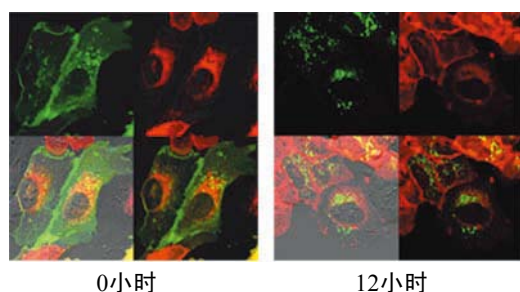


图27 使用Halo-tagTM技术研究蛋白质在细胞内的时空定位。两图是细胞标记后的12个小时内拍摄的图像。图像清楚显示了经不同荧光标记的蛋白质从胞质移动到胞膜以及它们进入胞膜的全过程。

图片来源: www.promega.com

5.3.5 可用于研究蛋白富集、SDS-PAGE和Western blot试验

使用生物素配体以及固化配基链亲和素，可以纯化Halo-tagTM融合蛋白，从而对其进行酶活性方面的研究及对其进行质谱分析或翻译后修饰等方面的研究。而且，使用荧光配体标记，Halo-tagTM融合蛋白经SDS-PAGE分离后可以直接荧光成像或用于Western blot试验分析（图28）。

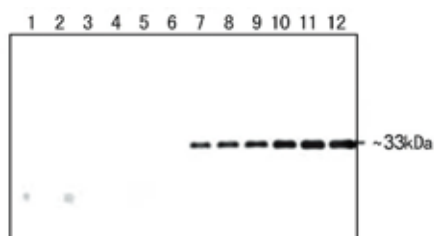


图28 快速、高效以及高特异地标记哺乳动物细胞内的Halo-tagTM融合蛋白。CHO-K1对照细胞（第1~6列）和瞬时转染Halo-tagTM pHT2表达载体的试验细胞组（第7-12列）都与5μM Halo-tagTM TMR配体在37°C下作用一定的时间（0.5、1、2、5、15、30分钟）。蛋白经SDS-PAGE分离后使用Hitachi FMBIO荧光成像系统分析，从而获得此图。

图片来源: www.promega.com

5.4 Halo-tag™技术的创新点（表8）

通过Halo-Tag™可与多种配体特异性共价键结合，研究人员利用Halo-tag™技术可以对活的哺乳动物细胞或固定哺乳动物细胞进行成像、监测 Halo-tag™融合蛋白在细胞内部的迁移、观察亚细胞结构或蛋白更新周期，并且也实现了细胞到凝胶的分析，可以从活细胞或体外转录/翻译反应中，通过固相载体获得Halo-tag融合蛋白或者蛋白复合物。

表8 Halo-tag™技术的创新点

应用方面	技术优势
活细胞（固定细胞）成像	配体通过细胞膜与Halo-tag™形成稳定共价键，这种荧光信号对细胞固定剂的耐受使得对固定细胞的成像变得更容易，从而与免疫细胞化学技术和免疫组织化学技术共用成为可能； 荧光强度高； 优异的荧光信号信噪比，使得可以在相对较低的表达水平下，检测出所表达的蛋白； 特异性强，Halo-tag™来源于原核细胞，哺乳动物无内源性Halo-tag™，因此配体和蛋白的集合是高特异性和高亲和性的； 实现“脉冲-追踪”样标。
蛋白分析	蛋白与配体相互作用稳定，即使与SDS样品缓冲液一起煮沸，并且经SDS-PAGE凝胶电泳分离后，也没有可测定的荧光信号损失； 可以结合使用其它蛋白分析方法，例如Western Blot； 可使用多种荧光标记，实时监测蛋白表达。
蛋白捕获（亲和标签）	通过配体的亲和臂，Halo-tag™技术可以用来捕获哺乳动物细胞中表达的 Halo-tag™融合蛋白； 获得的融合蛋白仍保留蛋白活性。

5.5 Halo-tag™ ORF表达克隆及其应用

Halo-tag™只有与目的基因构建融合表达克隆才能发挥其威力，广州复能基因有限公司对Halo-tag™的融合表达载体进行了优化，并构建好了人类、小鼠的编码基因ORF与Halo-tag™融合表达克隆（<http://www.genecopoeia.com/product/halo/>）（图29）。研究人员可选购各种Halo-tag™ ORF融合表达克隆，直接进行下游的研究工作。

