

## 细菌双杂交系统的改进

王俊阳<sup>1</sup>, 王为善<sup>2</sup>, 赵华<sup>1</sup>, 杨克迁<sup>2</sup>

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

王俊阳, 王为善, 赵华, 等. 细菌双杂交系统的改进. 生物工程学报, 2016, 32(2): 231-240.

Wang JY, Wang WS, Zhao H, et al. The modified bacterial two-hybrid system. Chin J Biotech, 2016, 32(2): 231-240.

**摘要:** 解析蛋白质之间的相互作用, 对理解调控和代谢等生物学过程具有重要意义。其中基于互补腺苷酸环化酶功能的细菌双杂交系统是一种研究蛋白质之间相互作用的有效手段。本文在利用该系统时发现存在假阳性高的缺陷。进一步报告基因活性分析表明产生假阳性的原因是不同克隆的生理状态影响了 LacZ 的输出, 即 lacZ 启动子除了受 cAMP 信号分子的控制, 还受到其他调控蛋白的直接或间接的调控。为了降低生理因素对报告基因的影响, 我们向该系统引入用多拷贝 lacZ 启动子控制的 *gfp* 报告基因。这不仅通过增加 lacZ 启动子的数量, 弱化了生理因素的影响; 还实现了第二个报告基因 *gfp* 与 lacZ 同时报告蛋白质之间的相互作用情况, 提高了输出的准确性。系统的实验验证表明, 我们改进的细菌双杂交系统的灵敏性确实得到大幅提高。

**关键词:** 细菌双杂交系统, 灵敏性, 蛋白质相互作用, 改进

## The modified bacterial two-hybrid system

Junyang Wang<sup>1</sup>, Weishan Wang<sup>2</sup>, Hua Zhao<sup>1</sup>, and Keqian Yang<sup>2</sup>

1 Institute of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resource, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Bacterial two-hybrid system is a newly developed method for studying protein-protein interactions. However, in our studies of the interaction of regulatory proteins in *Streptomyces*, it was found that the bacterial two-hybrid system is not sensitive enough by the blue-and-white selection on X-gal plate. To overcome this drawback, the reason of false

**Received:** April 5, 2015; **Accepted:** May 21, 2015

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31400034, 31130001), the Ministry of Science and Technology of China (No. 2013CB734001).

**Corresponding authors:** Keqian Yang. Tel/Fax: +86-10-64807459; E-mail: yangkq@im.ac.cn

Hua Zhao. Tel/Fax: +86-22-60601396; E-mail: zhaohua@tust.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31400034, 31130001), 国家科技部基金 (No. 2013CB734001) 资助。

网络出版时间: 2015-06-08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150608.1423.004.html>

positive clone was firstly determined, which was the disturbance of other direct or indirect regulation on *lacZ* promoter. Then the disturbance was diluted by introducing multicopy *lacZ* promoter, which drive another reporter gene *gfp*. By such design, the sensitivity of the modified bacterial two-hybrid system was significantly improved and the two different reporters also help to decrease the rate of the false positive clones. Further the evaluation of the modified bacterial two-hybrid system indicated that the sensitivity was significantly improved.

**Keywords:** bacterial two-hybrid system, sensitivity, protein-protein interactions, improvement

基于腺苷酸环化酶的细菌双杂交系统利用了百日咳博代杆菌 *Bordetella pertussis* 中 *cya* 基因编码的钙调蛋白 (CaM) 依赖性腺苷酸环化酶激活区可以分成 T18 和 T25 两个相对独立的功能片段<sup>[1]</sup>的特点, 当这两种片段在大肠杆菌 BTH101 (*cya*<sup>-</sup>) 中作为两个独立的实体表达时, 它们不能彼此识别与作用, 因此不能互补大肠杆菌 BTH101 的 *cya* 缺陷型性状, 表现为  $\beta$ -半乳糖苷酶活性很低, 生长在涂有 X-gal 的平板上的菌落呈白色。若这两个功能区分别与一对可相互作用的蛋白质融合表达, 它们可形成有功能的腺苷酸环化酶, 互补大肠杆菌 BTH101 的 *cya*<sup>-</sup> 缺陷型, 使菌株的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性上升, 生长在涂有 X-gal 的平板上的菌落显蓝色<sup>[2-3]</sup>。因此可以方便地应用该双杂交系统, 通过蓝白斑筛选来高效地鉴定蛋白质间的相互作用<sup>[4-7]</sup>。

与酵母双杂交系统<sup>[8]</sup>相比, 细菌双杂交系统具有一些优点<sup>[3]</sup>: 大肠杆菌比酵母菌生长繁殖快、转化效率高、遗传操作方便, 可进行快速高通量的研究<sup>[2]</sup>; 适用范围广, 可用于研究膜蛋白的相互作用<sup>[9]</sup>等, 细菌双杂交系统被广泛应用于功能基因组学的研究<sup>[10]</sup>。但是, 在使用过程中我们发现, 细菌双杂交系统和酵母双杂交系统都具有检测灵敏度不高, 从而导致假阳性和假阴性高发的缺陷。因此, 提高细菌双杂交系统的检测灵敏度, 有助于该方法更广泛地应用

