ژنتیک نوین
دوره سوم،شماره۱،بهار ۱۳۸۷
صفحه ۲۸-۵

اساس و کاربرد سیستم دو گانه در مخمر[1]

دکتر ایرج نحوی[1] ، دکتر کامران قائدی[1و2]* ، مریم عباسی دینانی [1]
۱-دانشگاه اصفهان – دانشکده علوم – گروه زیست شناسی
۲-پژ وهشکده رویان پایگاه تحقیقاتی اصفهان – گروه سلولهای بنیادی
*Kamranghaedi@yahoo.com
Tel: 0311-793-2479

چکیده

واکنش های پروتئین – پروتئین برای بیشتر فرآیندهای سلولی از جمله همانندسازی DNA، رونویسی، پردازش، ترجمه، ترشح، کنترل چرخه سلولی، متابولیسم، تشکیل ساختارهای سلولی و کمپلکس های آنزیمی ضروری است. به علاوه امروزه یکی از برنامه های اصلی زیست شناسان تفسیر داده های مربوط به توالی ژنوم است که برای موجودات زنده زیادی تعیین شده است. به خصوص تلاش ها روی ارزیابی عملکرد بیشتر ژن های ناشناخته و پروتئین هایی که آنها رمز می کنند، متمرکز شده است. چون واکنش پروتئین – پروتئین برای همه فرآیندهای سلولی اساسی است، اغلب ممکن است عمل یک پروتئین ناشناخته بوسیله تعیین پروتئین هایی که با آن واکنش می دهند شناسایی شود. سیستم دوگانه سیستمی است که واکنش بین دو پروتئین را بوسیله ساخت مجدد یک عامل رونویسی فعال در شرایط *in vivo* تعیین می کند. بیشتر عوامل رونویسی یوکاریوتی دامنه‌های[2] عملکردی فعال کننده رونویسی و اتصال به DNA دارند که مجزا و قابل جدا کردن می‌باشد. فعال کردن رونویسی می‌تواند به وسیله بیان مستقل دو زنجیره به صورت ترکیبات کیمری[3] با پروتئین هایی که با همدیگر در *in vivo* واکنش می‌دهند صورت گیرد. یک کیمر دارای زنجیره اتصال به DNA ترکیب شده با اولین پروتئین مورد نظر (DB-X یا طعمه[4]) و دیگری یک زنجیره فعال کننده ترکیب شده با پروتئین دوم (AD-Y یا صید[5] یا پروتئین هدف [6]) است.

واژه های کلیدی

سیستم دوگانه در مخمر، واکنش های پروتئین-پروتئین، نقشه واکنش های پروتئینی

1- Yeast two – Hybrid System
2- Domains
3- Chimeric
4- Bait
5- Prey
6- Target Protein

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

واکنش بین DB-X و AD-Y منجر به ساخت عامل رونویسی و در نهایت فعال شدن ژن گزارشگر[1] وارد شده به کروموزوم می‌گردد. وقتی یک مارکر قابل انتخاب مثل ژن *HIS3* به عنوان ژن گزارشگر استفاده شود فعالیت رونویسی وابسته به دوگانه می تواند به وسیله رشد سلولها روی پلیت فاقد هیستیدین مشخص شود. امروزه سیستم دوگانه به عنوان یک ابزار مناسب برای تعیین نقشه واکنش های پروتئینی سلول مد نظر قرار گرفته است. این نقشه ممکن است شامل واکنش های پروتئینی باشد که در طول زندگی یک موجود زنده روی می دهد.

مقدمه

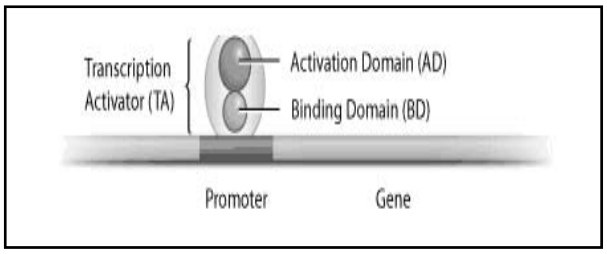
واکنش های پروتئین – پروتئین برای بیشتر فرایندهای سلولی از همانندسازی DNA، رونویسی، پردازش، ترجمه تا ترشح، کنترل چرخه سلولی، متابولیسم، تشکیل ساختارهای سلولی و کمپلکس های آنزیمی ضروری است. تشکیل ساختارهای سلولی بزرگ از قبیل اسکلت سلولی، اسکلت هسته ای و دوک های میتوزی از واکنش های پیچیده بین پروتئین ها ناشی می شود. خصوصیات ساختارهای کوچکتر ازقبیل منافذ هسته [2] ، سنتروزوم ها و کینتوکورها هم تعیین شده اند و در هر مورد واکنش های پروتئین – پروتئین نقش اساسی دارند. در فرایندهای سلولی از قبیل رشد سلول، چرخه سلولی، مسیرهای متابولیک و انتقال سیگنال نیز واکنش های پروتئین – پروتئین نقش کلیدی دارند. بررسی واکنش‌های بین پروتئین‌ها به زیست شناسان اجازه می‌دهد که عمل پروتئین‌های ناشناخته و ژن هایی که آنها را کد می‌کنند تعیین نمایند (۴ و ۵) .به علاوه امروزه یکی از برنامه های اصلی زیست شناسان تفسیر مقدار داده های مربوط به توالی ژنوم است که برای موجودات زنده زیادی تعیین شده است. به خصوص تلاش ها روی ارزیابی عملکرد بیشتر ژن های ناشناخته و پروتئین هایی که آنها کد می کنند متمرکز شده است. چون واکنش های پروتئین – پروتئین برای همه فرایندهای سلولی اساسی است اغلب ممکن است فعالیت یک پروتئین ناشناخته به وسیله تعیین پروتئین هایی که با آن واکنش می دهند شناسایی شود (۱۳ و ۱۵). تکنیک های زیادی برای مطالعه واکنش های پروتئین - پروتئین وجود دارد، از روش های زیست شیمیایی می‌توان ایمونوپرسیپیتیشن همزمان[3] و کروماتوگرافی میل ترکیبی[4] تا روش های ژنتیک مولکولی از قبیل سیستم دوگانه در مخمر را نام برد. به طور کلی دو روش موثر در مطالعه واکنش های پروتئین – پروتئین به کار می‌رود اول خالص سازی کمپلکس‌های پروتئین همراه با اسپکترومتری جرمی[5] و دوم سیستم دوگانه در مخمر است که یک روش حساس *in vivo* برای بررسی واکنش ها است. چهارده سال است که از معرفی این سیستم می‌گذرد. سیستم دوگانه از یک آزمایش ساده برای بررسی واکنش بین پروتئین های شناخته شده به یک سیستم متداول برای تعیین واکنش های جدید از کتابخانه های ژنی[6] پیچیده توسعه یافته است . قابلیت تغییر و حساسیت روش های دوگانه منجر به استفاده در حال رشد آنها در زمینه پروتئومیک شده است (۵)

اساس سیستم دوگانه در مخمر

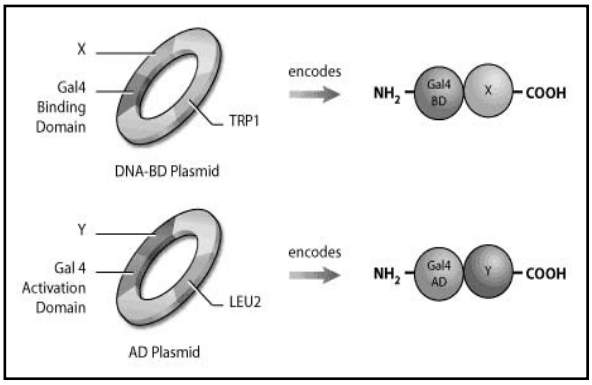
در سال ۱۹۸۹ این سیستم توسط Fields و Song براین اساس بنانهاده شد که بیشتر عوامل رونویسی یوکاریوتی زنجیره های فعال کننده رونویسی و اتصال به DNA قابل جدا شدن و مجزا دارند (شکل ۱). آنها نشان دادند که فعال کردن رونویسی می تواند به وسیله بیان مستقل دو زنجیره، به شکل ترکیبات کیمری با پروتئین هایی که با همدیگر به صورت *in vivo* ترکیب می شوند انجام گیرد (۲ ، ۶ ،۹ ، ۱۲ و۱۳).

1- Reporter gene
2- Nuclear pores
3- Coimmunoprecipitation
4- Affinity chromatography
5- Mass spectrometry
6- Gene library

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]



شکل ۱ : بعضی عوامل رونویسی دارای زنجیره های اتصال به DNA و فعال کننده رونویسی مجزا هستند (۱۸).



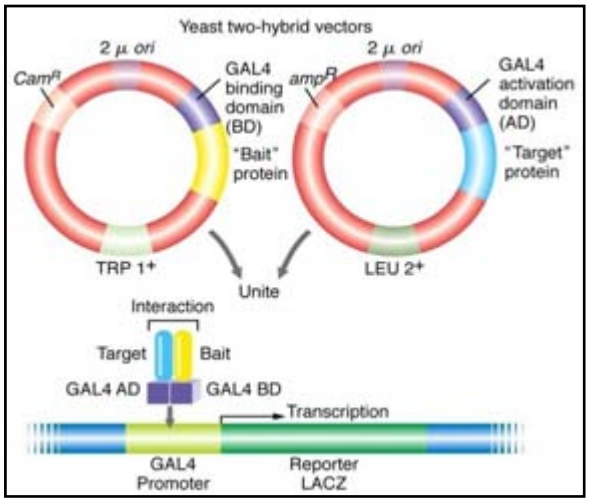
شکل ۲ : پروتئین X همراه با زنجیره اتصال در یک پلاسمید و پروتئین Y همراه با زنجیره فعال کننده در یک پلاسمید دیگر وارد می شود (۱۸).

یک پلاسمید حاوی زنجیره اتصال به DNA که با اولین پروتئین مورد نظر (پلاسمید طعمه یا DB – X پلاسمید) ترکیب شده و پلاسمید دوم دارای یک زنجیره فعال کننده است که با پروتئین دوم (پلاسمید صید یا AD - Y پلاسمید) ترکیب می شود. هنگامی که مخمر با هر دو پلاسمید هم زمان تراریخت شده[۷] هر دو پروتئین در مخمر بیان می شوند و در نتیجه یک پروتئین همراه با زنجیره اتصال فاکتور رونویسی و دیگری همراه با زنجیره فعال کننده فاکتور رونویسی خواهد بود (شکل ۲). واکنش بین AD-Y و DB-X منجر به ساخت فاکتور رونویسی و در نهایت فعال شدن ژن گزارشگر وارد شده به کروموزوم می گردد. وقتی یک ژن گزارشگر قابل انتخاب مثل ژن *HIS3* استفاده شود فعالیت رونویسی وابسته به دو هیبرید می تواند به وسیله رشد سلول ها روی پلیت فاقد هیستیدین مشخص شود (شکل ۳ و ۴). بنابراین سیستم دوگانه مخمر سیستمی است که واکنش بین دو پروتئین را به وسیله ساخت مجدد یک عامل رونویسی فعال به صورت *in vivo* تعیین می کند (۱ ،۲، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۳و ۱۵).

خصوصیات پروتئین های ترکیبی

وقتی که پلاسمیدها در سلول مخمر بیان می شوند، پروتئین های ترکیبی تولید شده بایستی خصوصیاتی داشته باشند تا سیستم بتواند به درستی عمل کند. این خصوصیات عبارتنداز(۲ و ۴) :

۱. ثبات پروتئین در مخمر
۲. توانایی ورود به هسته (به عنوان مثال GAL 4 دارای سیگنال ورود به هسته[۸] است، اما LexA فاقد آن است. بنابراین با آنتی ژن T بزرگ SV40 ترکیب می شود.)

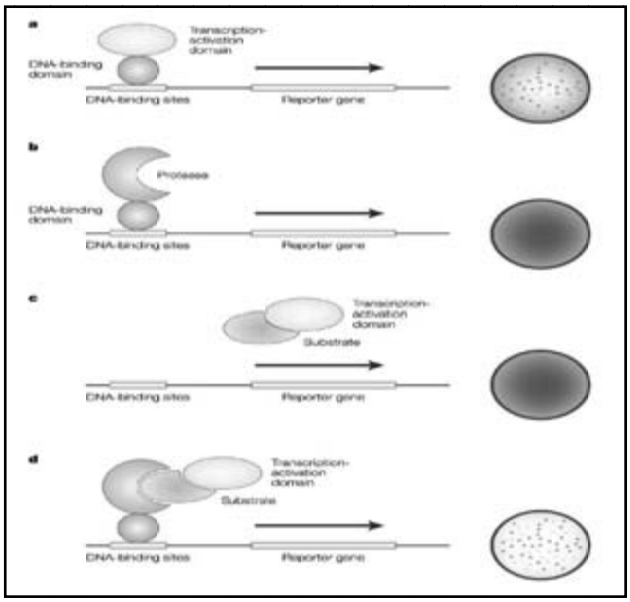


شکل ۳ : بیان پلاسمیدهای حاوی DB – X و AD – Y به طور همزمان در مخمر . در صورتیکه پروتئین ها با همدیگر واکنش دهند یک عامل رونویسی کامل تشکیل می شود و منجر به بیان ژن گزارشگر می گردد (۱۹) .

