维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0133-03

酵母双杂交 RRS 筛选系统对已知蛋白间相互作用的验证

王 琪,张 静,田 杰,张 晖

(重庆医科大学附属儿童医院心血管内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:通过一对已知蛋白 Pak 和 Chp 间的相互作用介绍酵母双杂交 RRS 筛选系统,以期将此系统更广泛的用于蛋白间相互作用的研究。方法:挑选酵母温度缺陷株 cdc25-2 的低回复突变单克隆,醋酸锂法制备酵母感受态细胞。重组质粒 Met425-Myc-Ras-Pak 单独转化酵母,排除诱饵蛋白的自激活作用。将两重组质粒 Met425-Myc-Ras-Pak 和 Ura-M-ChpAc 共转化酵母,设置不同质粒组合和不同培养基平板作为对照,观察酵母在 36℃的生长情况。结果:制备感受态的 cdc25-2 细胞无回复突变发生。质粒 Met425-Myc-Ras-Pak 转化酵母后对细胞既无毒性也无自激活作用。只有当能够表达两已知蛋白的重组质粒共转化酵母,并且在适合它们表达的培养基上,cdc25-2 细胞才能够在 36℃生长。结论:(1)RRS 筛选系统正确验证了 Pak 和 Chp 间的相互作用,可将其用于其它已知蛋白间相互作用的研究。(2)可以利用某已知蛋白构建诱饵,通过 RRS 筛选系统去寻找与已知蛋白相互作用的未知蛋白。

【关键词】酵母双杂交系统;Ras 恢复系统;蛋白相互作用

【中国图书分类法分类号】Q3-3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-02-27

Testing interaction between two know proteins by ras recruitment system

WANG Qi, et al

(*Department of Cardiovascular, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Introduce yeast two-hybrid system RRS screening system through interaction between two known proteins, Pak and Chp, in order to apply this system on research of the interaction between other proteins. *Methods*: Select the yeast strain cdc25-2 for single clone that displays low reversion rate, and prepare the competences of the yeast by LiAc. Only transform the plasmid Met425-Myc-Ras-Pak into the yeast to eliminate its self-activation. Co-transform the plasmids Met425-Myc-Ras-Pak and Ura-M-ChpAc into the yeast, set up some controls, observe their growth on different mediums at 36℃. *Results*: The cdc25-2 cells which are used to prepare competences have no reversion. After the transformation of the plasmid Met425-Myc-Ras-Pak into the yeast, there is neither toxicity nor self-activation. Only when the two plasmids which can express the two corresponding known proteins are co-transformed, and only on the medium suitable for their expression, the cdc25-2 cells can grow at 36℃. *Conclusion*: (1)The RRS screening system verifies the interaction between Pak and Chp correctly. So it can be used for research of the interaction between other known proteins. (2)We can construct a bait of an known protein, then use the RRS screening system to look for the interacted proteins.

【Key words】 Yeast two-hybrid system; Ras recruitment system; Interaction between porteins

酵母双杂交技术由 Fields 等[1]于 1989 年首先应用。经典的酵母双杂交系统所研究的蛋白质间相互作用都是在细胞核内完成的,这对于许多细胞膜蛋白来说是不合适的。近年来,由 Aronheim 等[2]建立的 Sos 募集系统(SRS),以及由 Broder 等[3]将其改进发展为的 Ras 恢复系统(RRS),能够将蛋白质间相互作用的研究定位在膜上,从而克服了传统酵母双杂交技术的一些局限性。

在本研究中,我们利用了一对已知蛋白:p21 活化蛋白激酶(Pak)和 GTP 酶同系物(Chp)[4]在酵母细胞内发生的相互作用来介绍 RRS 筛选系统,以期将此筛选系统用于其他未知蛋白相互作用的研究以及相互作用蛋白的钓取。

1 材料与方法

作者介绍:王 琪(1980-),女,硕士,
研究方向:轮状病毒分子致病机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300299)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

1.1.1 质粒载体 Met425-Myc-Ras;质粒载体 Ura-M-ΔpoLyA;克隆有 Pak 蛋白基因、Ras 蛋白基因和 Myc 表位标签的重组质粒 Met425-Myc-Ras-Pak;克隆有 Chp 蛋白基因和膜定位信号豆蔻酰化基因的重组质粒 Ura-M-ChpAc 均由以色列 Aronheim 教授惠赠。

