

研 究 进 展

酵母双杂合系统的改进和发展

秦宝明 罗述金 米志勇 吴乃虎

(中国科学院发育生物学研究所植物发育与分子生物学实验室 北京 100080)

摘要 酵母双杂合系统是在 1989 年由 Stanley Fields 和 Ok-kyu Song 等提出并初步建立的^[1], 该系统是在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 中研究蛋白质间相互作用的一种非常有效的分子生物学方法。近几年来随着人们对该系统的广泛应用, 这一系统得到了不断的完善及改进, 同时也衍生出单杂合系统, 三杂合系统等一系列相关的技术。这些技术在不同研究领域中的广泛应用有力地推动了蛋白质与 DNA, 蛋白质与 RNA, 以及多种蛋白质分子间相互作用的研究。

关键词 酵母 蛋白质间相互作用 双杂合系统 单杂合系统 三杂合系统

1 酵母双杂合系统的基本原理及应用

酵母双杂合系统最初是建立在人们对酵母转录因子 GAL4 的认识基础上的。一个完整的酵母转录因子 GAL4 可分为结构上可以分开的、功能上相互独立的两个结构域: 位于 N 端 1~174 位氨基酸区段的 DNA 结合域(DNA binding domain, DNA-BD)和位于 C 端 768~881 位氨基酸区段的转录激活域(Activation domain, DNA-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), 并与之结合。而 AD 则是通过同转录机(transcription machinery)中的其它成分之间的结合作用, 以启动 UAS 下游的基因进行转录^[2]。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较为接近时, 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。将 DNA-BD 与已知的诱饵蛋白质 X 融合, 构建出 BD-X 质粒载体; 将 AD 基因与 cDNA 文库, 基因片段或基因突变体(以 Y 表示)融合, 构建出 AD-Y 质粒载体。两个穿梭质粒载体共转化至酵母体内表达。该酵母菌株含有特

定报告基因(如 LacZ, HIS3, LEU2 等), 并已经去除相应转录因子的编码基因, 因此本身无报告基因的转录活性。蛋白质 X 和 Y 的相互作用导致了 BD 与 AD 在空间上的接近, 从而激活 UAS 下游启动子调节的报告基因的表达(图 1), 使转化体由于 HIS3 或 LEU2 表达而可在特定的缺陷培养基上生长, 同时因 LacZ 表达而在 X-Gal 存在下显蓝色。通过筛选阳性菌落即可检测已知蛋白间的相互作用、蛋白质二聚体的形成、确定蛋白质相互作用的结构域或重要活性位点, 以及从 cDNA 文库中筛选与已知蛋白质 X 相互作用的未知蛋白质 Y 的编码序列等。

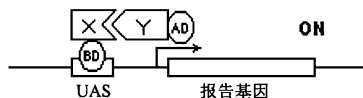


图 1 双杂合系统。诱饵蛋白质 X 与 DNA 结合域 BD 融合; 待筛选蛋白质 Y 与转录激活域 AD 融合, 蛋白质 X 与 Y 的相互作用导致 AD 与 BD 空间上的接近, 激活下游报告基因的转录。

2 酵母双杂合系统的改进

在酵母双杂合系统建立的初期阶段, 由于仅仅采用 β -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。James 等人于 1996 年构建了 PJ69-4A 菌株^[3], 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, 从而显著地消除了假阳性。考虑到某些诱饵蛋白质 X 或待筛选蛋白质 Y 在酵母中大量表达时, 可能对酵母产生一定的毒性作用, 如使酵母体内的信号传导通路阻断, 干扰酵母中正常基因的表达调控, 抑制酵母细胞的分裂, 甚至使酵母细胞在选择培养基上不能生长等, 由此使得对某些种类的蛋白质不能在该系统中进行分析。针对这些异源蛋白质对酵母生长的毒性作用, 近几年来在双杂合系统中主要的改进是选用更加灵敏的报告基因从而降低这些异源蛋白质在酵母中的表达量, 减轻这些异源蛋白质在酵母中的毒性。如采用 LexA 酵母双杂合系统^[4]。在该系统中 GAL4 的 BD 区段被原核生物的 LexA 蛋白质编码区所取代, 单纯疱疹病毒的 88 个 VP 编码区则取代了 GAL4 的 AD 区段。

