

双杂交扩展技术——报告蛋白片段互补及功能重建技术的应用与展望

宋林霞*

(山东理工大学生命科学院, 淄博 255049)

摘要 报告蛋白片段互补及功能重建技术是对传统的酵母双杂交技术的改进。其原理是将报告蛋白分割成两个没有功能的片段, 分别与两个待检测的蛋白质融合, 如果待检测的两个蛋白质能够发生相互作用, 就可以使报告蛋白的两个片段发生互补, 从而使其功能得以重建。这一技术在检测方法和适用的细胞类型上都对酵母双杂交系统进行了扩展。

关键词 双杂交; 片段互补; 功能重建; 蛋白质相互作用

生物体的许多现象如细胞的增殖、分化、代谢、死亡, 以及细胞周期、细胞信号转导和代谢调节等生命活动的发生都依赖于蛋白质与蛋白质间的相互作用。因此, 研究蛋白质之间的相互作用是现代生命科学研究中一项十分重要的课题。在众多的研究蛋白质相互作用的方法中, 酵母双杂交技术由于其简便快捷而被广泛应用, 本文将就酵母双杂交技术的基本原理及酵母双杂交的扩展技术——报告蛋白片段互补及功能重建技术的应用与展望作一介绍。

1 酵母双杂交的原理

酵母双杂交是一个用于研究蛋白质-蛋白质相互作用的遗传学系统^[1], 此系统是建立在对真核转录激活因子认识的基础之上。真核转录激活因子包括两个功能结构域: 一个是与 DNA 上游激活序列 (upstream activating sequence, UAS) 结合的 DNA 结合结构域 (DNA-binding domain, BD); 另一个是 DNA 激活结构域 (DNA activation domain, AD)。当某一报告基因位于 UAS 下游时, 转录因子中的 AD 区可以通过 BD 区与 UAS 的结合而激活报告基因的转录。这两个结构域在功能上是可以分离的, 当将它们彼此分开时, BD 仍可结合 DNA, 但因缺少 AD 而不能激活转录; 而 AD 仍可激活转录, 但却无法正确地定位到特异的 DNA 序列上。然而, 当通过某种相互作用将它们联系在一起时, 它们又可以恢复转录因子的功能, 激活下游报告基因的转录。

GAL4 是酿酒酵母中一个重要的转录激活因子, 由 881 个氨基酸组成。其 N 端 1~147 位氨基酸是它

的 BD 区, C 端 768~881 位氨基酸是它的 AD 区。Fields 等^[1]将 GAL4 的 N 端 1~147 个氨基酸与某一感兴趣的蛋白质 (X, 称为诱饵) 融合, 将 GAL4 的 C 端 768~881 个氨基酸与另一待筛选的蛋白质 (Y, 称为猎物) 融合, 之后将含有这两个融合蛋白基因的质粒转化到酵母细胞。假如 X 与 Y 能够发生相互作用, 就可将结构上分离的 BD 与 AD 连到一起, 使它们恢复转录因子的功能, 激活 GAL4 下游报告基因 *lacZ* 的转录。这样, 通过鉴定 β 半乳糖苷酶的活性就可推测 X 与 Y 是否发生了相互作用。

酵母双杂交系统提供了一种在酵母这种真核细胞体内检测蛋白质-蛋白质相互作用的方法, 因此一经建立就得到了广泛的应用。但是由于酵母双杂交系统需要将相互作用的蛋白质带入到细胞核中才能激活 UAS 下游报告基因的转录, 对于那些定位在细胞质或细胞膜上的蛋白质的相互作用研究就存在一定的局限性。为了克服这些局限, 人们对双杂交系统进行了多种改进, 其中许多科学家提出了这样一种方法, 即利用报告蛋白片段互补及功能重建技术来研究蛋白质之间的相互作用^[2-5]。这一技术能够使双杂交系统适用于更多类型的蛋白质, 并且能够在更多类型的细胞中进行研究。

2 报告蛋白片段互补及功能重建技术的原理

收稿日期: 2006-05-19 接受日期: 2006-10-11

* 通讯作者。Tel: 0533-2781329, Fax: 0533-2781832, E-mail:

slxch@163.com

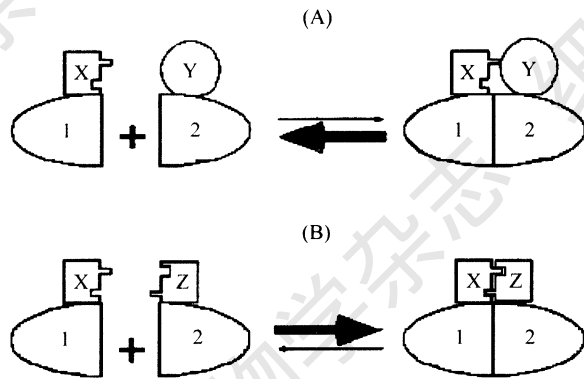


图1 报告蛋白片段互补及功能重建技术的原理示意图^[6]

