

克隆颜色鉴定结合 5-氟乳清酸负筛提高 三杂交系统筛库效率

何元政 包雷 刘定干*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031. *联系人, Email: liudiga@sunm.shcnc.ac.cn)

摘要 酵母三杂交系统是新近发展起来的一个分析 RNA 结合蛋白的有力工具, 然而在利用该系统筛库过程中, 常会遇到大量假阳性克隆. 将克隆颜色鉴定与 5-氟乳清酸负性筛选相结合, 运用到酵母三杂交系统的筛库过程中, 极大地提高了筛库的效率和假阳性克隆的鉴别, 并已实现了对重要的 RNA 结合蛋白的筛选. 这一改进将大大方便该系统在分析 RNA 与蛋白的相互作用中的运用.

关键词 克隆颜色鉴定 5-氟乳清酸负性筛选 酵母三杂交系统 RNA 结合蛋白

RNA-蛋白的相互作用在细胞生命活动中非常重要. 酵母三杂交系统是新近发展起来的研究 RNA-蛋白作用的一个强有力的工具^[1], 它由酵母双杂交系统演化而来, 其原理为利用 RNA(诱饵)与 cDNA 库中 cDNA 编码的 RNA 结合蛋白的相互作用恢复 GAL4 转录因子功能, 使报告基因(*His*, *LacZ*)表达, 改变酵母的宏观表型(图 1). 三杂交系统创立以来, 已成功运用到 RNA-蛋白相互作用的分析^[1~3], 并筛选到一些重要的 RNA 结合蛋白^[4~6]. 然而在利用三杂交系统筛库过程中, 常会得到大量的假阳性克隆(>90%), 有时甚至多到使系统无法工作(>1 000 : 1). 这种假阳性克隆主要为 RNA 非依赖性克隆, 其产生的主要原因是与 Gal4 转录激活结构域融合的外源蛋白能与 LexA-MS2 衣壳融合蛋白直接作用, 而不通过 RNA 诱饵这个中间桥梁, 恢复 GAL4 的转录功能.

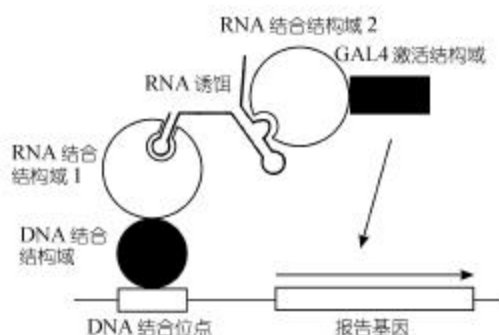


图 1 酵母三杂交系统示意图(由 SenGupta 原图^[1]改画)

为了排除假阳性克隆对筛选的干扰, Zhang 等人^[5]设计了一种颜色鉴定来提高筛选专一性, 其原理是: 在最初的三杂交系统中的 RNA 质粒(含 *Ura3* 标记)中引入 *ADE2* 基因. 三杂交所用的酵母菌株 L40 coat 为 *ADE2* 缺陷型, 通常其集落在生长后期显红色, 但转入改进的 RNA 质粒(含 *ADE2* 基因)后就显野生型的白色. 在最后的筛选培养基中如果只对报告基因(*His*)和库质粒(*Leu*)筛选, 而不对 RNA 质粒(*Ura*)筛选, RNA 非依赖性的假阳性克隆就会由于不受选择压力而自发丢失 RNA 质粒, 使菌落变红或是出现红色丝线; 另外, RNA 依赖的阳性克隆则将保留质粒而使集落呈现纯白色. 利用这种方法能很快地用肉眼鉴别出 RNA 依赖的克隆和 RNA 非依赖的克隆. 然而, 实验发现, 即使在纯白的克隆中, RNA 依赖的真阳性克隆也只占很少一部分(小于 10%), 这主要是因为 2 μ m 型的 RNA 质粒的自发丢失率很小(小于 0.01%)^[7].