在酵母双杂合系统中, 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。

针对这一问题, Aronheim 等人对传统的酵母双杂合系统做了重大的改进, 他们将蛋白质间相互作用场所从核内转移到酵母细胞膜上进行^[5], 构建了 Sos 恢复系统(Sos Recruitment System, SRS) (图 2), 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(Guanyl Nucleotide Exchange Factor, GEF) cdc25-2, 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 °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 等人将 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 °C 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, 而且冲破了许多的局限。当然, SRS 中也存在一些技术上的问题, 如必须分离出可能造成假阳性的 Ras 家族成员以及类 Cdc25 蛋白。但是我们相信, 不论怎样 SRS 将在构思与应用上给当今的酵母双杂合系统带来新的启迪。

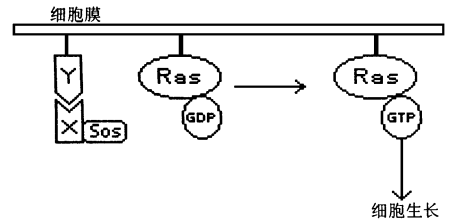


图 2 Sos 恢复系统(SRS)。诱饵蛋白质 X 与人的的一种鸟苷酸交换因子 Sos 融合。待筛选蛋白质 Y 定位于细胞膜上。X 与 Y 的相互作用促使 Sos 作用于细胞膜上的 Ras 蛋白质, 激活 ras 途径, 使细胞生长。

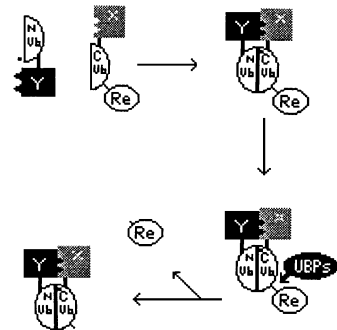


图 3 泛素专一性蛋白酶系统(USPS)。蛋白质 X 与 Y 相互作用, 使得与之相连的两个泛素片段(其中泛素 N 端片段带有错意突变) 结合, 并恢复了正常的功能, 从而泛素专一性蛋白酶(UBPs) 得以切下报告蛋白(Re)。

针对同一个问题, Johnson N 与 Vash-avsky^[6] 构建了泛素专一性蛋白酶系统 (Ubiquitin-Specific Proteases System, USPS) 图(3)。该系统的基本思想是, 泛素与蛋白质新形成的复合蛋白会被一种泛素专一性蛋白酶 (UBPs) 切断, 此专一性切割只在泛素正确折叠的前提下发生。他们发现, 泛素 N-C-端两部分在分立共表达时仍能正确地折叠, 而当 N-末端发生错义突变时, 这两个片段将不能正确折叠。但是真正令人感兴趣的是, 连于 N-端及 C-端的两已知蛋白若由于发生相互作用而结合时, 这一错义突变带来的折叠困难将意外地得到克服。利用这些特性, 二人将 X 蛋白与泛素 C 端, Y 蛋白 (未知) 与泛素 N 端 (含错义突变) 分别融合相连, 这里作为报告蛋白的是连在泛素 C 端的带有血凝素标记的二氢叶酸还原酶。当 X 与 Y 特异结合时, 导致泛素两片段能够正确折叠形成“正常”的泛素, 使 UBPs 切下报告蛋白, 再经免疫印迹分析呈阳性, 则可以确知 X 与 Y 发生了作用。这一系统可以用于解决很多问题, 而且可以用于检测蛋白相互作用中的动力学性质。但是由于 USPS 不得不借助于免疫学分析技术, 相对于表型识别显得繁冗。不过我们相信这一不足会很快得到克服。