于研究细菌的蛋白质间的相互作用。

链霉菌能够产生丰富的次级代谢产物<sup>[11]</sup>, 目前临床上应用的抗生素约 2/3 由该属产生, 因此链霉菌被称为药物合成的天然工厂<sup>[12]</sup>。对链霉菌的基础及应用研究目前已深入展开, 相对于其他原核生物, 链霉菌具有较大的基因组和较复杂的调控系统 (约 8 M 基因组, 编码约 8 000 多个基因, 以及多达 12% 的基因编码调控蛋白)<sup>[13-18]</sup>。近期研究表明, 调控蛋白之间的相互作用形成的异源二聚体在调控过程中发挥着重要作用<sup>[19]</sup>。因此, 研究链霉菌体内相互作用的蛋白显得尤为重要。我们希望采用基于腺苷酸环化酶的细菌双杂交技术来筛选链霉菌已知靶蛋白的调控蛋白, 但是在研究过程中发现此方法的检测灵敏度较低, 假阳性高发。为了使细菌双杂交系统能够更精确地用于筛找相互作用的蛋白质, 本文以探究该细菌双杂交系统灵敏度低的原因作为切入点, 进而根据具体原因采取相应策略, 改进了此细菌双杂交系统的灵敏度, 为研究链霉菌及其他细菌蛋白质之间的相互作用提供更好的方法支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109, *E. coli*

BTH101 (*cya*<sup>-</sup>)<sup>[3]</sup>菌株和质粒 pIJ8660<sup>[20]</sup>为本实验室保存;质粒 pKT25linker、pUT18Clinker、pT25-zip 和 pT18-zip 由法国国家科学研究院 Emmanuelle Bouveret 惠赠<sup>[3]</sup>;质粒 pKT25-scbR、pTW1、pTW2、pTW1-1、pTW1-2、pTW1-3、pTW1-4、pTW1-5 和 pTW1-6 为本实验室构建。

### 1.1.2 试剂和酶

本研究所用 Phusion DNA 聚合酶, KOD plus DNA 聚合酶, 2×*Taq* mix 和 *Taq* DNA 连接酶均购自 Biolink; dNTPs 购自 TaKaRa 公司;高纯质粒小量快速提取试剂盒和胶回收试剂盒购自北京博迈德生物技术有限公司;引物在上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.1.3 主要仪器

超低温冰箱 (DW-86L626), 酶标仪 (Synergy H4 Hybrid Reader), 台式离心机 (Sorvall legend RT+ centrifuge), PCR 仪 (DNA Engine Peltier Thermo Cycler)。

### 1.1.4 引物

本研究所用引物见表 1。

## 1.2 方法

### 1.2.1 质粒的构建

构建质粒 pKT25-scbR: 以天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 基因组为模板, 用表 1 中的引物 pKT25-scbR-F/R 扩增基因 *scbR* 片段, 以质粒 pT25zip 为模板, 用表 1 中 pKT-F/R 引物扩增 pKT25 骨架片段, 扩增出的基因片段经过琼脂糖凝胶电泳分析后, 用胶回收试剂盒回收 DNA 片段, 两个片段 Gibson 组装连接<sup>[21]</sup>。

构建质粒 pTW1: 分别以质粒 pT25-zip 和 pT18-zip 为模板, 用表 1 中引物 pTW1-18-F/R 和 pTW1-F/R 扩增基因片段 T18, 以及 pTW1-25 骨架, 两个片段 Gibson 组装连接<sup>[21]</sup>。

构建质粒 pTW2: 以 pIJ8660 为模板, 用表 1 中引物 pTW2-gfp-F/R 扩增 *gfp* 片段, 以 *E. coli* BTH101 为模板用表 1 中引物 pLac-F/R 扩增 *LacZ* 启动子序列, 同时以 pUT18Clinker 为模板, 用引物 pTW2-F/R 扩增 pTW2 骨架, 3 个扩增片段用 Gibson 法组装成质粒<sup>[21]</sup>。

构建质粒 pTW1-1: 用表 1 中引物 pTW1-1-18-F/R 和 pTW1-1-F/R, 分别以质粒 pT18-zip 和 pT25-zip 为模板进行 PCR 反应, 将产物用 Gibson 体系组装<sup>[21]</sup>。

构建质粒 pTW1-2: 以 pT18-zip 为模板, pTW1-2-18-F/R 为引物, PCR 扩增出 T18 基因序列, 以 pT25-zip 质粒为模板, 用 pTW1-2-F/R 引物扩增 pTW1-2 质粒骨架, Gibson 组装构建质粒<sup>[21]</sup>。