在如何提高对假阳性克隆的鉴别率的问题上, Park 等人^[8]采取了另一种策略, 即用含有 5-

氟乳清酸(5-fluoroorotic acid, 5FOA)的培养基对筛库过程中形成的原始克隆进行负筛(Park 等人此处采用的 RNA 质粒为不含颜色标记 *ADE* 的最初 RNA 质粒). RNA 依赖性的阳性克隆由于含有 *Ura3* 基因而不能在含有 5-氟乳清酸的平板上生长, 因为野生型的 *Ura3* 基因能将 5-氟乳清酸代谢为有毒的 5-氟脱氧尿苷^[9]; RNA 非依赖性的假阳性克隆则会由于 RNA 质粒的丢失而能在含有 5-氟乳清酸的培养基上生长. 采用这种方法虽然较大地提高了对假阳性克隆的鉴定率, 但需要对筛库过程中产生的数目庞大(>500)的所有原始阳性克隆进行处理, 因而也比较繁琐.

我们在用三杂交系统分离人白介素 6 核转录因子 3' 非翻译区(NF-IL6 3' UTR)RNA 结合蛋白基因的工作中, 同时应用上述两种方法, 即用带有 *ADE2* 的 RNA 质粒构建诱饵, 先对 His 和 Leu 筛选(克隆颜色鉴定), 再只对纯白的克隆进行 5-氟乳清酸负筛, 这两种方法的结合极大地提高了三杂交系统的筛库效率和对假阳性克隆的鉴别率, 并已分离到符合筛选中真阳性克隆所有标准的 cDNA 克隆(将另文发表). 这一改进为三杂交系统的进一步推广使用创造了条件.

1 材料与方法

(1) 材料. 三杂交系统的 pⅢA/MS2-1, pⅢA/MS2-2, pⅢA/IRE-MS2, pAD-IRP 质粒及菌种 L-40 coat [*MATa*, *ura3-52*, *leu2-3112*, *his3D200*, *trp1D1:TRP1*, *ade2*, *LYS2:::(lexAop)-His3*, *ura3:::(lexAop)-LacZ*]由 Wisconsin 大学的 Wickens 教授惠赠^[1,5]. 人正常肝细胞双杂交 cDNA 库由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所汪垣教授惠赠. 酵母双杂交基因组库 Y2HL-C1, Y2HL-C2, Y2HL-C3^[10]由 Wisconsin 大学的 James 博士惠赠. Yeast nitrogen base 购自 Difco. 3-氨基-1, 2, 4-三唑(3-AT)购自 Sigma. 5-氟乳清酸购自 Gibco/BRL.

(2) 方法. (i) 三杂交系统的 RNA 诱饵的构建: 以 5' -AGACCCGGGAAGAAGAAA-CGTCTATG-3', 5' -AATCCCGGGACTTCGAAACCGGCCCGC-3' 为引物, 从 pSP64/0.28^[11]上 PCR 扩增 82 bp 的 NF-IL6 3' UTR 的 D1 片段, *Sma* I 切平后克隆到 pⅢA/MS2-2 的 *Sma* I 位点, 称为 pⅢA/D1-MS2. (ii) 用 RNA 诱饵对库进行筛选: 按 LiAc/PEG^[12]方法将 pⅢA/D1-MS2 转入 L-40 coat 菌中, 在 SD-Ura(SD: synthetic, minimal medium, 合成最低培养基)^[12]平板上挑选转化的克隆, 然后再将 200 μ g 的库质粒(人肝细胞 cDNA 库或酵母基因组库)转入已含有 RNA 诱饵的 L-40 coat 克隆中(约相当于对 2×10^6 个克隆进行筛选), 在 SD-Leu, His/3AT(5 mmol/L)平板上筛选 His⁺的克隆, 而不对 RNA 质粒进行筛选. 30℃培养 1 周后, 挑选白色克隆备份到新的 SD-Leu, His 平板. (iii) 5-氟乳清酸负性筛选: 将 SD-Leu, His/3AT 板上纯白的 his⁺原始克隆分别备份到两块新的 SD-Leu, His 平板和一块 SD-Leu, His/3AT/5FOA(0.1%)板上. 30℃培养 2~3 d. (iv) RNA 质粒的丢失实验: SD-Leu, His/3AT 板上的 his⁺克隆先在 SD-Leu 板上划线, 30℃生长 2~3 d, 再挑单克隆在 SD-Leu/5FOA 板上划线. 30℃生长 2~3 d 长出的克隆即不含有 RNA 质粒. (v) β -半乳糖苷酶活力测定按文献^[13]进行.