另外, 本身就有转录激活活性的蛋白质, 如 RNA 聚合酶 转录激活因子, 会直接激活报告基因而不需要两种蛋白质相互作用, 导致假阳性产生, 因此不能用来作为诱饵蛋白 (Bait), 为避开这个障碍, Marsolier 等人提出了建立在 RNA 聚合酶 (Pol) 转录基础上的双杂合系统^[7] (图 4)。诱饵蛋白 X 与 Y 蛋白相互作用, 致使带有 $\tau 138$ 亚基的 pol 转录激活因子 TF C 重建成为功能因子, 激活报告基因 SNR6 的表达。该系统的建立对 RNA 聚合酶 的一系列转录因子多聚体的研究提供了一个非常有效的手段。

目前双杂合系统主要还是建立在酵母这一体系之中, 更准确地说, 以酵母细胞核作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

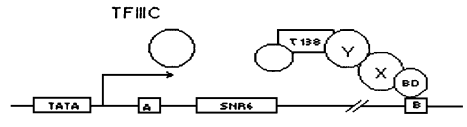


图 4 建立在 RNA 聚合酶 基础上的双杂合系统。诱饵蛋白质 X 与 BD 融合, 待筛选蛋白质 Y 与 polIII 转录激活因子 TFIIIC 的 $\tau 138$ 亚基融合。X 与 Y 的相互作用激活了依赖于 RNA 聚合酶 III 的报告基因 SNR6 的转录。

母细胞中完成的。众所周知, 酵母毕竟还是一种低等的真核生物, 它的各种生物学功能, 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中的双杂合系统。在这一方面, 近几年来, 已初步建立了哺乳动物细胞双杂合系统^[8]。在哺乳动物双杂合系统中, 采用单纯疱疹病毒的 BP16 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, 采用磷酸钙共沉淀法, 转化入 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。此后不久, Blau 等人利用 β -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 两种蛋白质之间的相互作用^[9]。此外, 在酵母双杂合系统的基础上, 结合荧光共振能量转换效应 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)^[10] 和表面胞质团共振分析技术 (Surface Plasmon Resonance, SPR)^[11], 也可对酵母双杂合系统的结果加以验证, 从而更加准确地探明大分子间相互作用的机理。

3 酵母双杂合系统的发展

近几年来, 双杂合系统不断改进, 发展出了许多新的技术, 对传统的双杂合系统作出了重要补充和扩展, 成为蛋白质间相互作用研究中充满活力的一个领域。

基于酵母双杂合系统建立的基础, 在 1993

年发展出了一种研究蛋白质和 DNA 相互作用的实验体系, 该体系被称为酵母单杂合系统^[12] (图 5-A)。酵母单杂合系统的构建与双杂合系统相类似, 不同之处在于与转录激活域 AD 相融合的待筛选蛋白质 Y 直接与 DNA 结合位点相结合, 使 AD 直接激活启动子下游报告基因的表达。这一过程无需 BD-X 的参与, 因而通过对 AD-Y 文库的筛选可分离出与靶 DNA 序列直接作用的蛋白质 Y。该系统为转录因子的分离鉴定提供了有效的实验手段。

为了研究阻断大分子间特定相互作用的机理, 在原有酵母双杂合系统上发展起反式双杂合系统和分裂杂合系统(图 5-B, C)。

Vidal 等人^[13] 采用了反式选择性的报告基因 URA3。AD 和 BD 的融合蛋白的相互作用可激活 URA3, 其编码的酶使细胞不能在 5-氟乳清酸存在下生长, 即表现酵母菌对 5-氟乳清酸敏感。相反地, 如果融合蛋白的相互作用被阻断, URA3 则不表达, 酵母菌则表现对 5-氟乳清酸的抗性。因此采用反式双杂合系统可以很容易地检出与某一蛋白相互作用的另一蛋白质的突变体。可用于反式双杂合系统的标记基因除了 URA3 以外, 还包括 CYH2, 其表达使酵母对环己亚胺敏感。基于同样原理, Vidal 等人还提出了反式单杂合系统, 并已成功地用于分离鉴定 p53 突变体^[14]。

