

## 酵母双杂交系统

酵母双杂交系统，又称蛋白阱捕获系统，是由 Fields 和 Song 等人根据真核转录调控的特点创建的。利用酵母双杂交系统能够快速、直接分析已知蛋白之间的相互作用，并能寻找、分离与已知蛋白相互作用的配体，在研究抗原和抗体相互作用、发现新的蛋白质和发现蛋白质的新功能、筛选药物作用位点及药物对蛋白互作影响、建立基因组蛋白连锁图等方面应用广泛。

### 酵母双杂交原理

酵母双杂交系统的建立是基于对真核生物转录调控过程的认识。真核生物中基因转录需要转录激活因子的参与，真核生物的转录激活因子含有两个不同的结构域：DNA 结合结构域（DNA binding domain，DNA-BD）和 DNA 转录激活结构域（Activation domain，AD），这两个结构域可以独立分开，功能互不影响。BD 和 AD 分别单独作用并不能激活转录反应，只有当二者在空间上充分接近时，才呈现完整的转录激活因子活性，使下游基因得到转录。根据这一原理，可设计酵母双杂交系统。

将两待研究蛋白（蛋白 X 与蛋白 Y）分别与 BD、AD 结构域构建融合质粒。将构建好的两个质粒转入同一酵母细胞中表达，如果两蛋白之间不存在相互作用，则下游基因（报告基因）不会转录表达；如果两个蛋白存在相互作用，则 BD 与 AD 两结构域空间上很接近，从而下游基因（报告基因）得到转录。判断通过报告基因表达与否，即可判断两蛋白之间是否存在相互作用。

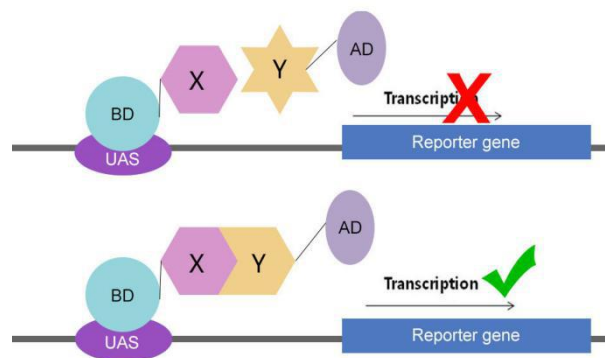


图 1：酵母双杂交原理

### 如何判断是否存在相互作用？

报告基因作为一种营养标记，常用的有 HIS3，URA3，LacZ 和 ADE2 等，对应的宿主菌则是相应标记的缺陷型细

胞，必须要在含有该营养标记的培养基中生长。因此，当有相互作用的蛋白存在时，激活报告基因的表达，从而能够在不含营养标记的培养基中生长，以此验证是否存在相互作用。

## 酵母双杂交系统重要元件

酵母双杂交系统由三个部分组成：

- 与 DNA 结合结构域 (BD) 融合蛋白表达载体 (BD-X)，被表达的蛋白称为诱饵蛋白 (bait) 或称为诱饵，通常诱饵蛋白为已知蛋白。
- 与转录激活结构域 (AD) 融合蛋白表达载体 (AD-Y)，被其表达的蛋白称为靶蛋白 (prey) 或称为猎物，靶蛋白可以为 cDNA 文库、基因片段或基因突变体等。
- 带有一个或多个报告基因的宿主菌株。常用的报告基因有 HIS3, URA3, LacZ 和 ADE2 等，而菌株则需具有相应的缺陷型 (如果报告基因为 HIS3, 则菌株应为 HIS3 的缺陷型。双杂交质粒上带有特定的抗性基因和营养标记)，一个菌株可以含有 1 个、2 个或多个报告基因。

目前酵母双杂交实验采用的系统有 LexA 系统和 Gal4 系统两种。在 LexA 系统中，DNA 结合结构域由一个完整的原核蛋白 LexA 构成，转录激活结构域则由一个 88 个氨基酸的酸性的大肠杆菌多肽 B42 构成，它在酵母中可以活化基因的转录；在 Gal4 系统中，BD 和 AD 分别由 Gal4 蛋白上两个不同的结构域 (1-147aa 与 768-881aa) 构成。