2 结果与讨论

我们首先检查了克隆颜色鉴定和 5-氟乳清酸负性筛选对于 RNA 依赖的真阳性对照克隆(铁应答元件与铁调节蛋白的作用, 即 iron response element, IRE and iron regulatory protein,

IRP)^[1]的作用(图 2(a)), 在 SD-Leu, His/3AT 板上, 对照克隆由于存在对于 RNA 质粒的筛选压力, 所以其克隆颜色为纯白色, 而假阳性克隆由于培养基中不对 RNA 质粒进行筛选, RNA 质粒会自发丢失, 从而使克隆呈现出红色或者在白色克隆中出现红色丝线. 在 SD-Leu, His/3AT/5FOA 板上进行负性筛选(图 2(b)), 对照克隆由于含有 RNA 质粒而不能在含有 5-氟乳清酸的平板上生存, 假阳性菌体由于 RNA 质粒自发丢失而能在含有 5-氟乳清酸的平板上形成集落. 然后将这种克隆颜色鉴定与 5-氟乳清酸负性筛选结合到实际的 RNA 结合蛋白的库筛选中, 以 NF-IL6 3' UTR RNA 诱饵对人肝 cDNA 库进行筛选, 将筛库过程中的 his⁺原始克隆同时接种到 SD-Leu, His/3AT 板(颜色鉴定), SD-Leu, His/3AT/5FOA 板(5-氟乳清酸负性筛选)及另一块 SD-Leu, His/3AT 板(对另一报告基因 β -半乳糖苷酶活力的检测)上, 2~3 d 后对比 3 块板的结果. RNA 依赖的阳性克隆必须同时满足: SD-Leu, His/3AT 板的颜色鉴定为纯白色; SD-Leu, His/3AT/5FOA 板的负性筛选不能生长; 同时另一报告基因 β -半乳糖苷酶检测变蓝. 在实验过程中, 只有一个克隆(克隆 14)同时满足这 3 个要求(图略), 随后对该克隆进行 RNA 丢失实验, 发现丢失 RNA 质粒的第 14 号克隆不能在 his 缺陷板上生长, 再次转入 RNA 质粒后又重新恢复了 his 缺陷板生长的能力, 说明这是一个真正的 RNA 依赖的阳性克隆. 将这种方法运用到对酵母基因组库 Y2HL 的筛选中, 同样以 NF-IL6 3' UTR RNA 为诱饵, 从该库中筛选 RNA 结合蛋白. 通过颜色鉴定, 5-氟乳清酸负性筛选, 得到了 7 个克隆, 经 RNA 丢失实验和诱饵再转入实验鉴定后, 其中的 5 个为真正的 RNA 依赖的阳性克隆. 由此可见, 通过颜色鉴定和 5-氟乳清酸负性筛选鉴定出的 RNA 依赖的阳性克隆率为 70%以上. 颜色鉴定结合 5 氟乳清酸负性筛选法筛库的数据如表 1 所示.

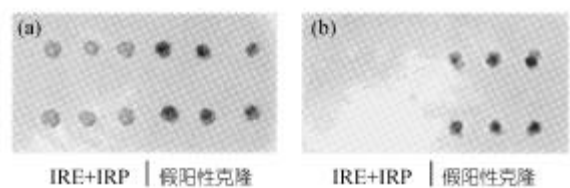


图 2 克隆颜色鉴定和 5FOA 负筛这两种筛选方法对于真阳性克隆和假阳性克隆的作用

(a) RNA 依赖真阳性克隆与假阳性克隆在不对 RNA 质粒选择的 SD-Leu, His/3AT 板上呈现不同颜色; (b) 5FOA 负筛对于 RNA 依赖真阳性克隆与假阳性克隆的不同作用

表 1 对比 3 种不同的方法筛库的结果

	颜色鉴定结合 5FOA 负筛		只用颜色鉴定		只用 5FOA 负筛	
	人肝库	酵母库	人肝库	酵母库	人肝库	酵母库
筛库过程中形成的最初原始克隆数	约 500	约 800	约 500	约 800	约 500	约 800
经过复筛后需要分析的克隆数	1	7	36	73	500	800
最终鉴定为 RNA 依赖的阳性克隆数	1	5	1*	5*	1*	5*
鉴别率	100%	71%	2.7%	6.8%	0.2%	0.6%

人肝库 = 人正常肝细胞 cDNA 库; 酵母库 = 酵母 Y2HL 基因组库. *表示推测的结果, 即根据颜色鉴定结合 5-氟乳清酸负筛鉴定出的最后真阳性克隆数的估计值. 由于 5-氟乳清酸和颜色鉴定这两种方法均不会漏筛掉 RNA 依赖的阳性克隆, 因此该结果应与实际的最终真阳性克隆数相符

