

- withdrawal and amyloid  $\beta$  peptide: Involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci*, 1997, **17** (11): 4212~ 4222
- 5 Gebicki J M. Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species. *Redox Report*, 1997, **3** (2): 99~ 110
- 6 Smith M A, Sayre L M, Monnier V M, *et al.* Radical aging in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 1995, **18** (4): 172~ 176
- 7 Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, *et al.* Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*, 1997, **54** (5): 533~ 539
- 8 Behl C. Amyloid  $\beta$  protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res*, 1997, **290** (3): 471~ 480
- 9 Yan S D, Chen X, Fu J, *et al.* RAGE and amyloid  $\beta$  peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 1996, **382** (6593): 685~ 691
- 10 Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, *et al.* Copper-binding amyloid precursor protein undergoes a site specific fragmentation in the reduction of hydrogen peroxide. *Biochemistry*, 1998, **37** (20): 7224~ 7230

**Alzheimer's Disease and Oxidative Stress.** CHEN Yuan, ZHOU Mei (*The First Military Medical University, Research Laboratory of Free Radical Medicine, Guangzhou 510515, China*).

**Abstract** Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder. It is the most common cause of dementia in aged population and also a main cause of death in aged people. The oxidative stress hypothesis of AD has focused on and described from four aspects: Molecular basis and oxidative stress basis of AD pathogenesis, and  $\beta$  amyloid aggregation and cytotoxicity related to reactive oxygen species.

**Key words** Alzheimer's disease, gene mutation, oxidative stress

## 酵母三杂交系统的应用研究进展

张浩 王全立 毛秉智<sup>1)</sup>

(军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850)

**摘要** 介绍了酵母三杂交系统的原理、应用、前景和存在的不足。在酵母双杂交基础上发展起来的酵母三杂交系统, 将应用范围扩大到研究蛋白质-蛋白质、蛋白质-RNA、蛋白质-小分子药物间的相互作用。

**关键词** 酵母三杂交系统, 酵母双杂交系统, 蛋白质间相互作用

学科分类号 Q81

### 1 酵母三杂交系统的原理

酵母双杂交系统作为研究两种蛋白质间相互作用的技术得到了广泛的应用。SenGupta<sup>[1]</sup>在酵母双杂交思想上提出的酵母三杂交系统, 不仅可以用来研究更为复杂的三个蛋白质间相互作用, 而且成为体内研究 RNA-蛋白质间相互作用, 小分子药物与蛋白质间相互作用的新途径。酵母三杂交系统具有比酵母双杂交系统更广泛的应用范围, 但两者在基本原理和实验操作中非常相似。酵母双杂交和酵母三杂交系统都是利用了酿酒酵母细胞的 GAL4 蛋白调节半乳糖苷酶基因转录的特点。GAL4 蛋白有两个可分离的功能区, N 端是 DNA 结合区, C 端为转录激活区。中间的一段序列的替换不影响其功能, 这为研究蛋白质间相互作用提供了可能。当 GAL4 的 DNA 结合区与 DNA 上游的激活序列 (UAS) 结合, 其转录激活区则能有效地激活 UAS 下游报告基因的转录; 当两者不能通过中间序列结

合, 任一区域都不会激活下游报告基因的转录。酵母双杂交系统将待研究的两个蛋白质, 其中之一与 DNA 结合区蛋白质构建成第一个融合蛋白, 另外一个与转录激活区的蛋白质构建成第二个融合蛋白。酵母三杂交系统是研究两个蛋白质与第三个成分间的相互作用, 按第三个成分的不同, 可以是蛋白质、RNA 或小分子药物。如果是蛋白质, 可以用 cDNA 文库或表达质粒或细胞内天然存在的蛋白质; 如果是 RNA, 要构建成可以转录成待研究 RNA 的质粒; 如果是小分子药物, 可以用化学方法进行修饰。然后使这三种成分相互作用, 通过观察下游报告基因的转录情况, 判断这三者间是否存在相互作用。三杂交系统需要满足以下条件: a. 第 1、2 个融合蛋白必须通过与成分 3 的结合, 间接起到激活报告基因转录的作用, 两者间没有直接作用, 不能直接激活报告基因的转录; b. 成分 3

<sup>1)</sup>军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850.

