

酵母正反向 n-杂交系统研究进展

关丽英 李 伟 刘祥林*

(首都师范大学生物系 北京 100037)

摘要: 介绍酵母单杂交、双杂交、三杂交等一系列酵母正向 n-杂交系统的原理、研究进展以及应用, 同时对在此基础上发展出的酵母反向 n-杂交系统的原理、研究进展、应用前景等也进行了综述。

关键词: 酵母, 正向 n-杂交, 反向 n-杂交

中图分类号: Q5-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0090-05

蛋白质之间的相互作用在生命过程中起着重要的作用, DNA 的复制与转录、RNA 的剪切、蛋白质的翻译和修饰、生物的应答反应以及信号的传导和许多的代谢过程都存在着蛋白质与蛋白质间的相互作用。1989 年 Fields^[1] 创立的酵母双杂交系统 (Two-hybrid system) 为研究蛋白质交互作用提供了崭新的方法。近年来, 随着人们对该系统的广泛应用, 双杂交系统得到了不断的完善和改进, 并衍生出单杂交系统 (One-hybrid system)、三杂交系统 (Three-hybrid system) 等一系列相关技术, 这些技术统称为酵母正向 n-杂交系统 (yeast forward n-hybrid systems), 其广泛应用有力的推动了蛋白质与 DNA、蛋白质与 RNA、以及多种蛋白质分子间相互作用的研究。同时在此基础上发展出了反向 n-杂交系统 (reverse n-hybrid systems), 用于研究包含重要功能信息的功能域、作用位点以及影响蛋白质间结合、解离的因素。

1 酵母正向 n-杂交系统

1.1 双杂交系统 酵母双杂交系统最初是建立在对酵母转录因子 GAL4 认识基础上的,

* 联系人

收稿日期: 2002-05-10, 修回日期: 2002-06-18

一个完整的转录因子都具有两个结构域：DNA结合域(DNA-BD)和转录激活域(DNA-AD)，DNA-BD可结合DNA上的特异序列，并使转录激活域DNA-AD位于它所调节基因的上游，转录激活域可以同转录复合体的其它成分相互作用启动它所调节基因的转录。Fields^[1]等将DNA-BD与已知诱饵蛋白X融合，将DNA-AD与cDNA文库、基因片段或基因突变体(以Y表示)融合，构建出BD-X质粒载体和AD-Y质粒载体，分别表达含蛋白X的杂合体I和含蛋白Y的杂合体II，双杂交系统也因此而得名。将两种穿梭质粒载体共转化含有特定报告基因(如*LacZ*、*HIS3*、*LEU2*等)且去除了相应转录因子编码基因的酵母菌株，X与Y的相互作用导致了BD和AD在空间的接近，重建了转录因子活性从而激活启动子调节的报告基因的表达。通过筛选阳性菌落即可检测已知蛋白质间相互作用、蛋白质二聚体的形成、确定蛋白质相互作用的结构域或重要活性位点以及从cDNA文库中筛选与已知蛋白X相互作用的未知蛋白质Y的编码序列等。

双杂交系统最大的优点是不需要分离纯化蛋白质，整个过程只对核酸进行操作；同时充分利用了酵母生长速度快、易操作的特点。

在酵母双杂交系统的早期阶段以 β -半乳糖苷酶*LacZ*作为报告基因，然而，由于筛选策略依赖于报告基因的转录激活，那么任何导致转录激活的事件都可能被误认为是BD-X和AD-Y发生了相互作用，从而出现了许多“假阳性”克隆^[2]。目前采用了多种方法增加检测的特异性，其中包括采用酵母着丝粒载体和截断的启动子如*ADH1*以降低酵母中双杂交蛋白的表达；采用多个报告基因，如James^[3]等人利用3种不同的报告基因(*ADE2*、*HIS3*和*LacZ*)构建了PJ69-4A菌株，只有3个不同报告基因同时被启动才会赋予菌株以特定表型，从而显著减少了假阳性；对于那些能够直接激活报告基因转录的自我激活蛋白发展出一种交换双杂交系统(Swapped hybrid-system)^[4]，将诱饵蛋白X和激活域AD融合而BD-Y文库被筛选，显著减少了由于自身激活而引起的假阳性问题；针对自我激活问题还建立了一种RNA聚合酶III(PolyIII)依赖的双杂交系统^[5]，内源的SNR6基因被一个3'调控区含有Gal4p结合位点的突变等位基因所取代构成了这一实验的报告基因，诱饵蛋白X与Gal4pBD融合(BD-X)而Y与polIII激活蛋白 τ 138(τ 138-Y)融合，BD-X/ τ 138-Y相互作用致使带有 τ 138亚基的polIII转录激活，TFIII因子重建为功能因子。