A: 1和2表示报告蛋白被分割成的两个片段, X蛋白与片段1融合, Y蛋白与片段2融合, X蛋白和Y蛋白不能发生相互作用, 所以片段1和2不能互补, 报告蛋白没有活性; B: 1和2表示报告蛋白被分割成的两个片段, X蛋白与片段1融合, Z蛋白与片段2融合, X蛋白和Z蛋白之间能够相互作用, 使得片段1和2发生互补, 报告蛋白恢复活性。

传统的酵母双杂交系统对蛋白质相互作用的检测依赖于UAS下游一个或几个报告基因的转录, 而报告蛋白片段互补及功能重建技术的双杂交系统则依赖于对报告蛋白的活性检测, 其原理如图1所示。在这种类型的双杂交系统中, 报告蛋白被分割成两个片段, 即片段1和片段2, 这两个片段单独存在时报告蛋白没有活性。将这两个片段分别与两个待检测的蛋白质融合, 如果待检测的蛋白质能够发生相互作用, 那么通过待检测蛋白质的相互作用可以使报告蛋白的两个片段发生互补, 从而使其功能得以重建(图1B); 如果待检测的蛋白质不能发生相互作用, 则报告蛋白的两个片段不能互补, 从而不能使其活性得到恢复(图1A)。综上所述, 这一技术主要是将两个待检测的蛋白质分别与报告蛋白的两个无功能的片段融合, 通过鉴定报告蛋白的活性从而推知两个待检测的蛋白质是否发生了相互作用。

3 报告蛋白片段互补及功能重建技术的应用

3.1 报告蛋白的选择

应用片段互补及功能重建技术构建的双杂交系统中, 大多采用酶分子作为报告蛋白, 如 β 半乳糖苷酶、 β 内酰胺酶和二氢叶酸还原酶等^[6~12]。这些酶在结构上可以分成两个部分, 各自独立表达时没有活性。在这些酶活性的缺陷型细胞株中, 酶活性的恢复依赖于与之融合表达的能够发生相互作用的两个

蛋白质。这些酶的活性比较容易检测, 尤其是二氢叶酸还原酶, 它对细胞的存活是必须的, 当它缺失或活性被抑制时, 细胞的生长会发生障碍, 因此对于这种酶可以通过观察细胞的生长状态来判断融合的靶蛋白间发生相互作用的情况。除此之外, 这种双杂交系统有些采用具有发光特性的绿色荧光蛋白和黄色荧光蛋白或者能够产生荧光的荧光素酶作为报告蛋白^[13~18], 这些蛋白质均具有检测方便、灵敏度高等特点。

3.2 片段互补及功能重建技术在原核细胞蛋白中的应用

酶分子作为报告蛋白, 它们的活性一般可以直接检测。有些报告蛋白是信号转导途径中的酶, 它的活性可以通过对下游信号通路调控产生的细胞学效应进行检测。Karimova等^[19]以腺苷酸环化酶的片段互补引起cAMP信号转导途径的重建为基础建立了细菌双杂交系统。在此系统中, 两个靶蛋白分别与组成百日咳杆菌腺苷酸环化酶催化区域的两个互补片段T25和T18融合。T25和T18对形成一个活性酶是必需的, 它们在大肠杆菌中分别表达时不能互识别形成一个功能性酶, 而当它们分别与可以相互作用的多肽或蛋白质融合后, 这些多肽的二聚化导致腺苷酸环化酶的功能重建, 合成cAMP, 之后cAMP与降解物基因活化蛋白(catabolite gene activation protein, CAP)结合, 激活分解代谢的操纵子(如乳糖操纵子)的转录活性, 促使分解某些糖类的相应的酶基因表达, 从而使细胞可以利用这些糖类作为碳源。为了验证这一系统, 他们先将来自酵母转录激活因子GCN4的亮氨酸拉链分别与T25和T18片段融合, 构建好的质粒共转化到腺苷酸环化酶缺陷的大肠杆菌DHP1中, 结果由于亮氨酸拉链之间的相互作用, 在转化的大肠杆菌中产生了可检测到的腺苷酸环化酶活性, 表现为菌株可以在以麦芽糖或半乳糖为唯一碳源的培养基中生长。之后, 他们将芽孢杆菌的酪氨酸tRNA合成酶的N末端片段分别连到T25和T18片段上进行检测, 结果表明酪氨酸tRNA合成酶的这一片段能够发生二聚化, 使细胞产生了能够检测到的腺苷酸环化酶活性。

