

录激活活性的锌指蛋白, 由于其结合的序列富含“GC”, 故命名为 GC-box 结合蛋白. Mak et al [15] 运用此技术测试哺乳动物具有基本的螺旋-环-螺旋(bHLH)结构的转录因子, 通过对肌调节因子 4(MRF4)的研究, 证实它具有转录活性, 并进一步证明运用酵母单杂交技术能在哺乳动物 cDNA 文库中筛选出与 E-box DNA 相互作用的新的 bHLH 蛋白. Nishiyama et al [16] 运用酵母单杂交技术并结合点突变方法对转录活性片段 Elf-1 进行分析, 确定具有转录活性的区域位于第 87-175 碱基区.

### 3 存在问题及解决办法

3.1 在鉴别 DNA 结合位点中存在的缺陷 由于细胞技术的先天局限性, 即影响因子多, 因此, 可能有内源性的酵母表达激活物与 DNA 结合位点结合, 并激活报告基因的表达, 则相应的目的基因片段可能因此而被漏检. 这个问题在试图鉴定某基因组中所有的 DNA 结合位点时就会暴露出来. 此缺陷的补救需要一个更加随机的文库. 例如, 可以用含有更多的已突变的片段构建一个随机剪切的 DNA 片段库. 另一个比较关心的问题就是此技术的检测灵敏度, 有报道<sup>[2]</sup>显示此系统对于 HIS3 基因表达是非常灵敏的, 即使是很弱的、甚或非特异性的相互作用都能被检测到, 这些非特异的相互作用可通过其他技术<sup>[2]</sup>避免, 但这也可能导致此方法灵敏度的过度下降.

3.2 在 DNA 结合结构域分析中存在的缺陷 用酵母单杂交技术分析突变导致 DNA 结合结构域改变的局限在于此方法的灵敏度依靠 DNA 结合结构域功能选择, 只有当突变影响了 DNA 结合结构域的功能时, 才能被发现. 改进的方法是在培养基中选择合适的半乳糖浓度<sup>[2]</sup>, 以减少杂交激活子的激活活性, 或用不同的阴性对照等方法.

总之, 随着生物化学及分子生物学技术的不断发展, 越来越多的大分子间相互作用被人们所认识, 这将有助于人们阐明生物体内各种生物学过程的发生情况, 并可能由此发现新的基因工程药物. 酵母单杂交技术作为一种研究生物大分子间的相互作用的体外、细胞内技术, 从 1993 年发展至今, 已有近 10 a 时间, 虽然有关的报道不是很多, 但在生物学研究领域, 特别是在研究 DNA-蛋白质相互作用方面他还是显示出了巨大的应用潜力, 而且, 由酵母单杂交技术衍生出的反向单杂交技术及单-双杂交技术更是拓宽了其应用范围<sup>[17]</sup>. 运用酵母单杂交技术不但可以验证许多已知的 DNA-蛋白质间相互作用, 而且可以发现新的 DNA-蛋白质间相互作用, 并由此发现新的基因. 相信随着酵母单杂交技术的不断发展和完善, 必将在科研、临床及生产中得到更加广泛的应用.

### 4 参考文献

- 1 Li JJ, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 1993;262:1870-1873
- 2 Liu JD, Wilson TE, Milbrandt J, Johnston M. Identifying DNA-

- binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods* 1993;5:125-137
- 3 Alexander MK, Bourns BD, Zakian VA. One-hybrid systems for detecting protein-DNA interactions. *Methods Mol Biol* 2001; 177:241-259
- 4 Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9578-9582
- 5 Chevray P, Nathans D. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5789-5793
- 6 Dalton S, Treisman R. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* 1992;68:597-612
- 7 Chew LJ, Huang F, Boutin JM. Identification of nuclear orphan receptors as regulators of expression of a neurotransmitter receptor gene. *J Biol Chem* 1999;274:29366-29375
- 8 Wei Z, Angerer RC, Angerer LM. Identification of a new sea urchin ets protein, SpEts4, by yeast one-hybrid screening with the hatching enzyme promoter. *Mol Cell Biol* 1999;19:1271-1278
- 9 Sieweke M. Detection of transcription factor partners with a yeast one hybrid screen. *Methods Mol Biol* 2000;130:59-77
- 10 Huang J, Hou CH, Qian RL. Screening of genes related to the expression of human epsilon-globin Gene by using yeast one-hybrid system. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2001;33:246-250
- 11 Liao MX, Liu DY, Zuo J, Fang FD. Yeast one-hybrid system used to identify the binding proteins for rat glutathione S-transferase P enhancer I. *Biomed Environ Sci* 2002;15:36-40
- 12 Wilson TE, Day ML, Pexton T, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. In vivo mutational analysis of the NGFI-A zinc fingers. *J Biol Chem* 1992;267:3718-3724
- 13 Wilson TE, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. A genetic method for defining DNA-binding domains: application to the nuclear receptor NGFI-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 9186-9190
- 14 Lisowsky T, Polosa PL, Sagliano A, Roberti M, Gadaleta MN, Cantatore P. Identification of human GC-box-binding zinc finger protein, a new Kruppel-like zinc finger protein, by the yeast one-hybrid screening with a GC-rich target sequence. *FEBS Lett* 1999;453:369-374
- 15 Mak KL, Longcor LC, Johnson SE, Lemercier C, To RQ, Konieczny SF. Examination of mammalian basic helix-loop-helix transcription factors using a yeast one-hybrid system. *DNA Cell Biol* 1996;15:1-8
- 16 Nishiyama C, Takahashi K, Ohtake Y, Yokota T, Okumura K, Ogawa H, Ra C. Analysis of transactivation region of Elf-1 by using a yeast one-hybrid system. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:1105-1107
- 17 廖名湘, 方福德. 酵母单杂交体系 - 一种研究 DNA-蛋白质相互作用的有效方法. *中国医学科学院学报* 2000;22:388-391

## 酵母双杂交系统的原理及应用

陈天艳, 成军, 张树林

陈天艳, 成军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎研究重点实验室 北京市 100039  
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-18

陈天艳, 成军, 张树林. 酵母双杂交系统的原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):451-455

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/451.htm>

## 0 引言

蛋白质和蛋白质的相互作用是很多生命现象的基础. 随着分子生物学技术的发展,特别是人类基因组计划的完成,使人类对基因的结构和功能的认识不断加深,但基因编码的蛋白质的功能研究尚是一个难题. 酵母双杂交(yeast two hybrid)技术是利用酵母遗传学方法分析蛋白质之间的相互作用,该方法建立以来,经过不断的完善和发展,不但可以检测已知蛋白质之间的相互作用,更重要的在于发现新的与已知蛋白相互作用的未知蛋白.

## 1 酵母双杂交技术的基本思想

酵母双杂交由 Fields et al<sup>[1]</sup>在 1989 年提出. 他的产生是基于对真核细胞转录因子特别是酵母转录因子 GAL4 性质的研究. GAL4 包括两个彼此分离的但功能必需的结构域. 位于 N 端 1-174 位氨基酸残基区段的 DNA 结合域(DNA binding domain, DNA-BD)和位于 C 端 768-881 位氨基酸残基区段的转录激活域(Activation domain, AD). DNA-BD 能够识别位于 GAL4 效应基因(GAL4-responsive gene)的上游激活序列(Upstream activating sequence, UAS), 并与其结合. 而 AD 则是通过与转录机构(transcription machinery)中的其他成分之间的结合作用,以启动 UAS 下游的基因进行转录. DNA-BD 和 AD 单独分别作用并不能激活转录反应,但是当二者在空间上充分接近时,则呈现完整的 GAL4 转录因子活性并可激活 UAS 下游启动子,使启动子下游基因得到转录.

Fields et al 建立了一个双杂交系统, DB 与 X 蛋白融合, AD 与 Y 蛋白融合,如果 X、Y 之间形成蛋白-蛋白复合物,使 GAL4 两个结构域重新构成,启动特异基因序列的转录. 他们利用 Snf1 与 Snf4 的相互作用,将 Snf1 与 DB 融合, Snf4 与 AD 融合,构建在穿梭质粒上. 其中 Snf1 是一种依赖于丝氨酸、苏氨酸的蛋白激酶, Snf4 是他的一个结合蛋白. 研究者将二种穿梭质粒转化酵母 GGY:171 菌株,该菌株含有 LacZ 报告基因,并已去除相应转录因子基因. 该实验的结果表明由 Snf1 和 Snf4 相互作用使得 AD 和 BD 在空间上接近,激活了报告基因 LacZ 的转录. 一般地,将 DB-X 的融合蛋白称作诱饵(bait),X 往往是已知蛋白, AD-Y 称作猎物(pre),能显示诱饵和猎物相互作用的基因称报告基因,通过对报告基因的检测,反过来可判断诱饵和猎物之间是否存在相互作用.