7- Cotransformation

8- Nuclear localization signal (NLS)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]



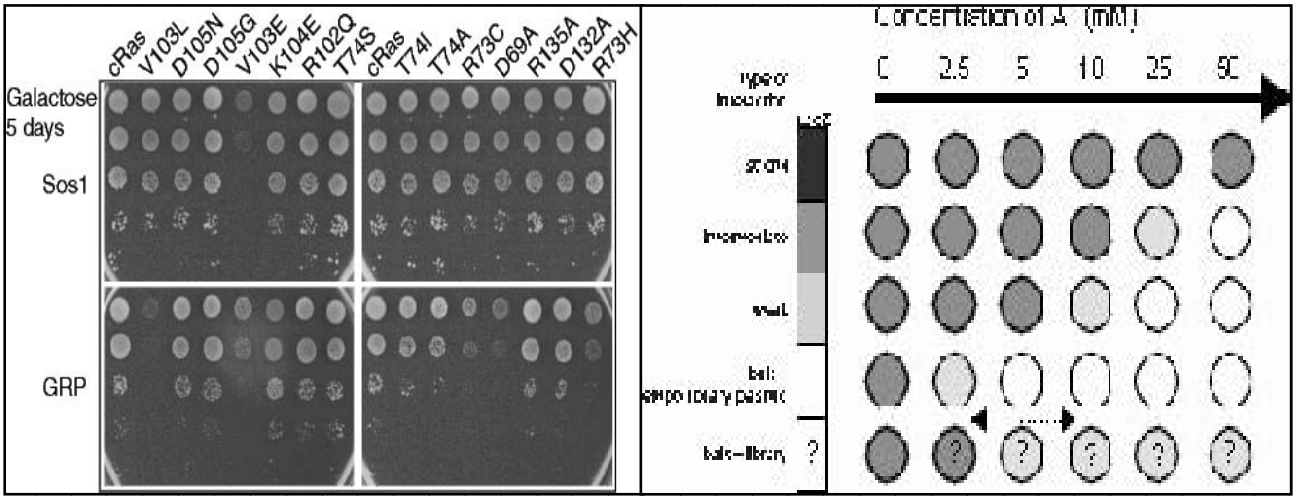
شکل ۴:عامل رونویسی کامل باعث بیان ژن گزارشگر و رشد سلول می گردد (a) زنجیره اتصال و زنجیره فعال کننده به تنهایی قادر به فعال کردن ژن گزارشگر نخواهند بود (b و c) در صورتیکه این زنجیره ها با پروتئین هایی ترکیب شوند که قادر باشند با همدیگر واکنش دهند یک عامل رونویسی کامل تشکیل می شود و ژن بیان می گردد در نتیجه سلول بر روی محیط انتخابی رشد می نماید (d) (۲۰) .

۳-عدم توانایی فعال کردن رونویسی به تنهایی
۴-توانایی اتصال به نواحی اپراتور برای پروتئین طعمه
۵-پیچش صحیح پروتئین

مزایای سیستم دوگانه در مخمر

این سیستم نسبت به روش های دیگری که برای تعیین واکنش بین پروتئین ها استفاده می شود دارای مزایای زیر است (۱ ، ۴ ، ۶ ، ۱۳ و ۱۵) :

۱-تکنیک به صورت *in vivo* انجام می گردد
۲-عدم نیاز به مقدار زیاد پروتئین یا آنتی بادی خالص شده و در نتیجه ارزان تر بودن آن نسبت به روش های دیگر
۳-توانایی تعیین واکنش های گذرا و ضعیف
۴-روش مستقیم برای غربال کمپلکس های پروتئینی دوتایی و سه تایی
۵-سهولت و سرعت انجام واکنش نسبت به روش های دیگر
۶-اندازه گیری واکنش ها به صورت نیمه کمی.بدان صورت که نیمه کمی بودن واکنش نسبت به کنترل بررسی می گردد و نتیجه به صورت واکنش ضعیف ، متوسط و قوی بیان می‌گردد. (شکل ۵)



شکل ۵ : نیمه کمی بودن واکنش نسبت به نمونه کنترل به صورت واکنش ضعیف ، متوسط و قوی تعیین می گردد(۲۱ و ۲۲).

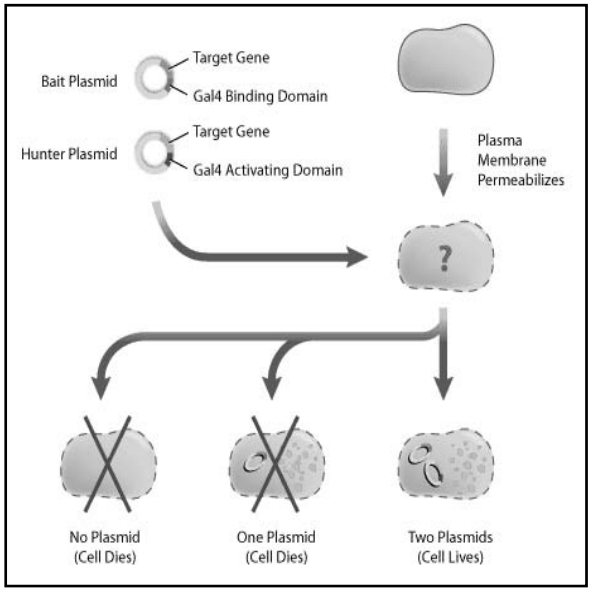
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

کاربردهای سیستم دوگانه در مخمر

۱-تعیین واکنش بین دو پروتئین شناخته شده
۲-تحقیق شبکه واکنش های انجام شده بین پروتئین ها در یک فرایند زیستی خاص
۳-تعیین پروتئین های حفظ شده به صورت تکاملی در بین گونه ها
۴-تعیین مناطق[9] و باقیمانده های[10] مورد نیاز برای واکنش فیزیکی بین یک جفت پروتئین به وسیله ایجاد حذف
۵-توانایی تعیین واکنش بین پروتئین های کد شده به وسیله ژن های جدید با یک پروتئین شناخته شده مورد علاقه
۶-تعیین واکنش هایی که با واسطه لیگاندهایی با منشا خارجی[11] انجام می گیرد ، یا به وسیله آنها از بین می رود
۷-توانایی تعیین نقشه واکنش های پروتئین – پروتئین در یک مقیاس وسیع (۵ ، ۶ و ۷).

مراحل انجام سیستم دو هیبرید درمخمر

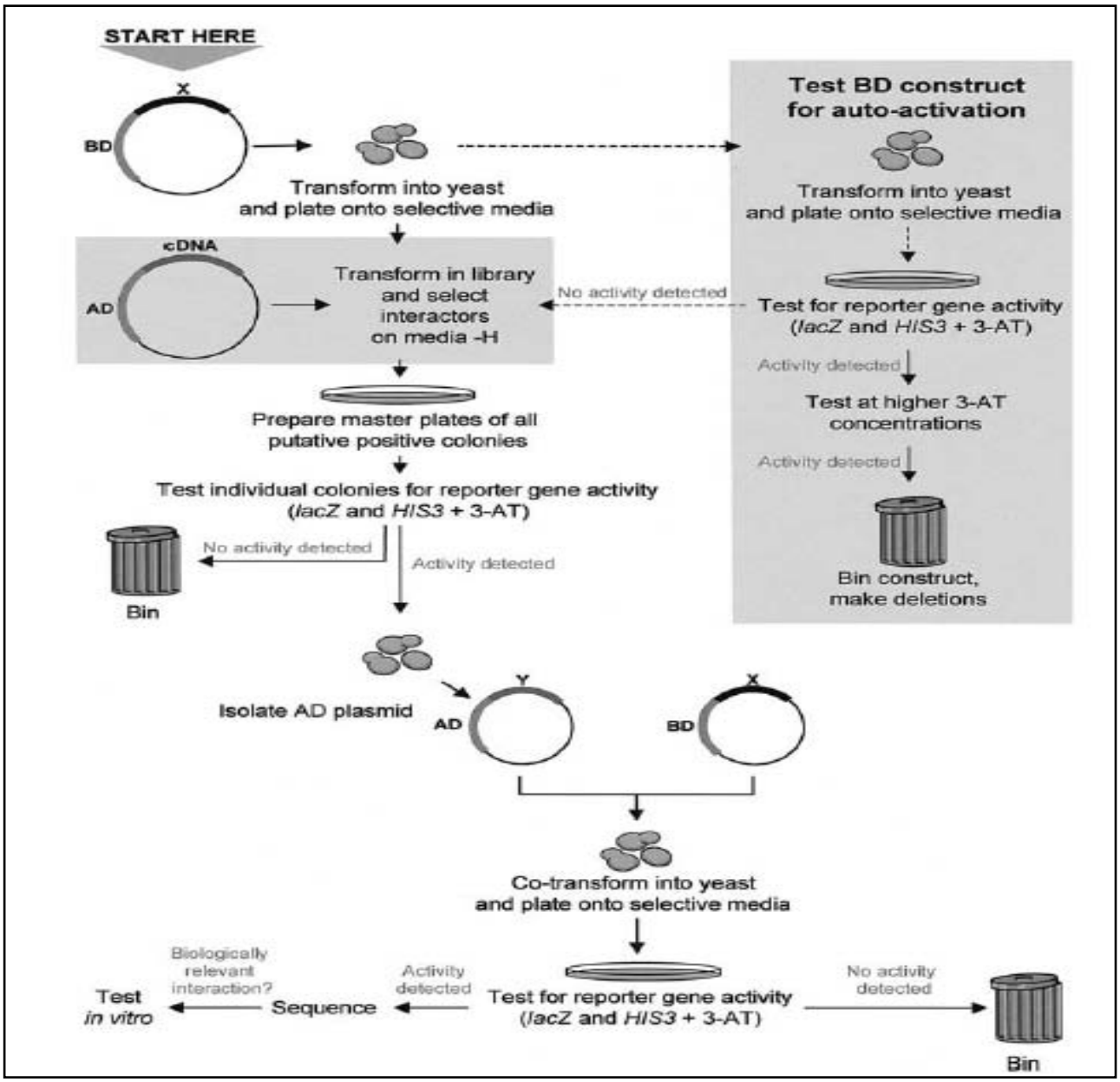
ابتدا ژن های X و Y با استفاده از PCR تکثیر می‌شوند سپس به پلاسمیدهای دارای زنجیره اتصال DNA و زنجیره فعال کنندگی DNA با استفاده از نوترکیبی توالی ویژه یا هضم آنزیم های اندونوکلئاز محدودکننده[12] واتصال[13] منتقل می شوند. در نتیجه پلاسمیدهای DB-X و AD-Y تولید می گردند. این پلاسمیدها به طور جداگانه به سویه‌های مخمر انتقال می یابند و سلول‌های مخمر دارای DB-X یا AD-Y برای فعال کردن خودبخودی بررسی می‌شوند. در صورتی که این سلول ها دارای اثر خود فعال کنندگی نباشند همزمان بر روی پلیت مادر[14] کشت داده می شوند تا تراریختی همزمان سلول های مخمر انجام شود. در این مرحله فقط سلول هایی زنده می مانند که حاوی هر دو پلاسمید باشند (شکل ۶). سپس به وسیله انتقال پلیت[15] روی محیط‌های زیر برای القاء ژن‌های گزارشگر کشت داده می‌شوند: {۱) *Sc-leu-Trp-Ura* ۲) *Sc-leu-Trp-His* + 3AT ۳) *Sc-leu-Trp*-0.2% 5FOA ۴) ۵ – برومو– ۴ –کلرو۳– اندولیل – ß– D– گالاکتوپیرانوزید) Xgal }در نهایت واکنش‌ها بوسیله روش‌های مستقل تایید می گردند (شکل ۷) (۱ ، ۲ ، ۶ و ۱۳).



شکل ۶ : در صورتیکه سلول مخمر فاقد یکی از پلاسمیدها یا هر دو پلاسمید باشد زنده نخواهد ماند ولی اگر هر دو پلاسمید را داشته باشد قادر به رشد خواهد بود (۱۹) .