收稿日期: 1998-10-23, 修回日期: 1999-02-15

具有分别与第 1、2 个融合蛋白结合的区域。

## 2 酵母三杂交系统的应用

酵母三杂交系统不但可以研究蛋白质间的相互作用，还可以研究蛋白质与 RNA，蛋白质与小分子药物间的相互作用，其应用范围比酵母双杂交系统广泛。

### 2.1 用于三种蛋白质间的相互作用的研究

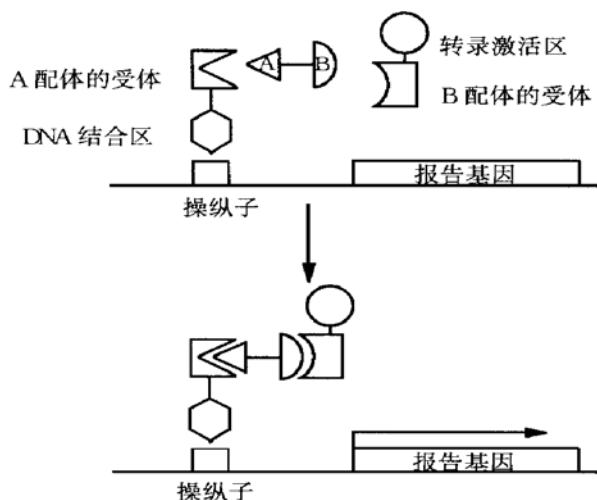


图 1 酵母三杂交系统的原理示意图

Zhang<sup>[2]</sup>利用酵母三杂交系统首先研究了 EGF 受体、Grb2 和 SOS 三种蛋白质间的相互作用。以 GAL4 DNA 结合区与 EGF 受体为第一个融合蛋白，GAL4 转录激活区与 SOS 蛋白为第二个融合蛋白，以 cDNA 文库作为成分 3，使三者间相互作用，从 cDNA 文库筛选到与 Grb2 功能类似的 2 种蛋白质。然后分别将 EGFR 基因、Grb2 基因、SOS 基因克隆进 pGBT9 (Leu<sup>+</sup>)、pDela (ura<sup>3+</sup>)、pGAD424 (Trp<sup>+</sup>) 质粒构建表达 3 个融合蛋白的质粒。将三种相容性质粒转染至 BY3161 酵母 (含 LacZ 和 His<sup>3+</sup> 报告基因) 中，可以激活报告基因的表达。在对照实验组中，去掉融合蛋白的任一组分，都不能激活报告基因的表达。这表明用酵母三杂交系统研究三种蛋白质间的相互作用是可行的。用同样的方法，以成年小鼠脑为材料构建了 pDela cDNA 文库。当用该文库转染已存在 pGBT9-EGFR 和 GAD424-SOS 质粒的 BY3161，发现了 2 个阳性克隆，分别命名为 E2 和 E9。再用 E9 转染 BY3161，发现报告基因激活有赖于 pGBT9-EGFR 和 pGAD422-SOS 的存在。使用 pGBT9-P53 或 pGAB-SV40T 的对照组均不能激活报告基因。E9 全长