## 2 酵母双杂交技术的改进和发展

酵母双杂交系统的出现,为研究蛋白质之间的相互作用提供了很好的工具,但这一技术也存在着许多缺陷,如假阳性和假阴性,检测敏感度不高,通过不断的改进,提高了双杂交系统的灵敏度和特异性. (1)酵母接合型的引入: Bendixen et al<sup>[2]</sup>通过酵母接合型的引入,避免了两次转化操作,同时又提高了双杂交的效率. 在酵母有

性生殖过程中涉及到二种配合类型:a 接合型和 接合型,这二种单倍体之间接合能形成二倍体细胞,根据酵母有性生殖这一特点,他们将文库质粒转化 接合型酵母细胞,“诱饵”表达载体转化 a 接合型细胞. 然后分别铺筛选平板使细胞长成菌苔,再将二种菌苔复印到同一个三重筛选平板上,只有诱饵和靶蛋白发生了相互作用的二倍体细胞才能在此平板上生长. 单倍体细胞或虽然是二倍体细胞但 DB 融合蛋白和 AD 融合蛋白不相互作用的都被淘汰. 阳性克隆则进一步通过 $\beta$ -半乳糖苷酶活力进行鉴定. 这项改进不仅简化了实验操作,而且也提高了双杂交的筛选效率. Fromont-Racine et al<sup>[3]</sup>则是把二种细胞直接在滤膜上混合,然后铺到选择性平板上,避免了繁琐的复印操作,使工作效率进一步提高. (2)诱饵表达载体:常用的有二种,酵母细胞的 GAL4 和来自大肠杆菌的 LexA,二者的差别在于 LexA 不具有核定位序列.(3)猎物表达载体:酵母 GAL4 的转录激活域;来自单纯疱疹病毒的 VP16,其转录活性较高;来自大肠杆菌的 B42 转录活性弱,但可缓和有毒性的基因表达对细胞的影响.(4)报告基因多样化:在酵母双杂交系统建立的初期阶段,由于仅仅采用 $\beta$ -半乳糖苷酶这一单一的报告基因体系,而这种报告基因的表达往往不能十分严谨地加以控制,因此容易产生一些假阳性,灵敏度也不高. 现大多数酵母双杂交系统利用酵母营养缺陷特点引入额外的报告基因,如广泛采用的 HIS3 基因. 经过改造的带有 HIS3 报告基因的酵母细胞,只有当 HIS3 被启动表达才能在缺乏组氨酸的选择性培养基上生长, HIS3 报告基因的转录表达是由“诱饵”和“猎物”的相互作用所启动的. James et al<sup>[4]</sup>于 1996 年构建了 PJ69-4A 菌株,内含三种不同的报告基因(ADE2、HIS3 和 LacZ),分别受三种不同的启动子(GAL2、GAL1 和 GAL7)调控,而这三种不同的启动子都由 GAL4 激活,该菌株可灵敏地检测出很弱的结合作用,又显著地消除了假阳性.

此后,研究人员在 Fields et al 的酵母双杂交原理基础上创建了很多新的方法和系统,使检测范围扩大,不仅能检测蛋白的相互作用,而且还能研究 RNA、DNA 与蛋白质的相互作用. 下面将感兴趣的几个系统给予介绍.