另外在筛选过程中也常常会出现本身存在却无法检测到的情况，即所谓的“假阴性^[2]”。引起假阴性的原因很多，其中一个重要原因是编码蛋白的基因在AD-Y文库中的表现度，因此文库中DNA的来源就显得非常关键，一方面我们可以利用校正的cDNA文库降低高表达cDNA的表现度；另一方面可根据筛选蛋白质的性质来决定采取何种文库。对于分离的、不连续的蛋白区域更多采用随机引物cDNA文库，对于编码全长蛋白的克隆则采用oligo-T引物cDNA文库，而对于那些由完整基因组编码且含有较小的基因间序列和内含子的有机体，筛选基因组文库要优于cDNA文库，最近已有人报道了用酵母蛋白作为诱饵来筛选一个复杂的基因组文库^[6]。

在传统酵母双杂交系统中，BD-X和AD-Y表达的融合蛋白必须定向到酵母细胞核中来激活报告基因的转录，这就可能限制了大量非核内蛋白质如膜受体蛋白、细胞外分泌蛋白等在此系统中的应用，针对这一问题相继构建了泛素专一性蛋白酶系统(Ubiquitin-Proteases System, USPS)和Sos恢复系统(Sos Réclutiment System, SRS)^[7]在USPS中，蛋白质X与Y相互作用，使得与之相连的两个泛素片段(其中泛素端带有错

义突变)结合,恢复了其正常功能,从而使泛素专一蛋白酶(UBP)切下报告蛋白,再经免疫印迹呈阳性,则可确定X和Y发生了作用。SRS是将蛋白质间的相互作用从核内转移到酵母细胞膜上进行,诱饵蛋白X与人的一种鸟苷酸交换因子Sos蛋白融合,待筛选蛋白质Y定位于细胞膜上。X与Y的相互作用促使Sos作用于细胞膜上的Ras蛋白质,激活ras途径,使细胞在36℃能够生长。

酵母双杂交系统主要还是建立在酵母这一体系中,以酵母细胞作为相互作用的反应场所,外源基因的转录、翻译、蛋白产物的修饰、折叠及细胞内定位等过程都是在酵母细胞中完成的。而酵母毕竟还是一种较低等的真核生物,其各种生物学功能特别是蛋白质的翻译后修饰等水平很难与高等真核生物相比,若要进一步研究蛋白质的生物学功能,必须建立高等生物体系的双杂交系统,近年来,已初步建立了哺乳动物细胞的双杂交系统。但是,筛选到的蛋白并不代表体内一定发生了交互作用,一方面筛选到的两个蛋白在体内可能是表达在不同细胞、或是出现在细胞生长的不同周期;另一方面也可能cDNA编码的某个蛋白的一部分能和目标蛋白起交互作用,而完整的蛋白则无法和目标蛋白结合。所以,双杂交只是反应蛋白质间能发生作用的可能性,必须经过其它实验验证,特别要与生理功能研究相结合才不会误入歧途。尽管如此,双杂交至少提供了人们可以深入研究的对象,仍是研究蛋白间交互作用的有利工具。

1.2 酵母单杂交系统 酵母单杂交系统是在双杂交系统基础上发展出的一种研究蛋白质和DNA相互作用的实验体系,这一体系中无需BD-X的参与,利用在相关生物体系中作为重要结合位点的特异DNA序列取代了原来的DNA Gal4p或LexA结合位点,AD-Y直接与该位点结合以启动下游报告基因的表达,因而通过对AD-Y文库的筛选可分离出与靶DNA序列直接作用的蛋白质Y。其操作大致如下:首先是DNA结合位点的鉴定,并尽可能将其准确定位克隆到驱动报告基因的启动子上,接着该结构被导入到酵母细胞中,检测其基础转录活性,因为酵母内源表达蛋白可能结合到该位点或其临近序列并激活报告基因,接下来的步骤类似于双杂交系统。单杂交系统主要用来分离鉴定与特异DNA序列结合作用的蛋白质并同时获得其编码基因。到目前为止,利用单杂交系统已成功的鉴定了多种蛋白质,如酵母起始复制复合体Orc6p蛋白、哺乳动物的嗅觉神经转用因子、哺乳动物神经元中钠通道抑制子以及一个金属相应结合子。该系统为转录因子的分离鉴定提供了有效的实验手段。

