

酵母双杂交系统及其应用研究进展

崔红军, 魏玉清 (北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏银川 750021)

摘要 酵母双杂交系统作为一种有效研究蛋白质相互作用的分子生物学方法, 具有真实、高效、敏感、广泛的特点, 被广泛应用于诸如蛋白质组学、基因组学等领域。主要对酵母双杂交技术的原理、特点及应用现状进行了综述。

关键词 酵母双杂交系统; 蛋白质相互作用; 应用

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)13-045-03

Review on Application Status of Yeast Two Hybrid System

CUI Hong-jun, WEI Yu-qing (College of Bioscience and Bioengineering, Beifang University of Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract The yeast two hybrid system, as a kind of effective molecular biology method for studies of protein interactions, is real, effective, sensitive, and popular, which is widely used in proteomics, genomics and other fields. The principle, characteristics and application status of yeast two hybrid technology were reviewed.

Key words Yeast two hybrid system; Protein-protein interaction; Application

蛋白质是细胞中的实际功能分子, 具有负责细胞生物化学活性的功能, 随着生物化学和分子生物学研究技术和手法的不断深入, 蛋白质分子间的相互作用作为蛋白质组学研究的主要内容之一已成为近年来的研究热点。蛋白质互作不但能够提供蛋白质本身功能的信息, 而且能够提供蛋白质在代谢调控、信号传导和复合体中起作用的信息^[1]。筛选、分析蛋白质互作的方法有很多种, 主要包括生物化学法, 如共纯化、亲和纯化和免疫共沉淀, 质谱技术, 离子体共振技术, 生物物理技术, 噬菌体展示技术和酵母双杂交技术等^[2]。目前, 酵母双杂交技术当属研究蛋白质互作方法中较为高效、灵敏和简便的一种方法。

1 酵母双杂交系统的基本原理

酵母双杂交系统是由 Fields 等^[3]根据真核转录调控的特点于 1989 年首次提出并建立, 可直接于细胞内检测蛋白质的相互作用。其原理为: 真核生物有上游激活序列 (UAS), 在转录水平上进行基因的表达调控, 如酵母转录因子 GAL4 含有 2 个或 2 个以上的结构域, 其中包括 2 个极其重要且可以彼此分割开的结构域, DNA 结合结构域 (DNA-binding domain, BD) 和 DNA 转录激活结构域 (Transcription-activating domain, AD)。BD 识别并结合于效应基因上游激活序列, AD 与 BD 结合成转录复合体, 从而激活 UAS 下游报告基因的转录。AD 和 BD 的单独存在并不能激活下游基因的转录作用, 只有两者在空间上互相接近, 下游报告基因才能得以表达。BD 与表达已知蛋白 X 的基因片段连接, 构建成 BD-X 质粒载体, AD 与 cDNA 文库表达未知蛋白 Y 的基因片段或基因突变体 Y 连接, 构建成 AD-Y 质粒载体, 把蛋白 X 和 Y 分别称为诱饵蛋白 (bait) 和靶蛋白 (prey), 将 BD-X 和 AD-Y 共同转化到酵母菌体内, 此酵母菌体内有报告基因 (LacZ、His、Leu、Trp、ADE 等^[4]) 而本身并无报告基因转录活

性。当 BD-X 和 AD-Y 这 2 个融合蛋白表达并相互作用时, 则在空间结构上将 AD 和 BD 拉近, 从而形成转录因子, 激活 UAS 下游报告基因的表达, 使此转化体可以在 His、Leu、Trp、ADE 等特定营养缺陷培养基上生长, 并由于 LacZ 报告基因的表达, 酵母菌会分泌 β -半乳糖苷酶, X-gal 在 β -半乳糖苷酶的存在下, 会变成蓝色底物, 从而使阳性菌落呈蓝色。当 BD-X 和 AD-Y 不融合时, 下游基因不表达, 据此分析判断 2 个蛋白是否相互作用。在目前通用系统中, 根据 BD 来源不同可分为 GAL4 系统和 LexA 系统。真核细胞中是 GAL4 系统; 原核细胞中是 LexA 系统, 其转录启动因子是 LexA。