在酵母双杂交系统中, BD-X 与 AD-Y 在酵母细胞核内发生相互作用,表达的融合蛋白需定向到核内来激活报告基因的转录,这就可能限制了大量非核内蛋白质如膜受体蛋白质,细胞外分泌蛋白质等在此系统中的应用. Aronheim et al<sup>[5]</sup>将蛋白间相互作用场所从核内转移到酵母细胞膜上进行,构建了 Sos 恢复系统(Sos recruitment system, SRS). 基本思想如下:人的鸟苷酸交换因子(guanyl nucleotide exchange factor, GEF)-Sos 蛋白是一种胞质蛋白,而酵母的鸟苷酸交换因子-cdc25 蛋白定位在内膜上,可将相关受体信号传导给 Ras 蛋白. 酵母细胞的一种温度敏感菌株-ras 途径突变体由于缺乏鸟苷酸交换因子 cdc25,而不能将外来信号传递给膜上的 Ras 蛋白,致使该酵母突变体在 36<sup>°</sup>C 不能存活,如果人为引入正常

的 GEF(Sos 蛋白), 并且使得 GEF 能与 Ras 蛋白足够接近, 则可以弥补这一缺陷. 为此, Aronheim et al 将 GEF 蛋白与蛋白质 X 融合, 将蛋白质 Y 与豆蔻酰化信号相连, 使 Y 定位于膜上. 这样, 若 X 与 Y 结合, X 连同的蛋白(GEF)就会定位于膜上, 从而得以靠近膜上的 Ras 蛋白, 激活 ras 途径, 完成 Sos 过程, 在 36 生长. 这一系统的提出大大扩展了经典杂合系统的探索领域, 而且冲破了许多局限. 使一些不基于转录读出的转录激活因子和抑制因子能够利用该技术进行研究, 许多蛋白质在胞质内表达可能比在核内更有生理功能, 一些蛋白的表达对酵母有毒性, 蛋白和 Sos 融合后毒性则可以减弱. 利用该技术 Aronheim et al 找到了 c-Jun 的两个新的作用蛋白 JDP1 和 JDP2.

此后, Hubsman et al<sup>[6]</sup>构建了 RRS 系统(reverse ras recruitment system). 将诱饵蛋白定位于膜上, 而猎物“prey”则与胞质中的突变体融合, 从而进一步扩大了应用范围. 目前酵母双杂交系统主要还是以酵母细胞核做为相互作用的反应场所, 外源基因的转录、翻译、蛋白产物的修饰、折叠及细胞内定位等过程是在酵母细胞中完成的. 但酵母毕竟是一种低等的真核生物, 他的各种生物学功能, 尤其是蛋白质的翻译后修饰如 N 端糖基化, 二硫键形成等的水平还很难与高等真核生物相比拟. 因此要进一步研究蛋白质产物的生物学功能, 还必须建立高等生物体系的双杂交系统. 近几年来, 已初步建立了哺乳动物细胞双杂交系统<sup>[7,8]</sup>. 在此系统中, 采用单纯疱疹病毒的 VP16 编码区取代 GAL4 的 AD 区段, 同时又引入另一个含有氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)报告基因的表达载体, 其活性可以在细胞提取物中检测, 采用磷酸钙共沉淀法, 转入 HeLa 细胞中进行培养. 该系统成功地验证了小鼠 p53 蛋白与 SV40 大 T 抗原间的蛋白质相互作用, 得到了和酵母双杂交技术相同的结果, 在哺乳动物细胞中能更好的模仿体内蛋白-蛋白的相互作用. Rossi et al<sup>[9]</sup>利用  $\beta$ -半乳糖苷酶构建的杂合体系成功地在成肌细胞中得到表达, 并检测了 FRAP 与 FKBP12 二种蛋白质之间的相互作用.

另外, 研究蛋白质的结构功能特点、作用方式过程, 有时还要通过突变、加抑制剂等手段破坏蛋白质间的相互作用. Vidal et al<sup>[10]</sup>发展了逆双杂交系统(reverse two-hybrid system). 其关键是报告基因 URA3 的引入. URA3 基因编码的酶是尿嘧啶合成的关键酶. 该酶能把 5-氟乳清酸(5-FOA)转化成对细胞有毒的物质. Vidal et al 通过改造 URA3 基因的启动子内引入 GAL4 的结合位点. 只有当“诱饵”和“猎物”相互作用激活 URA3 基因的表达时, 这个改造的酵母菌株才能在缺乏尿嘧啶的选择性培养基上生长. 但在含有 5-FOA 的完全培养基上, “诱饵”和“猎物”的相互作用则抑制细胞的生长. 然而如果目的蛋白, 即与 DB 或 AD 融合的蛋白质发生了突变或者由于外加药物的干扰不再相互作用, URA3 基因不表达,

则细胞能在含有 5-FOA 的完全培养基上生长. 通过这种方法, Vidal et al 筛选到了转录因子 E2F1 的突变物, 这些突变物仍然能结合视网膜母细胞瘤蛋白 RB, 但是丧失了同另外一种称为 DP1 蛋白的结合能力, 结果得到了体外结合实验的验证. 通过对这些突变蛋白基因的测序, 他们又发现了新的 E2F1 同 DP1 结合的位点.

