

- the evidence for its use? [J]. *Exper Rev Respir Med*, 2011, 5 (1): 17-25.
- 25 Philip G, Hustad C, Noonan G, et al. Reports of suicidality in clinical trials of montelukast[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124 (4): 691-696.
- 26 Bollinger ME, Diette GB, Chang CL, et al. Patient characteristics and prescription fill patterns for allergic rhinitis medications, with a focus on montelukast, in a commercially insured population [J]. *Clin Ther*, 2010, 32(6): 1093-1102.
- 27 Rabinovitch N, Graber NJ, Chinchilli VM, et al. Urinary leukotriene E4 / exhaled nitric oxide ratio and montelukast reponse in childhood asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(3): 545-551.
- 28 Capsomidis A, Tighe M. Archimedes. Question 2. Is oral montelukast beneficial in treating acute asthma exacerbations in children? [J]. *Arch Dis Child*, 2010, 95(11): 948-950.
- 29 Dicpinigaitis PV, Dobkin JB, Reichel J. Antitussive effect of the leukotriene receptor antagonist zifirlukast in subjects with cough-variant asthma[J]. *J Asthma*, 2002, 39(3): 291-297.
- 30 Todokoro M, Mochizuki H, Tokuyama K, et al. Childhood cough variant asthma and its relationship to classic asthma[J]. *Ann Allergy Clin Immunol*, 2003, 90(9): 625-659.
- [收稿日期 2012-09-25][本文编辑 谭毅 吕文娟]

新进展综述

分子遗传学研究的新工具—大肠杆菌双杂交系统联合 DNA 定点诱变技术

路文盛(综述), 程桦(审校)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:30860113)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院内分泌代谢科

作者简介: 路文盛(1968-), 男, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 糖尿病分子遗传学。E-mail: 15807718691@163.com

【摘要】 大肠杆菌双杂交系统和基因定点诱变技术已经成为疾病分子遗传学研究的重要技术手段。该文就近年来出现的大肠杆菌双杂交系统联合 DNA 定点诱变技术作一简要综述。

【关键词】 大肠杆菌双杂交系统; 基因定点诱变技术; 分子遗传学

【中图分类号】 R 393 【文献标识码】 A 【文章编号】 1674-3806(2013)01-0090-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.01.34

The new tool of molecular genetics research: bacterial two-hybrid system combined with DNA site-directed mutagenesis techniques LU Wen-sheng, CHENG Hua. *Department of Endocrinology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China*

【Abstract】 Bacterial two-hybrid system and DNA site-directed mutagenesis technique have become important technical means of disease molecular genetics research. In this paper, the united technique of bacterial two-hybrid system and DNA site-directed mutagenesis technique in recent years was briefly reviewed.

【Key words】 Bacterial two-hybrid system; DNA site-directed mutagenesis technique; Molecular genetics

大肠杆菌双杂交系统是继酵母真核双杂交系统之后,发明的新一代原核双杂交系统,其魅力在于不仅能够精确测定两个已知蛋白质间的相互作用^[1,2],亦可通过对 cDNA 文库的扫描发现新物质^[3-5]。DNA 定点诱变技术是依据基因多态性形成人工突变体,与大肠杆菌双杂交系统联合应用,利用

大肠杆菌易于培养、繁殖迅速的优势,能够短时间内快速定量检测基因定点诱变所形成的突变体与其生物学配体或特定蛋白质间相互作用力的微弱变化,该联合技术近年来在疾病分子遗传学领域得以快速推广与应用^[6,7]。

1 大肠杆菌双杂交系统

2001 年美国 Stratagene 公司发明的“大肠杆菌双杂交系统”^[8]与“酵母双杂交”相比具有明显优势:(1)大肠杆菌生命力强,易于培养;(2)感受态制备简单,易于转化;(3)实验周期短,工作效率高;(4)报告菌株经过特殊改造,灵敏度高,能够发现单碱基突变引起的微弱作用力变化。