1.1.2 酵母温度缺陷株 cdc25-2 由以色列 Aronheim 教授惠赠。

1.1.3 酵母氮源、琼脂糖粉购自 Difco 公司;半乳糖、蜜三糖、山梨糖醇、鲑精 DNA、50%PEG_{3350}、二甲基亚砜(DMSO)及氨基酸购自 Sigma 公司;葡萄糖、硫酸铵、醋酸锂、甘油均为国产分析纯。

1.1.4 仪器 含有水托盘的培养箱、恒温摇床、离心机、紫外分光光度仪等。

1.2 方法

1.2.1 挑选酵母温度缺陷株低回复突变克隆 cdc25-2 细胞生长于 YPD 平板上以得到单克隆,从平板上挑取 8 个单克隆,24℃过夜生长后复制于 2 块 YPD 板上,1 块板孵育于 24℃,另 1 块板孵育于 36℃,选择具有低回复突变率的克隆。

1.2.2 制备酵母细胞感受态 将选取的低回复突变克隆置于 60mlYPD 液体中 24℃过夜培养至 OD600 为 0.3。取 100μl 过夜培养液涂布 YPD 平板,直接在 36℃孵育;其余过夜培养液采用醋酸锂法[5]制备感受态细胞并分装为每管 200μl。

1.2.3 重组质粒 Met425-Myc-Ras-Pak 转化酵母及自激活实验 取 2 管感受态细胞,各 200μl,分别加入 0.1mg 鲑精 DNA、1μg 重组质粒,混匀后加入 800μl 50%PEG_{3350}、100μl 醋酸锂,剧烈混匀后室温震荡孵育 30min。加入 100μlDMSO 温和颠倒数次,42℃热休克 10min,立即冰浴 3min。快速旋转弃去上清,将细胞重悬于 120μl 的 1mol/L 山梨糖醇,涂布 Glu-leu-met 平板分别于 24℃和 36℃孵育。

1.2.4 不同质粒组合共转化酵母,在不同培养基上生长 取 4 管感受态细胞,各 200μl,分别标注为 1、2、3、4 号。将不同的质粒组合按上述方法共转化酵母,即:1 号加入 0.1mg 鲑精 DNA、0.5μg 重组质粒 Met425-Myc-Ras-Pak、0.5μg 重组质粒 Ura-M-ChpAc;2 号加入 0.1mg 鲑精 DNA、0.5μg 重组质粒 Met425-Myc-Ras-Pak、0.5μg 质粒 Ura-M-ΔpoLyA;3 号加入 0.1mg 鲑精 DNA、0.5μg 质粒 Met425-Myc-Ras、0.5μg 重组质粒 Ura-M-ChpAc;4 号加入 0.1mg 鲑精 DNA、0.5μg 质粒 Met425-Myc-Ras、0.5μg 质粒 Ura-M-ΔpoLyA。将上述 4 种转化体系各 120μl 涂布 Glu-leu-met 平板于 24℃孵育;5d 后将长出的克隆各选取 6 个涂布新鲜的 Glu-leu-met 平板于 24℃再生长 2d;将以上 24 个克隆分别复制于 Gal-leu-ura-met 平板、Glu-leu-met 平板、Gal-ura-leu 平板和 YPD 平板,于 36℃孵育。

2 结 果

cdc25-2 细胞的单克隆在 24℃时生长明显,在 36℃时不生长或者接近不生长(图 1)。选取 24℃生长而 36℃不生长的 1 个单克隆来制备酵母感受态细胞。



图 1 左侧为 cdc25-2 细胞在 24℃ YPD 平板上的生长情况 右侧为相对应克隆复制在 36℃的生长情况

100μl 过夜培养液涂布 YPD 平板后在 36℃生长 3d,平板上未见克隆。说明制备感受态的酵母细胞未发生回复突变。

选用适合重组质粒 Met425-Myc-Ras-Pak 表达的 Glu-leu-met 平板来进行诱饵蛋白的自激活实验。若诱饵蛋白对 cdc25-2 细胞有自激活作用,那 36℃就会有菌落生长;反之,若诱饵蛋白对 cdc25-2 细胞无自激活作用,那 36℃不应该有菌落生长。实验结果表明,重组质粒 Met425-Myc-Ras-Pak 转化酵母后,在 24℃Glu-leu-met 平板上生长良好,而在 36℃Glu-leu-met 平板上没有 1 个克隆生长,说明其表达的诱饵蛋白对 cdc25-2 细胞并无毒性,也无自激活作用,可以进行下一步相互作用的检验。

