

carrier including one or two genes for selection and to transfer it into the nucleus effectively. The targeted cells can be inherited stably. Gene targeting has promising prospects in production of new strains of living things, in clinical usage

and in theoretical research of some complicated biological phenomena such as the molecular mechanism of development.

Key words gene targeting, gene knocking out, homologous recombination

双杂合系统及其应用

黄家学 马晓军 刘 汀

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要 蛋白质与蛋白质的相互作用是生物体内包括复制、转录、分泌、信号传导、代谢等生命活动得以进行的物质基础。以基因工程技术为基础的双杂合系统可以在体内检测蛋白质与蛋白质的相互作用, 并推广应用到寻找同某已知蛋白质相互作用的未知蛋白质, 直接克隆未知蛋白质的基因, 鉴别同已知蛋白质相互作用的关键氨基酸残基, 绘制蛋白质联系图谱等。双杂合系统在药物设计中的应用使其具有更重大的实用价值。

关键词 转录因子, 蛋白质与蛋白质相互作用, 双杂合系统, 蛋白质联系图谱, 药物设计

蛋白质与蛋白质的相互作用是几乎所有的生命活动得以进行的根据。在生物体的发育过程中, 不同物种、不同细胞的蛋白质因子同细胞核中 DNA-蛋白质复合物上的组蛋白、非组蛋白相互作用而导致基因的差别表达。不同的蛋白质同各自特异的结构蛋白作用形成特定的复合物, 定位在一定的区域内, 使生物体的结构高度有序。催化代谢反应的酶也可与不同种类的亚基、抑制剂、激活因子、结构组分结合而改变催化反应的速度甚至方向。细胞与细胞之间以及细胞内的信息传递也依赖于蛋白质之间的相互作用而得以进行。因此, 对某一生命过程中同已知蛋白质相互作用的蛋白质的研究可以更清楚地揭示这一生命过程。但由于蛋白质间的相互作用有持续的和暂时的, 作用力有大有小, 而且依赖于细胞内环境, 蛋白质与蛋白质相互作用的研究进展缓慢。最近兴起的双杂合系统 (two-hybrid system) 为研究蛋白质间的相互作用提供了崭新的方法。

1 双杂合系统的原理

典型的真核生物转录因子, 如 GAL4、GCN4、GAL80 等都具有两个结构域, DNA 结合域 (DNA-binding domain) 和转录激活域 (transcription-activating domain)。DNA 结合域可以识别 DNA 上的特异序列, 并使转录激活域位于所调节的基因的上游; 转录激活域可以同转录复合体的其他成分相作用, 启动它所调节的基因的转录。若在两个结构域连接区的适当部位打断, DNA 结合域仍能识别特异的 DNA 序列, 转录激活域的转录激活功能也不受影响^[1]。把某个转录因子的 DNA 结合域与另一个转录因子的转录激活域重组可构成一个新的有功能的转录因子。这表明转录因子的两个结构域在结构和功能上不仅可以分离而且可以重建。

Fields 等根据以上认识, 将欲研究相互作用的两个蛋白质称为 X 和 Y (图 1), 通过构建两个重组质粒, 分别表达含蛋白 X 的杂合体 I 和含蛋白 Y 的杂合体 II. 双杂合系统也因此而得名. 在表达杂合体 I 的质粒中, 蛋白 X 的编码序列与转录因子(如 GAL4)的 DNA 结合域的编码序列组成融合基因; 在表达杂合体 II 的质粒中, 蛋白 Y 的编码序列与转录因子的转录激活域的编码序列组成融合基因. 将以上两种重组质粒共同转化含有报道基因 LacZ 的细胞株, LacZ 基因上游有与转录因子相互作用的调节序列. 融合基因在报道株(reportor strain)内表达出杂合体. 杂合体 I 上的 DNA 结合域识别 LacZ 基因的上游序列(the upstream activation sequence, UAS), X 蛋白的相应部分也被带到该位置. 如果 X 蛋白与 Y 蛋白存在相互作用, 这种作用将会把杂合体 II 上的转录激活域带到 DNA 结构域附近, 重建转录因子活性, 从而启动它所调节的基因的转录. 所以, 报告基因