此外, 酵母单杂交技术研究蛋白质和 DNA 的相互作用, 小配体三杂交则研究受体与有机小配体之间的作用, RNA 三杂交系统则分析 RNA 与蛋白之间相互作用<sup>[11,12]</sup>.

### 3 应用

自酵母双杂交系统建立以来, 得到了迅速发展, 成为蛋白质研究工作中有力的工具. 人类基因计划的即将完成, 随之而来的是基因功能的研究, 特别是基因表达蛋白质功能的研究更为重要. 生物体内多种蛋白质的相互作用, 形成复杂的调节网络, 在很大程度上决定细胞内信息系统, 信号转导及细胞周期调节. 已有学者应用酵母双杂交技术对酵母基因组学进行研究<sup>[13]</sup>, 这将为今后大规模的人类基因组学研究探索方法, 积累经验. 另外, 病原体蛋白和机体蛋白质之间的相互作用也是疾病发生、发展的物质基础. 深入研究这些相互作用对于揭示某些疾病如病毒性肝炎、艾滋病等的发病机制, 寻找可能的新的治疗方法有重要意义. 下面仅将这方面的研究工作做一简要介绍.

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染可引起慢性肝炎、肝硬化、肝肿瘤, 严重危害着人民群众的健康. 但目前致病机制尚未完全阐明, 治疗研究进展缓慢. 病毒蛋白与肝细胞蛋白之间相互作用是病毒致病的关键之一, 通过与肝细胞中的许多蛋白质的相互作用, 介导病毒进入肝细胞, 改变这些蛋白质的活性功能, 进一步调节改变细胞功能, 影响病毒复制, 造成机体免疫功能失调, 慢性化及肿瘤的发生.

目前鉴定的与 HBV 不同蛋白相互作用的蛋白质有十几种. 其中 HBxAg 作用复杂, 有反式激活作用, 研究较多. 1995 年 Fischer et al<sup>[14]</sup>用酵母双杂交方法, 克隆了与其他生物 28 kD 亚单位相似的蛋白质序列可以和 HBxAg 结合. HBxAg 结合到特殊的蛋白酶体亚单位, 干扰其降解过程, 提示 HBxAg 对转录过程的作用可能是间接的. 而与这个 28 kD 的蛋白酶体亚单位结合可能提示 HBxAg 具有多重功能. Hu et al<sup>[15]</sup>认为 HBxAg 既是蛋白酶体复合体的底物又是潜在的抑制因子, 他们用酵母双杂交技术等方法证明, HBxAg 可以和 26 S 蛋白酶体的两个亚单位结合. 在 HepG2 细胞中表达 HBxAg 降低蛋白酶体的糜蛋白酶及胰酶样活性以及被辅酶 Q 结合的溶菌酶的水解, 表明了 HBxAg 可作为蛋白酶体的抑制因子. 这可能是 HBV 感染的重要特性, 其机制可能是帮助稳定病毒基因产物和抑制抗原提呈. Zhang et al<sup>[16]</sup>描绘了 HBxAg 和蛋白酶体相互作用的结构和功能. 用酵