9- Domain
10- Residues
11- Exogenous ligands
12- Restriction enzymes
13- Ligation
14- Master plate
15- Replica plating

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]



شکل ۷ : شکل فوق مراحل انجام واکنش را توصیف می کند. این شکل سیستم پروتئین GAL4 با ژن های گزارشگر *HIS3* و LacZ را استفاده می‌کند. اولین مرحله شدن سویه مخمر با ساختار کد کننده پروتئین X با زنجیره اتصال GAL4 است .کلنی های مخمر تراریخته بایستی برای خود فعال کنندگی ژن های گزارشگر آزمایش شوند. اگر ساختار DB – X اثر خود فعال کنندگی نداشته باشد می‌تواند با کتابخانه ترکیبی GAL4 AD – cDNA تراریخت شود. تراریخته‌ها روی محیط فاقد هیستیدین (و دارای ۳ –آمینو تریازول در صورت لزوم) انتخاب می شوند. کلنی هایی که در یک سرعت بالاتر در مقایسه با زمینه رشد مخمر رشد می‌کنند مثبت های قوی برای واکنش پروتئین – پروتئین هستند و به یک پلیت تازه فاقد هیستیدین منتقل می شوند. از این مخمرها می توان برای فعالیت β-گالاکتوزیداز و محیط فاقد هیستیدین و دارای ۳- آمینو تریازول برای تایید فعالیت ژن گزارشگر استفاده نمود. پلاسمید دارای زنجیره فعال کننده می تواند از سلول هایی که فعالیت ژن گزارشگر آنها ثابت شده استخراج شود. پلاسمید AD می‌تواند دوباره به سلول های حاوی DB – X ترانسفورم شود و برای فعالیت ژن گزارشگر مجددا آزمایش شود. اگر واکنش آشکار شود cDNA کلون شده به وکتور AD می تواند تعیین توالی گردد و بررسی‌های بیشتر روی آن انجام شود (۶).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

آزمایش خود فعال کنندگی[16]

سلول های مخمر دارای DB-X یا AD-Y برای فعال کردن خودبخودی و تعیین غلظت ۳- آمینو ۱و ۲ و ۴ تریازول (3AT) مورد نیاز برای ارزیابی سطوح بیان پایه ژن *HIS3* آزمایش می شوند. *HIS3* ، ژن ایمیدازول گلیسرول فسفات دهیدراتاز را کد می کند. این آنزیم می تواند به طور اختصاصی در یک روش وابسته به غلظت[17] به وسیله تعیین آستانه مقاومت به 3AT و تعیین غلظت 3AT در پلیت فاقد هیستیدین ، حتی افزایش جزئی در بیان ژن گزارشگر *HIS3* را تعیین نماید. این روش امکان تعیین حتی واکنش های ضعیف پروتئین – پروتئین را تسهیل می کند. بهتر است که DB-X در حضور وکتور AD آزمایش شود. چون این احتمال وجود دارد که یک کمپلکس DB-X/AD بتواند تشکیل شود و رونویسی را فعال کند. کمترین غلظت 3AT که رشد سلولهای تراریخت یافته را ممانعت کند غلظت پایه 3AT است. اگر سلول های حاصل از تراریختی حتی در حضور ۱۰۰ میلی مولار 3AT رشد کنند DB-X (یا AD-Y) ، احتمالا یک پروتئین را کد می کند که به طور مستقیم یا غیر مستقیم فعالیت خود فعال کنندگی ژن گزارشگر در این سیستم را دارد. بنابراین چنین پلاسمیدهایی برای استفاد در غربال دو هیبرید مناسب نیستند (۱ ، ۶ و ۱۳).

موارد مثبت کاذب

این سیستم اگر چه دارای مزایای زیادی است، اما در بعضی موارد ایجاد موارد مثبت کاذب می نماید. در نتیجه منجر به بیان ژن گزارشگر در مواردی که پروتئین های مورد نظر هیچگونه واکنشی با همدیگر ندارند می شود ، که شامل موارد زیر می گردد (۱ ،۶ ، ۱۰ ، ۱۳ و ۱۵ و ۱۷) :

۱. پروتئین های دارای نواحی با سطوح با تمایل[18] کم برای پروتئین های متفاوت (مثل سطوح وسیع آبگریز)

۲-پروتئین هایی که به طور طبیعی با تعداد زیادی از پروتئین ها واکنش می دهند (مثل پروتئین های شوک حرارتی[19])

۳-پروتئین هایی که دارای نواحی هستند که به عنوان زنجیره فعال کننده عمل می کنند مثلا :

a) پروتئین هایی که ساختار کروماتین را تحت تاثیر قرار می دهند.

b) پروتئین های دارای تمایل کم یا غیر اختصاصی برای نواحی پیش برنده می‌باشند(یا پروتئین هایی که به آن ناحیه متصل می شوند) که باعث بیان ژن گزارشگر می شود.

به همین دلیل تغییراتی بر روی سیستم انجام شده است تا موارد مثبت کاذب کاهش یابد، که عبارتنداز (۱، ۳، ۵ و ۶):

۱-ناقل هایی با تعداد نسخه کم

۲-سه ژن گزارشگر با پیشبرنده های مستقل

۳-یک ژن گزارشگر انتخابی مثبت / منفی

۴-مجموعه ای از سویه های مخمر

۵-فناوری Gateway

فناوری Gateway

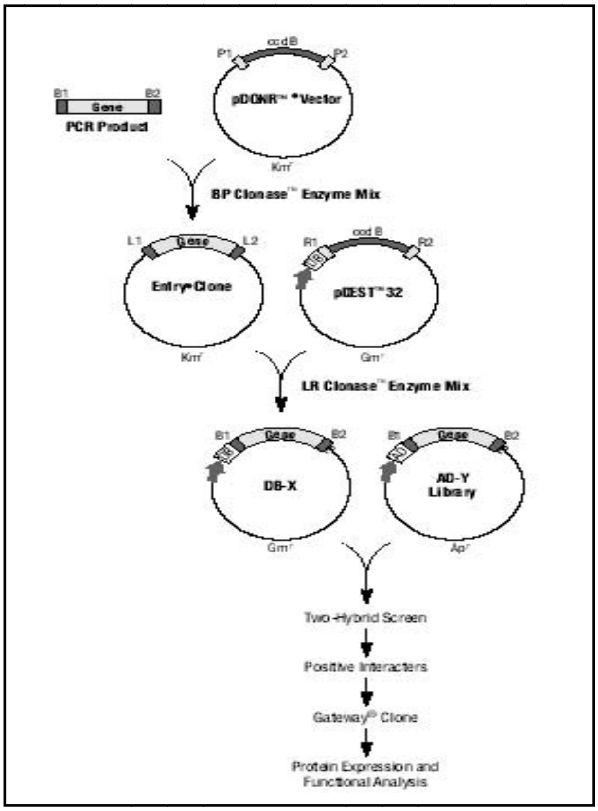
سیستم کلونینگ Gateway نوترکیبی توالی ویژه براساس فاژ لامبدا را به جای آنزیم های اندونوکلئازمحدودکننده و لیگاز استفاده می کند. این سیستم ،ازنوترکیبی به وسیله فاژ لامبدا در خلال تبدیل بین دومسیر لیتیک[20] و لیزوژنیک[21] بهره می برد . توالیهاینوترکیبی DNA کلیدی که واکنشهای نوترکیبی راوساطت می کنند ، اساس تکنولوژی Gatewayهستند و دو واکنش تکنولوژی Gateway را تشکیلمی دهند. واکنش LR یک واکنش نوترکیبی بینپلاسمید ورود و یک ناقل هدف است که به وسیلهمخلوط پروتئین های نوترکیب ، یک کلون بیان را ایجاد می کند.در این واکنش برای انتقال توالی مورد نظر به یک یا چند ناقل هدف از واکنش های موازی استفاده می گردد. واکنش BP یک واکنش نوترکیب بین یک پلاسمید

16- Self activation
17- Dose
18 -Affinity

19- Heat shock protein
20-Lytic
21-Lysogenic

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

بیان (یا یک محصول PCR محدود شده به attB) و یک ناقل دهنده برای ایجاد یک پلاسمید ورود است. در این سیستم ژن های مورد نظر با PCR تکثیر شده و از طریق واکنش های نوترکیبی نظر یا به ناقل DB-X یا AD-Y منتقل می شوند و غربالگری دو هیبرید انجام می شود (شکل ۸).



شکل ۸ : واکنش های LR و BP در تکنولوژی Gateway (۱).

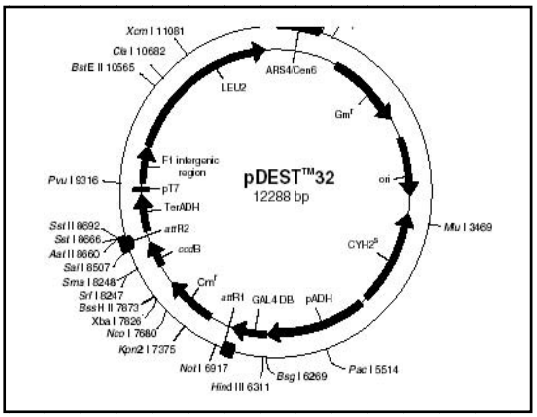
بعد از اینکه غربال دوگانه کامل می شود ژن های مورد نظر می توانند به وکتور های متعدد برای آزمایش یا مرحله بعدی منتقل شوند. واکنش های نوترکیبی برای تولید یک ناقل طعمه (DB-X) با ژن مورد نظر در غالب زنجیره اتصال GAL4 –DNA استفاده می شود (۱).

ناقل های AD و DB با تعداد نسخه کم (ARS/CEN)

بیان زیاد پروتئین های هیبرید AD-Y و DB-X می تواند واکنش غیر اختصاصی بین پروتئین های ترکیبی را در نتیجه موارد مثبت کاذب را افزایش دهد . به علاوه بیشتر پروتئین ها وقتی که به مقدار زیاد بیان شوند می توانند سمی باشند و به طور بالقوه پروتئین های واکنش دهنده مورد نظر ممکن است شناسایی نگردند (که منجر به جواب منفی کاذب می شود). در مخمر بیان پروتئین می تواند در سطوح نسبتاً پایین با استفاده از ناقل های بیانی با تعداد نسخه محدود ARS/CEN حفظ شود. ناقل هایی براساس ARS/CEN ، تعداد نسخه پلاسمید را به طور ثابت حفظ می کنند که منجر به افزایش توانایی بیان ژن گزارشگر می شود. بیان ثابت پروتئین های ترکیبی در سطوح نزدیک به وضعیت های فیزیولوژیکی مخصوصاً وقتی با ارزش است که جهش ها ، پپتیدها و پروتئین های دیگر یا ترکیبات دیگری که واکنش های پروتئین – پروتئین شناخته شده را تغییر یا تخریب کنند خصوصیاتشان تعیین گردد(۱ و ۶).

ناقل $pDEST^{TM}_{32}$: ناقل هدف Gateway زنجیره اتصال DNA (DB) مشتق شده از pDBLeu است. این ناقل برای کلون نمودن ژن شناخته شده در قالب توالی کد کننده زنجیره اتصال DNA پروتئین GAL4 استفاده می شود (تولید DB-X می کند) (شکل ۹).

شکل ۹ : واکنش های LR و BP



شکل ۹ : ساختار پلاسمید $pDEST^{TM}_{32}$ (۱)

الگوی این ناقل شامل موارد زیراست :

۱–توالی کد کننده زنجیره اتصال GAL4 (اسید امینه های ۱ تا ۱۴۷)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

۲-توالی ARS4/CEN6 برای همانند سازی و حفظ تعداد نسخه کم در مخمر

۳-ژن *LEU2* برای انتخاب در مخمر روی محیط فاقد لوسین

۴-پیش برنده ای با قدرت مشخص و خاتمه دهنده

رونویسی ژن الکل دهیدروژناز مخمرو بیان کننده *GAL4DB*

۵-آلل غالب *CYH2* که حساسیت به سیکلوهگزامید را در مخمر ایجاد می کند (برایPlasmid shuffling).

۶-یک مبدا همانندسازی و ژن مقاومت به جنتامایسین (Gm-R) برای همانندسازی و حفاظت در *کلی باسیل*[۲۲] .