1.3 kb 包含 Grb2 的全长序列，5' 端含 279 bp 非编码的序列，可能为 Grb2 基因的不同剪接方式的产物。

### 2.2 用于 RNA 与蛋白质间的相互作用的研究

在生物体内，很多关于 RNA 与蛋白质相互作用的问题未得到解决。如 mRNA 的加工和翻译；染色体末端的复制；生物体发育过程中 mRNA 的稳定性，在细胞中的定位以及 mRNA 活性的调节；RNA 病毒感染过程中，RNA 病毒与蛋白质间的相互作用对病毒感染和复制的影响。目前 RNA-蛋白质相互作用研究的体内实验方法有翻译阻滞法<sup>[3]</sup>和抗转录终止法<sup>[4]</sup>。体外实验方法有噬菌体显示法<sup>[5]</sup>和 RNA-蛋白质亲和法<sup>[6]</sup>。SenGupta<sup>[1]</sup>应用酵母三杂交系统对双功能 RNA 与蛋白质间的作用进行了研究，该方法利用表型筛选比传统的方法具有简便快速的优点。在以铁离子调节蛋白 (IRP1) 与铁反应元素 (IRE) 为模型的试验中，将 DNA 结合区蛋白与噬菌体 MS2 包膜蛋白构建成第 1 个融合蛋白，MS2 包膜蛋白可以识别并特异地与 R17 噬菌体 21nt 的茎环结构结合。将 IRP1 与转录激活区蛋白构建成第二个融合蛋白。将 IRE 基因克隆至 R17 噬菌体中使其转录成 5' 端为 R17 噬菌体 21nt 的茎环结构 (可与 MS 包膜蛋白结合)，3' 端为 IRE (可与 IRP1 结合) 的杂合 RNA 分子。将构建好的 3 个质粒转染进 L40-ura3 酵母，出现明显的报告基因转录现象，而缺少任一成分的对照组中报告基因不被转录。病毒反式激活因子 HIV Tat 与病毒间的作用机理的揭示，有望成为 AIDS 治疗的靶点。在以 HIV 反式激活因子 (Tat) 与 HIV 反式激活元件 (TAR) 为模型的试验中，将 DNA 结合区蛋白与噬菌体 MS2 包膜蛋白构建成第一个融合蛋白，将 Tat 与激活转录区蛋白构建成第二个融合蛋白。Tat 可以识别并特异地与 TAR 的 59nt RNA 结合，使 HIV 病毒在细胞内复制，增加病毒的感染性。将 TAR 基因克隆进 R17 噬菌体，可被转录形成 5' 端 R17 噬菌体 21 bp 茎环结构，3' 端为 TAR 的杂和 RNA 分子。将三种质粒转染进 L40-ura3 酵母，三者相互结合作用明显地激活报告基因的转录，对照实验中用 RAT (反义 TAR) 代替 TAR，或没有 TAR、Tat 蛋白存在下，均不能激活报告基因的转录。Bacharach<sup>[7]</sup>发现 HIV1Gag 蛋白可以特异性地与 HIV 衣壳体信号的含 4 个茎环结构的 139 个核苷酸 RNA 结合。用酵母三杂交系统研究发现，HIV1Gag 蛋白与 HIV 病毒衣壳体信号结合后，可以明显激活报告基因的转录。Gag

蛋白突变后或 HIV 衣壳体信号的改变都使基因的转录降低。

### 2.3 用于蛋白质-药物小分子的相互作用的研究

配体与受体结合后可引起一系列级联反应, 导致机体产生生理或病理反应。配体可作为药物筛选的研究对象。目前还没有一种合适的研究小分子化合物与受体相互作用的体内实验方法。Licitra<sup>[8]</sup> 使用酵母三杂交系统寻找已知配体的受体或已知受体的配体, 该方法简便快捷。在以肾上腺皮质激素受体, FK506 受体, 地塞米松与 FK506 交联药物为模型的试验中, 将肾上腺皮质激素受体与 DNA 结合区蛋白构建成第 1 个融合蛋白, FK506 受体与转录激活蛋白构建第二个融合蛋白。FK506 和地塞米松经化学方法交联形成的小分子化合物, 不影响地塞米松与肾上腺皮质激素受体的结合, 也不影响 FK506 和 FK506 受体的结合, 形成的三元素复合物可以激活下游报告基因的转录。将野生型的糖皮质激素受体基因突变为与地塞米松高亲和力的受体后发现, 报告基因的转录相应地比突变前增强了。将单独 FK506 代替交联的地塞米松-FK506 后发现, 由于单独 FK506 不能有效地形成三元复合物, 所以抑制了报告基因的转录。另外的实验中, 用 FK506 受体和 DNA 结合区蛋白构建成第一个杂交蛋白, FK506-地塞米松交联, 试验该三杂交系统对获得已知配体的受体的可靠性, 结果发现了三个阳性克隆, 然后仅用了三周时间就分离鉴定了这三个阳性克隆。如果用传统的方法, 首先要分离出足够量的待测蛋白, 然后进行蛋白质氨基酸分析。再将 cDNA 克隆至少需要数月至一年时间。酵母三杂交系统大大加快了寻找已知配体的受体或已知受体的配体的速度。