构建质粒 pTW1-3: 以质粒 pKT25-scbR 为模板, 用表 1 中引物 pTW1-3ScbR-F/R 进行 PCR 扩增, 得 *ScbR* 基因片段, 以质粒 pTW1-2 为模板, 用表 1 中 pTW1-3-F/R 引物进行 PCR, 得到 pTW1-3 骨架片段, Gibson 连接两个片段<sup>[21]</sup>。

构建质粒 pTW1-4: 以天蓝色链霉菌基因组为模板, 分别以表 1 中 pTW1-4bldM-F/R 和 pTW1-4whiI-F/R 为引物扩增 DNA 片段 *bldM* 和 *whiI*, 以 pT18-zip 质粒为模板, 引物用表 1 中的 pTW1-4-18-F/R, 扩增 T18 片段; 以质粒 pTW1-1 为模板, 以表 1 中的 pTW1-4-F/R 为引物, 扩增 pTW1-4 的线性 DNA 序列, 将 4 个 DNA 片段 Gibson 组装<sup>[21]</sup>, 构建质粒。

构建质粒 pTW1-5: 以天蓝色链霉菌基因组为模板, 以表 1 中 pTW1-5bldm-F/R 为引物扩增 DNA 片段 *bldM*, 以质粒 pTW1-3 为模板, 用表 1 中引物 pTW1-5-F/R, 扩增 pTW1-5 线性片段, 两片段 Gibson 组装构建环状质粒<sup>[21]</sup>。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
pKT25-scbR-F	AGGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCTATGGCCAAGCAGGACCCGGGCGATC
pKT25-scbR-R	ACGGCCAGTGAATTCTTACTTACTTAGGTACCCCTCAGTCCTTCCCGGTCCGGTG
pKT-F	TCGCGGCCGAAGTGGCACCCGACCCGGGAAGGACTGAGGGGTACCTAAGTAAGTAAG
pKT-R	TGCCGCGTGCGGATCGCCCCGGTCTGCTTGGCCATAGGTACCCGGGGATCCTCTAG
pTW1-18-F	AGGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCTTTTACACTTTATGCTTCCGGCTC
pTW2-18-R	ACGGCCAGTGAATTCTTACTTACTTAGGTACCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGAC
pTW1-F	ACGCCACTGCAGGTGCGACTCTAGAGGATCCCCGGGGTACCTAAGTAAGTAAG
pTW1-R	ACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAG
Gfp-F	AGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACTATCATTTGTACAGTTCATCC
Gfp-R	TCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTATGATAATTCTAAGTAGCTGAC
pLac-F	TCCTCATCCTGTCTCTTGTGTCAGCTACTTAGAATTATCATAGCCAGCTTTCATCAAC
pLac-R	ACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCTCGGTAGTGGGATACGAC
pTW2-F	AGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
pTW2-R	TCACGCATGGTATGGATGAACTGTACAAATGATAGTTAAGCCAGCCCCGACAC
pTW1-1-18-F	AGTTGCGCGCCTGAAAAAACTGGTGGGTGAACGTTTTACACTTTATGCTTCCGGCTC
pTW1-1-18-R	ACGACGGCCAGTGAATTCTTACTTACTTAGGTACCCCGAATTCACGTTACACCA
pTW1-1-F	TGAAAAAACTGGTGGGTGAACGTTGGGAATTCGGGGTACCTAAGTAAGTAAG
pTW1-1-R	ACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAG
pTW1-2-18-F	AGTTGCGCGCCTGAAAAAACTGGTGGGTGAACGTTTTACACTTTATGCTTCCGGCTC
pTW1-2-18-R	ACGGCCAGTGAATTCTTACTTACTTAGGTACCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGAC
pTW1-2-F	TGGAACGCCACTGCAGGTGCGACTCTAGAGGATCCCCGGGGTACCTAAGTAAGTAAG
pTW1-2-R	ACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAG
pTW1-3ScbR-F	TGCAGGGTGCAGTCTAGAGGATCCCCGGGTACCTATGGCCAAGCAGGACCG
pTW1-3ScbR-R	ACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAATCAGTCCTTCCCGGTCCGGTG
pTW1-3-F	TCGCGGCCGAAGTGGCACCCGACCCGGGAAGGACTGATTTACACTTTATGCTTCC
pTW1-3-R	TCTGCCGCGTGCGGATCGCCCCGGTCTGCTTGGCCATAGGTACCCGGGGATCCTCTAG
pTW1-5bldm-F	TGCAGGGTGCAGTCTAGAGGATCCCCGGGTACCTGTGTCCGTTCTCCTCGAGCAG
pTW1-5bldm-R	ACGGCCAGTGAATTCTTACTTACTTAGGTACCCCTCAGTGGATGATGCCCCGTG
pTW1-5-F	TCGCGGTGGCCCTGCGCACGGGCATCATCCACTGAGGGGTACCTAAGTAAGTAAG
pTW1-5-R	AGGCTTGCAGGCTGCTCGAGGAGAACGGACACAGGTACCCGGGGATCCTCTAG
pTW1-6whiI-F	CTGCAGGGTGCAGTCTAGAGGATCCCCGGGTACCTGTGGCAGCACCCGAGAACTAC
pTW1-6whiI-R	ACGGCCAGTGAATTCTTACTTACTTAGGTACCCCTCACTTCAGGAAGTCCGGCAC
pTW1-6-F	AGGAACTGGACGTGCCGACTTCTGAAGTGAGGGGTACCTAAGTAAGTAAG
pTW1-6-R	TGATGACTGCGAGGTAGTTCTGCGGTGCTGCCACAGGTACCCGGGGATCCTCTAG
pTW1-4bldM-F	TGCAGGGTGCAGTCTAGAGGATCCCCGGGTACCTGTGTCCGTTCTCCTCGAGCAG
pTW1-4bldM-R	AGTGAATTCTTACTTACTTAGGTACCCCTCAGTGGATGATGCCCCGTGCGCAG
pTW1-4whiI-F	AACGCCACTGCAGGTGCGACTCTAGAGGATCCCCGGTGGCAGCACCCGAGAACTAC
pTW1-4whiI-R	TGAGAGTGCACCATATTACTTAGTTATATCGATTCACTTCAGGAAGTCCGGCAC
pTW1-4-F	TCGCGGTGGCCCTGCGCACGGGCATCATCCACTGAGGGGTACCTAAGTAAGTAAG
pTW1-4-R	ACTGCGAGGTAGTTCTGCGGTGCTGCCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTG
pTW1-4-18-F	TCGCGGTGGCCCTGCGCACGGGCATCATCCACTGAGGGGTACCTAAGTAAGTAAG
pTW1-4-18-R	TGATGACTGCGAGGTAGTTCTGCGGTGCTGCCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGAC

构建质粒 pTW1-6 :以天蓝色链霉菌基因组为模板,以表 1 中 pTW1-6whiI-F/R 为引物扩增 DNA 片段 *whiI*,以质粒 pTW1-3 为模板,用表 1 中引物 pTW1-6-F/R,扩增 pTW1-6 线性片段,两片段 Gibson 组装构建环状质粒<sup>[21]</sup>。上述质粒的具体构建方法参考文献[22]。

### 1.2.2 细菌双杂交系统假阳性评价方法

将天蓝色链霉菌中的重要调控蛋白 ScbR 的编码基因与细菌双杂交系统中的 T25 片段融合构建成质粒 pKT25-ScbR,转化质粒 pKT25-ScbR 与质粒 pUT18Clinker 入 BTH101 菌中(实验组同时作为阴性对照),并设置阳性对照(质粒 pT25-*zip* 和 pT18-*zip* 同时转化入 BTH101)、阴性对照 1 (pKT25linker 和 pUT18Clinker 质粒同时转化入 BTH101) 和阴性对照 2 (质粒 pT25-*zip* 和 pUT18Clinker 同时转化入 BTH101),经过转化获得外源质粒的菌被涂布于含有合适抗生素的 LB 平板上(含 0.5 mmol/L IPTG 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  X-gal),30  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后,观察 LB-X-gal 平板上菌落的显色反应。

### 1.2.3 细菌双杂交系统酶活检测方法

$\beta$ -半乳糖苷酶酶活测定方法参考 Battesti 等的方法<sup>[3]</sup>。

### 1.2.4 细菌双杂交系统的改进策略

将构建的质粒 pTW1-2 和 pWT2 同时转入 *E. coli* BTH101 菌中,作为阴性对照 1,阴性对照 2 为含有外源质粒 pTW1-3 和 pWT2 的 *E. coli* BTH101 菌,获得质粒 pTW1-1 和 pTW2 的 *E. coli* BTH101 菌作为阳性对照组,通过和假阳性评价方法中一样的操作步骤,观察各个 LB-X-gal 平板上菌落的显色情况,并分析  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性,同时,从每个平板上挑取单菌落接入液体 LB 培养基中培养 24 h,再从每种培养液中取

出 200  $\mu\text{L}$  (共取 4 次)置于 96 微孔板中,用酶标仪(激发光为 488 nm,发射光为 529 nm)检测蛋白 GFP 的荧光值<sup>[23]</sup>。

### 1.2.5 改进的细菌双杂交系统的验证方法

用天蓝色链霉菌蛋白 BldM 或 WhiI 的编码基因分别与 T18 和 T25 融合构建质粒 pTW1-5 或 pTW1-6,把基因 *bldM* 和 *whiI* 共同插入 pTW1 质粒与 T25 和 T18 融合构建 pTW1-4 质粒,然后将质粒 pTW1、pTW1-4、pTW1-5、pTW1-6 分别与质粒 pTW2 共同转化入 *E. coli* BTH101 (其中共同转入质粒 pTW2 和 pTW1-4 的一组为阳性对照,其余组合为阴性对照),按照与上步方法一样的操作,观察 LB-X-gal 平板上菌落的显色情况,分析酶活,同时用酶标仪检测报告基因 *gfp* 的荧光值。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌双杂交系统的灵敏度分析