Shin 等人通过分裂杂合系统得到了类似的结果^[15]。该系统用大肠杆菌转录抑制了 TetR 作为报告基因, 并在原报告基因 HIS3 上游引入一 TetR 产物结合位点即 Tet 操纵基因。双杂合融合蛋白的相互作用激活 TetR, 其表达产物结合于 Tet 操纵基因, 抑制了 HIS3 的表达。

近几年来, 以双杂合思想为基础建立起来的三杂合系统可用来研究多至三个分子间的相互作用, 该系统的主要特征是两个融合蛋白质空间的接近通过第三个分子的参与而实现。根据第三个参与对象的不同, 可以简单地将其分为蛋白-多肽-激酶-小配体以及 RNA 等不同的三杂合系统。

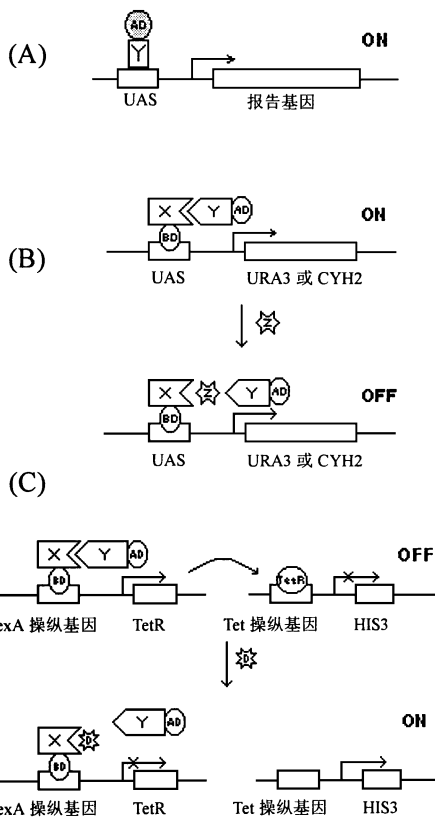


图 5 酵母双杂合系统的改进。(A) 单杂合系统。待筛选蛋白质 Y 与转录激活域 AD 融合, Y 直接与上游激活域 UAS 结合, 导致 AD 激活报告基因转录。(B) 反式双杂合系统。蛋白质 X 与 Y 的相互作用导致了报告基因 URA3 或 CYH2 转录激活。URA3 表达使酵母对 5-氟乳清酸敏感; CYH2 则导致对环己亚胺敏感。阻断 X 与 Y 的相互作用, 导致 URA3 或 CYH2 不表达, 使酵母在 5-氟乳清酸或环己亚胺存在下可生长。(C) 分裂双杂合系统。该系统利用了 E. coli 中 Tn10 编码的 tet 阻遏物(TetR)/操纵基因系统。X 与 Y 相互作用, 激活 TetR, 其表达产物与 tet 操纵基因作用, 抑制 HIS3 的表达, 使酵母在组氨酸缺陷培养基上不生长。由于 Y 的突变或解离物 D (Dissociator) 的引入, 阻断了 X 与 Y 的相互作用, TetR 不表达, HIS3 得以正常转录, 酵母在组氨酸缺陷培养基上可以生长。

蛋白三杂合系统(图 6-A)是指, 蛋白 X 与 Y 的相互作用是以蛋白 Z 介导的。蛋白 Z 的作用或是与 X、Y 简单地形成三联体, 或是诱导 X 或 Y 的构象改变, 促进二者结合, 进而激活报

告基因的表达。Zhang 与 Lauter^[16]二人在发现 Grb2 可以介导表皮生长因子胞质结构域与 Sos 蛋白的相互作用之后,又进一步阐明可以用这一系统从 cDNA 文库中筛选类 Grb2 基因。