不同质粒组合共转化酵母细胞后,复制在 36℃不同的培养平板上生长 3d 的情况如表 1 及图 2 所示。

表 1 及图 2 均说明,只有共转化了重组质粒 Met425-Myc-Ras-Pak 和 Ura-M-ChpAc,并且在适

表 1 不同质粒组合在 36℃不同培养基上的生长情况

质粒组合 / 培养平板	1 号	2 号	3 号	4 号
Gal-leu-ura-met	生长	不生长	不生长	不生长
Glu-leu-met	不生长	不生长	不生长	不生长
Gal-ura-leu	不生长	不生长	不生长	不生长
YPD	不生长	不生长	不生长	不生长

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 2 左上为 Gal-leu-ura-met 平板；右上为 Glu-leu-met 平板；左下为 Gal-ura-leu 平板；右下为 YPD 平板。每块平板又分为左上、右上、左下、右下 4 格，其内依次为 1、2、3、4 号质粒组合转化子。

合两者表达的培养基上，酵母细胞才能在 36℃生长。其余质粒组合及培养基类型均未见到酵母菌落生长。

3 讨 论

酵母双杂交技术是一种常用的研究蛋白质与蛋白质相互作用的方法。传统的酵母双杂交是基于对真核生物转录激活因子的功能的认识，这使得蛋白质间的相互作用必须发生在细胞核内，从而限制了大量细胞膜和细胞质蛋白功能的研究。Aronheim 等人建立的 SRS，取代了传统的转录激活机制，大大拓展了酵母双杂交技术的应用范围。其原理如下：在酵母温度缺陷株 cdc25-2 中，其 Cdc25 蛋白丧失了鸟苷酸交换因子（GEF）的功能，不能促使 Ras 蛋白的 GDP 转换为 GTP，因此这种酵母株只能在 24~25℃生长，在 36℃却无法生长。如果引入 GEF（Sos 蛋白）并使之定位于酵母细胞膜上，它可以替代 Cdc25 蛋白的功能，使得酵母细胞在 36℃存活和增殖。这样，可以将蛋白 X 与Sos 蛋白融合构成诱饵蛋白，蛋白 Y 与膜定位信号豆蔻酰基融合构成猎物蛋白，如果 X 和 Y 发生了相互作用，则 Sos 蛋白被带到膜上，酵母能够在 36℃生长。如 Ko 等[6]利用 SRS 筛选到了与甲状腺素受体 β-1 相互作用的甲状腺素受体结合蛋白 TRBP；Shamay 等[7]利用该系统筛选到了与 HBV 的 X 蛋白作用的两个蛋白质。

虽然 SRS 有很多优点，但是它也存在一些局限。例如在文库筛选时可能会出现较多的假阳性；另外，Sos 蛋白的分子较大，应用时可能有一些局限。针对这一点，Broder 等根据 SRS 的原理设计了 RRS，直接将哺乳动物的 Ras-GTP 与蛋白 X 融合，通过 X 与 Y 的相互作用，将 Ras-GTP 带到酵母细胞膜上，从而激活 Ras 信号途径，使酵母在 36℃生长。尽管如此，RRS 仍然不能完全避免哺乳动物 cDNA 文库筛选时的假阳性。

在本研究中，Pak 蛋白编码基因克隆在表达 Ras 蛋白的载体 Met425-Myc-Ras 上，其表达的融合蛋白即为诱饵蛋白；Chp 蛋白编码基因克隆在表达豆蔻酰基的载体 Ura-M-ΔpoLyA 上，构成猎物蛋白。由于 cdc25-2 细胞有一定的回复突变率，因此，通过同时在 24℃和 36℃培养同一克隆来挑选 24℃生长而 36℃不生长的低回复突变克隆，用于制备酵母细胞感受态；同时，用 cdc25-2 细胞过夜培养液在 36℃直接孵育，再次证明制备感受态的 cdc25-2 细胞未发生回复突变。如果诱饵蛋白未经相互作用就直接激活了酵母在 36℃的生长，那么在验证过程中就会出现假阳性结果，因此诱饵蛋白的自激活实验是必须且重要的。在转化酵母时，我们不仅共转化了两种重组质粒，同时也转化了重组质粒与空质粒载体的组合或者两种空质粒载体的组合以作为对照。对于质粒 Met425-Myc-Ras 而言，其自身编码亮氨酸，但蛋氨酸的存在会抑制其表达；因此，当细胞生长于一种缺乏蛋氨酸的介质上时诱导了其表达。对于质粒 Ura-M-ΔpoLyA 而言，其自身编码脲嘧啶，含有半乳糖的介质可诱导其表达，而葡萄糖的存在却会抑制其表达。由此可知，为了诱饵蛋白和猎物蛋白同时表达，细胞必须生长于缺乏蛋氨酸的半乳糖介质上，如 Gal-leu-ura-met 培养基，其他种类介质均不能保证 2 个融合蛋白的同时表达。因此，只有当下面这种情况发生时：即 2 个融合蛋白在酵母细胞内能够表达并且发生了相互作用，Ras 蛋白才能被带到细胞膜上，Ras 信号途径才能被激活，酵母在 36℃才能够存活和生长。在本研究中，2 个已知蛋白的相互作用得到了 RRS 筛选系统的正确验证；因此，可以应用该系统来研究其它已知蛋白之间的相互作用，也可以利用 1 个已知蛋白的表达质粒作为诱饵通过该系统从 cDNA 表达文库中钓取相互作用的蛋白质。