在基于腺苷酸环化酶的细菌双杂交系统中,质粒 pKT25linker 和 pUT18Clinker 分别含有腺苷酸环化酶激活区的 T25 和 T18 两个相对独立的功能片段;质粒 pT25-*zip* 和 pT18-*zip* 含有能相互作用的 *zip* 基序 (Leucine zipper motif)<sup>[24]</sup>,用于表达融合蛋白 T25-*zip* 和 T18-*zip*。通过两个 *zip* 之间的互作,可以重建腺苷酸环化酶的活性<sup>[3]</sup>。为了筛找能与天蓝色链霉菌调控蛋白 ScbR 互作的调控蛋白,我们构建质粒 pKT25-ScbR,希望通过该细菌双杂交技术筛选与其相互作用的蛋白。

首先对该细菌双杂交系统的灵敏性进行评鉴,结果表明,阳性对照 *E. coli* BTH101 (pT25-*zip*+pT18-*zip*) 的菌落能够在 X-gal 平板上显蓝色(图 1A),阴性对照 *E. coli* BTH101

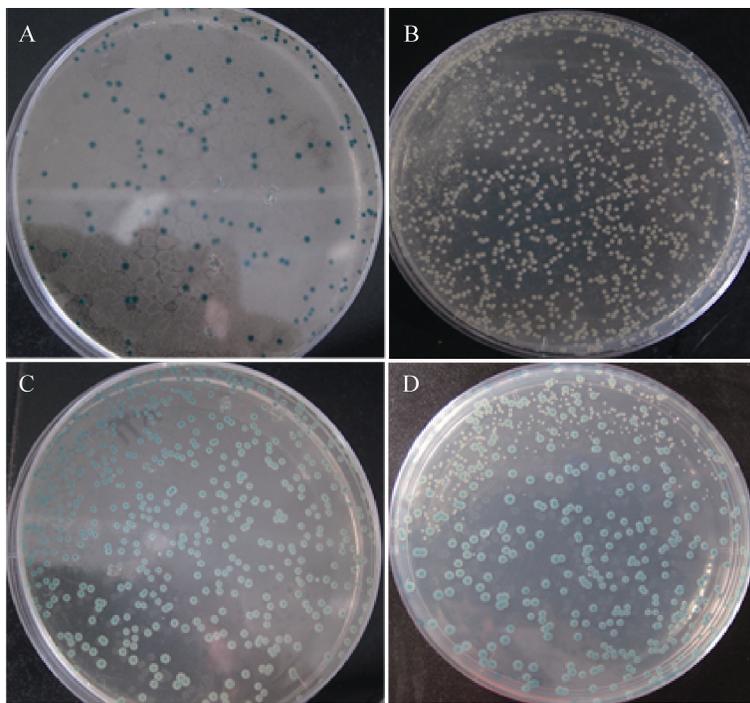


图 1 蓝白斑评价细菌双杂交系统的灵敏性

Fig. 1 The phenotype of different clones. (A) The phenotype of *E. coli* BTH101 (pT25-*zip*+pT18-*zip*). (B) The phenotype of *E. coli* BTH101 (pKT25linker+pUT18Clinker). (C) The phenotype of *E. coli* BTH101 (pKT25-*scbR*+pUT18Clinker). (D) The phenotype of *E. coli* BTH101 (pT25-*zip*+pUT18Clinker). The transformants were spreaded on plates with 0.5 mmol/L IPTG and 40  $\mu$ g/mL X-gal.

(pKT25linker+pUT18Clinker) 的菌落在 X-gal 平板上没有显蓝色 (图 1B); 然而随着培养时间的延长, 阴性对照 1 的克隆也会逐渐显蓝色 (结果未展示)。而另外两组阴性对照 *E. coli* BTH101 (pKT25-*scbR*+pUT18Clinker) 和 *E. coli* BTH101 (pT25-*zip*+pUT18Clinker) 在 X-gal 平板上有部分克隆却显示为蓝色 (图 1C 和 1D), 这些结果表明该细菌双杂交系统的 LacZ 报告输出不灵敏, 单纯的靠显色反应分辨阳性克隆存在一定的假阳性。