由表 1 可以看出, 采用克隆颜色鉴定与 5-氟乳清酸负性筛选相结合的方法, 大大地提高了三杂交系统筛库的效率. 以人肝 cDNA 库筛选为例, 如果只采用颜色筛选, 则要对 36 个纯白克隆进行鉴定, 而这 36 个克隆中只有 1 个是 RNA 依赖的真阳性克隆, 这是一个十分繁琐的过程. 如果只采用 5-氟乳清酸负性筛选, 即用不含 ADE2 基因的三杂交原始 RNA 质粒

pIII/MS2 作为 RNA 诱饵质粒, 则要对整个筛库过程中出现的所有 his⁺克隆(约 500 个)进行分析, 这也是繁琐的. 如果这两种方法都不采用, 而是像双杂交系统一样逐个分析克隆, 要从这么多 (>99%)的假阳性克隆中分析到真正 RNA 依赖的克隆是不可能的. 由此可见采用克隆颜色鉴定与 5 氟乳清酸负性筛选相结合的方法, 极大地提高了三杂交系统筛库的效率, 这一改进将大大推动三杂交系统在筛选新的 RNA 结合蛋白中的运用.

根据筛选 NF-IL6 3' UTR 结合蛋白实验的经验, 我们推荐的一个三杂交系统筛库的流程是: 以含 ADE2 标志的 RNA 质粒构建 RNA 诱饵, 转入酵母后, 在筛库过程中不对 RNA 质粒的 Ura 标记进行筛选, 而只对库质粒的标记 Leu 和报告基因 His 进行筛选, 挑选 SD-Leu/His/3AT 平板上长出的原始纯白克隆, 测定其 β -半乳糖苷酶活力并进行 FOA 负筛, 对通过这两项检测的克隆进行进一步的 RNA 丢失和 RNA 诱饵再转入实验以确定其 RNA 依赖性.

致谢 本工作为国家“863”计划(批准号: 863-102-11-03-04)资助项目. 感谢 Wisconsin 大学的 Wickens 教授提供酵母三杂交系统, Wickens 实验室的 Zhang Beilin 在实验中给了许多有益的讨论; 同样感谢 Wisconsin 大学的 P. James 博士提供酵母基因组库 Y2HL 和中国科学院上海生命研究院生物化学与细胞生物学研究所的汪垣教授提供人正常肝细胞 cDNA 库.

参 考 文 献

- 1 Sengupta D J, Zhang B, Kraemer B, et al. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93: 8496~8501
- 2 Bacharach E, Goff S P. Binding of the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein to the yeast three-hybrid system. *J Virol*, 1998, 72: 6944~6949
- 3 Lee Eg, Yeo A, Kraemer B, et al. The gag domains required for avian retroviral RNA encapsidation determined by using two independent assays. *J Virol*, 1999, 73: 6282~6292
- 4 Wang Z F, Whitfield M L, Ingledue III T C, et al. The protein that binds the 3' end of histone mRNA: a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing. *Genes Development*, 1996, 10: 3028~3040
- 5 Zhang B, Gallegos M, Puoti A, et al. A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germ line. *Nature*, 1997, 390: 477~484
- 6 Jan E, Motzny C K, Graves L E, et al. The STAR protein, GLD1, is a translational regulator of sexual identity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*, 1999, 18: 258~269
- 7 Toh-e A, Wickner R B. Curing of the 2 μ DNA plasmid from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1981, 145: 1421~1424
- 8 Park Y M, Tan S L, Katze M G. Differential sensitivity to 5-fluoroorotic acid as a screen for bait RNA-independent false positives in a yeast three-hybrid system. *Biotechniques*, 1999, 26: 1102~1106
- 9 Boeke J D, Trueheart J, Natsoulis G, et al. 5'-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol*, 1987, 154: 164~175
- 10 James P, Halladay J, Craig E A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 1996, 144: 1425~1436
- 11 刘定干, 李载平, 申良静男, 等. 回复系 RR 中一种与回复相关的蛋白表达增强. *中国科学, B 辑*, 1995, 25(4): 372~378
- 12 Gietz D, St Jean A, Woods R A, et al. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 1425
- 13 Bartel P L, Chien C T, Sternglanz R, et al. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In: Hartley D A, ed. *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 1993. 153~179

(2000-01-10 收稿, 2000-05-24 收修改稿)