母双杂交的方法鉴定了蛋白酶体亚单位 PSMA7 与 HBxAg 特异相互作用. 又证实与 PSMC1(19S 蛋白酶组分的 ATPase 样亚单位)的相互作用. 与 PSMA7 和 PSMC1 相互作用的 HBxAg 的关键序列对 X 蛋白作为转录辅助因子功能很重要. PSMC1 的过度表达在哺乳动物细胞中似乎抑制各种报告基因的表达,但可以被 HBxAg 的过度表达所克服. 另外, HBxAg 的表达抑制了细胞中 c-Jun 和辅酶 Q-精氨酸- $\beta$ -半乳糖苷酶的周转,这两个是已知的辅酶 Q-蛋白酶通路的底物. 研究提示蛋白酶体复合体是 HBxAg 的细胞靶位的功能基础. Lee et al [17]则证实 HBxAg 可以和可能的细胞 DNA 修复蛋白结合. 他们用酵母双杂交技术方法证明一种蛋白(X-associated protein 1, XAP-1)与 HBxAg 有相互作用,此蛋白与 UV 损伤 DNA 结合蛋白(UV-DDB)同源(来自猴细胞文库),UV-DDB 可能涉及 DNA 修复, X 蛋白和此蛋白相互作用可在一定程度上解释乙型肝炎病毒双链的修复以及修饰细胞转录过程,解释了 HBV 在肝癌发生过程中起到辅助因子的作用. Barak et al [18]研究了 HBxAg 和人免疫缺陷病毒(HIV)的 Tat 结合蛋白 1(Tbp1)的相互作用,应用基于胞质的酵母双杂交筛选鉴定出 Tbp1,一个新的与 HBxAg 相互作用蛋白. Tbp1 在酵母和动物细胞内均和 HBxAg 有相互作用. HBxAg 和 Tbp1 相互作用具有功能性意义调节 HBV 转录. Tbp1 同源物如 Sug1,是蛋白酶 19 S 调节帽颗粒的已知成员,涉及转录共激活. Tbp1 和 Sug1 与多重病毒效应蛋白包括 HIV Tat、SV40 大 T 抗原和腺病毒 E1A 作用,而这些蛋白是病毒癌基因的重要表位.

Harvey et al [19]为研究 HBV 受体使用酵母双杂交方法研究 L-HBsAg 的前 S1 区筛选人肝文库,一个未鉴定蛋白和一个线粒体中蛋白可以和前 S1 相互作用. 起相互作用的两个蛋白用 Far-Western 及竞争实验分析,证明这个未鉴定蛋白作用有特异性. 竞争实验表明 HBV 而不是纯化的 HBsAg 可以和前 S1 进行竞争,阻止谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)-前-S1 融合蛋白结合到未鉴定蛋白而不是线粒体蛋白. 这个未鉴定蛋白与 GST 表达成融合蛋白可以和 HBV 以直接方式结合,但不能确定这个蛋白是否是 HBV 受体.

由此可见 HBV 与细胞许多蛋白质相互作用,其中 HBxAg 作用较广泛,对细胞的调节,是通过细胞中许多蛋白质作用而完成的. 对此进行深入研究,可能为致病机制提供新的线索.

HCV 是一个应用分子生物学技术克隆的 RNA 病毒,至今无有效的病毒培养系统. 但近年来对病毒的基因及病毒的蛋白有了更多的认识,通过酵母双杂交等技术,很多病毒蛋白与细胞蛋白质间的相互作用被确定. HCV 核心蛋白与人体作用复杂,有反式激活细胞基因表达的作用. Matsumoto 和 Chen et al [20,21]用酵母双杂交技术对人肝 cDNA 文库进行筛选,一半以上的克隆都是淋巴毒素  $\beta$  受体(LT- $\beta$ R)胞质域,是肿瘤坏死因子受体家族的成员之一. HCV 核心蛋白与 LT- $\beta$ R 结合,表明这个蛋

白可能有免疫调节功能,可能部分解释病毒持续感染机制. Chen et al 进一步证实 HCV 核心蛋白可与 LT- $\beta$ R 结合,在一些细胞中,核心蛋白通过此通路起到调节作用. 他们的发现提示 HCV 核心蛋白增加 LT- $\beta$ R 的生物功能,引起 HCV 感染细胞的发病. You et al [22]为了解 HCV 核心蛋白的反式激活机制,克隆了一个 cDNA 编码 DEAD 盒家族中推定的 RNA 解旋酶称为 CAP-Rf, HCV 核心蛋白的全长成熟形式和 C 末端截短形式均可以和这个蛋白结合. CAP-Rf 所涉及基因表达的调节及 HCV 核心蛋白启动 CAP-Rf 的反式激活能力可能是通过复合体形式和 CAP-Rf ATPase-dATPase 活性调节. 这些发现表明 HCV 已经进化了一种特殊机制通过其核壳蛋白涉及 RNA 代谢,并提示核心蛋白对宿主细胞的多重作用. 我们通过酵母双杂交技术,克隆一个 HCV 核心蛋白结合蛋白(HCBP6),由 456 nt 组成,编码 152 个氨基酸残基,位于人 22 号染色体上,初步研究表明可能和体内蛋白运输有关.