1.1 基本原理^[9] 双杂交系统基于如下理论依据:转录起始需要反式转录激活因子参与,而该因子由两个结构上可以分开,功能上相互独立的结构域 DNA 结合域(pBT)和转录激活域(pTRG)组成。两个结构域分别具有功能,且单独不能激活转录,只有当两个结构域在空间上较为接近时,才能呈现完整的转录活性而启动下游基因转录。假设两个目标蛋白为蛋白 1 和蛋白 2,则蛋白 1 外显子与 pBT 连接构成诱饵质粒,蛋白 2 外显子与 pTRG 连接组成靶质粒。诱饵质粒和靶质粒共转化大肠杆菌分别表达诱饵蛋白(含蛋白 1)和靶蛋白(含蛋白 2),当蛋白 1 和蛋白 2 发生相互作用时,pBT 和 pTRG 空间位置相互接近,激活 LacZ 启动子,促进下游报告基因表达以判定是否发生蛋白质相互作用(见图 1)。

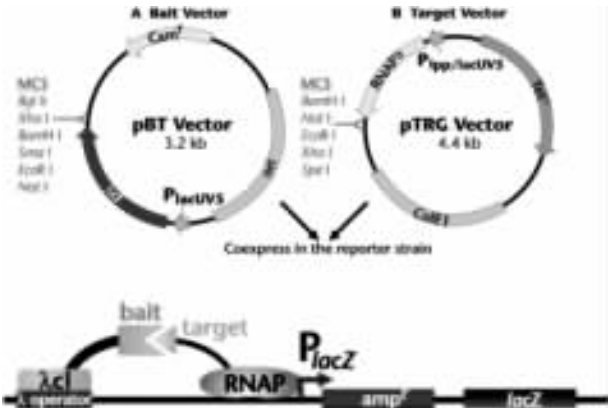


图 1 大肠杆菌双杂交系统示意图

1.2 结果判定^[10] 经人工改造后,诱饵质粒空载体 pBT 带有氯霉素抗性,靶质粒空载体 pTRG 带有四环素抗性,大肠杆菌报告株带有卡那霉素抗性同时含有组氨酸基因(HIS3)外显子可以表达组氨酸,在缺乏必需氨基酸组氨酸培养基中能够存活。当诱饵质粒和靶质粒共转化大肠杆菌报告株后,当诱饵蛋白和靶蛋白发生相互作用时,即可启动下游氨苄青霉素和 LacZ 基因的转录(见图 1),报告株表达氨苄青霉素抗性标签和 β 半乳糖苷酶。鉴于此,凡能在氯霉素、四环素、卡那霉素和氨苄青霉素四抗性且组氨酸单缺陷培养基中存活的单克隆菌落同时表现为

蓝斑者即可证明蛋白质之间存在相互作用,经蓝斑筛选和 β 半乳糖苷酶活性检测可以定性、定量了解蛋白质的相互作用。需要注意的是诱饵质粒和靶质粒空载体转化大肠杆菌报告株后所表达的蛋白质是否对报告株具有毒性或是否能够单独促发报告基因表达将直接影响结果的判定,因而共转化前需进行空载体毒性和自激活实验,只有当两质粒空载体均对报告株无毒性或单独转化无自激活作用时才能进行下一步共转化实验。

2 DNA 定点诱变技术^[11]

定点诱变技术是研究蛋白质结构和功能之间复杂关系的常用手段,也是人工形成基因多态性的有力工具。美国 Stratagene 公司快速定点诱变试剂盒具有以下特点:(1)聚合反应在公认的高保真聚合酶“黄金标准”-Stratagene® Pfu 聚合酶催化下完成,可有效避免碱基错配;(2)巧妙利用来源于大肠杆菌的模板质粒甲基化 Gm⁶ATC 序列,通过 DpnI 内切酶切割模板质粒,突变质粒得以保留,使得操作简单有效。

2.1 基本原理^[12] 以双链 DNA 为模板,以目标基因突变位点为中心设计一对互补的定点诱变引物,在高保真酶催化下经传统多聚酶链式反应(PCR)可以获取大量带有突变位点的双链 DNA。由于模板质粒是经大肠杆菌(带 dam⁺ 基因型)扩增而来,其 GATC 序列可被大肠杆菌 dam⁺ 甲基化变成 Gm⁶ATC,而此序列可被 DpnI 内切酶识别切割;而经 PCR 扩增形成的带突变位点的质粒,其 GATC 序列并没有甲基化而不被切开,依此原理模板质粒可被切碎,在随后转化中即可得到大量突变质粒单克隆(见图 2)。