### 为什么选择酵母作为双杂交系统的报道株？

酵母作为酵母双杂交系统的报道株，它具有诸多优点：易于转化、回收扩增质粒；具有可直接进行选择标记基因和特征性报道基因；酵母内源性蛋白不易同来源于哺乳动物的蛋白结合。

## 酵母双杂交系统应用

- 检验一对已知蛋白间的相互作用；
- 用已知功能的蛋白基因筛选双杂交 cDNA 文库，以研究蛋白质之间相互作用的传递途径；
- 通过对待测蛋白做点突变或缺失突变处理，研究一对蛋白间发生相互作用所必需的结构域；
- 分析新基因的生物学功能。即以功能未知的新基因去筛选文库，然后根据钓到的已知基因的功能推测该新基因的功能。

## 酵母双杂交系统优势

利用酵母双杂交系统可以直接、快速的研究蛋白-蛋白之间的相互作用，具有敏感性高、操作简便等优点

- **敏感性高**：检测结果是基因表达产物的积累效应，如酵母的表型，因而可检测存在于蛋白之间微弱或暂时的相互作用
- **操作简便**：与其它检测方法相比，酵母双杂交实验不需要进行蛋白纯化，省去了纯化蛋白质的繁琐步骤
- **真实性好**：相互作用的验证在细胞内进行，能真实的反应蛋白间的相互作用

|          | 酵母双杂交系统  | 免疫共沉淀 ( Co-IP ) |
|----------|----------|-----------------|
| 检测瞬时相互作用 | 是        | 否               |
| 检测弱相互作用  | 是        | 否               |
| 验证方式     | 体内相互作用检测 | 体内相互作用检测        |
| 是否需要蛋白纯化 | 否        | 是               |
| 是否需要抗体   | 否        | 是               |

表 1：酵母双杂交与免疫共沉淀对比

## 酵母双杂交系统局限性

### 假阳性

假阳性是酵母双杂交实验常遇到的问题，假阳性是指两待测蛋白没有相互作用但依然显示出了阳性结果。产生假阳性的原因很多，如某些蛋白质本身具有激活转录功能或在酵母内表达时发挥转录激活作用，使 DNA 结合结构域杂交蛋白 ( BD-bait ) 在无特异激活结构域的情况下可激活转录。另外有些蛋白质表面有对其它蛋白质的低亲和力区，容易形成蛋白体复合物，能够引起报告基因表达，产生假阳性结果。

为了降低假阳性需要设计正确的对照，应对诱饵蛋白和靶蛋白能否单独激活报告基因做验证。使用两个或两个以上的报告基因也可以降低假阳性，利用两个以上报告基因，只有同时具有两种以上相应表型才是真阳性结果。另外，将报告基因整合到染色体上，可以使基因表达水平稳定，消除了由于质粒拷贝数变化引起基因表达水平波动而造成的假阳性。

## 不能检测某些在核外蛋白之间的相互作用

酵母双杂交分析相互作用的蛋白必须定于核内才能激活报告基因，但是很多蛋白质的相互作用依赖于翻译后加工，如二硫键的形成等，而此过程需要在包浆内完成，这样有多种蛋白质不适用此方法。

为了解决这一问题，人们对酵母双杂交技术进行改进，发展了核外双杂交技术（见下文）。

## 酵母双杂交技术的新发展

在传统酵母双杂交系统的基础上，发展了多种改型的双杂交技术以适应不同目的需要。

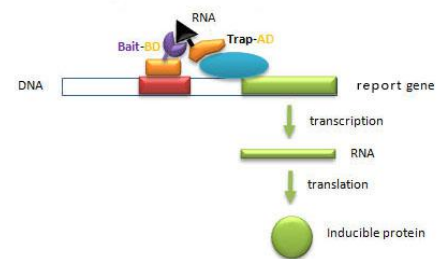
### 反向双杂交技术

反向杂交技术（也成反式双杂交技术）主要用于在确定蛋白质之间相互作用后，进一步研究其结构和功能的关系，确定蛋白质间作用的关键位点或起决定作用的个别氨基酸、特定结构等。这项技术的特点是采取了反选择筛选策略，其关键是报道基因的表达产物对细胞生长有抑制作用。这样当诱饵蛋白与靶蛋白存在相互作用时，表达出有毒性的报道蛋白，细胞不能生长。