3.3 片段互补及功能重建技术在真核细胞蛋白中的应用

Rossi等^[6]利用 β 半乳糖苷酶缺失突变体的互补作用, 建立了检测哺乳动物细胞蛋白的双杂交系统。 $\Delta\omega$ 和 $\Delta\alpha$ 是 β 半乳糖苷酶的两个多肽片段, 它们各自

单独存在时没有功能。他们将两个蛋白质 FK506 结合蛋白 12 (FKBP12) 和 FKBP- 纳巴霉素结合蛋白 (FRAP) 分别与 $\Delta\omega$ 和 $\Delta\alpha$ 融合, 并将含有融合蛋白基因的质粒转染到鼠的成肌细胞中, 通过检测 β 半乳糖苷酶活性来监测纳巴霉素诱导的 FKBP12/ FRAP 复合物的形成。实验结果表明这一系统能够很好地检测两个蛋白质的相互作用。

利用 β 半乳糖苷酶片段的互补还可以检测膜蛋白的相互作用, 如 Blakley 等^[7] 将人的表皮生长因子受体 (EGFR) 的胞外区和跨膜区的部分分别与 β 半乳糖苷酶的两个缺失突变体片段融合, 融合蛋白质转染到鼠的成肌细胞中。用 EGF 样复合物进行诱导, 结果发现 EGFR 能够二聚化, 从而在细胞中检测到了 β 半乳糖苷酶活性。而阻碍配体与受体结合的抗体能够抑制受体的二聚化, 加入此抗体的细胞则检测不到 β 半乳糖苷酶活性。这一结果表明 β 半乳糖苷酶片段的互补作用为蛋白质相互作用的检测提供了一种快速、简便和灵敏的方法。

报告蛋白片段互补及功能重建技术建立的双杂交系统除了能够对翻译后修饰的蛋白质进行检测, 还可以对相互作用的蛋白质进行定位。如 Kaihara 等^[20] 利用荧光素酶作为报告蛋白研究了胰岛素信号转导通路中磷酸化的胰岛素受体底物 1 (IRS1) 和磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 的 SH2 结构域的相互作用, 发现它们的相互作用发生在细胞质靠近质膜的区域。

Nyfelner 等^[18] 还将这一技术应用于细胞分泌途径中相互作用蛋白质的研究。ERGIC-53 是早期分泌途径中的一种同源寡聚化的跨膜蛋白, 含有凝集素结构域, 作为糖蛋白的货物受体^[21]。MCFD2 是一个非糖基化的腔蛋白, 含有 2 个 EF 手型结构, 已经发现它与 ERGIC-53 的相互作用是 Ca^{2+} 依赖性的^[22]。将 ERGIC-53 与黄色荧光蛋白 (YFP) 的其中一个片段融合表达, 将 MCFD2、组织蛋白酶 Z 和非糖基化的清蛋白分别与 YFP 的另一个片段融合表达。荧光分析显示 ERGIC-53 与 MCFD2 或组织蛋白酶 Z 共表达时, 能够发生相互作用而使 YFP 的两个片段发生互补, 产生荧光。而与清蛋白共表达时, 则没有相互作用, YFP 的两个片段不能互补。同时还发现 ERGIC-53 与 MCFD2 或组织蛋白酶 Z 的相互作用发生在早期的分泌途径中。

片段互补及功能重建技术的进一步应用是在活体动物中, 利用荧光素酶作为报告蛋白^[23~26]。Luker 等^[26] 将 N 端荧光素酶片段与哺乳动物的纳巴霉素结

合区 (FRB) 融合, C 端荧光素酶片段与 FKBP 融合, 共转染 HEK-293 细胞, 之后将此细胞植入小鼠体内, 过一段时间, 将荧光素注入小鼠体内, 结果由于 FRB 与 FKBP 的相互作用使 N 端和 C 端荧光素酶片段发生了互补, 利用体内成像系统检测到荧光的产生。这一系统为活体动物在正常状态或疾病状态下发生的蛋白质间相互作用的研究提供了基础。

信号转导途径中的蛋白质相互作用通常构成一个复杂的蛋白质网络, 同传统的酵母双杂交一样, 以片段互补及功能重建技术为基础的双杂交同样可以用于多个蛋白质对的相互作用筛选。如 Remy 等^[12] 利用二氢叶酸还原酶为报告蛋白研究了 RTK/FRAP 信号转导途径中 35 对蛋白质的相互作用, 结果发现 14 对蛋白质具有相互作用关系, 而其中 5 对是未见报道的。分析所得结果, 他们构建了一个比先前更为详细的 RTK/FRAP 信号转导网络图。