在研究跨膜受体胞外结构域的过程中,发展出了以多肽为配体的三杂合系统^[17]。跨膜受体的胞外结构域各自与 GAL4BD 和 AD 融合(形成 X-BD 和 X-AD)。胞内自身表达的多肽特异性地与受体结合,导致其二聚体化(X-X),促使 BD 与 AD 接近,激活报告基因。OzeubergerBA 与 Young KH(1995)两人在研究中阐明了生长激素受体及血管内皮生长因子受体 flk1/KDR 的作用机理。这个系统可以用来筛选某些随机肽库,也可用以寻找在信号转导过程中的作用蛋白及相互作用机理。

关键氨基酸(如酪氨酸,丝氨酸)的磷酸化常常是某些蛋白质加工成熟的重要一步,基于这种研究目的,Osborne 等人^[18]在原有双杂合系统中加入一可将目的氨基酸残基磷酸化的酪氨酸激酶 Lck,只有当蛋白质 X, Y 中一种被磷酸化后,两种融合蛋白才能够彼此结合(图 6-B)。应用此方法研究在酪氨酸激酶 Lck 存在下,IgE 高亲和性受体的 γ 亚基(Fc ϵ RI γ)与一种新的蛋白质的相互作用。Lck 使该蛋白质的 SH2 结构域(Src 同源域 2)磷酸化,SH2 构象发生变化从而得以与 Fc ϵ RI γ 相结合,并激活报告基因的表达。

小配体三杂合系统(图 6-C)^[19]以小有机化合物共价连接形成的异源二聚体为配体,体现了“二聚化化合物诱导物”(Chemical inducers of dimerization, CIDs)的概念。Licitra EJ 与 Jiu JO 利用地塞米松(Dexamethasone)与一小鼠糖皮质激素受体(与 LexA BD 融合),以及 FK 506 与其受体 FKBP12(与 AD 融合)的相互作用,构建了第三个杂合配体即地塞米松-FK 506,同样也能激活报告基因。他们利用杂合配基从 cDNA 文库中重新得到了 FKBP12 的 cDNA。这一系统将 CIDs 与双杂合系统合并使用,在技术上是一个创新,但是,如何使杂合配

体顺利扩散进入酵母细胞中仍然是限制其应用的一个重要因素。

1996 年,Putz 等人将杂合系统扩展到了 RNA 领域(图 6-D)^[20]。他们将 HIV-1 的 RevM10 突变体蛋白与 GAL4BD 融合,前者与其靶 RNA 即 Rev 应答元件(Rev responsive element, RRE)结合很紧密。他们又构建一 RRE 杂合 RNA 文库,即 RRE RNA 与其余种类 RNA 相连接产生的杂合 RNA 文库,从而在 AD-Y 中筛选出与这些种类 RNA 相结合的 RNA 结合蛋白质,根据已知蛋白质也可寻找与这种蛋白质相互作用的 RNA。SeuGupta 等^[21]、Martin F 等^[22]等人的成功范例预示着有关 RNA 结合蛋白的研究将会更加深入下去。

4 蛋白质相互作用图谱的构建

随着基因组研究计划的开展,以及 mRNA 在不同组织器官不同发育阶段的表达图谱的构建(Body map),蛋白质在不同时空状态下相互作用图谱的构建也逐渐展开。近来双杂合系统最引人注目的应用是酵母蛋白质相互作用的横向研究,以揭示多种细胞活动过程中各控制因子间的联系,并进一步探明至今还不了解或了解很少的大约 3600 种酵母编码基因的功能。目前已经成功地完成一些小规模的蛋白质相互作用图谱,如 T7 噬菌体(55 种蛋白质)^[23]和部分真核细胞蛋白亚基等。但是若要对酵母中总共约 6000 种蛋白质进行系统而可信的研究,在筛选方式的自动化程度,数据的精确性,质量的可靠性等方面还需要技术上的进一步提高。