HCV NS5A 是 HCV 的非结构蛋白之一,本身是磷酸蛋白,在病毒复制中可能起作用,也可能与 HCV 对干扰素(IFN)耐受有一定作用. Ghosh et al [23]用酵母双杂交技术证明了 NS5A 与新鉴定的细胞转录因子 SRCAP 相互作用,可能是 NS5A 对细胞生长调节的机制之一. Tu et al [24]认为 NS5A 是磷酸蛋白具有隐性反式激活作用,他们用酵母双杂交的方法在人肝文库中筛选出 N-己基顺丁烯二酰亚胺(N-ethylmaleimide)敏感因子附着蛋白受体样蛋白,命名为人囊泡-相关膜蛋白相关蛋白-33(vesicle-associated membrane protein-associated protein, hVAP-33). hVAP-33 与 NS5A 和 NS5B 的作用部位不同,NS5A 结合到 hVAP-33 的 C 末端,而 NS5B 结合到 hVAP-33 的 N 末端,这些相互作用提示了 HCV RNA 复制复合体的膜相关机制,进一步表明 NS5A 是作为病毒 RNA 复制复合体的一部分.

王琳 et al [25]还发现 HCV 核心蛋白和 NS5A 均可和载脂蛋白 A1(apoA1)相互作用,这种结合可能干扰破坏了肝细胞脂类代谢的正常途径,使肝细胞中脂类代谢机制发生改变,最终在肝细胞中累积并出现脂肪滴,形成小泡型、大泡型或大小泡混合型的肝脏脂肪变. Shi et al [26]也通过对 HepG2 和人肝 cDNA 文库的酵母双杂交筛选到 apoA1,一个高密度脂蛋白成分,与 NS5A 相互作用,提示 NS5A 参与脂代谢紊乱的病理过程,可以解释 HCV 感染后普遍存在的肝脏脂肪变性.

应用酵母双杂交技术研究 HIV 蛋白与机体蛋白质之间的相互作用则更为广泛. 艾滋病是由于 HIV 感染破坏 CD4<sup>+</sup> 细胞,致使机体免疫力下降,导致各种机会性感染和肿瘤的发生. HIV 是目前所发现的调节机制最为复杂的病毒类型之一,其中包含着复杂的反式调节机制. Kamine et al [27]用人 B 淋巴文库与 HIV-1 反式激活因子 Tat 做酵母双杂交技术筛选,筛选到一个新的克隆(Tip60)与蛋白的 N 端功能区域相互作用,可以使 Tat 反

式激活作用在没有增加 HIV 启动子基础作用下提高 4 倍, 提示 Tip60 可能是 Tat 的辅助因子, 对 HIV 基因表达有影响. Tat 介导的激活作用需要 CycT1/CDK9 复合物 (P-TEFb) 的补充, Fraldi et al<sup>[28]</sup>通过双杂交及三杂交技术发现了 CycT1 与 CDK9 及 Tat/TAR 特异的结合位点, 这些发现提示可设计一个正确的位点缺失的 P-TEFb 复合物干扰 Tat 的功能.

HHR23A 是进化的保守基因家族成员, 与核苷酸的删除和修复相关, Withers-Ward et al<sup>[29]</sup>研究认为与 HIV-1 的 Vpr 相互作用, 过量表达 HHR23A 或切断 Vpr 结合区, 则使 Vpr 产生的 G2 阻止作用减弱. 这些结果提示 Vpr 干扰蛋白的正常功能或与 DNA 修复相关的蛋白的正常功能, 干扰了从 G2 到 M 周期的信号传递. Gragerov et al<sup>[30]</sup>的结果也显示 HHR23A 对 Vpr 引导的细胞周期停止有减缓作用, 而对 Vpr 的转录辅助因子功能无影响. Gupta et al<sup>[31]</sup>通过酵母双杂交技术发现新的 HIV 颗粒相关与基质相作用的蛋白 VAN, 在大多数人组织中表达, 在核和胞质间穿梭, 组织培养中过量表达可以有效地抑制 HIV 的复制. 结果提示 VAN 可调节核基质的定位.