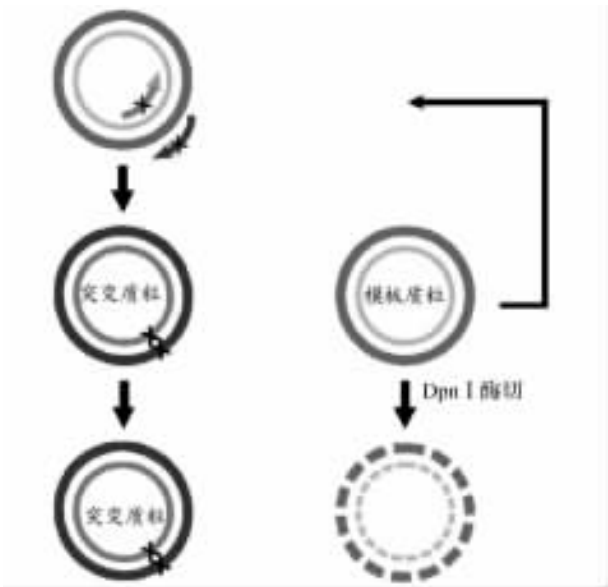


图 2 定点诱变原理示意图

2.2 突变引物设计要求^[13] 上下游引物横跨突变位点,以突变位点为中心对称设计引物(见图3),长度以25~45 bp为宜,要求上下游引物碱基互补,GC含量40%左右,引物末端以G或C结尾。

3 大肠杆菌双杂交与DNA定点诱变联合技术

3.1 联合技术的优势 DNA定点诱变技术已成为基因功能研究的常用手段,将双杂交和定点诱变相结合的技术是研究蛋白质结构与功能关系的重要技术策略之一^[14]。通过群体遗传学研究得到的相关基因热区变异,借助定点诱变技术构建其相应的突变体,进而经过双杂交技术观察各个突变体与目的蛋白的相互作用,以明确基因突变是否造成功能改

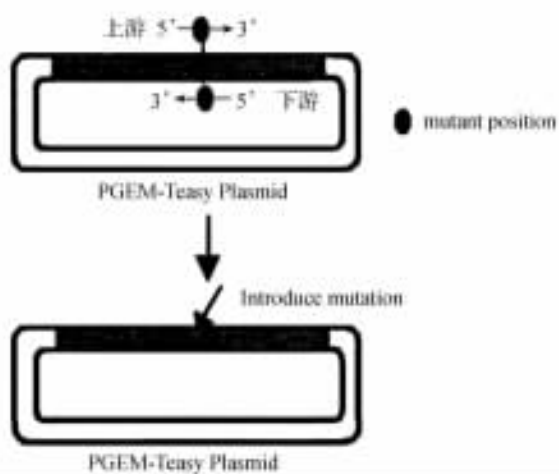


图3 定点诱变引物设计示意图

3.2.2 目标基因定点诱变^[17] 定点诱变反应直接在目标基因重组TA克隆载体上进行,在一对中间包含有突变碱基的互补引物引导下,经高保真聚合酶PCR合成突变质粒(见图3)。DpnI内切酶识别模板链Gm⁶ATC序列,酶切反应切碎模板链(见图2)。酶切反应产物纯化后转化感受态大肠杆菌,扩增后抽提质粒得到目标基因突变体TA克隆质粒,经含有X-Gal的氨苄抗性LB平板筛选白色菌落即为诱变成功的单克隆。

3.2.3 诱饵质粒与靶质粒的构建 诱饵载体pBT、靶载体pTRG、目标基因TA克隆质粒、目标基因突变体TA克隆质粒以及目标基因生物学配体TA克隆质粒分别经EcoR I、BamHI双酶切,pBT与目标基因或其突变体连接得到诱饵质粒;pTRG与目标基

变。近年来,随着大肠杆菌双杂交系统日臻完善,灵敏度进一步提高,单碱基改变的微弱影响也可以给予定量检测^[15]。

3.2 联合技术的关键实验步骤

3.2.1 目标基因及其生物学配体TA克隆^[16] 首先设计带有限制性内切酶EcoR I、BamHI双酶切位点的引物,经逆转录PCR(RT-PCR)从相关组织总RNA中克隆目标基因及其生物学配体,通过割胶纯化PCR产物后与TA质粒连接构建携带有EcoR I、BamHI双酶切位点的重组TA质粒(见图4),经转化感受态大肠杆菌,扩增后得到TA克隆质粒。