2 酵母双杂交系统的研究历史

酵母双杂交系统在实际应用中不断得到改进和完善, 并衍生出几个新的系统。1993 年, Li 等^[5]提出酵母单杂交系统, 在单杂交系统中无需转录激活结构域和诱饵蛋白的融合蛋白与 DNA 结合结构域和靶蛋白的融合蛋白结合来激活报告基因的表达, 转录激活结构域融合蛋白可直接与特异 DNA 序列结合激活报告基因表达, 单杂交系统是研究转录因子分离鉴定的有效方法^[6]。1996 年, Vidal 等^[7]提出反向酵母双杂交系统, 即使用表达产物对酵母菌本身有毒性的报告基因, 当诱饵蛋白和靶蛋白没有相互作用或者相互解离时酵母菌株能够正常生长。此双杂交模式更适用于研究蛋白质间作用位点或者利用抑制或阻断蛋白质间相互作用来寻找药物。1996 年, Sengupta 等^[8]提出酵母三杂交系统, 它与双杂交的不同在于激活结构域融合蛋白与结合结构域融合蛋白之间的相互作用需要第三组分的介导来完成, 该组分可为 RNA、蛋白质或小分子物质。1997 年, Aronheim 等^[9]提出 Sos 招募系统, 其原理为哺乳动物的 Ras 鸟苷酸交换因子 Sos 蛋白为一种胞质蛋白, 酵母中其同源 Ras 鸟苷酸交换因子 Cdc25 蛋白定位于细胞膜上。Cdc25 突变可产生温度敏感缺陷型细胞, 使酵母菌株不能在 37 °C 下生长, 可将 Sos 蛋白定位在细胞膜上代替 Cdc25 蛋白的作用, 激活 Ras 信号通路, 恢复酵母菌株在 37 °C 条件下生长的能力。酵母双杂交及其衍生系统在蛋白质与蛋白质间、蛋白质与核酸间以及蛋白质与其他小分子间互作的作用中起着举足轻重的作用。

基金项目 北方民族大学国家级大学生创新创业训练计划项目 (201311407019)。

作者简介 崔红军 (1990 -), 女, 河北河间人, 本科生, 专业: 生物工程。

收稿日期 2015-03-24

3 酵母双杂交系统的主要特点

酵母双杂交技术可以精确地分析已知蛋白间的相互作用,以及筛选编码未知蛋白的基因,具有真实性、敏感性、高效性、广泛性等^[10]特性。即便双杂交是检验蛋白质互作的有效方法,其自身也存在缺点,如易产生假阳性、假阴性等。

3.1 酵母双杂交系统的优点

(1) 检测蛋白质的相互作用是在真核细胞内进行,在核酸水平上操作,避免了蛋白质的分离纯化过程,保证了蛋白质的活性,所以能更加真实地反映蛋白质互作情况。

(2) 报告基因表达产物的积累,使双杂交技术能敏感地检测到蛋白质间微弱、暂时的作用。

(3) 可以直接从 cDNA 文库中筛选与已知蛋白质相互作用的基因片段。双杂交技术应用广泛,可采用不同类型细胞构建 cDNA 文库,分析不同类型细胞的蛋白质功能。

(4) 酵母菌有不同的标记基因:营养缺陷型基因、抗性基因,易于相互作用的蛋白质的筛选。

3.2 酵母双杂交系统的局限性及改进

(1) 假阳性。假阳性是酵母双杂交中的主要问题。由于某些蛋白质本身具有激活报告基因表达的功能,无需诱饵蛋白和靶蛋白的特异性结合,某些蛋白和空载体的结合也可激活转录系统,抑或是某些蛋白质表面有其他蛋白质的低亲和力和区,易于激活报告基因的表达,产生假阳性现象。针对上述不足,研究者们对报告基因进行改进^[11],对其载体构建策略进行改进^[12]等,提出双筛选系统和假阳性显示分析法,显著减少假阳性的产生。

(2) 假阴性。假阴性虽不是酵母双杂交中的主要问题,但仍需重视。其常见原因:一是两蛋白质间作用微弱使得报告基因不表达或表达量少而使其难以检测,对其进行改进应选择高敏感的菌株及多拷贝载体。二是诱饵蛋白和靶蛋白融合体的表达对细胞有毒害作用,应选择敏感性低的菌株或拷贝数低的载体^[8]。