Fromont-Racine 等人^[24]应用迭代的方式从高质量的基因组文库中不断筛选出相互关联的一系列诱饵蛋白质。在以前的双杂合系统中将两种重组质粒都转化到同一细胞内,这样所得到的可合理检测到的结果较少。Fromont-Racine 等采用了相互作用接合技术(Interaction mating strategy),将 BD-诱饵蛋白质(X)与 AD-基因组文库(Y)分别转化至两种不同交配型单倍体酵母菌株中,令二者在滤膜上接合,然后涂布于选择培养基上,挑选出阳

性克隆作为诱饵蛋白质进入第二轮筛选(图7)。此方法免除了利用二倍体菌株表达时筛选

过程中繁琐的交叉影印以及大量培养皿的使用,并能显著地提高相互作用的效率。

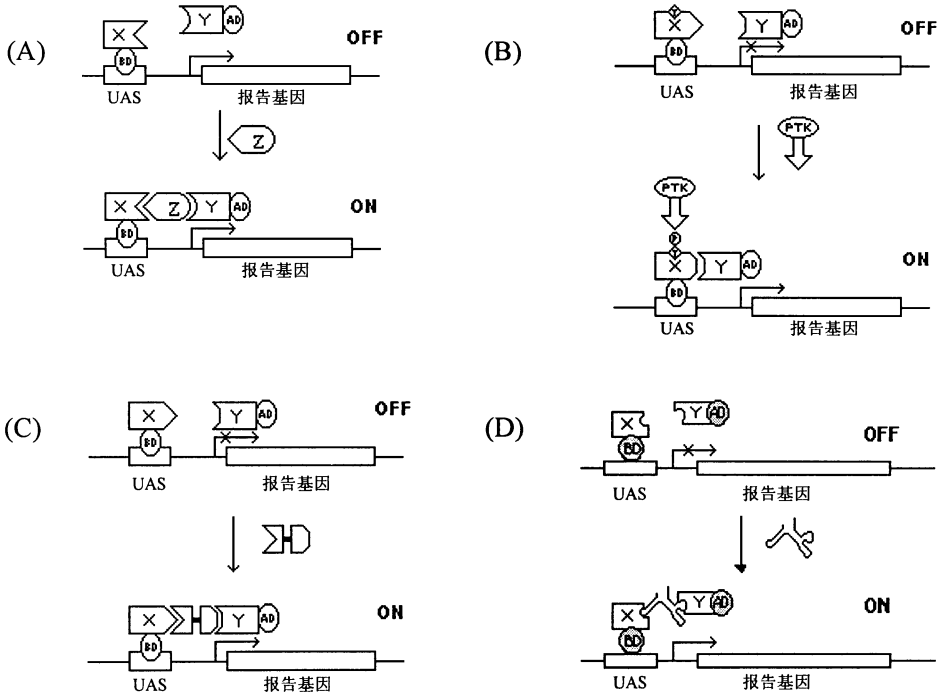


图6 酵母三杂合系统。(A)蛋白质和多肽三杂合系统。蛋白质X和Y的相互作用由蛋白质或多肽配体Z介导,形成一稳定的复合体。Z可以诱导X或Y构象改变,促进二者结合,或是诱导受体的胞外结构域二聚体化。(B)激酶三杂合系统。酪氨酸激酶(PTK)的作用使酪氨酸(T)磷酸化(P),进而导致相互作用的一方X发生构象改变。(C)小配体三杂合系统。利用二聚化化合物诱导物(CIDS)研究受体与有机小配体间的作用。有机小配体是一杂合体:一部分可识别结合蛋白质,另一部分可以用来筛选其受体的已知小配体,或是对受体进行突变分析;也可以是用来筛选已知Y受体的配体的配体文库。(D)RNA三杂合系统。两种杂合蛋白质与一种杂合RNA参与相互作用。与(C)类似,杂合RNA的一部分是已知RNA,与蛋白质X相互作用,另一部分可用来分析或筛选RNA或RNA结合蛋白质Y。

