

· 技术方法 ·

植物中验证蛋白相互作用的Pull-down和Co-IP技术

徐重益*

中国科学院植物研究所, 中国科学院分子植物科学卓越创新中心, 植物分子生理学重点实验室, 北京 100093

摘要 蛋白互作在细胞生命活动中发挥关键作用, 在不同时空层面上参与多种细胞学过程, 因此研究蛋白互作对理解分子调控网络至关重要。通常情况下, 利用酵母双杂交系统筛选植物蛋白互作必须通过体外和体内系统进行验证。Pull-down和Co-IP是验证植物蛋白互作的常用技术。Pull-down被广泛用于体外验证蛋白间的直接互作; 而在植物活体内, 利用本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)叶片瞬时表达蛋白, 继而通过Co-IP进行鉴定是目前验证蛋白互作最简单且最有效的方法之一。该文对GST Pull-down和烟草瞬时表达系统中Co-IP技术原理及实验方案进行详细描述, 以期对验证植物蛋白互作提供参考。

关键词 植物, 蛋白互作, Pull-down, Co-IP

徐重益 (2020). 植物中验证蛋白相互作用的Pull-down和Co-IP技术. 植物学报 55, 62–68.

酵母双杂交是研究植物蛋白间互作非常有用的系统(Stasi et al., 2015), 是筛选和发现新互作蛋白的一项首选技术。然而, 由于酵母本身是异源系统, 故存在体内无法正常重建蛋白互作原始环境的缺陷。例如, 酵母双杂交技术需要2个蛋白同时定位于细胞核, 而植物中原始蛋白存在于不同的细胞结构中, 会导致出现假阳性结果。因此, 酵母双杂交系统获得的候选蛋白必须通过一些其它方法, 尤其需要在相似的生物体中进行验证。

Pull-down技术(也称蛋白质体外结合实验)是一种行之有效的验证酵母双杂交系统的体外实验技术(Wissmueller et al., 2011)。早在1988年, Smith和Johnson (1988)就利用谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)融合标签从细菌中一步纯化出GST融合蛋白。从此GST融合蛋白便在蛋白质相互作用研究领域得到极大地推广。利用GST融合蛋白进行Pull-down的基本原理是将靶蛋白-GST融合蛋白亲和固化在谷胱甘肽标记的珠子(作为与目的蛋白亲和的支撑物)上, 充当诱饵蛋白, 目的蛋白溶液与之孵育, 可从中捕获与之相互作用的捕获蛋白(目的蛋白), 洗脱结合物后通过SDS-PAGE (Sodium Dode-

cyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)电泳分析, 从而证实2种蛋白间的相互作用或筛选相应的目的蛋白。诱饵蛋白和捕获蛋白均可通过细胞裂解物、纯化的蛋白、表达系统以及体外转录翻译系统获得。在Pull-down实验中, 设计恰当的对照实验非常重要, 对照可以是表达有GST (非诱饵融合蛋白)的转化细胞裂解物, 也可是将GST加到非转化细胞的裂解物中。GST融合蛋白Pull-down方法可以用于鉴定能与已知融合蛋白相互作用的未知蛋白质, 以及2个已知蛋白质之间是否存在相互作用, 且方法简单易行、操作方便。但Pull-down的结果并不能真实地反应蛋白质之间的相互作用, 即不意味着在生理条件下一定能结合, 因为在活体内它们在亚细胞空间上不一定能相遇。

植物中许多蛋白之间的相互作用是通过酵母双杂交技术筛选发现的。大多数情况下, 获得表达2种蛋白的稳定转化植株既费时又费力, 故将这些蛋白共表达于自身植物物种中并进行互作验证非常困难。在这种情况下, 我们可采用一种瞬时表达系统来快速表达目的蛋白并检测蛋白互作。目前, 最常用且较稳定的植物瞬时表达系统是用含有表达假定相互作用蛋

收稿日期: 2019-08-01; 接受日期: 2019-08-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 31371447, No. 31771632)