۷-دو ناحیه نوترکیبی attR1 و attR2 محدود شده به یک ژن مقاومت به کلرامفنیکل (Cm^r) و یک ژن ccdB . به دنبال واکنش آنزیم LR کلوناز، ژن های Cm^r و *ccdB* به وسیله ژن مورد نظر جایگزین می شوند و نواحی attR به نواحی attB تبدیل می گردند. در نتیجه ژن مورد نظر در قالب DB محدود شده به نواحی attB در ساختارناقل هدف وارد می گردد (۱)

$pDEST^{TM}$ 22 : یک ناقل هدف Gateway دارای زنجیره فعال کننده است. این ناقل برای کلون ژن شناخته شده دوم مورد نظر در قالب توالی کدکننده زنجیره فعال کننده رونویسی پروتئین GAL4 استفاده می شود (تولید کننده AD-Y) (شکل ۱۰). الگوی این وکتور شامل موارد زیراست :

۱-توالی کدکننده زنجیره فعال کننده GAL4 (اسیدامینه های ۷۶۸ تا ۸۸۱)

۲-توالی ARS4/CEN6 برای همانندسازی و حفظ تعداد نسخه کم در مخمر

۳-ژن TRP1 برای انتخاب در مخمر روی محیط فاقد تریپتوفان

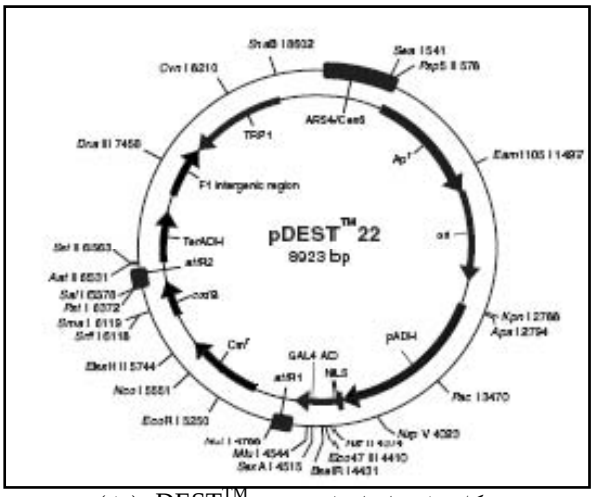
۴-پیش برنده ای با قدرت مشخص و خاتمه رونویسی ژن الکل دهیدروژناز مخمر (ADH1)و بیان کننده GAL4AD

۵-یک مبدا همانندسازی و ژن مقاومت به آمپی سیلین (AP-R)

برای همانندسازی و حفاظت درکلی باسیل

۶-دو ناحیه نوترکیبی attR1 و attR2 محدود شده به یک ژن مقاومت به کلرامفنیکل (Cm^r) و یک ژن *ccdB* . به دنبال واکنش

LR کلوناز، ژن های Cm^r و *ccdB* به وسیله ژن مورد نظر جایگزین می شوند و نواحی attR به نواحی attB تبدیل می گردند. در نتیجه ژن مورد نظر در قالب AD محدود شده به نواحی attB در ساختار ناقل هدف وارد می شود (۱).



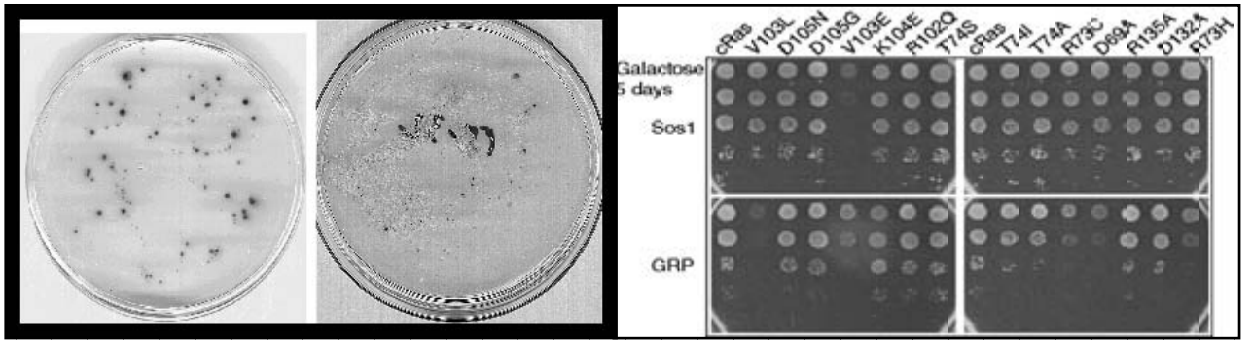
شکل ۱۰ : ساختار پلاسمید $pDEST^{TM}$ 22 (۱)

22- *E.coli*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

سه ژن گزارشگر

یک تک نسخه از سه ژن گزارشگر *URA3* ، *HIS3* و *LacZ* به طور ثابت در جایگاه های متفاوت در ژنوم مخمر وارد می شود. نواحی پیش برنده این سه ژن به صورت مستقل می باشد (به جز برای نواحی اتصال *GAL4*). چون سه واقعه رونویسی مستقل (از پیش برنده های مجزا) اغلب در جایگاه کروموزومی مستقل روی می دهد،موارد مثبت کاذب کاهش می یابد(جدول ۱) . القاء ژن های گزارشگر *URA3* و *HIS3* وابسته به واکنش دو هیبرید به وسیله رشد سلول به ترتیب روی پلیت فاقد هیستیدین یا اوراسیل مشخص می شود(شکل ۱۱). القاء ژن *LacZ* وقتی با محیط X- gal آزمایش شود ایجاد یک رنگ آبی می کند (شکل۱۲) (۱ ، ۳ ، ۵ و۶).



شکل ۱۱ : در صورت واکنش بین پروتئین ها کلنی های آبی رنگ بر روی محیط X - gal (سمت چپ) ایجاد می گردد در غیر اینصورت کلنی ها سفید (سمت راست) خواهند بود (۲۳) .

شکل ۱۲ : در صورت واکنش بین پروتئین ها کلنی های آبی رنگ بر روی محیط X - gal (سمت چپ) ایجاد می گردد در غیر اینصورت کلنی ها سفید (سمت راست) خواهند بود (۲۳) .

	$His^+(3AT^R)$	β-Gal	Ura^+	5FOA
X:Y do not interact	−	White	−	+
X:Y do interact	+	Blue	+	−

جدول ۱ : جدول فوق واکنش های مشاهده شده در صورت انجام یا عدم انجام واکنش بین پروتئین ها را نشان می دهد (۱).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

ژن گزارشگر انتخابی مثبت / منفی

مستقل از واکنش دو هیبرید، ژن URA3 منجر به تبدیل ترکیب ۵– فلورواوروتیک اسید (5FOA) به ۵–فلورواوراسیل می شود که سمی است.

بنابراین سلول های دارای پروتئین های واکنش دهنده وقتی روی پلیت فاقد اوراسیل کشت داده می شوند رشد می کنند. اما وقتی روی محیط دارای 5FOA کشت داده می شوند رشد آنها متوقف می شود(شکل۱۳).

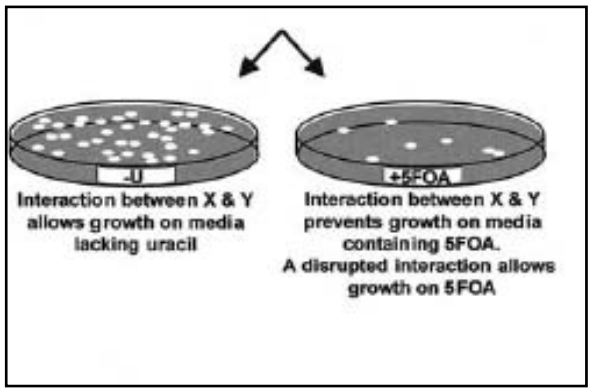
ممانعت رشد ناشی از القاء ژن گزارشگرURA3 روی محیط دارای 5FOA هم یک روش برای تعیین خصوصیت سریع واکنش دهنده های پروتئین – پروتئین است. جهش‌ها ، پپتیدها و پروتئین‌ها یا موادی که واکنش پروتئین – پروتئین را ممانعت یا تعدیل می‌کنند، می‌توانند به وسیله تعیین سلول‌هایی که قادر به رشد روی پلیت انتخابی دارای 5FOA باشد (Sc – Leu - Trp + 5FOA) انتخاب شوند.

بنابراین در این سیستم به وسیله موارد زیر مثبت های کاذب را کاهش می دهند :

۱–ایجاد چهار فنوتیپ متفاوت ($5FOA^s$, Ura^+ , ß – gal , His^+(3AT)) برای آزمایش واکنش دهنده های مثبت

۲–وجود یک پیش برنده غیر وابسته سوم که تشخیص فعالیت ژن گزارشگر مصنوعی را با توجه به اتصال نادرست پروتئین های ترکیبی با AD-Y یا با معکوس های خودبخودی تسهیل نماید.

۳–استفاده از ناقل‌هایی با تعداد نسخه محدود (ARS/CEN) که سطح بیان ژن و سمیت را کاهش دهد (۱).



شکل ۱۳ : در صورت واکنش بین پروتئین های X و Y سلول ها بر روی محیط فاقد اوراسیل رشد می کنند اما بر روی محیط فاقد 5FOA رشد نخواهند کرد (۶) .

کنترلهای مخمر

سطوح بیان ژن گزارشگر از یک غربال دو هیبرید می تواند از قوی تا کاملا ضعیف متفاوت باشد (اگر چه این سطوح ممکن است تمایل واکنش های پروتئین – پروتئین مشاهده شده در محیط اصلی را منعکس نکند). برای کمک به تعیین اینکه کلون های نماینده به طور مشابه واکنش دهنده‌های مثبت را نشان می‌دهند، مجموعه از سویه‌های کنترل (مشتق از MaV103) توسعه داده شده است که دارای جفت پلاسمیدهای بیان کننده پروتئین‌های ترکیبی با طیفی از قدرت‌های واکنش دهنده می‌باشند(جدول ۲) (۱).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

جدول ۲ : انواع نمونه های کنترل مورد استفاده در یک آزمایش دوگانه مخمر برای کاهش موارد مثبت کاذب (۱)

Transformation	Plasmid 1	Plasmid 2	Selection	Purpose
1	Control plasmid (pDBLeu)	None	SC- Leu	Transformation control
2	None	None	SC-Leu and SC- Leu - Trp	Transformation control
3	pDBLeu	pEXP-AD502	SC- Leu - Trp	Self- activation control
4	DB-X	pEXP-AD502	SC- Leu - Trp	Test self activation of DB-X
5	pDBLeu	AD-Y	SC- Leu - Trp	Self activation of AD-Y if screening khnown X & Y
6	DB-X	AD-Y	SC- Leu - Trp	Interaction test for khnown X & Y
7	DB-X	None	SC- Leu	For sequentional transformation if screening cDNA library

تحقیق کلونهای نماینده

پروتئین های ترکیبی (AD- Y) تعیین شده در یک غربال دو هیبرید بایستی توانایی القاء ژن های گزارشگر را وقتی که با پروتئین مورد بررسی (DB – X) دوباره آزمایش می شوند داشته باشند. این ارزیابی مجدد، موارد مثبت کاذب را که به وسیله فعال سازی خودبخود ناقل AD- Y یا نمونه های DB- X ایجاد می شود حذف می کند . برای این بررسی ها Plasmid Shuffling یا یک آزمایش تراریخته گی مجدد[1] می تواند استفاده شود.

Plasmid Shuffling: سلول های مخمر جدا شده از یک غربال دو هیبرید دارای پلاسمیدهای DB-X و AD-Y هستند. در این روش سلول‌هایی که به طور خودبخودی فاقد پلاسمید DB-X شده اند اما پلاسمید AD-Y را حفظ کرده‌اند انتخاب می‌شوند.

سلول های دارای AD-Y بدست آمده، مستعد بوده و مجددا با سلول حاوی DB-X تراریخت می‌شوند، تراریخته ها سپس انتخاب و برای واکنش X و Y دوباره ارزیابی می‌گردند.

کلون هایی که ژن های گزارشگر را القا می کنند احتمالا دارای پروتئین های ترکیبی واکنش دهنده هستند. سلول های مخمر که فقدان خودبخودی پلاسمید DB-X را دارند با استفاده از ژن غالب $CYH2^s$ موجود روی پلاسمید DB-X انتخاب می شوند. سویه مخمر MaV103 مقاوم به سیکلوهگزامید (cyh^r) است که وابسته به آلل cyh^s مغلوب است بنابراین سلول های MaV103 دارای پلاسمید ($CYH2^s$) DB-X حساس به سیکلوهگزامید هستند. در حالیکه آنهایی که فاقد این پلاسمیدند مقاوم به سیکلوهگزامید می‌باشند.آزمایش تراریخته گی مجدد: سلول های مخمر تراریخته حاوی هر دو

1- Retransformation

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

پلاسمید DB-X و AD-Y هستند. اغلب برای جدا کردن پلاسمیدهای حاوی DB-X و AD-Y به طور جداگانه و برای تایید واکنش و تعیین خصوصیات بعدی، کلون نمودن این ناقلها در کلی باسیل توصیه می گردد. برای تسهیل جداسازی در کلی باسیل، ناقل $pDEST^{TM}_{32}$ ژن مقاومت به جنتامایسین را کد می کند. در حالیکه ناقل $pDEST^{TM}_{22}$ ژن مقاومت به آمپی سیلین را کد می‌نماید. DNA پلاسمید جدا شده از سلول های مخمر کلی به وسیله روش الکتروپوریشن[2] به کلی باسیل معرفی می شوند. تراریخته های دارای پلاسمیدAD-Y با آمپی سیلین انتخاب می‌گردند (یا DB-X بوسیله جنتامایسین). DNA پلاسمید از این سلول های کلی باسیل جداشده و مجددا به سویه MaV203 همراه با پلاسمید pDBLeu یا DB-X انتقال می یابد. القاء ژن های گزارشگر مجدداً آزمایش می‌شوند. موارد مثبت صحیح ژن‌های گزارشگر را با pDB-X القاء می‌کند اما به تنهایی با ناقل pDBLeu القاء نمی‌کنند(۱).