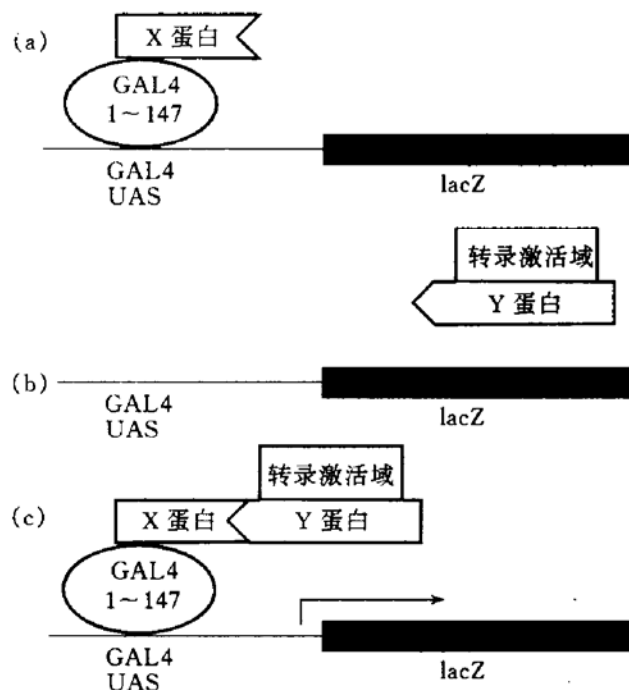


图 1 双杂合系统工作原理示意图

(a) GAL4 DNA 结合域 (GAL4 1~147) 与 X 蛋白融合而成的杂合体 I 因缺乏转录激活域而不能驱动 LacZ 转录; (b) GAL4 转录激活域与 Y 蛋白融合而成的杂合体 II, 因不能与 UAS 结合而不能驱动 LacZ 转录; (c) 由于 X 蛋白与 Y 蛋白相互作用, 重建转录因子活性从而驱动 LacZ 转录.

(LacZ) 的表达反映了 X 与 Y 相互作用的存在. 图 1 简要地说明了双杂合系统的工作原理.

2 双杂合系统的构建

由上可知, 双杂合系统由两个主要部分组成, 表达杂合体 I、II 的融合基因的重组质粒和出示相互作用信号的报道株.

2.1 克隆融合基因的载体

双杂合系统有两类载体, 一类用于克隆编码杂合体 I 的融合基因的 DNA 结合域载体 (图 2), 另一类用于克隆编码杂合体 II 的融合基因的转录激活域载体 (图 3).

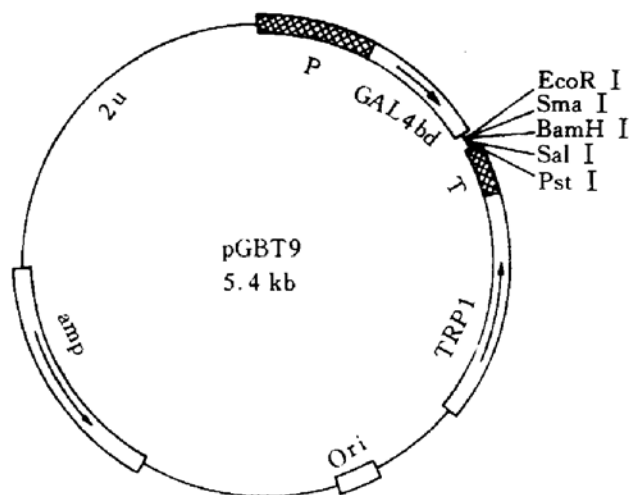


图 2 DNA 结合域载体 pGBT9

P: ADHI 启动子; T: ADHI 转录终止信号;
GAL4 bd: GAL4 DNA 结合域.

