

### 酵母双杂交系统的发展和应用

随着对多种重要生物的大规模基因组测序工作的完成, 基因工程领域又迎来了一个新的时代---功能基因组时代。它的任务就是对基因组中包含的全部基因的功能加以认识。生物体系的运作与蛋白质之间的互相作用密不可分, 例如: DNA 合成、基因转录激活、蛋白质翻译、修饰和定位以及信息传导等重要的生物过程均涉及到蛋白质复合体的作用。能够发现和验证在生物体中相互作用的蛋白质与核酸、蛋白质与蛋白质是认识它们生物学功能的第一步。

酵母双杂交技术作为发现和研究在活细胞体内的蛋白质与蛋白质之间的相互作用的技术平台, 在近几年来得到了广泛运用。酵母双杂交系统是在真核模式生物酵母中进行的, 研究活细胞内蛋白质相互作用, 对蛋白质之间微弱的、瞬间的作用也能够通过报告基因的表达产物敏感地检测得到, 它是一种具有很高灵敏度的研究蛋白质之间关系的技术。大量的研究文献表明, 酵母双杂交技术既可以用来研究哺乳动物基因组编码的蛋白质之间的互作, 也可以用来研究高等植物基因组编码的蛋白质之间的互作。因此, 它在许多的研究领域中有广泛的应用。本文就酵母双杂交的技术平台和应用加以介绍。

酵母双杂交系统的建立是基于对真核生物调控转录起始过程的认识。细胞起始基因转录需要有反式转录激活因子的参与。反式转录激活因子, 例如酵母转录因子 GAL4 在结构上是组件式的 (modular), 往往由两个或两个以上结构上可以分开, 功能上相互独立的结构域 (domain) 构成, 其中有 DNA 结合功能域(DNA binding domain, DNA-BD)和转录激活结构域 (activation domain, DNA-AD)。这两个结合域将它们分开时仍分别具有功能, 但不能激活转录, 只有当被分开的两者通过适当的途径在空间上较为接近时, 才能重新呈现完整的 GAL4 转录因子活性, 并可激活上游激活序列 (upstream activating sequence, UAS) 的下游启动子, 使启动子下游基因得到转录。

根据这个特性, 将编码 DNA-BD 的基因与已知蛋白质 Bait protein 的基因构建在同一个表达载体上, 在酵母中表达两者的融合蛋白 BD-Bait protein。将编码 AD 的基因和 cDNA 文库的基因构建在 AD-LIBRARY 表达载体上。同时将上述两种载体转化改造后的酵母, 这种改造后的酵母细胞的基因组中既不能产生 GAL4, 又不能合成 LEU、TRP、HIS、ADE, 因此, 酵母在缺乏这些营养的培

培养基上无法正常生长。当上述两种载体所表达的融合蛋白能够相互作用时，功能重建的反式作用因子能够激活酵母基因组中的报告基因 **HIS**、**ADE**、**LACZ**、**MEL1**，从而通过功能互补和显色反应筛选到阳性菌落。将阳性反应的酵母菌株中的 **AD-LIBRARY** 载体提取分离出来，从而对载体中插入的文库基因进行测序和分析工作。在酵母双杂交的基础上，又发展出了

酵母单杂交、酵母三杂交和酵母的反向杂交技术。它们被分别用于核酸和文库蛋白之间的研究、三种不同蛋白之间的互作研究和两种蛋白相互作用的结构和位点。

基于酵母双杂交技术平台的特点，它已经被应用在许多研究工作当中。

### 1、利用酵母双杂交发现新的蛋白质和蛋白质的新功能

酵母双杂交技术已经成为发现新基因的主要途径。当我们将已知基因作为诱饵，在选定的 **cDNA** 文库中筛选与诱饵蛋白相互作用的蛋白，从筛选到的阳性酵母菌株中可以分离得到 **AD-LIBRARY** 载体，并从载体中进一步克隆得到随机插入的 **cDNA** 片段，并对该片段的编码序列在 **GENEBANK** 中进行比较，研究与已知基因在生物学功能上的联系。另外，也可作为研究已知基因的新功能或多个筛选到的已知基因之间功能相关的主要方法。例如：**Engelender** 等人以神经末端蛋白 **alpha-synuclein** 蛋白为诱饵蛋白，利用酵母双杂交 **CLONTECH MATCHMARKER SYSTEM 3** 为操作平台，从成人脑 **cDNA** 文库中发现了与 **alpha-synuclein** 相互作用的新蛋白 **Synphilin-1**，并证明了 **Synphilin-1** 与 **alpha-synuclein** 之间的相互作用与帕金森病的发病有密切相关。为了研究两个蛋白之间的相互作用的结合位点，找到影响或抑制两个蛋白相互作用的因素，**Michael** 等人又利用酵母双杂交技术和基因修饰证明了 **alpha-synuclein** 的 1-65 个氨基酸残基和 **Synphilin-1** 的 349-555 个氨基酸残基之间是相互作用的位点。研究它们之间的相互作用位点有利于基因治疗药物的开发。

### 2、利用酵母双杂交在细胞体内研究抗原和抗体的相互作用

利用酶联免疫 (**ELISA**)、免疫共沉淀 (**CO-IP**) 技术都是利用抗原和抗体间的免疫反应，可以研究抗原和抗体之间的相互作用，但是，它们都是基于体外非

细胞的环境中研究蛋白质与蛋白质的相互作用。而在细胞体内的抗原和抗体的聚积反应则可以通过酵母双杂交进行检测。例如：来源于矮牵牛的黄烷酮醇还原酶 DFR 与其抗体 scFv 的反应中，抗体的单链的三个可变区 A4、G4、H3 与抗原之间作用有强弱的差异。Geert 等利用酵母双杂交技术，将 DFR 作为诱饵蛋白，编码抗体的三个可变区的基因分别被克隆在 AD-LIBRARY 载体上，将 BD-BAIT 载体和每种 AD-LIBRARY 载体分别转化改造后的酵母菌株中，并检测报告基因在克隆的菌落中的表达活性，从而在活细胞的水平上检测抗原和抗体的免疫反应。

### 3、利用酵母双杂交筛选药物的作用位点以及药物对蛋白质之间相互作用的影响

酵母双杂交的报告基因能否表达在于诱饵蛋白与靶蛋白之间的相互作用。对于能够引发疾病反应的蛋白互作可以采取药物干扰的方法，阻止它们的相互作用以达到治疗疾病的目的。例如：Dengue 病毒能引起黄热病、肝炎等疾病，研究发现它的病毒 RNA 复制与依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(NS5)与拓扑异构酶 NS3，以及细胞核转运受体 BETA-importin 的相互作用有关。研究人员通过酵母双杂交技术找到了这些蛋白之间相互作用的氨基酸序列。如果能找到相应的基因药物阻断这些蛋白之间的相互作用，就可以阻止 RNA 病毒的复制，从而达到治疗这种疾病的目的。

### 4、利用酵母双杂交建立基因组蛋白连锁图 (Genome Protein Linkage Map)

众多的蛋白质之间在许多重要的生命活动中都是彼此协调和控制的。基因组中的编码蛋白质的基因之间存在着功能上的联系。通过基因组的测序和序列分析发现了很多新的基因和 EST 序列，HUA 等人利用酵母双杂交技术，将所有已知基因和 EST 序列为诱饵，在表达文库中筛选与诱饵相互作用的蛋白，从而找到基因之间的联系，建立基因组蛋白连锁图。对于认识一些重要的生命活动：如信号传导、代谢途径等有重要意义。