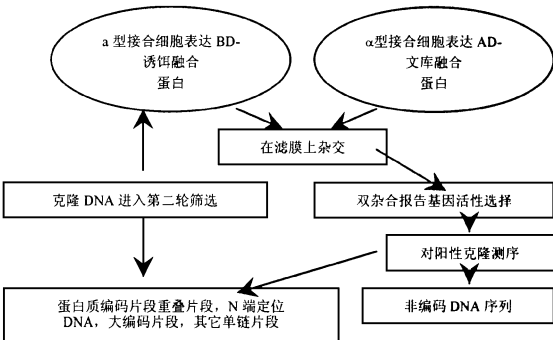


图7 Fromont-Racine 等人采用迭代的方式从基因组文库中不断筛选出相互关联的一系列诱饵蛋白质。

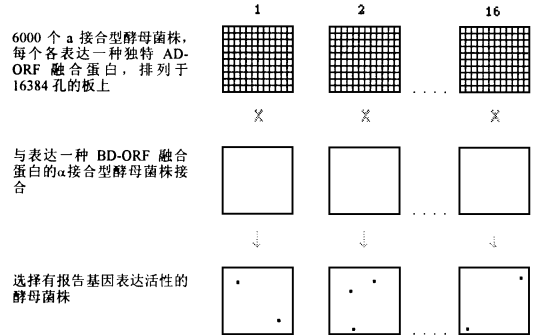


图8 Fields 等人采用的方法。用表达6000种ORF BD融合蛋白的每一种酵母菌株重复整个操作,使得36,000,000种组合全部得以检验。

Fields 等人则利用了酵母中已知的约 6000 种蛋白质编码序列。将每一种序列的可读框(Open Reading Frames, ORFs)与 BD 融合在酵母菌株中表达, 然后与排列有序的待检测异性菌株交配, 后者表达完整的一系列 AD 杂合蛋白质^[25](图 8)。此过程已实现自动化, 并且不需要大规模测序和特异性控制, 因此可望成为构建更大的蛋白质相互作用图谱如人类基因组蛋白质的雏形。但其缺陷是利用全长 ORF 的融合, 由于毒性, 错误折叠以及立体构象等因素可能致使应有的相互作用缺失, 这样导致的结果不完整性有多大尚待进一步研究。

5 结 论

自从双杂合系统提出至今八年多来, 分子生物学家们不懈的努力终于使得大分子间相互作用研究从过去有限的生化, 免疫学技术发展到现在初具规模的各种杂合技术, SPR 技术更使得相互作用的动力学研究从技术上有了空前的突破。哺乳动物双杂合系统的应用可较好地解决蛋白质翻译后修饰的问题, 不过此技术的缺陷是不能大量筛选转化体, 因此今后的一项重要工作还将是把杂合系统更完善的推广到比酵母菌更高等的真核生物体内, 以使蛋白质的加工, 修饰及相互作用过程更接近于真实状态。另外, 构建酵母蛋白质相互作用图谱, 利用酵母中与人类相类似的基因进行有关病理学的分子生物学研究等工作也正在生机勃勃地进行着, 这些问题的解决必将为揭示细胞生命活动的规律奠定重要的基础。

参考文献

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

[2] 吴乃虎. 基因工程原理, 科学出版社, 第二版 1998: 365.

[3] 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.

[4] Kasten MM, Ayer DE, Stillman DJ: SIN3-dependent transcriptional repression by interaction with the Mad1 DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1996, 16: 4215- 4221.

[5] 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.

[6] Johnsson N, Varshavsky A: Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:10340-10344.

[7] Marsolier M-C, Prioleau M-N, Sentenac A: An RNA polymerase β -based two-hybrid system to study RNA polymerase transcriptional regulators. *J Mol Biol* 1997, 268: 243- 249.