## 2.2 LacZ 酶活分析

为了分析该细菌双杂交系统依靠蓝白斑显色反应鉴定阳性克隆不灵敏的原因, 随机挑取以

上克隆, 进一步对 LacZ 活性进行定量分析, 结果表明阴性对照 *E. coli* BTH101 (pKT25-*scbR*+pUT18Clinker) 和阴性对照 *E. coli* BTH101 (pT25-*zip*+pUT18Clinker) 不同的克隆之间有较大的酶活差异, 而阳性对照 *E. coli* BTH101 (pT25-*zip*+pT18-*zip*) 和阴性对照 *E. coli* BTH101 (pKT25linker+pUT18Clinker) 的酶活相对比较稳定 (图 2)。这表明该细菌双杂交系统灵敏度低的原因确实是由于不同克隆间 LacZ 酶活有较大差异造成的。阳性克隆中, *lacZ* 基因的表达响应的是腺苷酸环化酶产生的 cAMP 信号, 而在假阳性克隆中, 由于存在非特异性相互作用, 存在 cAMP 和除 cAMP 信号之外的

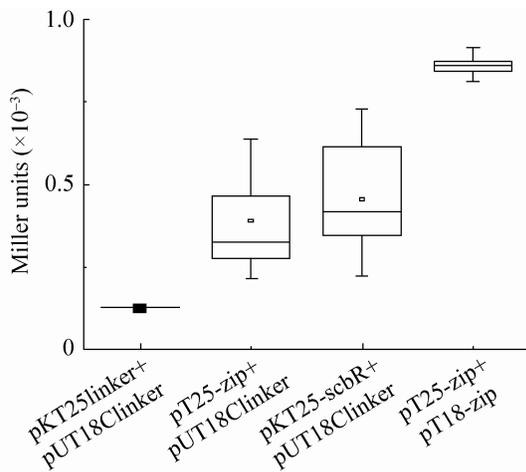


图2 细菌双杂交系统 LacZ 输出的灵敏性分析

Fig. 2 The sensitivity of LacZ assay of bacterial two-hybrid system. The box-plot indicates the range of LacZ activities of random picked clones from selection plates. Box and Whisker plots provide a simple description of a distribution of values by depicting the 25 th and the 75 th percentile values as the bottom and top of a box, respectively. The median is depicted as a line across the box. The values are  $\bar{x} \pm s$  from three independent experiments.

其他生理因素对 *lacZ* 表达的影响, 如在该系统 中, 除了 cAMP 和激活蛋白 CAP 结合后激活了 *lacZ* 基因的启动子<sup>[3]</sup>, *lacZ* 启动子还受到 LacI 等其他调控蛋白的直接或间接调控, 所以不同克隆的生理状态也可能会影响 *lacZ* 的表达。

### 2.3 细菌双杂交系统的改进

在该细菌双杂交系统中, 蛋白质之间相互作用产生的 cAMP 信号为控制 LacZ 输出的主效信号, 而其他的生理因素为非主效信号。因此为了提高该系统的灵敏度, 应该降低本底 cAMP 信号 (非特异性相互作用产生 cAMP 信号) 和非主效的生理因素对该系统的影响。我们通过增加 *lacZ* 启动子的数量来缓冲本底 cAMP 信号和非主效的生理因素的影响, 同时, 为了提高

双杂交系统的报告基因输出的灵敏性, 降低假阳性发生的概率, 采用了第二个报告基因 *gfp*。改进后的双杂交系统, 含有用 *lacZ* 启动子控制的 *gfp* 报告基因的低拷贝质粒 pWT2 (图 3A), 因此该系统兼具蓝白斑高效筛选和 GFP 高效定量的双重优势。

实验结果表明, 阴性对照 *E. coli* BTH101 (pTW1-2+pWT2) 和 *E. coli* BTH101 (pTW1-3+pWT2) 的检测结果都明显低于阳性对照 *E. coli* BTH101 (pTW1-1+pWT2) (图 3B 和 3C)。同时, GFP 作为报告输出的灵敏性明显好于 LacZ。这可能是由于 *gfp* 在游离质粒上拥有多个拷贝, 测得的 GFP 结果为多个 *lacZ* 启动子的综合效应, 显著抵消了非特异信号和生理扰动; 而 *lacZ* 只在基因组上存在一个拷贝, 所以报告输出的结果的相对差异略大于 GFP。总之, 无论用 LacZ 活性分析还是 GFP 荧光强度分析, 改进的细菌双杂交系统的灵敏性确实得到了明显的改善。

### 2.4 改进的细菌双杂交系统的验证

Mark J. Buttner 课题组最近报道天蓝色链霉菌的 BldM 和 WhiI 蛋白之间存在相互作用<sup>[19]</sup>。为了验证改进的双杂交系统的灵敏性, 分别将 BldM 或 WhiI 与 T25 融合构建质粒 pTW1-5 或 pTW1-6 (图 3A), 以及把 BldM、WhiI 分别插入 pTW1 质粒, 与 T25 和 T18 融合构建 pTW1-4 质粒 (图 3A)。然后测试双杂交系统对它们的响应, 结果如图 4 所示, 表明改进后的双杂交系统测试的 BldM 和 WhiI 相互作用的结果与结果 3 中 Zip 相互作用的结果相似: 无论 GFP 还是 LacZ 输出的阳性结果都显著高于各个阴性对照。因此, 改进后的细菌双杂交系统具有更灵敏的报告输出, 能够明显降低假阳性的发生。