* 通讯作者。E-mail: xuchongyi@ibcas.ac.cn

白质粒的农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株混合物注射本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)叶片(Hirsch et al., 2009; Fernández-Bautista et al., 2017; Muñoz et al., 2017)。一旦植物蛋白被瞬时表达,可采用免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation, Co-IP)(Takahashi, 2015)方法检测互作。Co-IP是以抗体与抗原之间的专一性作用为基础来研究蛋白质相互作用的经典方法,也是确定2种蛋白在完整细胞内生理性相互作用的有效方法。其原理是:当细胞在非变性条件下被裂解时,完整细胞内存在的蛋白互作得以保持,当蛋白粗提物与能够识别目的蛋白的琼脂糖凝胶交联的标签抗体珠子(agarose-conjugated anti-TAG beads)一起孵育时,与目的蛋白在体内结合的互作蛋白也被沉淀下来。这里通常采用目的蛋白融合一个商业化的标签,通过特异识别标签抗体珠子来实现。使用较多的商业化标签主要有HA (hemagglutinin)、Flag或c-Myc肽段。将粗提物与珠子一起温育后,用相同的提取缓冲液洗涤数次,以消除所有未与珠子结合的蛋白质,同时保留特定的互作蛋白。接着从珠子中洗脱蛋白质复合物,最直接的方法是用电泳上样缓冲液煮沸珠子。最后,用SDS-PAGE检测等份的粗提物(以分析所产生的蛋白质的表达水平)和洗脱产物(以检测目的蛋白之一的免疫沉淀和互作蛋白的免疫共沉淀),使用特异性标签抗体进行蛋白质印迹。这种方法常用于测定2种目的蛋白是否在体内结合;也可用于确定1种特定蛋白的新互作蛋白。该方法的优点在于:相互作用的蛋白均是经翻译后修饰的,处于天然状态;蛋白的相互作用在自然状态下进行,可避免人为影响;可分离得到天然状态下相互作用的蛋白复合物。缺点是:可能检测不到低亲和力蛋白与蛋白之间的瞬时相互作用;两种蛋白可能不是直接结合,而需要起桥梁作用的第3个蛋白存在;必须在实验前预测目的蛋白是什么,以选择最后检测的抗体。

Pull-down与Co-IP的原理类似,均是利用亲和配体捕获互作蛋白。不同之处在于Pull-down利用1个纯化且含有标签的蛋白作为诱饵来结合互作蛋白,通常用来证明蛋白之间直接的相互作用;Co-IP则采用固定的抗体捕获互作蛋白,用来证明2个蛋白之间的相互作用,但是不排除通过第3个蛋白介导的间接互作。下面我们将详细介绍GST标签融合蛋白的Pull-down和烟草瞬时表达系统中Co-IP两种技术的

实验流程,以期验证植物中蛋白的相互作用提供参考。

1 实验材料

Pull-down: 表达质粒及携带各种表达质粒的BL21大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株。

Co-IP: 生长约4周的本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* D.)幼苗(16小时光照/8小时黑暗,温度为(22±2)°C),表达质粒以及携带各种表达质粒的GV-3101或者EHA105农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株。

2 试剂

- Pull-down: 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)和 Glutathione Sepharose™ 4B (GE-Healthcare 17075601);
- Co-IP: 商业化琼脂糖凝胶交联的标签抗体珠子(agarose-conjugated anti-TAG beads, MBI Fermentas)、抗生素和LB (Luria-Bertani)液体培养基,苯甲基磺酰氟(PMSF)和蛋白酶抑制剂(Cocktail)为Pull-down与Co-IP共用。