[8] Tsan J, Wang Z, Jin Y, Hwang L, Bash RO, Baer R: Mammalian cells as hosts for two-hybrid studies of protein-protein interaction. In *The Yeast Two-Hybrid System*, edn 1. Edited by Bartel PL, Fields S. New York: Oxford University Press; 1997: 217-232.

[9] Rossi F, Charlton CA, Blau HM: Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by β -galactosidase complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 8405- 8410.

[10] Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY: Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 1997, 388: 882-887.

[11] Malmqvist M: Biospecific interaction analysis using biosensor technology. *Nature* 1993, 361: 186- 187.

[12] 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.

[13] Vidal M, Brachmann RK, Fattaey A, Harlow E, Boeke JD: Reverse two-hybrid system and one hybrid system to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 10315- 10320.

[14] Brachmann RK, Vidal M, Boeke JD: Dominant-negative p53 mutations selected in yeast hit cancer hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 4091- 4095.

[15] Shin HM, Goldman PS, DeMaggio AJ, Hollenberg SM, Goodman RH, Howkstra MF: A positive genetic selection for disrupting protein-protein interactions; identification of CREB mutations that prevent association with the coactivator CBP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 10315- 10320.

- Sci USA 1996, 93: 13896– 13901.
- [16] Zhang J, Lautar S: A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components. *Anal Biochem* 1996, 242: 68– 72.
- [17] Kajkowski EM, Price LA, Pausch MH, Young KH, Ozenberger BA: Investigation of growth hormone releasing hormone receptor structure and activity using yeast expression technologies. *J Recept Signal Transduct Res* 1997, 17: 279– 281.
- [18] Osborne MA, Dalton S, Kochan JP: The yeast tribrid system-genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions. *Bio-Technology* 1995, 13: 1474– 1478.
- [19] Licitra EJ, Liu JO: A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 12817– 12821.
- [20] Putz U, Skehel P, Kuhl D: A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 1996, 24: 4834 – 4640.
- [21] SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M: A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 8496– 8501.
- [22] Martin F, Schaller A, Eglite S, Schumperli D, Muller B: The gene for histone RNA hairpin binding protein is located on human chromosome 4 and encodes a novel type of RNA binding protein. *EMBO J* 1997, 16: 769– 778.
- [23] Bartel PL, Roecklein JA, SenGupta D, Fields S: A protein linkage map of Escherichia coli bacteriophage T7. *Nat Genet* 1996, 12: 72– 77.
- [24] Fromont-Racine M, Rain J-C, Legrain P: Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 1997 16: 277– 281.
- [25] Hudson JR, Dawson EP, Rushing KL, Jackson CH, Lockshon D, Conover D, Lanciault C, Harris JR, Simmons SJ, Rothstein R, Fields S: The complete set of predicted genes from *S. Cerevisiae* in readily usable form. *Genome Res* 1998, in press.

The Improvement and Progress of Yeast Two-Hybrid System

Qin Baoming Luo Shujin Mi Zhiyong Wu Naihu

(Laboratory of Plant Developmental and Molecular Biology

Institute of Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The yeast two-hybrid system was first established by Stanley Fields and Ok-kyu Song in 1989. Since then, the system has proven to be a highly efficient genetic tool for detecting protein-protein interactions that utilizes the molecular genetics of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The past few years have witnessed a broad application as well as modification and permutation of the basic two-hybrid system. Such improvements as the Sos recruitment system and mammalian two-hybrid system promise to overcome some limitations of original two-hybrid system. Moreover, the one- and three-hybrid systems and some other related techniques can now address an even bigger set of questions. In addition, the advanced application of the two-hybrid system has opened the way to the systematic analysis of the protein interaction networks of the yeast complete proteome. Taken together, all these approaches to the study of protein-protein interaction should greatly enrich our knowledge of a wide range of cellular process. In this review, we introduce the principles of the two-hybrid system and the development and improvement of this technique.

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