(3) 核内反应。利用酵母双杂交研究互作蛋白质必须定位在细胞核内,这限制了核外蛋白质的研究。针对此现象,产生了 Sos 恢复系统^[9],将互作蛋白的研究场所转移到细胞质中。

(4) 此外,蛋白质转化率的高低是成败的关键。研究表明质粒转化过程中共转化比依次转化效率高^[13]。

4 酵母双杂交系统的应用

酵母双杂交作为具有开创意义的研究方法,是研究蛋白质互作,蛋白质结构与功能的重要手段,目前已广泛应用于蛋白质与蛋白质间、蛋白质与核酸间以及蛋白质与其他小分子间相互作用的研究。该技术也可用于大规模蛋白质间互作的研究,具有易于自动化、高通量^[14]等特点。

4.1 检测已知蛋白质间的互作 建立酵母双杂交系统最初是为了研究已知蛋白间的互作。至今应用双杂交系统已证实了大量蛋白质间的相互作用。如已知玉米类 *pto* 和类 *ptil* 基因参与逆境胁迫的信号传导,邹华文等^[15]利用双杂交技术初步确定只有 *Zmpto* 和 *Zmptil* 相互作用时才能激活报告

基因的表达。柑橘衰退病毒(CTV)能引起柑橘衰退病,CTV 编码的外壳蛋白 CP 和 P20 蛋白均存在自身互作,Chofong 等^[16]运用双杂交技术分析和 GST-pulldown 体外验证,表明 P20 氨基酸序列 N 端的 1~21 位氨基酸及 CP 氨基酸序列 N 端的 41~84 位氨基酸对自身互作具有重要作用。PML 是与急性早幼粒细胞白血病(APL)发病机制相关联的蛋白质,包含 PML 的 coiled-coil 结构域,命名为 PML-C。2010 年,朱丹等^[17]从白血病 cDNA 文库筛选出包含 CYPN2 蛋白在内的 9 种与 PML-C 结构域相互作用的蛋白质,为阐明 APL 发病机制提供新的思路。2012 年,吴秀娟等^[18]利用酵母双杂交以及免疫共沉淀试验进一步验证 PML-C 和 CYPN2 之间的相互作用,PML-C 和 CYPN2 作用形成的复合物可能影响 CYPN2 的正常功能,与 APL 发病有重要关系。

4.2 发现新蛋白及蛋白新功能 酵母双杂交最重要的用途是从 cDNA 文库中寻找与已知蛋白相互作用的未知蛋白^[19],继而研究蛋白互作效应。目前研究者应用双杂交系统已经发现许多新蛋白。如崔雨明等^[20]利用酵母双杂交技术在人白细胞文库中筛选到 8 个与流感病毒 PB1-F2 蛋白相互作用的宿主蛋白,为探索流感病毒致病机理指明了一定方向,提供一定理论基础。GsCBRLK 在 ABA 及盐胁迫诱导的钙离子信号通路中起着关键调节作用,为更加深入地研究 GsCBRLK 的作用机制,杨姗姗等^[21]应用酵母双杂交筛选到 SNARE 和 14-3-3 两种与 GsCBRLK 互作的蛋白。独脚金内酯(SLs)是一种抑制植物分枝的新型激素,其合成及信号传导途径尚不清楚,王涛^[22]以多个水稻矮化多分蘖突变体包为试验材料研究 SLs,利用酵母双杂交等方法筛选到与 SLs 信号途径中 D3 和 D14 互作的蛋白质,为阐明 SLs 调控水稻分蘖、植物分枝的作用机制奠定了理论基础。为明确不结球白菜 *Pol* 胞质雄性不育相关基因的信号传递通路,钱瑜等^[23]构建了不结球白菜 *Pol* 胞质雄性不育花酵母双杂交 cDNA 文库,筛选到与细胞色素 C 还原酶铁硫蛋白(BCRISP1)互作的蛋白 CYP81G 和 PIP2。