3 试剂配方

Pull-down (表1)和Co-IP (表2)所用的试剂配方如下。

表1 GST Pull-down实验流程中所使用的相关试剂配方

Table 1 Related reagent formulations used in the GST Pull-down

| Solution | Composition | Final concentration |
|-----------------------|----------------------------------|--------------------------|
| 1× PBS buffer (pH7.4) | NaCl | 137 mmol·L ⁻¹ |
| | KCl | 2.7 mmol·L ⁻¹ |
| | Na ₂ HPO ₄ | 10 mmol·L ⁻¹ |
| | KH ₂ PO ₄ | 2 mmol·L ⁻¹ |
| NETN buffer | Tris-HCl (pH8.0) | 20 mmol·L ⁻¹ |
| | NaCl | 100 mmol·L ⁻¹ |
| | EDTA | 0.5 mmol·L ⁻¹ |
| 3× SDS sample buffer | Nonidet P-40 (NP-40) | 0.5% (v/v) |
| | Tris-HCl (pH6.8) | 167 mmol·L ⁻¹ |
| | Glycerin | 33% (v/v) |
| | Sodium dodecyl sulfate | 6.6% (w/v) |
| | Bromophenol blue | 0.01% (w/v) |
| | β-mercaptoethanol | 7.5% (v/v) |

表2 Co-IP实验流程中所使用的相关试剂配方**Table 2** Related reagent formulations used in the Co-IP

| Solution | Composition | Final concentration |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| Infiltration buffer | MES-KOH (pH5.6) | 10 mmol·L ⁻¹ |
| | MgCl ₂ | 10 mmol·L ⁻¹ |
| | Acetyl syringone (AS) | 0.2 mmol·L ⁻¹ |
| NB1 buffer | Tris-MES (pH8.0) | 50 mmol·L ⁻¹ |
| | Sucrose | 500 mmol·L ⁻¹ |
| | MgCl ₂ | 1 mmol·L ⁻¹ |
| | EDTA | 10 mmol·L ⁻¹ |
| | DTT | 5 mmol·L ⁻¹ |
| | PMSF | 1 mmol·L ⁻¹ |
| | Cocktail | 100× |
| 3× SDS sample buffer | Same as Pull-down buffer | |

4 仪器设备

超声波细胞粉碎机(JY92-IIN, 宁波新芝生物科技股份有限公司)为Pull-down技术专用; 控温摇床、微量分光光度计(Nano-300)、微量离心机、台式离心机、水浴锅、静音混合器(WH-986, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、免疫印迹设备和其它基础实验室设备等为Pull-down与Co-IP共用。

5 实验程序

5.1 Pull-down的实验方案

Pull-down实验的具体操作流程见图1。

5.1.1 GST融合蛋白的原核诱导表达

- (1) 将表达GST融合蛋白(实验组)和GST(对照组)的质粒分别转入BL21菌株中;
- (2) 分别挑取阳性单克隆于3 mL含有抗生素的LB液体培养基中, 37°C, 200 rpm, 过夜培养;
- (3) 将过夜培养的3 mL菌液接入300 mL (1:100)含有抗生素的LB液体培养基中, 37°C, 200 rpm摇菌2.5–3小时, 至OD₆₀₀=0.8左右;
- (4) 取0.5 mL菌液于4°C保存(作为诱导前菌液);
- (5) 同时在剩余菌液中加入终浓度为1 mmol·L⁻¹的IPTG, 16–27°C, 100–200 rpm, 诱导8–16小时;
- (6) 诱导后取0.5 mL菌液于4°C保存(作为诱导后菌液);

- (7) 4°C, 4 500 ×g离心15分钟, 收集诱导后菌体, 用20 mL PBS溶液重悬菌体后, 转移至50 mL离心管中;
- (8) 4°C, 4 500 ×g离心10分钟, 弃上清, 液氮速冻, -80°C保存(用于纯化);
- (9) 4°C, 10 000 ×g离心2分钟, 收集诱导前菌液和诱导后菌液, 用80 μL 1× SDS上样缓冲液重悬菌体;
- (10) 100°C, 煮沸样品5分钟, 15 000 ×g离心2分钟, 取上清对诱导结果进行SDS-PAGE检测。