### 3 酵母三杂交的前景和存在的不足

新方法的出现为以前局限于方法得不到解决的问题带来希望。例如, 细胞因子融合蛋白除提高原有的生物活性外, 同时具有新增加的生物活性。但其机理不明。有的认为是细胞因子融合蛋白分别与各自的受体结合; 有的认为是细胞因子融合蛋白与各自受体外的新型受体结合激活该受体引起级联反应所致。酵母三杂交系统的出现为探索这一机理提供了可能。虽然酵母三杂交系统应用范围比酵母双杂交系统广泛, 但还存在不足。局限于三种成分间的相互作用, 其中两种为蛋白质, 第 3 种成分可以是 RNA 或小分子药物, 对于超过三种成分更为复

杂的相互作用则无能为力; 酵母双杂交系统可以检测解离常数 ( $K_d$ ) 小于 5 nmol/L 的两种为蛋白质间的相互作用<sup>[9]</sup>, 而对于酵母三杂交系统的检测灵敏度没有明确的研究结果; 在对蛋白质-药物小分子的相互作用研究中, 药物小分子要能透入酵母细胞膜, 对于不能透入酵母细胞膜的药物小分子, 该方法不适用; 与酵母双杂交系统一样, 酵母三杂交系统适用于可溶蛋白, 不适用于膜结合型蛋白的研究。

**致谢** 感谢彭剑淳同志在文字录入和编辑过程中的辛勤工作。

### 参 考 文 献

- 1 SenGupta D J, Zhang B, Kraemer B, *et al.* A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (8): 8496~ 8501
- 2 Zhang J, Lautar S. A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components. *Anal Biochem*, 1996, **242** (1): 68~ 72
- 3 Stripecke R, Oliverira C C, McCarthy J E. Protein binding to 5' untranslated region site: a general mechanism for translational regulation of mRNAs in human and yeast cells. *Mol Cell Biol*, 1994, **14** (9): 5898~ 5909
- 4 Harada K, Martin S S, Frankel A D. Selection of RNA-binding peptides *in vivo*. *Nature*, 1996, **380** (6570): 175~ 179
- 5 Laird-Offringal A, Belasco J G. Analysis of RNA-binding proteins by *in vitro* genetic selection: identification of an amino acid residue important for locking U1A onto its RNA target. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (25): 11859~ 11863
- 6 Gold L, Polisku B, Uhlenbeck O. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64** (3): 763~ 797
- 7 Bacharach E, Goff S P. Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein to the viral RNA encapsidation signal in the yeast three-hybrid system. *J Virol*, 1998, **72** (8): 6944~ 6949
- 8 Licitra E J, Liu J O. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein-receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (11): 12817~ 12824
- 9 Estojak J, Brent R, Golemis E, *et al.* Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (10): 5820~ 5829

**Advance in Application of Yeast Three-hybrid System.** ZHANG Hao, WANG Quar-Li, MAO Bing-Zhi (*Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China*).

**Abstract** Yeast three-hybrid system based on yeast two-hybrid system can be used in research of the interaction among three kinds of proteins and interaction among the proteins and RNA or interaction between protein and drug. Its theory, application and shortcoming were summarized.

**Key words** yeast three-hybrid system, yeast two-hybrid system, protein-protein interaction