موارد منفی کاذب

این سیستم همچنین می‌تواند در مواردی واکنش منفی کاذب ایجاد نماید. در نتیجه با وجود واکنش بین پروتئین‌ها ، ژن‌های گزارشگر القا نمی‌گردند که شامل موارد زیر می‌شود (۳ ، ۵ ، ۶ ، ۷ و ۱۰ و ۱۷):

۱-ورود پروتئین DB-X یا AD-Y به هسته صورت نگرفته باشد.

۲-ضعیف بودن واکنش بین دو پروتئین به طوری که توسط این سیستم آشکار نشود.

۳-ممکن است پروتئین های X و Y به صورت ترکیب با DB و AD نتوانند با همدیگر واکنش دهند.

۴-واکنش بین پروتئین های X و Y ممکن است وابسته به تغییرات بعد از ترجمه باشد که در هسته سلول مخمر وجود ندارد.

۵-یک تعداد از واکنش های پروتئین – پروتئین فقط وقتی روی می دهد که یا پروتئین X یا پروتئین Y بعد از ترجمه قسمتی از ساختار خود را از دست بدهد.

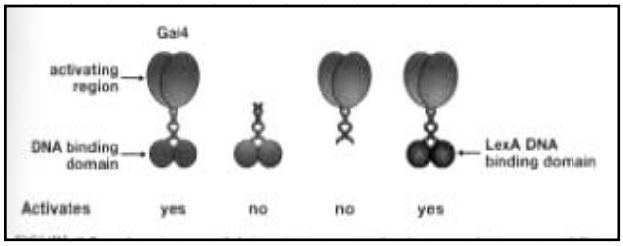
سیستم های دوگانه مخمر کلاسیک

سیستم‌هایی که به طور رایج، استفاده شده سیستم GAL4 است(که زنجیره اتصال DNA و زنجیره فعال کننده پروتئین GAL4 مخمررا استفاده می‌کند). عیب این سیستم این است که بایستی در مخمرهای سویه gal4- انجام شود که تراریخت نمودن این سویه‌ها مشکل است. در سیستم LexA، زنجیره اتصال DNA پروتئین رپرسور باکتریایی lexA در ترکیب با زنجیره فعال کنندگی B42 کلی باسیل یا زنجیره فعال کننده GAL4 استفاده می شود، به طور معمول به عنوان سیستم Interaction Trap شناخته می شود شکل ۱۴) (۲ ، ۵ ، ۶ ، ۱۲ و ۱۳). سویه های مخمر استفاده شده برای آزمایشات دو هیبرید حاوی جهش‌هایی در یک تعداد از ژن‌های مورد نیاز برای بیوسنتز اسیدهای آمینه از قبیل URA3, HIS3, LEU2, TRP1 می‌باشند. اگر این اسیدهای آمینه از محیط رشد حذف شوند سویه مخمر نمی‌تواند رشد کند. بیشتر پلاسمیدهای دو هیبرید ژن‌هایی دارند که این جهش‌ها را کامل می‌کند و باعث انتخاب مخمر تراریخت می‌شود (۲ و ۳).

در سیستم اولیه فقط یک ژن گزارشگر LacZ استفاده شده است با این وجود همانطور که تکنولوژی توسعه پیدا کرده سویه‌های مخمری با تعدادی از ژن‌های گزارشگر تولید شده است. ژن هایی از قبیل HIS3 (در مورد سیستم GAL4) و LEU2 (در سیستم LexA). در مورد ژن گزارشگر HIS3 آزمایش برای واکنش پروتئین – پروتئین بایستی بهینه شود تا با افزودن ۳- آمینو ۱ و ۲ و ۴ تریازول (3AT) در غلظت‌های میلی‌مولار به محیط، موارد مثبت کاذب را کاهش داد. 3AT یک ممانعت کننده رقابتی محصول ژن HIS3 است و زمینه وابسته به بیان پایه ژن HIS3 رانیز کاهش می دهد . در سیستم LexA حساسیت ژن‌های گزارشگر به وسیله تعداد توالی‌های اپراتور lexA در پیش برنده‌های ژن‌های گزارشگر ساماندهی شده است. سویه‌های مخمر با حساسیت بالا، شش ناحیه اتصال در مقایسه با سویه‌هایی با حساسیت کمتر دارند، که فقط دو ناحیه اتصال lexA دارند. برای رفع مشکلات ناشی از سیستم های کلاسیک و کاهش موارد منفی کاذب سیستم های دیگری توسعه داده شده است(۵ و ۶).

[2] Electrophoration

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

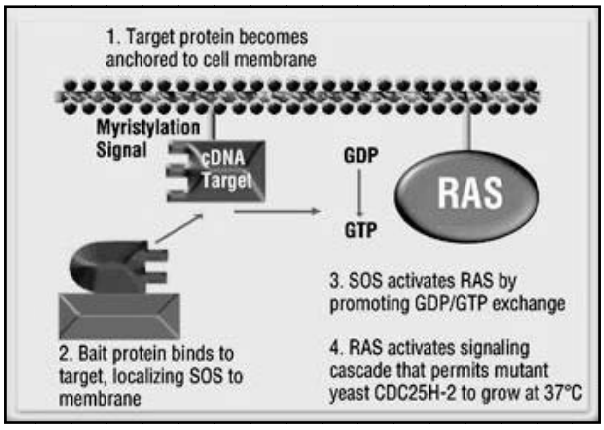


شکل ۱۴ : در صورت جدا بودن زنجیره های اتصال و فعال کنندگی فعالیت رونویسی فعال نخواهد شد در سیستم GAL4 زنجیره اتصال و فعال کنندگی از فاکتور رونویسی GAL4 و در سیستم LexA زنجیره اتصال از رپرسور LexA و زنجیره فعال کنندگی از فاکتور رونویسی GAL4 است.(۲۴)

سیستم دوگانه سیتوپلاسمی (سیستم بازیابی hSOS/Ras)[3]

درسیستم فوق یک سویه جهش یافته حساس به درجه حرارت و جدشده ازسویه cdc25 مخمر ساکارومایسس سرویزیه[4] استفاده می شود.این سویه دارای یک جهش نقطه ای در اسیدآمینه ۱۳۲۸ ژن cdc25 است. این ژن همولوگ ژن SOS انسانی است که فاکتور تعویض نوکلئوتید گوانیلات را کد می کند که به Ras متصل شده و آن را فعال می‌کند و منجر به رشد سلول می‌گردد. جهش در ژن cdc25 از رشدسلول میزبان در ۳۷ ^{o} C جلوگیری نموده ، اما در درجه حرارت مجاز (۲۵ ^{o} C) رشد آن طبیعی است .مبنای این سیستم بر اساس توانایی hSOS برای کامل کردن نقص cdc25 و فعال کردن مسیر سیگنال Ras مخمر است. یک پروتئین مورد نظر به صورت ترکیب با hSOS بیان می شود و پروتئین هدف دیگر با سیگنال جایگزینی در غشاء با استفاده از افزودن گروه مریستل[5] ترکیب می شود .

سپس سلول های مخمر تحت وضعیت محدود کننده ۳۷ ^{o}C رشد داده می‌شوند اگر پروتئین‌های طعمه و صید واکنش دهند پروتئین hSOS به غشاء وارد شده و مسیر سیگنالRas را از طریق تبدیل GDP به GTP فعال کرده و اجازه رشد سویه مخمرcdc25 را در ۳۷ ^{o}C می‌دهد.(شکل ۱۵)



شکل ۱۵ : سیستم بازیابی hSOS : یک پلاسمید حاوی یک سیگنال ورود به غشاء myristylation همراه با یک پروتئین و پلاسمید دوم حاوی hSOS به همراه پروتئین دوم است پلاسمیدها به سلول مخمر همزمان منتقل می شوند در صورت واکنش بین پروتئین ها سیستم Ras بازیابی شده و سلول قادر به رشد در 37°C خواهد بود (۲۵).

تعیین واکنش‌ها در سیتوپلاسم دو مزیت دارد: این سیستم‌ها ممکن است برای پروتئین‌هایی که به خوبی وارد هسته نمی‌شوند بیشتر مناسب باشد و در سیتوپلاسم برخلاف هسته تست پروتئین‌ها ممکن است تحت تغییرات بعد از ترجمه باشد که برای بعضی واکنش‌ها ضروری است با این وجود اگر چه سیستم مزیت‌هایی دارد مشکلاتی هم دارد اول اینکه سویه مخمر cdc25 برگشت پذیر است (به طور مثال قادر است در درجه حرارت محدود کننده بدون توجه به پلاسمیدی که آن را حمل می کند رشد نماید) این بدین معنی است که سویه مخمر بایستی پیش از هر آزمایش برای واکنش پروتئین – پروتئین برای حساسیت به درجه حرارت هم قبل و هم بعد از تراریخت شدن آزمایش شود. دوم اینکه تعیین واکنش های پروتئین – پروتئین منحصراً بر اساس رشد مخمر در درجه حرارت محدود کننده است و هیچ نشانگر دیگری برای تایید واکنش وجود ندارد. مشکل بازگشت سویه مخمر و فقدان نشانگر های اضافی برای تعیین واکنش پروتئین – پروتئین پیشنهاد می کند که سیستم بازیابی hSOS/Ras ممکن است برای غربالگری کتابخانه ژن مناسب نباشد. با این وجوداین

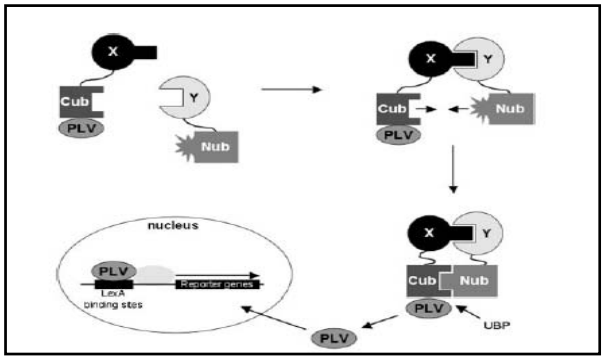
3- Cyto trap two- hHybrid- system (hSOS / Ras recruitment system)
4- *Saccharomyces cerevisiae*
5- myristylation membrane – localization signal

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

سیستم ممکن است در تایید واکنش پروتئین – پروتئین تعیین شده به وسیله روش‌های دیگر نقش داشته باشد (۵ و ۶).

سیستم شکست یوبی کوئیتین [۶]

یوبی کوئیتین یک پلی پپتید کوچک است که با پروتئین ها همراه شده و آنها را برای تجزیه شدن هدف قرار می‌دهد. بدین صورت که به پروتئین ها متصل شده و آنها را به پروتئوزوم ۲۶ s منتقل می کند ، جاییکه یوبی‌کوئیتین به وسیله پروتئازهای اختصاصی یوبی کوئیتین رها می شود و دوباره به سیستم بر می گردد. Johnsson و Varshavsky برای اولین بار مزیت طبیعت اختصاصی UBP_s را برای توسعه سیستم شکست یوبی کوئیتین به منظور بررسی واکنش های پروتئین – پروتئین بیان کردند. پروتئین ازمایش شونده به عنوان یک ترکیب با یک پلی پپتید C – انتهایی یوبی کوئیتین بیان می شود که به یک پروتئین گزارشگر نیز متصل شده است. پروتئین ازمایش شونده دوم با یک ناحیه N – انتهایی تغییر یافته از یوبی کوئیتین ترکیب می‌شود. این تغییر از پیچش صحیح N–ترمینال یوبی کوئیتین جلوگیری کرده و بنابراین با C–ترمینال یوبی کوئیتین همراه می شود. با این وجود اگر X و Y واکنش دهند یک مولکول یوبی کوئیتین فعال دوباره ساخته می شود. سیستم شکست یوبی کوئیتین به وسیله UBp شناسایی می‌شود و پروتئین گزارشگر رها می گردد و ژن گزارشگر بیان می شود (شکل ۱۶) (۵، ۶ و ۱۳).