5.1.2 50% GST Sepharose 4B slurry的准备

- (11) 将原75% Glutathione Sepharose 4B slurry弹至均匀;
- (12) 每管取677 μL原液, 1 000 ×g离心5分钟, 弃上清;
- (13) 加入500 μL PBS, 颠倒混匀, 1 000 ×g离心5分钟, 弃上清, 反复5次;
- (14) 加入500 μL PBS, 颠倒混匀, 配成50% Glutathione Sepharose 4B, 备用。

5.1.3 GST融合蛋白的纯化

- (15) 从-80°C冰箱中取出冻存的样品, 冰浴溶解菌体后, 加入4 mL PBS、40 μL PMSF (100 mmol·L⁻¹)和40 μL蛋白酶抑制剂Cocktail (100×)进行充分重悬;
- (16) 超声破碎, 频率: 100–200 J·S⁻¹; 超声40秒, 停止20秒, 共5次(菌体由浑浊变为澄清);
- (17) 4°C, 15 000 ×g离心40分钟;
- (18) 冰上转移细胞裂解液上清至洁净的10 mL离心管中;
- (19) 在细胞裂解液上清中加入50 μL 50% Glutathione Sepharose 4B, 4°C, 静音混合器上温和旋转孵育30–60分钟;
- (20) 1 500 ×g离心5分钟, 弃上清, 此时Sepharose上即结合了GST融合蛋白或GST;
- (21) 在管中加入预冷的500 μL PBS (沿壁加入, 动作轻柔, 以免打断珠子与蛋白的连接), 轻晃悬浮珠子, 将Sepharose洗涤1次, 1 500 ×g离心3分钟, 弃上清;
- (22) 用PBS洗涤3次, 最后用小枪头吸净珠子表面的水膜, 即获得结合有GST融合蛋白或GST的Sepharose, 用大口径的移液枪头转移Sepharose至1.5 mL尖底离心管中;
- (23) 如用于检测, 在Sepharose中加入15–20 μL 1× SDS蛋白上样缓冲液, 沸水煮3分钟, 15 000 ×g离