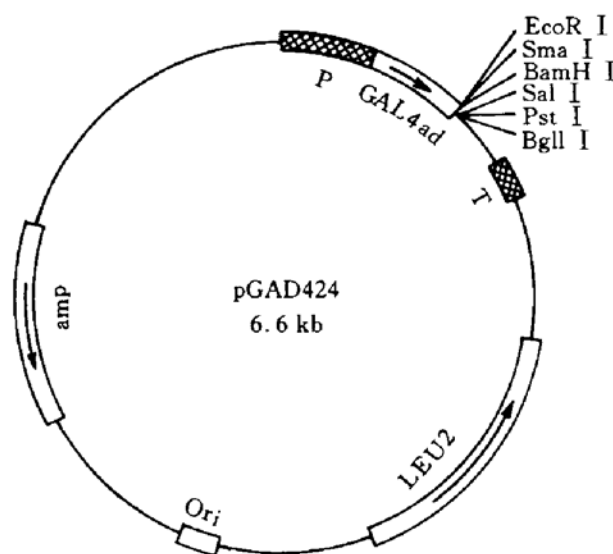


图 3 转录激活域载体 pGAD424

P: ADHI 启动子; T: ADHI 转录终止信号;
GAL4 ad: GAL4 转录激活域.

由以上两类载体构建杂合体融合基因, 可采用常规方法. 但测试蛋白(X或Y)基因与 GAL4 DNA 结合域(GAL4 bd)或 GAL4 转录激活域(GAL4 ad)编码序列必须在阅读框架内融合. 融合基因在报告株中表达, 其表达产物只有定位在核内才能驱动报告基因的转录. GAL4 bd 具有核定位序列(nuclear-localization sequence), 而 GAL4 ad 没有. 因此, 在 GAL4 ad 氨基端或羧基端应克隆来自 SV40 的 T-抗原的一段序列作为核定位序列^[2].

构建 DNA 结合域载体及转录激活域载体, 最常用的是 GAL4 (1~147)和 LexA(大肠杆菌转录抑制因子)的 DNA 结合域编码序列及 GAL4(768~881)和疱疹病毒 VP16 的编码序列. 采用其他转录因子的 DNA 结合域与转录激活域可构建成不同的双杂合系统.

2.2 报告株

双杂合系统中的报告株是指经改造的、含报告基因的重组质粒的宿主细胞. 它可以是哺乳动物细胞, 也可以是其他真核细胞, 但常用的是酵母细胞. 酵母双杂合系统有很多优点: a. 易于转化, 便于回收扩增质粒; b. 具有可以直接进行选择的标记基因和特征性报告基因; c. 酵母的内源性蛋白不易同来源于哺乳动物的蛋白质结合^[3].

报告株的选择随载体的不同而异, 其基因型应与载体相匹配, 如系统采用 pGBT9 (图2)载体, 则报告株应是色氨酸营养缺陷型. 报告基因的启动子也应经过特殊改造, 采用能与转录因子 DNA 结合域特异结合的序列. 报告株自身不能表达激活报告基因的转录因子, 即为该转录因子的缺失突变株.

报告株中含有的报告基因常是 LacZ, 可用含 X-Gal 的平板筛选阳性(蓝色)克隆. 双报告基因系统含有两个报告基因, 这有利于筛选, 也使假阳性大大减少.

3 双杂合系统的应用

3.1 检测两已知蛋白质之间的相互作用

通过遗传或生化分析, 或者根据蛋白质的

相似性, 判断两种蛋白质存在于同一代谢途径上, 且它们的编码基因已克隆, 利用克隆的基因构建双杂合系统, 可以检测它们是否存在蛋白质间的相互作用. 采用这种方法已经证实了许多蛋白质与蛋白质之间有相互作用^[4].

常规研究蛋白质与蛋白质相互作用的生化方法反映的是体外的情况而不是体内情况. 双杂合系统检测蛋白质之间的相互作用具有明显的优点: a. 作用信号是在融合基因表达后, 在细胞内重建转录因子的作用而给出的, 省去了抽提纯化蛋白质的繁琐步骤; b. 检测是在活细胞内进行, 可以在一定程度上代表细胞内的真实情况; c. 检测的结果可以是基因表达产物的积累效应, 因而可以检测存在于蛋白质之间的微弱的或暂时的相互作用. 因此该系统已得到广泛的应用.

已经检测的蛋白质之间的相互作用有发生在核内的, 也有发生在胞质内的. 膜相关蛋白和病毒蛋白之间的相互作用也可用双杂合系统来检测.