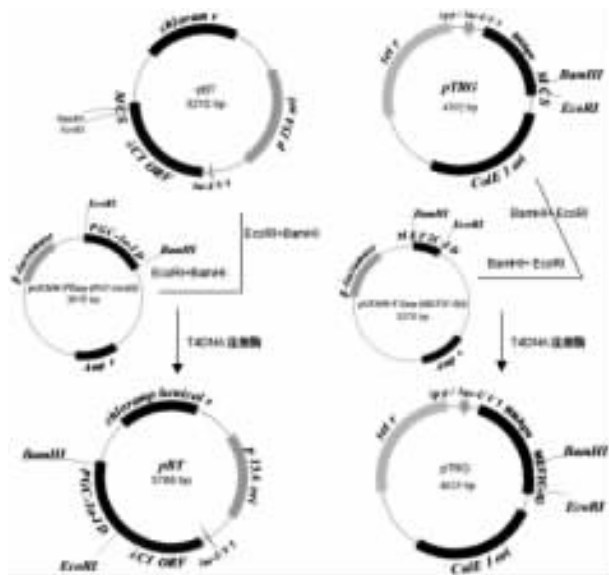


图4 诱饵质粒和靶质粒构建策略

因生物学配体连接构建靶质粒。诱饵质粒和靶质粒分别转化感受态大肠杆菌扩增。以目标基因PGC-1a结构域(PGC-1a-ID)与其生物学配体MEF2C结构域(MEF2C-ID)为例以图4说明诱饵质粒与靶质粒的构建策略^[18]。

3.2.4 大肠杆菌双杂交^[19] 将诱饵质粒和靶质粒共转化大肠杆菌报告株,通过预加有X-Gal的LB琼脂糖平板(具有氨苄青霉素、四环素、氯霉素、卡那霉素抗性)筛选蓝色菌落,并通过 β -半乳糖苷酶活性检测,定性定量分析各突变体与其生物学配体间结合力的变化。以目标基因PGC-1a结构域(PGC-1a-ID)与其生物学配体MEF2C结构域(MEF2C-ID)为例说明大肠杆菌双杂交实验流程^[18](见图5)。

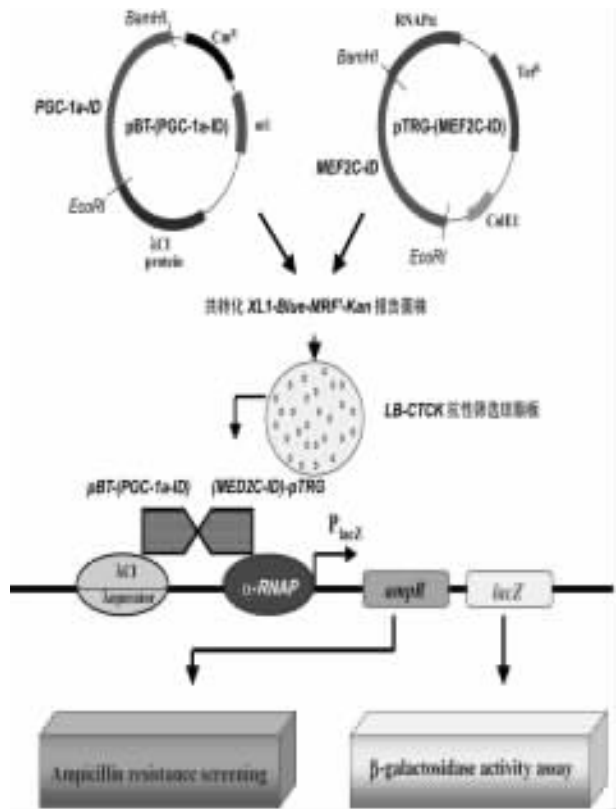


图 5 大肠杆菌联合基因定点诱变技术示意图

4 结语

大肠杆菌双杂交系统联合 DNA 定点诱变技术是首先通过定点诱变技术改造目的基因编码区以在体外精确模拟 DNA 单碱基变异形成人工突变蛋白,进而借助大肠杆菌双杂交系统研究突变蛋白质结构与功能关系的定量检测技术,近年来已经成为分子遗传学研究的重要策略。许多老年性疾病诸如糖尿病、心脑血管疾病等均与遗传关系密切,寻找群体遗传学结论的分子遗传学证据应该是疾病遗传学发展的方向,大肠杆菌双杂交联合 DNA 定点诱变技术正好契合了这一发展趋势。

参考文献

1 Qi Q, Gibson A, Fu X, et al. Involvement of the N-terminal B-box domain of arabidopsis BBX32 protein in interaction with soybean BBX62 protein[J]. J Biol Chem,2012,287(37):31482-31493.