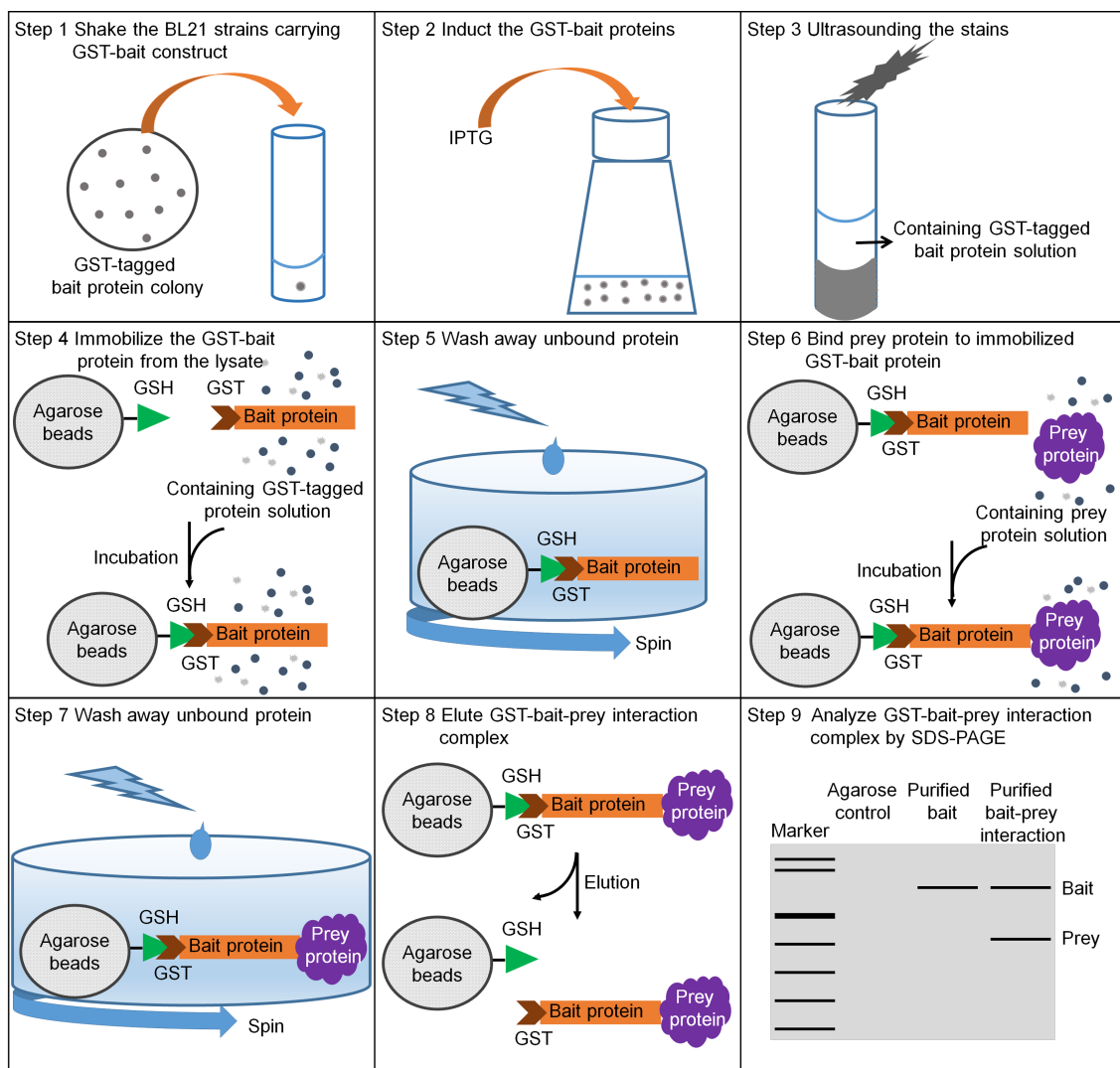


图1 利用原核表达系统检测融合GST (谷胱甘肽-S-转移酶)的诱饵蛋白与捕获蛋白互作的Pull-down实验流程图
IPTG: 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷; GSH: 谷胱甘肽

Figure 1 Schematic representation of the Pull-down procedure in prokaryotic expression system to test the interaction between a bait protein tagged with GST (glutathione S-transferase) and a prey protein
IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; GSH: Glutathione

心1分钟, 取上清做SDS-PAGE电泳;

(24) 如用于Pull-down检测, 继续后续操作。

5.1.4 GST体外蛋白质结合分析(GST Pull-down)

(25) 将结合有GST融合蛋白的Glutathione Sepharose 4B悬浮在500 μ L NETN缓冲液中, 加入20–30 μ L含有其它蛋白(如细胞裂解物或纯化的蛋白)的溶液, 同时采用结合有GST的Glutathione Sepharose 4B平行操作作为对照;

(26) 4 $^{\circ}$ C条件下, 在静音混合器上温和孵育5–8小时;

(27) 1 200 $\times g$ 离心2分钟, 吸去上清, 注意勿扰动底层的Sepharose;

(28) 加入200 μ L NETN缓冲液对Sepharose进行洗涤, 注意贴壁加入, 不可直接冲击Sepharose, 随后轻柔晃动, 使Sepharose重悬即可;

(29) 1 000 $\times g$ 离心2分钟, 吸去上清, 注意勿扰动底层的Sepharose;

(30) 重复洗涤2–3次;

(31) 吸干Sepharose上方的水层后, 加入20–30 μL $1\times$ SDS蛋白电泳上样缓冲液, 沸水浴4分钟, -20°C 冻存;

(32) 做SDS-PAGE和western blotting检测;