3.2 研究蛋白质的结构与功能

Raycroft 等^[5]将野生型 p53 的编码基因同 GAL4 的 DNA 结合域编码序列构成融合基因转化报告株, 结果使报告基因得到了表达. 这说明了野生型 p53 蛋白具有转录激活活性. 转化突变型的 p53 蛋白则没有转录激活活性, 说明突变的部位对 p53 蛋白的功能具有重要作用.

3.3 阐明蛋白质相互作用的结构域

如果已知两蛋白质之间存在相互作用, 在编码蛋白质的基因上引入缺失突变, 便可阐明蛋白质相互作用的结构域, 以及分析在相互作用中起关键作用的氨基酸残基. Li 等^[6,7]采用双杂合系统证明了人为突变 p53 蛋白与癌细胞中各型突变 p53 蛋白高度相关.

3.4 绘制蛋白质联系图谱

以 X 为靶蛋白寻找与之相互作用的 Y 蛋白是双杂合系统最为诱人的应用. 用转录激活域载体与细胞或组织的 cDNA 构建成转录激活域文库. DNA 结合域载体和靶蛋白编码序列

构成的重组质粒与该文库共转化报告株, 筛选阳性克隆, 便可找到与靶蛋白相互作用的蛋白质的编码序列. Lwabachi 等^[8]在 B 细胞的转录激活域文库中筛选到了两个能与 p53 结合的 53BP1 和 53BP2, 并进一步分析了它们与 p53 野生型和突变型相互作用的差异.

找到了同靶蛋白 X 相互作用的 Y 蛋白后, 可继续以 Y 蛋白为靶蛋白找出同它相互作用的 Z、S 蛋白等等. 这样, 对于许多蛋白质与蛋白质之间相互作用的了解可以帮助我们绘制蛋白质联系图谱 (protein linkage map). 结合基因组 DNA 或 cDNA 序列可以帮助我们在一维的 DNA 序列演化成三维时空图象.

3.5 双杂合系统在药物设计中的应用

双杂合系统可以检测其中一方是小肽的相互作用, 因而可以用来验证小分子的药理作用, 并进行药物设计^[3].

双杂合系统在活体内检测, 如果存在于细胞外的小分子可以进入细胞内并干扰导致疾病的 X、Y 之间的相互作用, 那么这个小分子可以用作治疗药物.

例如, Rb 结合蛋白有一保守序列 Leu-X-Cys-X-Glu, 将 Rb 蛋白的编码序列克隆于 DNA 结合域载体, 然后筛选用含有 Leu-X-Cys-X-Glu 编码序列的人工合成的 16 寡聚核苷酸构建的转录激活域文库, 选出的几个序列具有治疗作用.

致谢 王莉娟同志帮助绘图, 在此深表感谢.

参 考 文 献

- 1 Keegan L, Gill G, Ptashne M. Science, 1986; 231: 699
- 2 Bartel P L, Chien C-T, Sternglanz R *et al.* In: Hartley D A

ed. Cellular interactions in development: a practical approach Oxford: Oxford University Press, 1993: 153

- 3 Fields S, Sternglanz R. TIG, 1994; 10 (8): 286
- 4 Fields S. Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 1993; 5: 116
- 5 Raycroft L, Wu H, Lozano G. Science, 1990; 249: 1049
- 6 Lwabachi K, Bin L, Paul B *et al.* Oncogene, 1993; 8: 1693
- 7 Li B, Fields S. FASEB J, 1993; 7: 957
- 8 Lwabachi K, Bartel P, Li B *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 6098

Two-Hybrid System and Its Applications.

Huang Jiaxue, Ma Xiaojun, Liu Ting (College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract Protein-protein interaction is the basis of many phenomena including replication, transcription, secretion, signal transduction, metabolism *et al.* Designed genetically, two-hybrid system can be used to detect protein-protein interaction *in vivo*. An unknown protein which interacts with certain target protein can also be found by using this method. Consequently, the DNA sequence encoding the unknown protein can be cloned, the key amino acids involved in the interaction can also be decided. Drawing protein linkage map is its another application. Being used in drug design, two-hybrid system will have a more practical value in future.

Key words transcriptional activator, two-hybrid system, protein-protein interaction, protein linkage map, drug design