4.3 筛选多肽类药物及寻找药物作用位点 分子间相互作用可能导致疾病的产生,研究表明,多肽类药物对治疗癌症和病毒类等疾病最有效。利用酵母双杂交技术筛选与来源于肿瘤、细菌及病毒的蛋白间相互作用的多肽类药物,分析疾病发生机理,确定药物互作蛋白在肿瘤、细菌及病毒中的位置,有目标性地干扰疾病蛋白的表达,已达到治疗疾病的预期效果。Waheed 等^[24]利用细菌逆向双杂交筛选出一种细胞周期蛋白,可干扰 Gag 蛋白与 TsG101 的结合,阻断 HIV-1 在宿主内的出胞过程。秦咸蕴^[25]运用双杂交筛选出引起手足口病的肠道病毒 EV71 的抑制活性中药,为治疗肠道病毒疾病提供了理论基础。人巨细胞病毒(HCMV)是导致胎儿中枢神经系统异常的一种感染性病原,王慧等^[26]利用酵母双杂交发现鼠巨细胞病毒(MCMV)即刻早期基因 M122 蛋白与宿主因子 *Myst4* 相互作用的结合位点位于 M122 蛋白的 1~148 氨基酸,为预防和治疗 MCMV 导致的神经系统异常提供一定的理论基础。

4.4 建立蛋白质互作网络 许多蛋白在功能上是互相联系的,在生命活动中彼此协调控制。随着基因组计划的完成,大量开放阅读框产生,研究阅读框的功能成为后续任务,这些基因的功能由其编码产生的蛋白质体现,利用酵母双杂交技术研究蛋白互作,并向大规模、自动化、高通量方向成熟^[27],建立起蛋白质互作网络。建立蛋白质互作网络能更加系统地了解生命活动,寻找有利蛋白,解决困扰人类的重大疾病^[28]等。郜尽^[29]在研究肝脏调控相关转录因子时选择 32 个 ORF 为诱饵筛选互作蛋白,绘制肝脏再生过程中转录因子互作网络,为肝脏蛋白质组学研究提供新思路。加拿大和美国科学家组成的一个国际研究小组,绘制出迄今最大规模的人类基因组编码蛋白间直接相互作用的图谱,并预测出数十个与癌症相关的新基因,包括蛋白质间 1.4 万个直接相互作用^[30]。相信完成此项研究将会解释困扰人类的众多问题。

5 存在问题与展望

酵母双杂交系统自建立以来,虽存在假阳性、假阴性等局限性,但仍处于不断改进和完善的过程。因其快速、灵敏、高效的特征被广泛应用于蛋白质间的相互作用,蛋白质与基因的结构功能,新型多肽类药物的开发与利用等多个领域,并在此基础上衍生出酵母单杂交系统、反向酵母双杂交系统、酵母三杂交系统及 Sos 恢复系统等。为人类提供大量生物学信息,为人类获得生物体内蛋白质间作用关系的有效途径。随着科学研究的不断深入,相信酵母系统必将发挥越来越重要的作用。

参考文献

- [1] TWYMAN R M. Principles of proteomics [M]. New York: BIOS Scientific Publishers, 2004.
- [2] 王冰,尹姣,李克斌,等. 酵母双杂交在互作组学中的研究进展[C]//中国植物保护学会成立 50 周年庆祝大会暨 2012 年学术年会论文集. 中国植物保护学会, 2012:9.
- [3] FIELDS S, SONG O. A novel genetic system to detect protein-protein interaction[J]. Nature, 1989, 340(6230):245-246.
- [4] 李向阳,张嘉保. 酵母双杂交系统在蛋白质相互作用中的应用[J]. 中兽医医药杂志, 2011(1):26-29.
- [5] LI J J, HERSKOWITZ I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system[J]. Science, 1993, 262:1870-1874.
- [6] 李芳. 应用酵母单杂交技术筛选平菇漆酶 poxc 转录因子研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2014.
- [7] VIDAL M, BRACHMANN R K, FATTAEY A, et al. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(19):