(33) 用两种标签的抗体做western blotting检测, 一种检测Pull-down的蛋白, 另一种检测互作蛋白。

5.2 Co-IP的实验方案(图2)

5.2.1 烟草的准备

转化前1天将4周苗龄的烟草小苗转移至黑暗中培养, 转化当天浇足水分, 恢复光照, 烟草的状态是决定瞬时表达成功与否的关键。

5.2.2 烟草叶片的瞬时表达

第1天

(1) 小摇 分别将含有不同标签诱饵蛋白和捕获蛋白质粒的农杆菌及P19农杆菌(P19质粒为卡那抗性, 转入EHA105农杆菌菌株中, P19有助于目的蛋白的高水平表达和状态维持)接种到3–5 mL含有适宜抗生素的LB培养基中, 28°C , 200 rpm, 过夜培养;

第2天

(2) 大摇 将过夜培养的菌液分别转接至10–20 mL新的含有适宜抗生素、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES和 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮(AS)的LB培养基中, 28°C , 200 rpm, 过夜培养至 $\text{OD}_{600}=3$;

第3天

(3) 收集菌液 将农杆菌菌液于 $3\text{ }200\times g$ 离心10分钟(采用台式离心机), 弃上清;

(4) 重悬菌液 将离心后的菌体分别用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镁重悬至 $\text{OD}_{600}=1$;

(5) 静置菌液 加入AS至终浓度为 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 室温静置至少3小时;

(6) 准备注射液 将携带诱饵蛋白和捕获蛋白构建的重悬液等体积混合, 以携带诱饵蛋白或捕获蛋白与空载体的组合作为对照, 同时每个组合加入等体积的P19重悬液;

(7) 注射烟草 使用1 mL去掉针头的注射器将注射液注入平展的烟草叶片, 每株最好注射2枚叶片, 做好标记, 勿重复使用注射器;

第4–6天

(8) 分别于转化后的1、2和3天收取标记过的叶片,

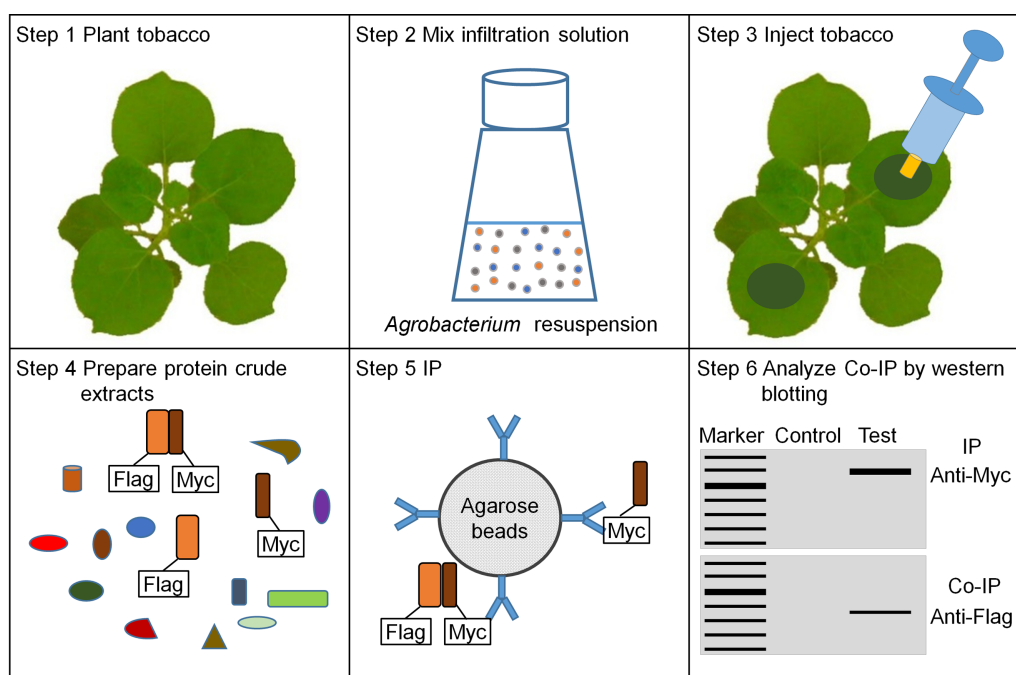


图2 利用烟草瞬时转化体系检测融合Myc的诱饵蛋白与融合Flag的捕获蛋白互作的Co-IP实验流程图

Figure 2 Schematic representation of the Co-immunoprecipitation procedure from infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves to test the interaction between a prey protein tagged with Flag and a bait protein tagged with Myc