1.3 酵母三杂交系统 三杂交系统是近年在酵母双杂交技术的基础上发展的由活性小分子鉴定靶蛋白的方法。其基本原理^[8]与双杂交类似,只是在“钩”(X)和“鱼”(Y)之间加上“饵”(Z)构成三杂交系统中的3个组分。其中“饵”(Z)是由活性小分子和配体A连接而成的,“钩”是由配体A的受体蛋白与BD融合而成,“鱼”是AD-Y文库中的蛋白。当待筛选的靶组织的cDNA文库中的某一蛋白与小分子相互作用时,报告基因转录激活,这时细胞可被明显检测到。

根据“饵”的不同,酵母三杂交系统可简单分为:小配体三杂交系统、RNA三杂交系统、多肽三杂交系统和激素三杂交系统。小配体三杂交系统是利用二聚化化合诱导物研究受体与有机小配体间的作用,有机小配体是一杂合体:一部分可识别结合蛋白,另一部分可以是用来筛选其受体的已知小配体也可用来筛选已知受体的配体文库,采用该方法从cDNA文库中筛选到FK506的靶蛋白FKBP12^[9];RNA杂交系统中,BD-X/AD-Y相互作用由第三个分子RNA介导,与小配体三杂合系统相类似,杂合RNA的一

部分是已知 RNA, 与蛋白质 X 相互作用, 另一部分可用来分析或筛选 RNA 或 RNA 结合蛋白 Y; 多肽为配体的三杂交系统是在研究跨膜受体胞外结构域的过程中发展出来的, 蛋白质间的相互作用由多肽配体介导, 形成一稳定的复合体, 可诱导 X 或 Y 构象变化, 促进二者结合, 或是诱导受体的胞外结构域二聚化, 利用这一系统阐明了生长激素受体和血管内生长因子受体 (flk1) KDR 的作用机理, 筛选了某些肽库, 也可以用来寻找信号传导过程中作用蛋白质及其相互作用的机理; 由于关键氨基酸 (如酪氨酸、丝氨酸) 的磷酸化是某些蛋白质加工成熟的重要一步, 且肽链中的非肽基部分参与了蛋白质的相互作用, Osborne^[10] 等人在原双杂交系统的基础上构建了第三个反式作用因子的质粒, 可表达出氨基酸残基磷酸化的酪氨酸激酶 Lck, 只有蛋白质 X、Y 中的一种被磷酸化后, 两种融合蛋白才能彼此结合。作为第三个因子除了介导一个蛋白质磷酸化外, 还有利于形成一个稳定的三联复合体。

三杂交系统提供了快速、多用的体内检测 RNA - 蛋白间相互作用的新方法, 具有更广泛的应用: 可分析确定 RNA - 蛋白质作用的精确结构域, 甚至单个核苷酸或氨基酸残基; 用于鉴定和克隆那些识别结合有重要生理功能 RNA 的蛋白质; 可用于调控的机理研究、疾病的防治以及抗病毒药物的研制开发; 通过构建杂交 RNA 库, 可筛选与特定蛋白结合的 RNA; 有可能在此基础上发展出四杂交系统研究 RNA-RNA 间的相互作用。

2 反向 n-杂交系统

在通过双杂交系统获得大量相互作用的蛋白质的同时, 研究蛋白质中包含重要信息的功能域、作用位点以及影响蛋白质结合、解离因素成为当前研究的新热点, 因此在双杂交系统基础上发展出了酵母反向双杂交系统, 其机理类似与酵母双杂交, 只是报告基因导致的生长表型正好相反, 当 BD-X 与 AD-Y 相互作用时启动的报告基因表达对酵母细胞有毒性或是致死, 而只有不发生相互作用的情况下, 报告基因不被启动细胞才能生长。目前常用的反式选择性报告基因有 *URA3* 和 *CYH2*。*URA3* 作为反式选择性报告基因, BD-X/AD-Y 相互作用激活 *URA3* 表达, 其编码的酶使酵母细胞在 5FOA 存在下不能生长, 即表现酵母菌对 5FOA 敏感, 相反如果 BD-X/AD-Y 相互作用被阻断, *URA3* 不表达, 酵母菌则表现对 5FOA 抗性, 从而很容易的检出与某一蛋白相互作用的突变体。反式报告基因 *CYH2* 的表达使酵母对环-亚胺敏感。在另一体系中, 双杂交的相互作用激活 *Tet*、抑制 *TetR* 表达, *TetR* 反过来抑制正向选择报告基因 *HIS3* 的表达, 从而使酵母菌呈 *HIS* 营养缺陷表型。