例如 Vidal 等采用了反式选择性的报告基因 URA3，其编码的酶使细胞不能在 5-氟乳清酸存在的情况下生长。如果融合蛋白的相互作用被阻断，URA3 则不表达，酵母菌表现对 5-氟乳清酸的抗性。因此，采用反式双杂交系统可以很容易地检验出与某一蛋白相互作用的蛋白的突变体。对突变体进行研究，即可找出影响蛋白质间相互作用的关键位点。

### 酵母三杂交系统

酵母三杂交系统可以用于检测蛋白质-核酸之间的相互作用。三杂交系统的本质与双杂交是相同的，只是需通过第三个分子的介导把两个杂交蛋白带到一起。它的基本原理是将一个已知与 RNA 结合的蛋白与 BD 构建第一个融合蛋白，将待测蛋白质与 AD 构建第二个融合蛋白，同时构建一条含有



两个不同结合位点的融合 RNA，当 RNA 与两个融合蛋白相结合时，可激活报道基因的表达。除了蛋白质-核酸之间的相互作用，酵母三杂交系统也可用于检测检测蛋白质与肽配体、蛋白质与有机小配体、蛋白质与蛋白激酶间的

相互作用。

## 核外双杂交技术

在传统的酵母双杂交系统中，蛋白之间的相互作用是在细胞核内发生的。因此，它不能检测某些在核外蛋白之间的相互作用。为了克服这种局限性，发展出了核外双杂交技术。该技术以 SRS 和 USPS 两种系统为代表。

SRS 也称 Sos 蛋白召集系统（ Sos Recruitment System ）。它的基本原理是分别将待测蛋白 X 与哺乳动物细胞的一种鸟苷交换因子（ EGF ） Sos 蛋白融合；将 Y 蛋白与锚定在酵母细胞膜上的 Src 肉豆蔻酰化信号蛋白融合，并使它们共表达于一个 cdc25-2 基因温度敏感型突变的酵母菌株内。由于该菌株中 cdc25-2 基因编码的 EGF 蛋白在 36 °C 条件下不能激活细胞膜上的 Ras 蛋白，Ras 途径不通。所以细胞无法在 36 °C 条件下生存。但如果待测蛋白 X 与 Y 之间发生相互作用就能把 Sos 蛋白带到细胞膜上并激活附近的 Ras 蛋白，从而打通 Ras 途径，使该菌株获得在 36°C 条件下生存的能力。

USPS 也称为基于遍在蛋白的裂解蛋白感受器。它的设计是根据这样一个事实，即真核细胞中遍在蛋白与某一蛋白之间新生成的融合会被遍在蛋白特异的蛋白酶（ UBP s ）迅速切开，但这种切割只有当遍在蛋白正确折叠时才会发生。研究发现，遍在蛋白基因的 N 端和 C 端这两部分即使分离，只要共表达与同一个细胞内，它们仍能正确折叠。将待测蛋白 X 与带有点突变的遍在蛋白 N 端片段融合，将待测蛋白 Y 与下游接有报告蛋白的正常遍在蛋白 C 端片段融合，并使它们共表达与同一个细胞内。因遍在蛋白 N 端片段内含有有点突变，它与 C 端片段之间不能自然形成正确的折叠。只有当蛋白 X 和 Y 之间发生相互作用时才能克服点突变的影响，使遍在蛋白的两端形成正确折叠，从而引来 UBP s 切除与 C 端片段连接的报告蛋白。此技术建立之初是通过 Western blot 检测有无被切下的报告蛋白来判断待测蛋白之间是否发生了相互作用的，所以操作比较繁琐，不便于推广。最近有人对它作了改进，以一种融合的转录激活因子 PLV 作为报告蛋白。PLV 一旦被从遍在蛋白 C 端片段上切下，它就会进入细胞核内激活特定的报告基因，如 LacZ 和 HIS3 等。这样就可以根据转化细胞是否生长及显色来判断待测蛋白之间有无相互作用。因此极大地简化了操作步骤，提高了筛选效率。