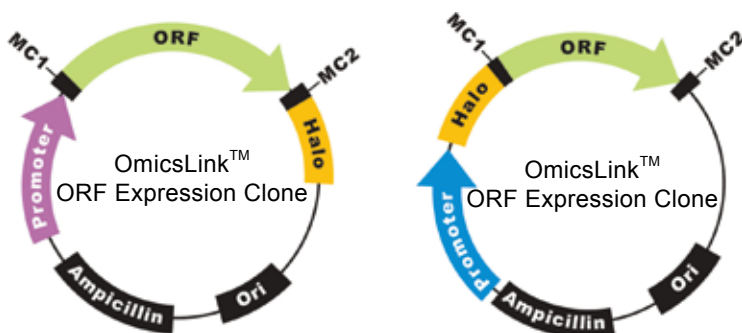


图29 OmicsLink™人类、小鼠的ORF表达克隆与Halo-tag™融合表达克隆。

图片来源: www.genecopoeia.com

原文检索:

<http://www.promega.com>

<http://www.fulengen.com>

<http://tong.dxy.cn/info/infoSupplyView.htm?id=50c35b041b977f34011b97c7de673b66>

http://www.hopebio.com/newEbiz1/EbizPortalFG/portal/html/InfoContent.html?InfoContent150_action=show&InfoPublish_Infold=c373e90ab872ab868ffaaf954792611c

Los, G. V. et al. (2005) HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology for cell imaging and protein capture. *Cell Notes* 11, 2-6.

Puck T T, et al. Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* 108: 945-956, 1958. PubMed: 13598821

小词典

CHO-K1细胞

CHO-K1细胞是实验中十分常用的一个细胞株，在生物制药中的应用也非常广泛。该细胞株培养条件简单，贴壁强度适中，比较容易转染，很适合用它来研究一般哺乳动物基因的功能。

来源：中国仓鼠（*Cricetulus griseus*）卵巢

形态：表皮细胞

生长特性：贴壁

CHO-K1由CHO衍生而来，CHO是T. T. Puck 在1957年从一只成年中国仓鼠的卵巢中获得的。

二、常用蛋白标签

1. His-tag——历久弥新的6组氨酸标签

金属螯合亲和层析，又称固定化金属离子亲和层析（Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC），是近30年发展起来的一种新型分离技术。最早由Paroth等人提出^[1]。该方法利用蛋白质表面的一些氨基酸，如组氨酸、色氨酸、半胱氨酸等能和金属离子发生特殊的相互作用的原理，从而对蛋白质加以分离。这些作用包括配价键结合、静电吸附、共价键结合，其中以配价键结合为主，而且这其中又以6组氨酸标签（His-Tag）应用最为广泛。

以His-Tag纯化标签结合金属螯合亲和层析，为重组蛋白质的分离纯化提供了一个有力的工具。由于金属螯合亲和层析具有配体简单、吸附量大、分离条件温和、通用性强等特点，上样条件可选择范围广，在高盐、一定浓度的变性剂以及去垢剂的条件下，带6His纯化标签的蛋白质都可以和亲和填料特异性结合，逐渐成为分离纯化蛋白质等生物工程产品最有效的技术之一^[2]。

1.1 His-tag是蛋白纯化的首选标签

Susanne Graslund等人^[3]在对10,000多个不同蛋白的表达纯化进行总结，认为His-tag是蛋白纯化的首选标签，主要有五方面的因素（表9）。

表9 His-tag被认为是蛋白纯化的首选标签的五个因素

N-端的His-Tag与细菌的转录翻译机制兼容，有利于蛋白表达；

采用固定化金属离子亲和层析纯化His-Tag融合蛋白操作简便；

His-Tag对目的蛋白本身特性几乎没有影响，而不象GST标签那样容易形成二聚体，从而影响蛋白的特性；

His-Tag非常小，不会改变目的蛋白自身的可溶性，相反一些大的标签如MBP，可大大提高融合蛋白的可溶性，尽管目的蛋白本身是不可溶或者折叠不正确；

His-Tag非常小，在融合蛋白结晶后对蛋白结构没有影响。