- 10315-10320.
- [8] SENGUPTA D J, ZHANG B, KRAEMER B, et al. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(16):8496-8501.
- [9] ARONHEIM A, ZANDI E, HENNEMANN H. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method or detecting protein-protein interactions[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(16):3094-3102.
- [10] 李先昆, 聂智毅, 曾日中. 酵母双杂交技术研究与应用进展[J]. 安徽农业科学, 2009(7):2867-2869.
- [11] JAMES P, HALIDAY J, CRAIGE E A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast[J]. Genetics, 1996, 144:1425-1436.
- [12] 黄欣媛, 范红波. 酵母双杂交及其衍生系统[J]. 生物技术通报, 2014(1):75-82.
- [13] YOKOTA Y, MORIS S. Role of Id family proteins in growth control[J]. J Cell Physiol, 2002, 190(1):21-28.
- [14] 郭春燕, 詹克慧. 蛋白质组学技术研究进展及应用[J]. 云南农业大学学报, 2010, 25(4):583-591.
- [15] 邹华文, 宋仲骞, 朱泳. 利用酵母双杂交系统鉴定玉米 Pto 蛋白与 Ptl 蛋白间的相互作用[J]. 玉米科学, 2012, 20(4):42-44.
- [16] NCHONGBOH C G, WU G W, HONG N, et al. Protein-protein Interactions of between proteins Citrus tristeza virus[J]. Virus Genes, 2014, 49(3):456-465.
- [17] 朱丹, 王翀, 刘北忠, 等. 酵母双杂交技术筛选并回转基因在胞内与 PML-C 结构域相互作用的蛋白[J]. 医学分子生物学杂志, 2010, 7(3):242-246.
- [18] 吴秀娟, 刘北忠, 钟梁, 等. 含 Coiled-coil 结构的 PML 结构域与 CNPY2 蛋白相互作用的胞内外验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2012(5):553-556.
- [19] 吴娟, 钱凯, 杨泽峰. 酵母双杂交系统的研究进展[J]. 安庆师范学院学报, 2005, 11(2):59-63.
- [20] 崔雨明, 侯佩莉, 张茂林, 等. 酵母双杂交筛选人白细胞文库与 A 型流感病毒 PBI-F2 相互作用的蛋白[J]. 动物医学进展, 2012, 33(3):1-5.
- [21] 杨姗姗, 孙晓丽, 于洋, 等. 酵母双杂交筛选与 GsCBRLK 相互作用的蛋白质[J]. 遗传, 2013(3):388-394.
- [22] 王涛. 水稻独脚金内酯相关基因的图位克隆与功能分析[D]. 北京:中国农业科学院, 2012:1-109.
- [23] 钱瑜, 刘同坤, 侯喜林, 等. 不结球白菜 Pol 胞质雄性不育花酵母双杂交 cDNA 文库的构建及筛选[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(1):21-26.
- [24] WAHEED A A, FERREDD E O. Peptide inhibitors of HIV-1 egress[J]. ACS Chemical Biology, 2008, 3(12):745-747.
- [25] 秦咸蕴. 以肠道病毒 71 型 3C 蛋白酶为靶点的药物筛选模型的建立及药物筛选[D]. 曲阜:曲阜师范大学, 2011:1-71.
- [26] 王慧, 张菊, 舒赛男, 等. M122 蛋白与宿主因子 Myst4 的相互作用位点[J]. 实用儿科临床杂志, 2011(22):1702-1705.
- [27] 吴志豪, 王建, 贺福初. 大规模酵母双杂交技术研究蛋白质相互作用的应[J]. 遗传, 2006(12):1627-1632.
- [28] 王海侠, 许传营, 谢超, 等. 人类蛋白质相互作用组[J]. 生命的化学, 2012(1):79-83.
- [29] 郜尽. 肝脏再生调控相关转录因子间相互作用网络的初步研究[D]. 上海:上海交通大学, 2008:1-144.
- [30] 冯卫东. 迄今最大人类基因组编码蛋白互作图谱问世[N]. 科技日报, 2014-12-03.

(上接第 17 页)

- [5] 王超, 张韬, 范金霞. 春甘蓝抽薹特性的研究(III). 农艺性状间遗传相

关与途径分析[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(1):31-33.