参 考 文 献

（下转第 193 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

PHB/PEO 导管的表面既达到了为神经生长提供支架的作用，又构建了一个有利于神经再生的内环境。本次研究中，电镜和组织学结果显示 PHB/PEO 导管复合神经生长因子可显著促进神经纤维和神经髓鞘再生，其疗效与自体神经移植效果相近，显著优于异体神经移植和 PHB/PEO 移植。SFI 和神经传导速度等反映神经功能的检测指标显示，PHB/PEO 导管复合神经生长因子可显著促进坐骨神经电生理功能恢复，改善运动功能，其改善程度与自体神经移植相似，优于异体神经移植和 PHB/PEO 移植。其它也有研究证明生物导管复合生物分子治疗，较单独使用生物导管更能促进神经再生，疗效较对照组高 98%[10]。

综上所述，PHB/PEO 导管复合神经生长因子可显著促进大鼠坐骨神经损伤后神经纤维的解剖结构和神经功能的恢复，疗效与自体神经移植相似。我们认为下一步如果能够对该材料在生物相容性和生物降解率进行深入的研究，该材料在替代自体神经移植方面具有一定的潜力。

参 考 文 献

[1] Slater SC, Gallaher T, Dennis D, et al. Polyhydroxybutyrate, natural biocompatible and biodegradable polyesters produced by barteria [J]. J Bacterial, 1988; 170(10): 4431-4436.

[2] Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2003; 5: 293-347.

[3] Hadlock TA, Sundback CA, Hunter DA, et al. A new artificial nerve graft containing rolled Schwann cell monolayers[J]. Microsurgery, 2001; 21: 96-101.

[4] Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, et al. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap [J]. Plast Reconstr Surg, 2000; 105: 660-666.

[5] Yoshii S, Oka M, Shima M, et al. 30mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments[J]. Brain Res, 2002; 949: 202-208.

[6] Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, et al. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin[J]. Biomaterials, 2000; 21: 1541-1547.

[7] Lesny P, De Croos J, Pradny M, et al. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair[J]. J Chem Neuroanat, 2002; 23: 243-247.

[8] Matheson CR, Carnahan J, Urich JL, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins[J]. J Neurobiol, 1997; 32: 22-32.

[9] Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, et al. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 8735-8739.

[10] Miller C, Jeftinija S, Mallapragada S. Micropatterned Schwann cell-seeded biodegradable polymer substrates significantly enhance neurite alignment and outgrowth[J]. Tissue Eng, 2001; 7: 705-715.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 135 页)

[1] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989; 340(6230): 245-246.

[2] Aronheim A, Zandi E, Hennemann H, et al. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions[J]. Mol Cell Biol, 1997; 17(6): 3094-3102.

[3] Broder YC, Katz S, Aronheim A. The Ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions[J]. Curr Biol, 1998; 8(20): 1121-1124.

[4] Aronheim A, Broder YC, Cohen A, et al. Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton [J]. Curr Biol, 1998; 8(20): 1125-1128.

[5] 金冬雁，黎孟枫，译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 科学出版社，1996.

[6] Iwasaki T, Chin WW, Ko L. Identification and characterization of RRM-containing coactivator activator (CoAA) as TRBP-interacting protein, and its splice variant as a coactivator modulator (CoAM)[J]. Biol Chem, 2001; 276(36): 33375-33383.

[7] Shamay M, Barak O, Shaul Y. HBXAP, a novel PHD-finger protein, possesses transcription repression activity [J]. Genomics, 2002; 79(4): 523-529.

(责任编辑：冉明会)