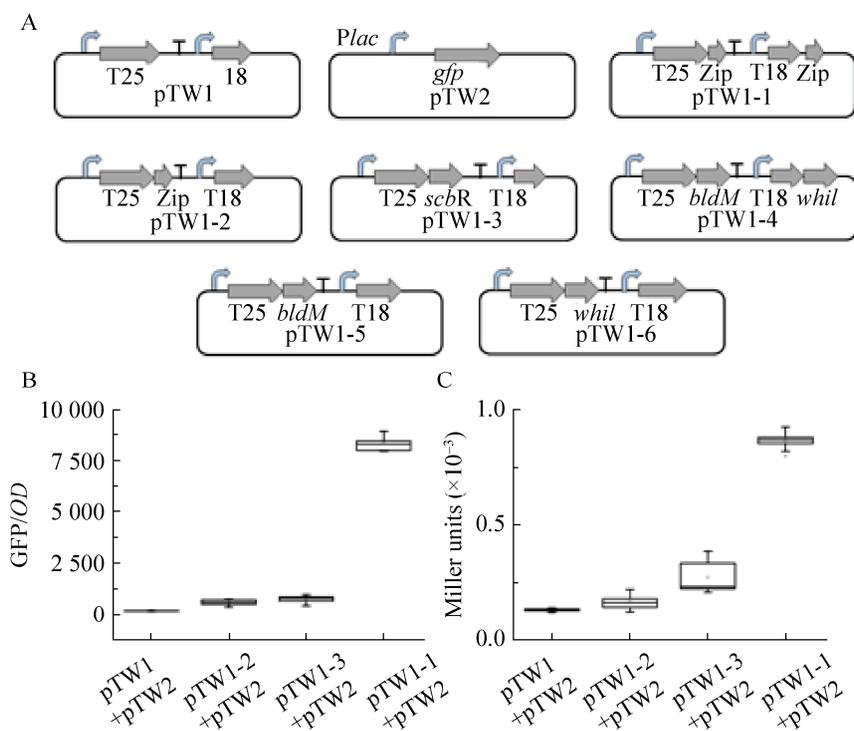


图 3 改进的细菌双杂交系统

Fig. 3 The improved bacterial two-hybrid system. (A) The plasmids of the improved bacterial two-hybrid system. (B) The evaluation of the GFP output of the improved bacterial two-hybrid system. (C) The evaluation of the LacZ output the improved bacterial two-hybrid system. The values are  $\bar{x} \pm s$  from three independent experiments.

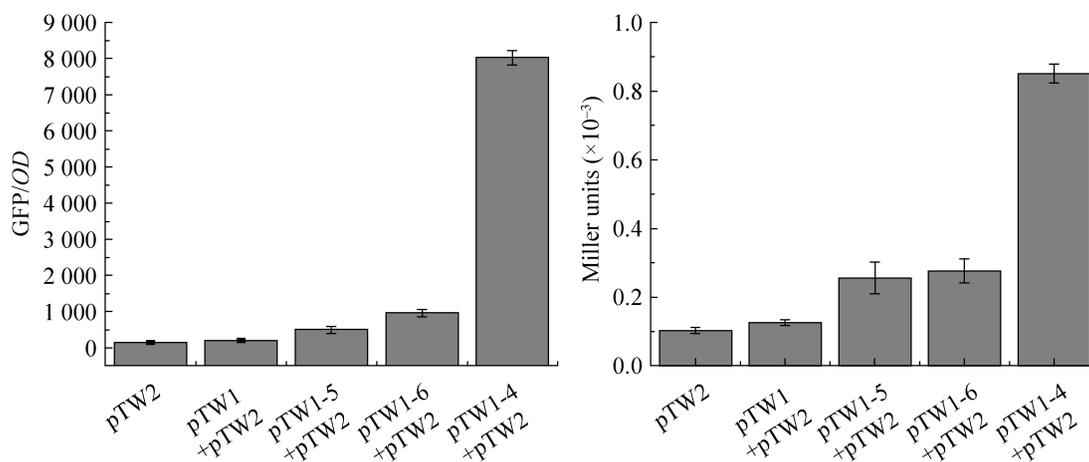


图 4 改进的细菌双杂交系统的验证

Fig. 4 The verification assays of the GFP and LacZ output of the improved bacterial two-hybrid system. Green fluorescence and LacZ activity of different strains was measured after incubation in LB medium for 24 h. The values are  $\bar{x} \pm s$  from three independent experiments.