-80°C冻存。

5.2.3 蛋白粗提液的准备

- (9) 从-80°C冰箱中取出冷冻烟草叶片, 放入液氮, 称取约2 g冷冻叶片, 迅速放回液氮中;
- (10) 在液氮预冷过的研钵中将烟草叶片研成粉末;
- (11) 转移粉末至10 mL离心管中, 用1.5-2 mL的裂解提取液NB1重悬, 并用振荡器充分混匀;
- (12) 放置冰上反应30分钟, 预冷台式离心机;
- (13) 4°C条件下, 15 000 ×g离心1小时;
- (14) 冰上取上清, 用双层神奇滤布(Miracloth)过滤上清, 注意勿起泡沫;
- (15) 测量每个蛋白粗提液的浓度。

5.2.4 IP (以下操作均在4°C条件下进行)

- (16) 准备IP的样品, 在10 mL的圆底离心管中补充裂解提取液NB1, 使每个蛋白的粗提液体积和蛋白浓度一致;
- (17) 用大口径移液枪头分别吸取20 μL的琼脂糖凝胶交联的标签抗体珠子(agarose-conjugated anti-TAG beads)加入各蛋白粗提液中;
- (18) 将装有IP混合物的10 mL离心管分别平放在静音混合器上, 温和旋转孵育3小时(时间可以调整);
- (19) 孵育后, 用台式离心机1 000 ×g离心5分钟, 弃上清;
- (20) 用1 mL裂解提取液NB1重悬珠子, 并用大口径的移液枪头转移至1.5 mL尖底离心管中;
- (21) 静音混合器上温和旋转孵育5分钟;
- (22) 1 000 ×g离心5分钟, 弃上清;
- (23) 用1 mL裂解提取液NB1清洗珠子, 并旋转孵育5分钟;
- (24) 1 000 ×g离心5分钟, 弃上清;
- (25) 重复(23)和(24)步骤至少3次;
- (26) 加入适量1× SDS蛋白上样缓冲液到珠子中, 100°C煮沸5分钟, 5 000 ×g离心1分钟, 准备western blotting检测;
- (27) 用2种标签的抗体做western blotting检测, 一种检测免疫沉淀蛋白, 另一种检测Co-IP的蛋白。

6 注意事项

6.1 Pull-down

- (1) 细胞裂解需采用温和的裂解条件。为了不破坏细

胞内存在的蛋白与蛋白之间的相互作用, 多使用非离子变性剂(NP-40或Triton X-100), 不可使用高浓度的变性剂(0.2% SDS), 且细胞裂解液中要添加各种酶的抑制剂。

- (2) 要确保抗体的特异性。不表达抗原的细胞溶解物中添加抗体后不会引起共沉淀; 同时, 为确保共沉淀的蛋白是由所加入的抗体沉淀得到, 最好选用单克隆抗体, 以免发生污染。

- (3) Pull-down的结果需进一步实验验证。确定蛋白间的相互作用是在细胞中发生, 而非源于细胞裂解, 需通过进一步的蛋白质定位确定。

6.2 Co-IP

- (1) 裂解缓冲液组分(Co-IP实验成功的关键)。为避免非特异性离子和疏水蛋白质与树脂之间的相互作用, 裂解缓冲液必须含有缓冲物质(如Tris)和一定量的盐及洗涤剂。此外, 为防止目的蛋白的降解, 需加入一定量的蛋白酶抑制剂。在烟草瞬时转化体系中, 由于本氏烟草是一种富含酚类物质的茄科植物, 因此必须添加还原剂(如DTT)和多酚吸附剂(如PVPP), 以免形成不溶性多酚-蛋白质复合物, 干扰蛋白之间的相互作用。另外, 鉴于蛋白自身的性质, 裂解液中必须包含特异的金属或辅助因子。