目前主要利用顺式作用突变体即相互作用缺陷的等位基因和反式因子如解离的蛋白质、多肽或小分子来阻断蛋白质与蛋白质的相互作用^[11]。现在鉴定的突变等位基因主要是一些依赖条件的突变, 如温度敏感型突变, 这一类突变只在某一限制温度下影响蛋白质间的相互作用, 而其它部位则不影响, 这样可以在同一酵母细胞中同时进行正、反向筛选。但在筛选过程中常常会出现一些无意义的突变, 给筛选带来困难, 为此人们在蛋白质的 C-端再融合一个易检测的蛋白如 β -半乳糖苷酶 (*GUS*) 和绿色荧光蛋白 (*GFP*), 这样通过阴性筛选结合 *GUS* 和 *GFP* 在酵母克隆中筛选作用缺陷的等位基因。对于一些反式作用解离因子的筛选已有所报道。最近 Yong 等利用 N 型钙离子亚基间的相互作用建立的反式双杂交对 156,000 个合成的化合物库进行了系统筛选, 获得了

一个抑制 N 型 Ca^{2+} 通道的活性小分子 WAY141520, 该小分子通过解离 $\beta 3$ 和 $\alpha 1\beta$ 两个基因而抑制 N 型 Ca^{2+} 通道的活性, 它可能发展成一类新型的、有潜在治疗意义的钙离子通道拮抗剂。基于上述原理, Vidal 等人提出了反式单杂交系统, 利用它成功的分离鉴定了 P53 突变体。

3 结语

酵母正反向 n-杂交系统作用模式比较如图 1^[11] 所示。这些系统已被广泛应用于高灵敏度地检测蛋白与蛋白的交互作用, 寻找在蛋白-蛋白交互作用中起关键作用的结构域, 寻找与靶蛋白相互作用的新蛋白以及绘制蛋白质相互作用图谱等。相信酵母各种杂交系统的建立与逐步发展完善将为人们认识越来越多的大分子间相互作用及其生物功能的相关性, 为人们阐明各种生物学过程发生的分子机制提供强大的技术支持。

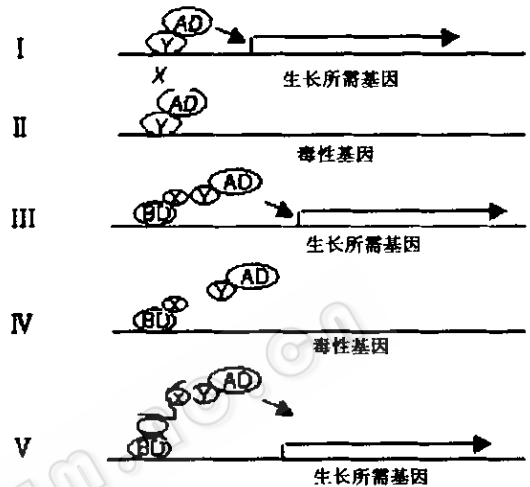


图 1 酵母正反向 n-杂交系统

I 和 II 分别为酵母正反向单杂交系统, III 和 IV 分别为酵母正反向双杂交系统, V 为酵母三杂交系统

参考文献

[1] Fields S, Song O. Nature, 1989, 340: 245 ~ 246.
 [2] Albertha J M, Simon J, Marc V. Yeast, 2000, 17 (4): 88 ~ 94.
 [3] James P, Halladay J, Craig E A, et al. Genetics, 1996, 144 (2): 1425 ~ 1436.
 [4] Soares M B, Bonaldo M F, Jelenz P, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91 (4): 9228 ~ 9232.
 [5] Fromont-Racine M, Rain J C, Legrain P, et al. Nucleic Acids Res, 1994, 22 (1): 1778 ~ 1779.
 [6] Brachmann R, Vidal M, Boeke J, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93 (3): 4091 ~ 4095.
 [7] 秦宝明, 罗述金, 米志勇, 等. 生物工程进展, 1998, 18 (4): 2 ~ 9.
 [8] 唐功利, 麻锦彪, 吴厚铭, 等. 科学通报, 2000, 45 (13): 1345 ~ 1357.
 [9] Putz U. nucleic Acids Res, 1996, 24: 4834 ~ 4840.
 [10] Licitra E J. Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 12817 ~ 12821.
 [11] Marc V, Pierre L. Nucleic Acid Research, 1999, 27 (4): 916 ~ 922.