尽管越来越多的新的作用蛋白质被发现, 但 HBV、HCV、HIV 感染的发病机制未完全阐明, 要彻底阐明并完全治疗还有漫长而艰苦的路. 酵母双杂交技术的发展和革新, 使之已成为很多实验室研究蛋白质相互作用和蛋白质结构功能的必要手段. 但是要看到他只是反映蛋白质间可能发生的作用, 还必须通过其他手段来证实, 特别是要和生理病理机制相结合, 才不会被误导.

#### 4 参考文献

- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;340:245-246
- Bendixen C, Gangloff S, Rothstein R. A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:1778-1779
- Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature Genet* 1997;16:277-282
- James P, Halladay J, Craig EA. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 1996;144: 1425-1436
- Aronheim A, Zandi E, Hennemann H, Elledge SJ, Karin M. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 1997;17:3094-3102
- Hubsman M, Yudkovsky G, Aronheim A. A novel approach for the identification of protein-protein interaction with integral membrane proteins. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E18
- Vidal M, Braun P, Chen E, Boeke JD, Harlow E. Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10321-10326
- Chiu M, Katz H, Berlin V. RAP1. a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12574-12578
- Rossi F, Charlton CA, Blau HM. Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by  $\alpha$ -galactosidase complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 8405-8410
- Vidal M, Brachmann R K, Fattaey A, Hodow E, Boeke JD. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein and protein-DNA interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:10315-10320
- Li JJ, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 1993; 262: 1870-1874
- Licitra EJ, Liu J. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12817-12821
- Frederickson RM. Micromolecular matchmaking: advances in two-hybrid and related technologies. *Curr Opin Biotech* 1998; 9: 90-98
- Fischer M, Runkel L, Schaller H. HBxAg protein of hepatitis B virus interacts with the C-terminal portion of a novel human proteasome alpha-subunit. *Virus Genes* 1995;10:99-102
- Hu Z, Zhang Z, Doo E, Cou XO, Goldberg AL, Liang TJ. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol* 1999; 73:7231-7240
- Zhang Z, Torii N, Furusaka A, Malayaman N, Hu Z, Liang TJ. Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* 2000;275:15157-15165
- Lee TH, Elledge SJ, Butel JS. Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein. *J Virol* 1995;69:1107-1114
- Barak O, Aronheim A, Shaul Y. HBV X protein targets HIV Tat-binding protein 1. *Virology* 2001;283:110-120
- Harvey TJ, Macnaughton TB, Park DS, Gowans EJ. A cellular protein which binds hepatitis B virus but not hepatitis B surface antigen. *J Gen Virol* 1999;80:607-615
- Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS, Gorbale nya AE, Lo SY, Ou JH, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:1301-1309
- Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:9417-9426
- You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999;73:2841-2853
- Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- Tu H, Gao L, Shi ST, Taylor DR, Yang T, Mircheff AK, Wen Y, Gorbalenya AE, Hwang SB, Lai MM. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 1999; 263:30-41
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 A1 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MN. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002;292:198-210
- Kamine J, Elangovan B, Subramanian T, Coleman D, Chinnadurai G. Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* 1996;216:357-366
- Fraldi A, Licciardo P, Majello B, Giordano A, Lania L. Distinct regions of cyclin T1 are required for binding to CDK9 and for recruitment to the HIV-1 Tat/TAR complex. *J Cell Biochem* 2001; 81:247-253
- Withers-Ward ES, Jowett JB, Stewart SA, Xie YM, Garfinkel A, Shibagaki Y, Chow SA, Shah N, Hanaoka F, Sawitz DG, Armstrong RW, Souza LM, Chen IS. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with HHR23A, a cellular protein implicated in nucleotide excision DNA repair. *J Virol* 1997;71:9731-9742
- Gragerov A, Kino T, Ilyina-Gragerova G, Chrousos GP, Pavlakis GN. HHR23A, the human homologue of the yeast repair protein RAD23, interacts specifically with Vpr protein and prevents cell cycle arrest but not the transcriptional effects of Vpr. *Virology* 1998;245:323-330
- Gupta K, Ott D, Hope TJ, Siliciano RF, Boeke JD. A human nuclear shuttling protein that interacts with human immunodeficiency virus type 1 matrix is packaged into virions. *J Virol* 2000;74: 11811-11824