شکل ۱۶ : یک پروتئین با ناحیه N– انتهایی یوبی کوئیتین و پروتئین دوم با ناحیه C – انتهایی آن همراه با یک مولکول گزارشگر متصل می گردد در صورتیکه پروتئین ها واکنش دهند مولکول یوبی کوئیتین کامل شده توسط UBp شناسایی می گردد مولکول گزارشگر آزاد

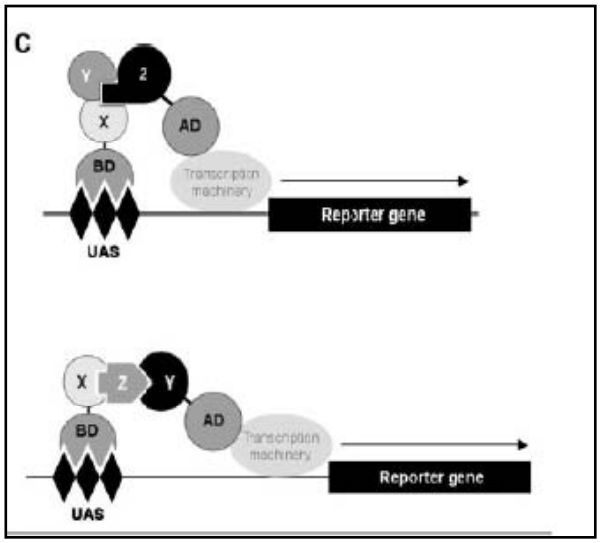
سیستم های سه پروتئین [۷]

سیستم دو هیبرید در مخمر برای آزمایش واکنش بین دو پروتئین طراحی شده است با این وجود بیشتر فرایندهای سلولی وابسته به تشکیل کمپلکس بین چند پروتئین است. واکنش ها ممکن است در یک آزمایش دو هیبرید مشخص نگردند. اگر واکنش بین دو پروتئین نیاز به حضور پروتئین سوم داشته باشد یا اگر یک پروتئین با یک زنجیره تشکیل شده از طریق واکنش بین دو پروتئین دیگر واکنش دهد. سیستم‌های واکنش پروتئین –پروتئین در مخمر برای مطالعه تشکیل این کمپلکس‌های سه‌تایی توسعه داده شده است، آنها بر اساس اصول مشابه با سیستم Y2H کلاسیک‌اند دو پروتئین با زنجیره اتصال به DNA و زنجیره فعال کننده پروتئین GAL4 ترکیب می شود در حالیکه پروتئین سوم با یک سیگنال ورود به هسته بیان می شود.این سیستم به گونه ای طراحی شده است که فعالیت ژن گزارشگر فقط وقتی تعیین می شود که هر سه پروتئین با همدیگر یک کمپلکس در توالی فعال کننده بالادست GAL4 تشکیل دهند (شکل ۱۷). یک مشکل با سیستم سه پروتئین این است که ممکن است واکنش به صورت مستقل از پروتئین سوم آشکار شود از طریق آزمایش واکنش ها هم به صورت in vivo و هم به صورت in vitro بایستی واکنش مورد نیاز برای هر سه پروتئین تایید شود. که شامل آزمایش واکنش دهنده ها در یک سویه مخمر فاقد پلاسمید سوم (به عنوان مثال ترکیب زنجیره اتصال DNA برعلیه ترکیب زنجیره فعال کننده) و بر علیه پلاسمید سوم با زنجیره اتصال DNA است. این آزمایش‌ها نه تنها اختصاصیت سه روش واکنش را تعیین خواهد کرد ممکن است همچنین مشخص کند که آیا واکنش دهنده ها به عنوان یک پل عمل می کنند یا به یک زنجیره تشکیل شده از طریق واکنش دو پروتئین دیگر متصل می شوند (۵ و ۶ ، ۱۵ و ۱۶).

6- Split – Ubiquitin System

7- Three Protein System

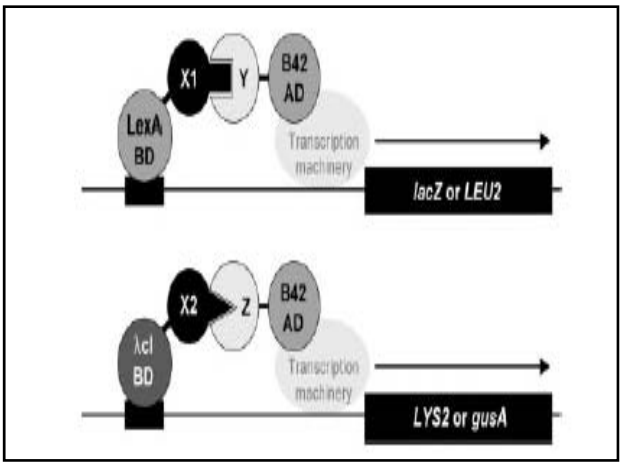
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]



شکل ۱۷ : سیستم سه پروتئین : پروتئین X و Z به ترتیب با زنجیره اتصال و فعال کننده همراه می‌شوند و پروتئین Y با سیگنال ورود به هسته ترکیب می شود در صورتیکه هر سه پروتئین واکنش دهند ژن بیان می شود (۵).

سیستم طعمه های دوتایی [8]

این سیستم براساس دو مجموعه از ژن‌های گزارشگر باند شده به زنجیره‌های اتصال به DNA مجزا است یک مجموعه از گزارشگرها (LacZ و LEU2) دارای عناصر پیش برنده است که به lexA متصل می شود. در حالیکه پیش برنده‌های مجموعه دوم (LYS2 و gusA) به زنجیره اتصال λ cIDNA باند می‌شوند و دو ساختار زنجیره اتصال DNA آماده می‌شود. اولی یک پروتئین آزمایش شونده ترکیب شده با lexA را کد می‌کند و دیگری یک پروتئین آزمایش شونده متفاوت ترکیب شده با λ cI را بیان می‌کند. ساختارها به یک سویه مخمر به طور همزمان تراریخت می شوند و واکنش با پروتئین‌های ترکیب شده با زنجیره فعال- کننده رونویسی B42 مطالعه می‌گردد (شکل ۱۸). سیستم طعمه‌های دوتایی کاربردهای متعدد دارند. دو پروتئین مورد آزمایش می توانند برای شرکای واکنش پروتئین – پروتئین در یک غربالگری کتابخانه ژن بررسی شوند. سیستم می‌تواند برای آزمایش اختصاصیت یک واکنش پروتئین – پروتئین از جمله پروتئین‌های به طور تکاملی حفظ شده در بین گونه‌ها استفاده شود. به علاوه این سیستم همچنین بررسی زنجیره‌های مورد نیاز برای یک واکنش را تسهیل می‌کند و غربالگری پروتئین‌ها یا مولکول‌های دیگر را که یک واکنش به خصوص را ممانعت می‌کنند اجازه می‌دهد (۵ ، ۶ و ۱۴).



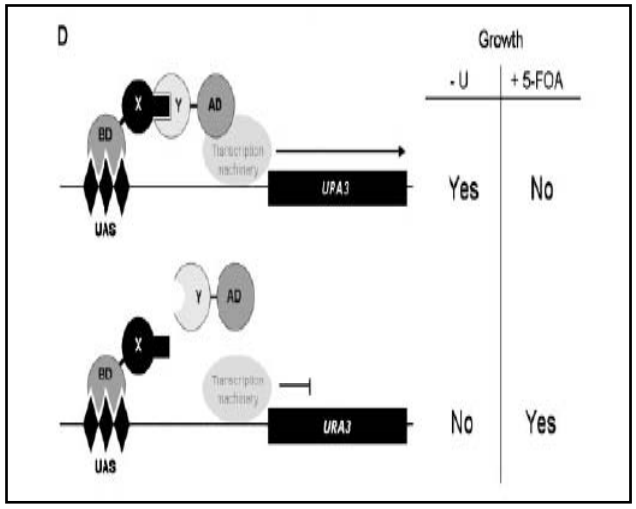
شکل ۱۸ : سیستم طعمه های دو تایی : در این سیستم دو مجموعه از ژن های گزارشگر استفاده می شود زنجیره اتصال یک فاکتور رونویسی با یک پروتئین و زنجیره اتصال فاکتور رونویسی دوم با یک پروتئین دیگر و پروتئین سوم با زنجیره فعال کننده متصل می شود در این حالت واکنش دو پروتئین به طور همزمان با یک پروتئین آزمایش می شود (۵).

8-Dual –Bait System

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

سیستم دوگانه معکوس [۹]

وقتی که یک واکنش پروتئین – پروتئین تعیین می شود ، محققین ممکن است بخواهند زنجیره ها یا باقیمانده های اسید آمینه [۱۰] دخیل در تشکیل واکنش را تعیین کنند. معمولا بحث شامل ایجاد حذف یا جهش های نقطه‌ای در cDNA کد کننده یکی از پروتئین‌ها و تعیین اینکه آیا پروتئین ها هنوز در آزمایش دو هیبرید واکنش می‌دهند یا خیر می‌باشد. ژن‌های گزارشگر معمول از قبیل LacZ و HIS3 واکنش های پروتئین – پروتئین را به وسیله آزمایش برای فعالیت ß- گالاکتوزیداز و رشد روی محیط فاقد هیستیدین (بعلاوه 3-AT) تعیین می‌نماید. اگر واکنش مخمر را از بین نبرد فعالیت ژن گزارشگر ثابت نمی گردد. برای مخمر جدا شده که واکنش پروتئین – پروتئین را مختل می کنند ، نیاز به انتقال پلیت مخمر روی محیط نگهداری معمولی و روی محیط برای آزمایش فعالیت ژن گزارشگر است. این مخمرها که هیچ فعالیت ژن گزارشگر را نشان نمی دهند می توانند سپس از محیط نگهداری معمولی بازیابی شوند. این روش نه تنها وقت گیر است بلکه غربالگری کتابخانه جهش های نقطه ای، خیلی مشکل است. این روش می تواند با استفاده از یک روش دوگانه معکوس ساده شود که برای انتخاب بر علیه واکنش های پروتئین – پروتئین مشخص استفاده می شود. این سیستم یک ژن گزارشگر را استفاد می کند که بیان آن برای سلول های مخمر تحت شرایط اختصاصی سمی است. برای مثال یک سیستم دوگانه معکوس ، URA3 را به عنوان یک ژن گزارشگر استفاده می کند. محصول ژن URA3 ۵- فلورواوروتیک اسید (5FOA) را به ترکیب سمی ۵ – فلورواوراسیل تبدیل می کند. سلول های مخمر که URA3 را به عنوان یکی از ژن های گزارشگر شان دارند می توانند به طور مستقیم روی محیط دارای 5FOA کشت داده شوند. هرگاه یک واکنش پروتئین – پروتئین روی دهد ژن URA3 بیان می شود و سلولهای مخمر می میرند. با این وجود اگر واکنش پروتئین – پروتئین انجام نشود URA3 به صورت بالادست تنظیم نمی شود و سلولهای مخمر زنده می‌مانند . کلونی‌ها می توانند از پلیت 5FOA انتخاب شوند و برای تعیین چگونگی تخریب واکنش پروتئین – پروتئین بررسی شوند (شکل ۱۹). سیستم های دوگانه معکوس دیگر براساس ژن‌های گزارشگر متفاوت برای استفاده در مخمر توسعه داده شده است (۵ ، ۶ ، ۱۳ و ۱۵).



شکل ۱۹ : سیستم دوگانه معکوس : موتاسیون یا حذف در ناحیه ای از یک پروتئین ایجاد می شود و واکنش دوگانه انجام می گردد سپس سلول ها بر روی محیط های فاقد اوراسیل و دارای 5FOA کشت داده می شوند . اگر ناحیه دارای حذف برای فعالیت پروتئین ضروری باشد واکنش انجام نشده ، ژن بیان نمی گردد در نتیجه سلول بر روی محیط فاقد اوراسیل رشد نکرده اما بر روی محیط 5FOA رشد می کند (۵) .