### 3 讨论

蛋白质之间的相互作用具有重要的生物学意义,基于腺苷酸环化酶功能互补的细菌双杂交系统在鉴定原核生物蛋白之间相互作用中具有无可比拟的优势<sup>[25]</sup>。但是也存在灵敏度不高等问题<sup>[26]</sup>。本工作中,发现该系统灵敏度不高的原因是本底 cAMP 信号及其他内源调控系统对 *lacZ* 启动子的扰动造成的。针对这一发现,本工作创造性地采用了增加 *lacZ* 启动子的拷贝数来缓冲这些内源生理扰动的策略,并收到良好的效果;同时为了更精确地检测细菌双杂交系统的报告输出,本工作采用了 *gfp* 和 *lacZ* 双报告基因的策略, LacZ 可以在平板上定性地高效筛选, GFP 可以在液体培养中精确定量,同时检测两个不同的报告输出将大大降低假阳性的发生。

测试改进的细菌双杂交系统时发现, GFP 输出相对于 LacZ 输出更为灵敏,这可能是由于 *gfp* 在质粒上,表现出多拷贝的累加效应,在一定程度上缓冲了本底 cAMP 信号和其他非主效生理因素的影响。另外,在利用改进的细菌双杂交系统时,首先初步用蓝白斑定性筛选,然后用 GFP 强度进行精确定量分析,将会收到更为理想的效果。总之,本研究改进的细菌双杂交系统的灵敏性得到了显著提高,有助于利用其更精确地研究原核生物蛋白质之间的相互作用。

### REFERENCES

- [1] Munier H, Krin E, Gilles AM, et al. Structural and functional organization of the catalytic domain of a bacterial toxin: *Bordetella pertussis* adenylate cyclase//Papa S, Azzi A, Tager JM, Eds. Adenine Nucleotides in Cellular Energy Transfer and Signal Transduction: Molecular and Cell Biology Updates. Basel: Birkhäuser, 1992: 335–344.
- [2] Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, et al. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(10): 5752–5756.
- [3] Battesti A, Bouveret E. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. Methods, 2012, 58(4): 325–334.
- [4] Karimova G, Ullmann A, Ladant D. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin as a tool to analyze molecular interactions in a bacterial two-hybrid system. Int J Med Microbiol, 2000, 290(4/5): 441–445.
- [5] Karimova G, Ullmann A, Ladant D. A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. Methods Enzymol, 2000, 328: 59–73.
- [6] Karimova G, Ladant D, Ullmann A. Two-hybrid systems and their usage in infection biology. Int J Med Microbiol, 2002, 292(1): 17–25.
- [7] Scheu PD, Witan J, Rauschmeier M, et al. CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system *in vivo*. J Bacteriol, 2012, 194(3): 636–645.
- [8] Duan QD, Chen TQ. The principal and development of yeast two-hybrid. J Anim Sci Vet Med, 2009, 28(1): 56–58 (in Chinese).  
段强德, 陈铁桥. 酵母双杂交体系的原理及研究进展. 畜牧兽医杂志, 2009, 28(1): 56–58.
- [9] Karimova G, Dautin N, Ladant D. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. J Bacteriol, 2005, 187(7): 2233–2243.
- [10] Stynen B, Tourneu H, Tavernier J, et al. Diversity in genetic *in vivo* methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. Microbiol Mol Biol Rev, 2012, 76(2): 331–382.
- [11] Hopwood DA, Chater KF, Bibb MJ. Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*

- A3(2), a model streptomycete. *Biotechnology*, 1995, 28: 65–102.
- [12] Liu G, Chater KF, Chandra G, et al. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77(1): 112–143.
- [13] Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, 417(6885): 141–147.
- [14] Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(2): 208–215.
- [15] van Wezel GP, McDowall KJ. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(7): 1311–1333.
- [16] Takano E.  $\gamma$ -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(3): 287–294.
- [17] Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, et al. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(39): 16410–16415.
- [18] Choi SU, Lee CK, Hwang YI, et al.  $\gamma$ -butyrolactone autoregulators and receptor proteins in non-*Streptomyces* actinomycetes producing commercially important secondary metabolites. *Arch Microbiol*, 2003, 180(4): 303–307.
- [19] Al-Bassam MM, Bibb MJ, Bush MJ, et al. Response regulator heterodimer formation controls a key stage in *Streptomyces* development. *PLoS Genet*, 2014, 10(8): e1004554.
- [20] Sun J, Kelemen GH, Fernández-Abalos JM, et al. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 1999, 145(9): 2221–2227.
- [21] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 343–345.
- [22] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1–66.
- [23] Pédelacq JD, Cabantous S, Tran T, et al. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(1): 79–88.
- [24] Karimova G, Ullmann A, Ladant D. Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, 3(1): 73–82.
- [25] Brent R, Finley RL Jr. Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. *Annu Rev Genet*, 1997, 31: 663–704.
- [26] Liao GX, Yu GQ, Zhu JB. Improvement of bacterial two hybrid system. *Acta Biochim Et Biophys Sin*, 2001, 33(3): 331–334 (in Chinese).  
廖贡献, 俞冠翹, 朱家壁. 细菌双杂交系统的应用和改进. *生物化学与生物物理学报*, 2001, 33(3): 331–334.

(本文责编 郝丽芳)