2 Milbradt J, Auerchs S, Sevana M, et al. Specific residues of a conserved domain in the N terminus of the human cytomegalovirus pUL50 protein determine its intranuclear interaction with pUL53[J]. J Biol Chem, 2012,287(28):2004-2016.

3 Karna SL, Zogaj X, Barker JR, et al. A bacterial two-hybrid system that utilizes Gateway cloning for rapid screening of protein-protein interactions[J]. Biotechniques,2010,49(5):831-833.

4 Fu QY, Gao YQ. Screening of AMP-activated protein kinase alpha2 subunit interacting proteins by bacterial two-hybrid system[J]. Mol Biol Rep, 2009,36(2):337-344.

5 Paschos A, den HA, Smith MA, et al. An in vivo high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component VirB8 identified inhibitors of Brucella abortus 2308 proliferation[J]. Infect Immun, 2011,79(3):1033-1043.

6 Sithisak S, Kitti T, Boonyonying K, et al. McsA and the roles of metal-binding motif in Staphylococcus aureus[J]. FEMS Microbiol Lett,2012,327(2):126-133.

7 Monteil V, Kolb A, D'Alayer J, et al. Identification of conserved amino acid residues of the Salmonella sigmaS chaperone Crl involved in Crl-sigmaS interactions[J]. J Bacteriol,2010,192(4):1075-1087.

8 Joung JK, Ramm EI, Pabo CO, et al. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2000,97(13):7382-7387.

9 Pellis M, Pardon E, Zolghadr K, et al. A bacterial-two-hybrid selection system for one-step isolation of intracellularly functional Nanobodies[J]. Arch Biochem Biophys, 2012,526(2):114-123.

10 Strauch EM, Georgiou G. A bacterial two-hybrid system based on the twin-arginine transporter pathway of E. coli[J]. Protein Sci, 2007,16(5):1001-1008.

11 Sjodin P, Holmberg SK, Akerberg H, et al. Re-evaluation of receptor-ligand interactions of the human neuropeptide Y receptor Y1: a site-directed mutagenesis study[J]. Biochem J, 2006,393(Pt 1):161-169.

12 Tonazzi A, Console L, Giangregorio N, et al. Identification by site-directed mutagenesis of a hydrophobic binding site of the mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier involved in the interaction with acyl groups[J]. Biochim Biophys Acta, 2012,1817(5):697-704.

13 Vasu V, Kumaresan J, Babu MG, et al. Active site analysis of cis-epoxysuccinate hydrolase from Nocardia tartaricans using homology modeling and site-directed mutagenesis[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2012,93(6):2377-2386.

14 Conde JA, Claunch CJ, Romo HE, et al. Identification of a motif in BMRP required for interaction with Bcl-2 by site-directed mutagenesis studies[J]. J Cell Biochem, 2012,113(11):3498-3508.

15 Yan P, Gao X, Shen W, et al. Parallel assembly for multiple site-directed mutagenesis of plasmids[J]. Anal Biochem,2012,430(1):65-67.

16 Brieger A, Adryan B, Wolpert F, et al. Cytoskeletal scaffolding proteins interact with Lynch-Syndrome associated mismatch repair protein MLH1[J]. Proteomics, 2010,10(18):3343-3355.

17 Dirks-Hofmeister ME, Inlow JK, Moerschbacher BM. Site-directed mutagenesis of a tetrameric dandelion polyphenol oxidase (PPO-6) reveals the site of subunit interaction[J]. Plant Mol Biol,2012,80(2):203-217.

18 路文盛,颜晓东,黄勤,等. PGC-1a 基因 MEF2C 结构域 482G/A 变异参与 2 型糖尿病发病的机制研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2008,25(6):616-623.

19 Varsaki A, Lamb HK, Eleftheriadou O, et al. Interaction between relaxase MbeA and accessory protein MbeC of the conjugally mobilizable plasmid ColE1[J]. FEBS Lett, 2012,586(6):675-679.

[收稿日期 2012-09-24][本文编辑 黄晓红 谭毅]