کاربردهای دیگر

سیستم مخمر دوگانه روشی را که محققین واکنش های پروتئین – پروتئین را بررسی می کنند تغییر اساسی داده است. در نتیجه محققین به زودی روش های استفاده از تکنولوژی دوگانه را برای مطالعه واکنش های پروتئین با مولکول های دیگر از قبیل اسید نوکلئیک و مطالعه واکنش هایی که شامل بیش از دو پروتئین می شوند را ارائه خواهد داد. اولین تغییر تکنولوژی دوگانه سیستم تک گانه در مخمر[۱۱] است که برای بررسی واکنش های پروتئین – DNA طراحی شده است. در

۹- Reverse two –hybrid system
10- Residues
11- Yeast one – hybrid system

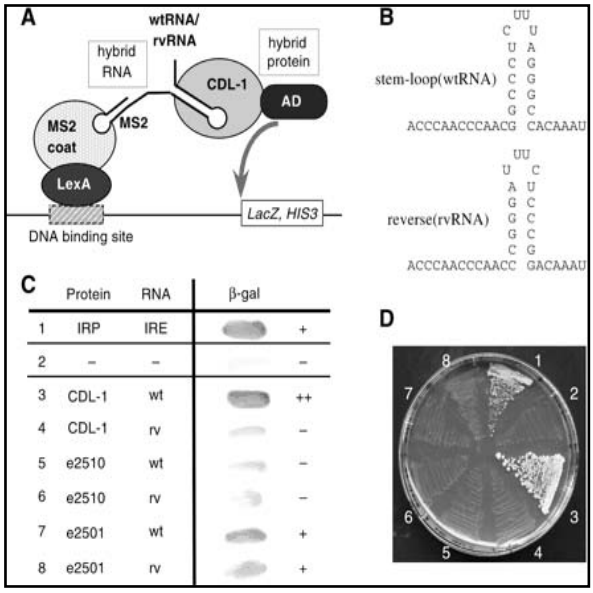
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

اصل سیستم تک گانه مشابه با سیستم دوگانه است که واکنش بین یک طعمه و صید به صورت in vivo تعیین می شود. با این وجود در مورد سیستم تک گانه طعمه یک توالی DNA شناخته شده است که پروتئین‌های اتصال را تعیین می‌کند. در اصطلاح دقیق نسخه‌های متعدد از توالی طعمه به بالادست ژن‌های گزارشگر مخمر از قبیل LacZ یا HIS3 وارد می‌شوند. پروتئین‌هایی که به طعمه متصل می‌شوند از یک کتابخانه صید با استفاده از روش‌های غربال که مشابه روش‌های استفاده شده در غربالگری دو هیبرید است جداسازی شده است. کتابخانه‌های استفاده شده برای غربالگری دوگانه مخمر اغلب می تواند برای غربال تک‌گانه استفاده شود (۵ و ۱۵ و ۱۷). یک تغییر در سیستم مخمر دوگانه براساس LexA ابزارهایی برای محققین فراهم می کند که واکنش پروتئین – RNA را به صورت in vivo مطالعه کنند و به عنوان سیستم سه گانه RNA در مخمر[12] شناخته شده است که پروتئین های جداشده ای را که به یک مولکول طعمه RNA از یک کتابخانه VP16 AD –صید متصل می شوند شناسایی نماید. در اینجا نیز کتابخانه‌های یکسان استفاده شده برای دوگانه می‌تواند استفاده شود. مولکول طعمهRNA یک هیبرید بین RNA مورد نظر و MS2RNA است که به پروتئین پوشش MS2 متصل می‌شود. بوسیله ترکیب پروتئین پوشش MS2 به LexA- BD مولکول طعمهRNA برای پیشبرنده‌های ژن های گزارشگر مخمر به کار گرفته می‌شود(شکل۲۰). پروتئین‌هایی که با RNA مورد نظر واکنش می دهند می‌توانند به آسانی از کتابخانه‌های صید به وسیله آزمایش برای فعالیت ژن گزارشگر تعیین شوند (۵ و ۸ و ۱۷).

مطالعه واکنش پروتئین – پروتئین درسطوح سلولی به توسط سیستم مخمر دوگانه

تعیین Pex19p به عنوان شریک اتصال به Pex3p با استفاده از روش دوگانه در مخمر

اعمال پروکسیزوم در مسیرهای گوناگون متابولیکی مثل ß–اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره خیلی طویل و سنتز لیپیدهای اتری است. اختلالات ژنتیکی مربوط به ساخت مجدد پروکسیزوم ها در انسان شامل سندرم زلوگر (ZS)، آدرنولوکودیستروفی جنینی (NALD) و ... می‌باشد (۲۸ و ۲۹). قائدی و همکاران در سال ۱۹۹۹ cDNA های ۵ پروکسین را جداسازی نمودند. PEX2 کد کننده یک پروتئین سرتاسری غشاء پروکسیزوم، PEX6 کد کننده یک عضو از خانواده AAA ATPase، PEX12 کد کننده پروتئین حلقوی سرتاسری غشاء پروکسیزوم و PEX1 کد کننده یک پروتئین ۱۴۳KDa از خانواده AAA ATPase است(۲۹). PEX1، PEX2، PEX5، PEX6، PEX7، PEX12 همچنین PEX10 و PEX16 مسوول اختلالات سنتزی پروکسیزوم هستند (۲۹ و ۳۰). هشت ژن PEX در خروج پروتئین های ماتریکس پروکسیزوم دخیل هستند



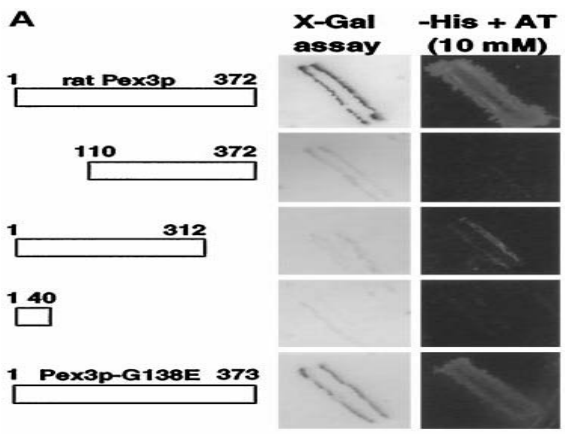
شکل ۲۰ : روش سیستم سه گانه RNA مخمر : RNA همراه با MS2RNA به ناحیه اتصال به DNA و پروتئین مورد نظر به ناحیه فعال کنندگی فاکتور رونویسی متصل می شود در صورت واکنش ژن بیان می شود (A) ساختار دو ساقه (Stem – loop) RNA استفاده شده در آزمایش (B) واکنش پروتئین و RNA با استفاده از فعالیت β گالاکتوزیداز مشخص گردیده است (C) تعیین واکنش با استفاده از رشد روی محسط فاقد هیستیدین (D) (۲۶)

PEX19 وPEX16 در مراحل اولیه تجمع غشا پروکسیزوم دخیل اند (۳۰). قائدی و همکاران در سال ۲۰۰۰ و شیموزاوا و همکاران در همان سال نشان دادند که پروکسین Pex3p هم

12- RNA yeast three – hybrid system

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

در دخول پروتئین های ماتریکس و هم در مراحل اولیه تجمع غشا پروکسیزوم نقش دارند (۲۸ و ۳۰). برای تعیین اینکه این پروتئین با کدامیک از پروتئین های پروکسیزومی در مرحله اول تجمع غشا واکنش می دهد و چه قسمتی از این پروتئین برای واکنش ضروری است ، قائدی و همکاران در سال ۲۰۰۰ آزمایشی را براساس روش فوق طراحی نمودند (۲۷). مخمر ساکارومایسس سرویزیه سویه MaV203 را با دو پلاسمید تراریخت نمودند که یکی زنجیره اتصال به DNA مربوط به GAL4 ترکیب شده با طول کامل Pex3p یا شکل شکسته شده شامل باقیمانده های ۳۷۲-۱۱۰، ۳۱۲-۹۱ و ۴۰-۱ از Pex3p و دیگری زنجیره فعال شدن GAL4 ترکیب شده با طول کامل Pex19p را کد می نمود. تراریخته ها بوسیله توانایی شان برای رشد روی محیط فاقد تریپتوفان، لوسین و هیستیدین بوسیله بیان ژن HIS3 کروموزومی شان غربال شدند. همچنین برای فعالیت b- گالاکتوزیداز ژن نشانگر LacZ نیز آزمایش گردید. نتایج نشان داد Pex19p یک پروتئین فارنسیل‌دار مورد نیاز برای تجمع پروکسیزوم می‌باشد که دارای فعالیت b-گالاکتوزیدازی مثبت و قدرت رشد روی محیط هیستیدین ۲ و ۳-آمینوتریازول را دارد. بر خلاف سایر پروکسین‌ها (Pex14p، Pex16p ، Pex13p ، Pex11pa و Pex11pb) پروکسین‌های حلقوی (Pex2p، Pex10p و Pex12p) منجر به نتایج منفی شدند. برای بررسی نواحی مسوول برای واکنش با Pex19p یک Pex3p با باقیمانده های اسید آمینه ۳۱۲-۱ یک سیگنال ضعیف دارد در حالیکه نمونه های جهش یافته دیگر شامل باقیمانده های ۳۷۲-۱۱۰، ۳۷۲-۱۵۱، ۲۰۳-۱ و ۴۰-۱ با Pex19p واکنش نشان ندادند. جهش Pex3p-G138E هم فعالیت b - گالاکتوزیدازی و هم قدرت رشد بر روی His2/AT1 داشت. بنابراین واکنش با Pex19p نیاز به طول کامل Pex3p دارد (۲۷).



شکل ۲۱ : واکنش Pex3p با Pex19p بوسیله آزمایش دوگانه (۲۷)

نقشه واکنش های پروتئین در مقیاس ژنوم[13]

با تکامل تکنیک دو گانه در خلال دهه گذشته کاربرد های متنوع مثل تحلیل مولکولی واکنش های پروتئین – پروتئین شناخته شده و تعیین شرکای واکنش دهنده جدید آشکار شده است . با این وجود با در دسترس بودن توالی های کامل DNA برای بیشتر ژنوم‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی روش‌هایی در مقیاس ژنوم[14] برای فهم بهتر عمل پروتئین مهم می‌باشد. برای رفع این نیاز سیستم آزمایش دو گانه تغییر یافته، برای تثبیت نقشه واکنش های پروتئین (PIMs)[15] در مقیاس بزرگ از یک اورگانیسم تایید شده است. این نقشه‌ها ممکن است شامل بیشتر واکنش‌های پروتئینی ممکن در خلال دوره زندگی کامل یک سلول باشد (۴ ، ۵ ، ۹ ، ۱۰ ، ۱۱ و ۱۳). چندین نوع اطلاعات می تواند از این PIM ها بدست آید که شامل :

۱-آشکار کردن اعمال پروتئین های تعیین شده جدید

۲-تعیین خصوصیت مسیرهای متفاوت انتقال سیگنال و مسیرهای متابولیک

۳-تعیین اهداف دارویی جدید

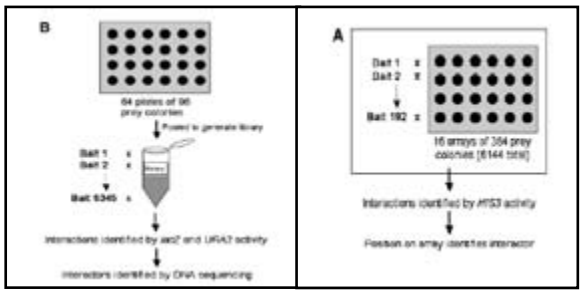
۴-تولید بینش در پیچیدگی یک فرایند بیولوژیک (۴)

13- Genome – wide protein interaction maps
14- Genome – wide
15- Protein interaction maps

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

تا امروز PIMs در مقیاس ژنوم برای ویروس T_7 کلی باسیل ، ویروس واکسینیا [16] ، مخمر جوانه زننده ساکارومایسس سرویزیه ، هلیکوباکتر پیلوری[17] ونماتد Caenorhabditis elegans با استفاده از آزمایش دو هیبرید به دست آمده است. روش های سازگار شده برای تولید این نقشه های واکنش می تواند به طور وسیع به دو نوع تقسیم بندی شود : ۱- روش ماتریکس[18] ۲- روش غربال کتابخانه [19]