4 展望

酵母双杂交技术的诞生对蛋白质相互作用的研究起到了极大的推动作用。随着这一技术的广泛应用, 人们针对其出现的问题和缺陷进行了不断的改进。以报告蛋白片段互补及功能重建技术建立的双杂交系统不仅拓宽了双杂交可检测的蛋白质类型, 而且拓宽了用于检测相互作用的细胞类型。由于这一系统不需要将蛋白质定位到细胞核中, 从而使得由于某种限制不能转移到核中或在核中不能正确折叠的蛋白质之间相互作用的检测成为可能。在用于检测的细胞类型上, 除了传统的酵母细胞外, 还可以在哺乳动物细胞和细菌细胞中, 甚至能够在活体动物中进行蛋白质相互作用的研究。另外, 这一系统检测到的报告蛋白的活性是通过相互作用产生的而不是从头合成的, 故此它可以检测到瞬间发生的相互作用, 并且对于由信号引起的酶联反应产生的低水平表达的蛋白质高度敏感。基于上述这些优点, 相信以这一技术为基础建立的双杂交系统将会在今后的生命科学如药物筛选^[27]、基因组学及蛋白质组学等领域中具有广阔的应用前景。

当然, 这一双杂交系统也存在着一些不足, 如存在于不同细胞类型、细胞空间或处于不同生长发育时期、不同生理状态的蛋白质, 在这一系统的检测中可能会发生相互作用而产生假阳性。另外, 以真核细胞为宿主的检测系统相对于以原核细胞或酵母为宿主的检测系统来说, 存在着操作复杂, 实验周期

长等不利因素。并且,由于外源蛋白的过度表达,可能会对细胞产生一定的毒害作用而影响细胞的生长,以上这些问题希望研究者在使用时加以考虑。

参考文献 (References)

- [1] Fields S *et al.* *Nature*, 1989, **340**: 245
- [2] Remy I *et al.* *Methods Mol Biol*, 2002, **185**: 447
- [3] Remy I *et al.* *Methods Mol Biol*, 2004, **261**: 411
- [4] Michnick SW. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**: 610
- [5] Michnick SW *et al.* *Methods Enzymol*, 2000, **328**: 208
- [6] Rossi F *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 8405
- [7] Blakely BT *et al.* *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 218
- [8] Wehman T *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 3469
- [9] Spotts JM *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 15142
- [10] Galarneau A *et al.* *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 619
- [11] Pelletier JN *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 12141
- [12] Remy I *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 7678
- [13] Ghosh I *et al.* *J Am Chem Soc*, 2000, **122**: 5658
- [14] Hu CD *et al.* *Mol Cell*, 2002, **9**: 789
- [15] Magliery TJ *et al.* *J Am Chem Soc*, 2005, **127**: 146
- [16] Ozawa T *et al.* *Anal Chem*, 2000, **72**: 5151
- [17] Ozawa T *et al.* *Anal Chem*, 2001, **73**: 5866
- [18] Nyfeler B *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 6350
- [19] Karimova G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 5752
- [20] Kaihara A *et al.* *Anal Chem*, 2003, **75**: 4176
- [21] Klumperman J *et al.* *J Cell Sci*, 1998, **111**: 3411
- [22] Zhang B *et al.* *Nat Genet*, 2003, **34**: 220
- [23] Paulmurugan R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 15608
- [24] Paulmurugan R *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**: 7413
- [25] Paulmurugan R *et al.* *Anal Chem*, 2005, **77**: 1295
- [26] Luker KE *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 12288
- [27] Yu H *et al.* *Assay Drug Dev Technol*, 2003, **1**: 811

Extension of Yeast Two-hybrid System: Applications and Prospects of Reporter Protein Fragment Complementation and Functional Reconstitution Technology

Lin-Xia Song*

(College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

Abstract In this review, an improved two-hybrid system with technology of reporter protein fragment complementation and functional reconstitution is described. The principle is that reporter protein using in the system was dissected to two inactive fragments and could regain its function when the fragments fused to two interactive proteins respectively. This technology provided the extension of the traditional yeast two-hybrid system both in the detection methods and the range of cell types.

Key words two-hybrid; fragment complementation; functional reconstitution; protein interaction

Received: May 19, 2006 Accepted: October 11, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-533-2781329, Fax: 86-533-2781832, E-mail: slxch@163.com