## 相关阅读

[FRET 荧光共振能量转移检测蛋白质间相互作用](#)

[TAP 串联亲和纯化技术检测蛋白质间相互作用](#)

## 更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

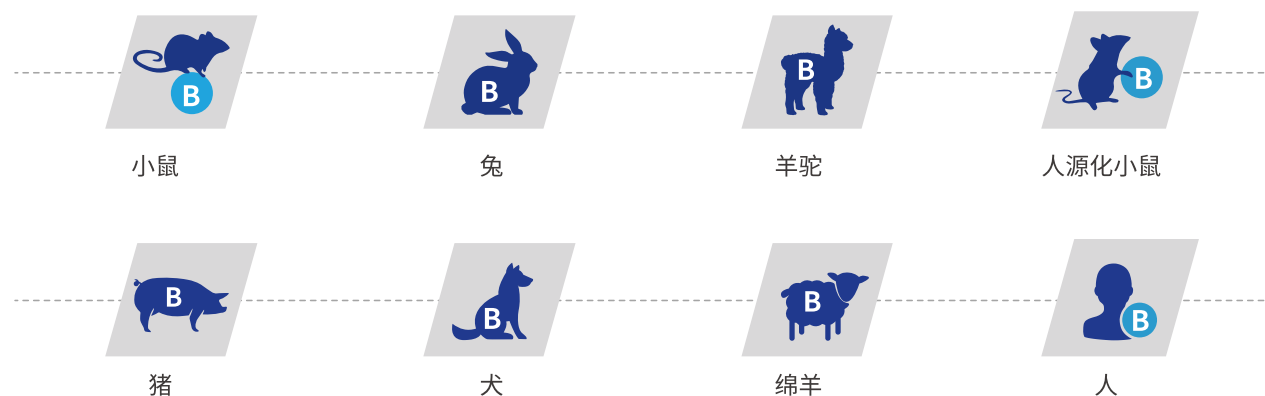
### SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

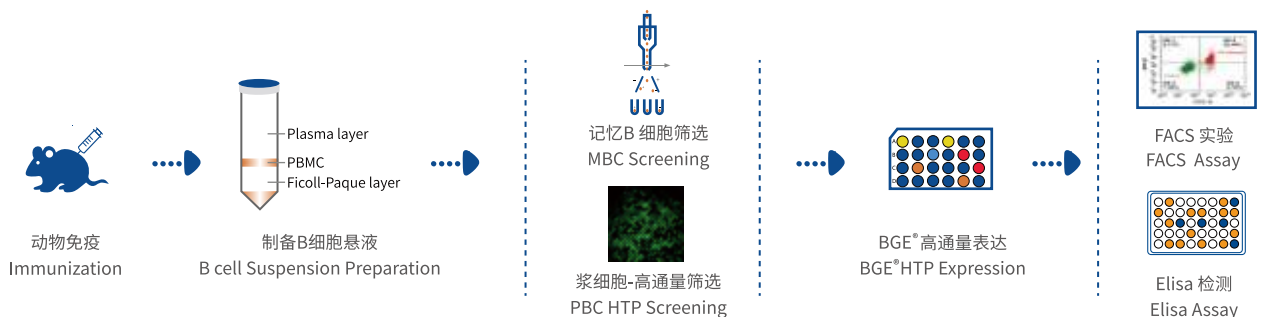
#### 平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