- (2) 琼脂糖凝胶交联的标签抗体珠子的选用。以往通常采用蛋白质A或G结合的树脂与抗体结合后再与蛋白粗提液共孵育进行免疫沉淀。现今已有商业化琼脂糖凝胶交联不同标签抗体珠子生产, 使用此种抗体珠子进行免疫沉淀, 不仅可简化操作步骤, 而且可提高产物的清洁度, 故其成为免疫沉淀较好的选择。

- (3) 注射液中需添加沉默抑制蛋白。例如, 注射液中添加番茄丛生阻碍生长病毒P19或烟草蚀刻病毒HC-Pro抑制蛋白, 有助于目的蛋白高水平表达和构象的维持。

- (4) 选择适宜的烟草叶片。一般情况下, 4周苗龄的烟草, 从顶部向下第3和第4片叶子较平展, 更适宜注射。勿使用开花的烟草, 因其蛋白质的表达水平会降低。

- (5) 蛋白粗提液的过滤。该步骤采用双层的神奇滤布清除杂质, 较过滤器更易操作, 使用前用裂解缓冲液浸泡神奇滤布, 可降低蛋白粗提液的损失。

- (6) 孵育时间。可根据蛋白互作强度和表达量的差异做出相应调整。

参考文献

- Fernández-Bautista N, Fernández-Calvino L, Muñoz A, Castellano MM** (2017). HOP3, a member of the HOP family in *Arabidopsis*, interacts with BiP and plays a major role in the ER stress response. *Plant Cell Environ* **40**, 1341–1355.
- Hirsch S, Kim J, Muñoz A, Heckmann AB, Downie JA, Oldroyd GED** (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**, 545–557.
- Muñoz A, Mangano S, González-García MP, Contreras R, Sauer M, De Rybel B, Weijers D, Sánchez-Serrano JJ, Sanmartín M, Rojo E** (2017). RIMA-dependent nuclear accumulation of IYO triggers auxin-irreversible cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **29**, 575–588.
- Smith DB, Johnson KS** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31–40.
- Stasi M, De Luca M, Bucci C** (2015). Two-hybrid-based systems: powerful tools for investigation of membrane traffic machineries. *J Biotechnol* **202**, 105–117.
- Takahashi Y** (2015). Co-immunoprecipitation from transfected cells. In: Meyerkord CL, Fu HA, eds. Protein-Protein Interactions. New York: Humana Press. pp. 381–389.
- Wissmueller S, Font J, Liew CW, Cram E, Schroeder T, Turner J, Crossley M, Mackay JP, Matthews JM** (2011). Protein-protein interactions: analysis of a false positive GST pulldown result. *Proteins* **79**, 2365–2371.

Pull-down and Co-immunoprecipitation Assays of Interacting Proteins in Plants

Chongyi Xu*

Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract Protein-protein interactions play a key role in cellular signaling, involved in various biological processes. Studies on these interactions are therefore crucial toward understanding the regulatory networks of cellular signaling. It is a standard practice that the protein-protein interactions identified by the yeast two-hybrid system should be independently confirmed by *in vitro* and *in vivo* approaches. Pull-down and co-immunoprecipitation (Co-IP) are routine approaches to detect protein-protein interactions. Pull-down assay is used to detect direct or physical interactions between proteins *in vitro*. In plant biology studies, one of the most convenient methods to detect protein-protein interactions is the transient expression of the target proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves followed by the Co-IP assay. In this paper, we describe the principles and protocols for the GST tag-based pull-down assay and the Co-IP assay of proteins transiently expressed in *N. benthamiana* leaves, providing a reference for detecting plant protein-protein interactions.

Key words plants, protein-protein interactions, Pull-down, Co-immunoprecipitation

XU CY (2020). Pull-down and Co-immunoprecipitation assays of interacting proteins in plants. *Chin Bull Bot* **55**, 62–68.

* Author for correspondence. E-mail: xuchongyi@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 孙冬花)