در روش بر اساس ماتریکس open – reading frames (ORF) با طول کامل در ناقل های دوهیبرید طعمه و صید کلون شده اند که به طور جداگانه به سویه های مخمر MATα و MATa تراریخت می شوند . هر سویه طعمه با یک ردیف از سویه های صید جفت می شود و دیپلوئیدهایی که پروتئین های واکنش دهنده را بیان می کنند براساس فعالیت ژن گزارشگر تعیین می شود . موقعیت روی ردیف برای تعیین واکنش دهنده ها استفاده می شود . روش دوم براساس کتابخانه است . کتابخانه های صید تعریف نشده که بیان کننده یا ORF های با طول کامل یا cDNA های تولید شده به صورت تصادفی هستند با سویه های طعمه غربال[20] می شوند این غربال به وسیله تولید استخر[21]هایی از کتابخانه ساده می گردد که بر علیه هر طعمه (یا استخری از طعمه) می تواند غربال شود تعیین واکنش دهنده ها به وسیله بررسی توالی DNA تعیین می شود (شکل ۲۱) (۴ ، ۵ ، ۱۰ و ۱۱) . غربالگری واکنش های پروتئین ژنوم در مقیاس وسیع ابتدا به ارگانیسم های ساده با ژنوم کوچک مثل باکتریوفاژ T_7 یا کلی باسیل و بعد با پروتئوم ویروس هپاتیت C و ویروس واکسینیا محدود می شود. با این وجود همانطور که مقدار در حال افزایش داده های توالی ژنوم برای ارگانیسم هایی از قبیل ساکارومایسس سرویزیه در دسترس قرار گرفت، گزارشهای غربال های دو هیبرید در مقیاس بزرگ برای ارگانیسم های پیچیده تر در مقالات آشکار شد. ابتدا این گزارشها یک مطالعه از کمپلکس کارکردی دخیل در پردازش pre – mRNA مخمر بود. یک تعداد کلی از ۲۶ عامل پردازش pre – mRNA به عنوان طعمه برای غربال برعلیه یک کتابخانه ژنومی تصادفی مخمر استفاده گردید . بیش از ۴۰۰ واکنش بالقوه تعیین شده که شامل عوامل پردازش کننده شناخته شده ، عوامل پردازش کننده جدید و پروتئین های دخیل در محصول mRNA است . با استفاده از کتابخانه پروتئوم مخمر یکسان ، Flores و همکاران واکنش هایی را بررسی کردند که شامل ۱۲ سابیونیت پروتئین از کمپلکس RNA پلیمراز III مخمر است بررسی غربال های جامع دو هیبرید ، یک نقشه واکنش پروتئین – پروتئین کمپلکس پلیمراز را آشکار کرده و یک مدل از کمپلکس پیش آغازگر، پلیمراز III را پیشنهاد داده است. غربال های واکنش در مقیاس وسیع با پروتئین های مخمر، مناسب بودن تکنیک برای ترسیم شبکه های واکنش پروتئینی مهم از نظر کارکردی را ثابت کرده است.غربال های مشابه همچنین استفاده شده که سوالات بیولوژیک مهم در ارگانیسم هایی از قبیل مگس سرکه ، نماتدCaenorhabditis elegans و هلیکوباکتر پیلوری و Oryza sativa را جواب داده است .



شکل۲۱ : روش ماتریکس : در یک میکرو پلیت در هر ردیف یک طعمه به صید های موجود در هر چاهک اضافه می گردد (A) روش کتابخانه : یک استخر از صید به استخری از طعمه ها اضافه می شود و با کشت بر روی محیط واکنش تعیین می گردد (B) (۵)

اولین ژنوم یوکاریوتی که به طور کامل تعیین توالی شد و تفسیر شد ژنوم ساکارومایسس سرویزیه بود که تعیین ژنوم منجر به اولین بررسی جامع واکنش دهنده ها [22] در یک سلول شد. Uetz و همکارانش روش های براساس ماتریکس

16- *Vaccinia virus*
17- *Helicobacter pylori*
18- Matrix approach
19- Library screening approach
20- Screen
21- Pool
22- Interactome

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

و کتابخانه را برای امتحان واکنش ها بین پروتئین های کد شده به وسیله ۶۰۰۰ ORF مخمر استفاده نموده اند. با استفاده از روش ماتریکس ۱۹۲ پروتئین طعمه بر علیه یک ردیف از تقریبا ۶۰۰۰ صید غربال شده و ۲۸۱ جفت پروتئین واکنش دهنده تعیین شد. در روش براساس کتابخانه یک بررسی جامع از واکنش های پروتئینی انجام شده است ۶۰۰۰ صید برای تولید یک کتابخانه پیچیده استفاده می شود. کتابخانه با طعمه های تکی که تقریبا همه ۶۰۰۰ ORF مخمر را ارائه می کند غربال شد و ۶۹۲ واکنش پروتئین – پروتئین از طریق این روش تعیین گردید. مقایسه دو روش مشخص کرده است که روش بر اساس ماتریکس که ۳/۴ واکنش برای هر طعمه را تعیین می کند. این روش نسبت به روش براساس کتابخانه که فقط ۱/۸ واکنش برای هر طعمه تعیین می کند حساس تر است. یک روش بر اساس کتابخانه همچنین بوسیله Ito و همکاران در مطالعه جامع آنها از واکنش دهنده های مخمر استفاده شده است. ۶۰۰۰ ORF مخمر به طور فردی در ناقل های طعمه و صید کلون شده اند. طعمه ها به طور فردی به سلول های مخمر MATa و صید به MATα تراریخت شدند. هر تراریخته در چاهک یک پلیت ۹۶ چاهکی تکثیر می شود و سویه های مخمر هر پلیت در یک لوله تک برای تولید کتابخانه های ۶۲ طعمه و ۶۲ صید جمع آوری می شود. همه واکنش های ممکن بین استخرها به وسیله جفت کردن هر استخر حاوی طعمه بر علیه هر استخر حاوی صید بررسی گردید که منجر به یک تعداد کلی ۳۸۴۴ واکنش جفت شونده می شود. این روش ۸۴۱ واکنش قابل توجه را نشان می دهد (۵).

سیستم های دوگانه دیگر

امروزه یک تعداد از سیستم های دوگانه براساس سلولهای باکتریایی و پستانداران طراحی شده است. اصول این سیتم ها با آنچه در سیستم مخمر استفاده می شود یکسان است (۶ و ۱۵). در سیستم های براساس سلول باکتریایی یک پروتئین با پروتئین C1 باکتریوفاژ لامبدا و دیگری با ناحیه آمین انتهایی زیر تکه آلفا RNA پلیمراز ترکیب می شود. واکنش بین دو پروتئین باعث اتصال RNA پلیمراز به پیش برنده و بیان ژنهای مقاومت به آمپی سیلین و LacZ می شود. مزیت اصلی سیستم باکتریایی نسبت به سیستم مخمر سرعت و پتانسیل غربالگری کتابخانه های ژنی بزرگتر است. با این وجود چون سیستم براساس سلولهای پروکاریوتی است ، ممکن است مشکلاتی را در رابطه با تغییرات بعد از ترجمه که در بعضی واکنش های پروتئین – پروتئین دارای اهمیت است داشته باشد (۶ . بنابراین در این مورد استفاده از سیستم دوگانه پستانداران ممکن است سودمند باشد. این سیستم در سلولهای پستانداران و با استفاده از پلاسمیدهایی که قابلیت تکثیر توسط ماشین همانندسازی پستانداران را دارند طراحی شده است. رایج ترین ژن گزارشگر استفاده شده در این سیستم یا کلرامفنیکل استیل ترانسفراز یا لوسیفراز است. عیب این سیستم این است که فاقد ظرفیت برای غربالگری مقدار زیاد سلولهای ترانسفکت شده می باشد. در واقع سیستم برای تایید واکنش های مشاهده شده در سیستم براساس مخمر استفاده می شود (۱۵).

نتیجه گیری

سیستم دو هیبرید یک ابزار مناسب برای تعیین واکنش های بین پروتئین هاست. همچنین با این روش می توان توالی واکنش های پروتئین های دخیل در یک فرایند را هرچند پیچیده تعیین نمود. مطالعات انجام شده ثابت نموده که با تغییرات انجام شده بر روی سیستم به طوریکه موارد مثبت کاذب حذف شود شبکه واکنش های پروتئین – پروتئین که در خلال زندگی یک سلول روی می دهد در نتیجه نقشه واکنش های پروتئینی سلول تعیین خواهد شد و در نهایت می توان پروتئین های کلیدی مسوول برای کنترل رشد سلول را تعیین نمود. همچنین فعالیت ژن های ناشناخته را بوسیله تعیین پروتئین هایی که آنها را کد می کنند مشخص نمود. امروزه علاوه بر سیستم دو گانه براساس مخمر سیستم هایی براساس باکتری و سلول پستانداران نیز در حال گسترش است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

منابع

1.Invitrogene. 2002. ProQuest™ Two – Hybrid System with Gateway Technology. Available : // www.lifetech.com.

2-Golemis EA, Serebriiskii I, Gyuris J and Brent R (1997) Interaction Trap/ Two – Hybrid system to Identify Interaction Proteins. Current Protocols in Molecular Biology. 20.1.1-20.1.35.

3-Henn LM, Gibson N and Panisko E (1999) Application of the Yeast Two – Hybrid System. Methods. 19: 330-337.

4-Mukherjee S, Bal S and Saha P (2001) Protein interaction maps using yeast two – hybrid assay. Current Science. 81: 458-464.

5-Causier B (2004). Studying the interactome with the yeast two – hybrid system and mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviees. 23: 350-367.

6-Causier B and Davise B (2002). Analysing protein – protein interaction with the yeast two – hybrid system. Plant Molecular Biology. 50: 855-870.

7-Allen JB, Walberg MW, Edwards MC and Elledge SJ (1995). Finding prospective partners in the library: the two – hybrid system and phage display find a match. TIBS. 20: 511-516.

8-Sengupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P and Fields S (1996) A three – hybrid system to detect RNA – Protein interaction in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 8496-8501.

9-Evangelista C, Lochshon D and Fields S (1996). The yeast two - hybrid system: prospects for protein linkage maps. Trends in Cell Biology. 6: 196-199.

10-Walhout AJM, Boulton SJ and Vidal M (2000) Yeast two – hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. Yesat. 17: 88-94.

11-Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M and Sakaki Y (2001) A comprehensive two – hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. PNAS. 98(8): 4569-4574.

12-Uets PH and Hughets RE (1998) The two – hybrid system: finding likely partners for lonely proteins. Focus. 20 (3): 62-64.

13-Sobhanifar S (2003) Yeast two – hybrid assay: A fishing tale. BioTech Journal. 1: 81-88.

14-Serebriiskii I, Khasak V and Golemis EA (1999) A Two-hybrid Dual طعمه System to Discriminate Specificity of Protein Interactions. The Journal of Biological Chemistery. 274 (24): 17080-17087.

15-Knudsen CA, Jadidi M, Friis I and Mansilla F (2002) Application of yeast two hybrid system in molecular gerontology. Biogerontology. 3: 243-256.

16-Clark DD and Peterson BR (2005) Fluorescence – based cloning of a protein tyrosin kinase with a yeast tribrid system. ChemBioChem. 6: 1442-1448.

17-Coates PJ and Hall PA (2003) The yeast two – hybrid system for identifying protein – protein interaction. Journal of Pathology. 199: 4-7.

18-Sobhanifar S (2006) The Yeast two – hybrid assay: an exercise in experimental eloquence. Available: http://www.bioteach.ubc.ca / MolecularBiology / AYeastTwoHybridAssay

19-Available : // http://www.mun.ca /biology/scarr /Figures_Ch9_Genomics / Yeast_2-hybrid.html

20-Available : // http:// www.nature.com/ horizon/ proteases/ background/ figs/ searching_f1.html

21-Criekingel WV and Beyaert R (1999) Yeast two – hybrid: state of the art. Biological Procedures Online. 2 (1): 1-38.

22-Available : // http://www.molbio.ku.dk/MolBioPages/ amc/PersonalPages/ BMW/ExRasMutants.gif

23-Nelson TJ (1999) Yeast two – hybrid screening using LexA system. Available : // http://brneurosci.org/methods/2hybrid/methods 13.html

24-Available : // http:// bioweb.wku.edu/ courses/biol566/ L4EukPolymerase. Html

25-Available : //http://www.sciencemag.org/feature/e-market/ prodlink/ stratcyto .dtl

26-Kodama Y, Rothman JH, Sugimoto A and Yamamoto A (2002) The stem loop binding protein CDL-1 is required for chromosome condensation , progression of cell death and morphogenesis in *Caenorhabditis. Elegans.* Development. 129: 187- 196.

27- Ghaedi K, Tamura S, Okumoto K, Matsuzono Y and Fujiki Y (2000) The Peroxin Pex3p Initiates Membrane Assembly in Peroxisome Biogenesis. Molecular Biology of the Cell. 11: 2085-2102.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]

28- Ghaedi K, Honsho M, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N and Fujiki Y (2000) PEX3 Is the Causal Gene Responsible for Peroxisome Membrane Assembly–Defective Zellweger Syndrome of Complementation Group G. Am. J. Hum. Genet. 67: 976-981.

29- Ghaedi K, Itagaki A, Toyama R, Tamura S, Matsumura T, Kawai A, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N and Fujiki Y (1999) Newly Identified Chinese Hamster Ovary Cell Mutants Defective in Peroxisome Assembly Represent Complementation Group A of Human Peroxisome Biogenesis Disorders and One Novel Group in Mammals. Experimental Cell Research. 248: 482–488.

30-Shimozawa N, Suzuki Y, Zhang Z, Imamura A, Ghaedi K, Fujiki Y and Kondo N (2000) Identification of PEX3 as the gene mutated in a Zellweger syndrome patient lacking peroxisomal remnant structures. Human molecular genetics. 9 (13): 1995-1999.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.1.1.8]