#### 可开发单抗物种



#### 服务流程







Recombinant Antibody Expression Service

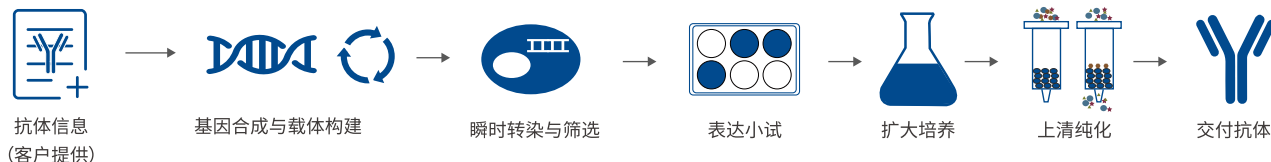
## 重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

### 服务优势



### 服务流程

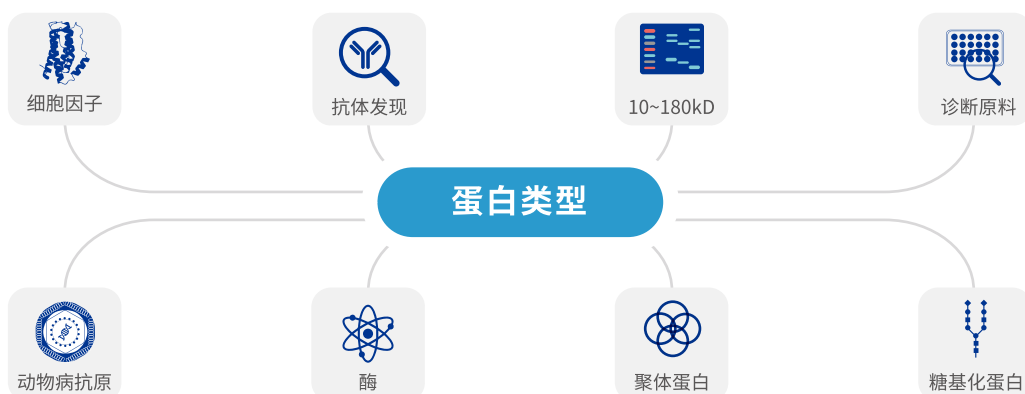


Recombinant Protein Expression Service

## 重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



# 4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

## 杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

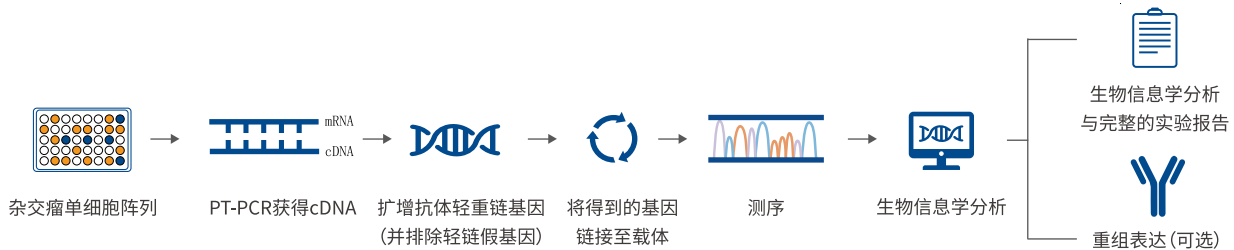
### 应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

### 服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

### 服务流程



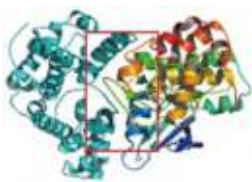
# 5

Biomolecular Interaction Analysis Service

## 分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

### 检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



# 6

Antibody Humanization Service

## 抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

### 服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

### 服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

# 7

Stable Cell Line Development Service

## 生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

### DeepLight®细胞筛选平台的优势

|         | 有限稀释法筛选 | DeepLight® On-chip筛选 |
|---------|---------|----------------------|
| 筛选时间    | 8周      | 1天                   |
| 细胞分离效率  | 低       | 高                    |
| 筛选通量    | 低       | 高                    |
| 单细胞水平筛选 | 否       | 是                    |

### 服务流程



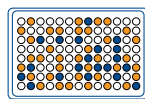
基因合成&质粒抽提



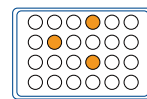
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

### 服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株  
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞  
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台  
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代  
重组单抗可达5 g/L