

DOI: 10.1360/yc-006-1627

# 大规模酵母双杂交技术研究蛋白质相互作用的应用

吴志豪, 王建, 贺福初

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

**摘要:** 简介了酵母双杂交技术原理, 总结了酵母双杂交技术大规模筛选蛋白质相互作用的基础、应用及存在的问题。因为大规模酵母双杂交技术结果有大量假阳性及假阴性问题, 因此, 有条件情况下有必要同时开展其他方法的大规模蛋白相互作用研究, 以构建规模更大可信度更高的蛋白质相互作用网络图。

**关键词:** 大规模; 酵母双杂交; 蛋白质相互作用

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)12-1627-06

## The Application of Large-scale Yeast Two-hybrid to Study Protein—Protein Interaction

WU Zhi-Hao, WANG Jian, HE Fu-Chu

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

**Abstract:** The principle of yeast two-hybrid were summarized, the basis for large scale yeast two-hybrid screening of protein-protein interaction was given and the main application of yeast two-hybrid in large scale screening of protein-protein interaction was presented. The problems of large scale yeast two-hybrid screening of protein-protein interaction were also discussed. Because there were a lot of false positives and false negatives in the result of protein-protein interaction obtained by large-scale yeast two-hybrid screening, the employment of other methods to study protein-protein interaction in large scale in parallel was proposed if possible.

**Key words:** large scale; yeast; two-hybrid; protein-protein interaction

人类基因组计划的完成, 测序了许多模式生物基因组和人类自身基因组, 产生了大量的预测的开放阅读框(open reading frame, ORF); 人类基因组计划还促进了测序技术的发展, 使被测序的生物越来越多, 产生更多的预测 ORF。但是, 大多数预测 ORF 的功能尚不清楚, 研究和注释这些 ORF 的功能也就成了基因组测序后重要而紧迫的任务。

研究基因功能的方法很多, 有传统的由表型到基因的方法, 也有反向生物学的由基因序列到功能的

方法, 其中酵母双杂交技术是研究基因功能的一种重要方法。基因的功能由其编码的蛋白质来体现, 蛋白质是基因功能的执行者, 而蛋白质功能的发挥是通过蛋白质—小分子底物、蛋白质—核酸和蛋白质—蛋白质之间相互作用而实现的, 所以, 通过研究已知功能蛋白质和未知功能蛋白质是否相互作用, 可有助于了解未知蛋白的功能。酵母双杂交技术就是基于研究蛋白质是否相互作用而建立的, 该技术建立十多年来, 已广泛用于研究蛋白—蛋白的相互

收稿日期: 2006-01-22; 修回日期: 2006-03-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2002-BA711A11, 2004BA711A19)和北京市科委计划项目(编号: H030230280290)[Supported by the Chinese National Programs for High Technology Research and Development (863 Program) (No.2002-BA711A11, 2004BA711A19) and the Plan Program of Beijing Science Committee (No.H030230280290)]

作者简介: 吴志豪(1973—), 男, 贵州从江县人, 博士研究生, 专业方向: 细胞生物学。E-mail: [wuzh@hupo.org.cn](mailto:wuzh@hupo.org.cn)

通讯作者: 贺福初(1962—), 男, 中国科学院院士, 博士生导师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: [hafc@nic.bmi.ac.cn](mailto:hafc@nic.bmi.ac.cn)

作用,并向大规模、自动化、高通量方向成熟,近几年用于研究了一些模式生物的几乎全部 ORF 之间的相互作用,为大规模研究蛋白-蛋白相互作用以了解更多蛋白质的生物学作用和细胞的复杂分子系统提供了范例。

## 1 酵母双杂交技术原理

1989年,Fields S等<sup>[1]</sup>报道了一种检测蛋白-蛋白相互作用的遗传方法-酵母双杂交技术,它是利用转录激活因子GAL4的特性建立的。GAL4由两个结构域组成,一个是N端的DNA结合域(DNA binding domain, DBD),一个是C端的转录激活域(active domain, AD),二者可以从核酸一级结构上分开而独立表达出有功能的结构域;当二者在物理空间上靠近时可再现完整的转录因子活性,和自然表达转录激活因子GAL4一样,可结合其顺式元件UAS<sub>G</sub>并激活下游的半乳糖苷酶基因转录。因此,用目的蛋白X的核酸序列同DBD的核酸序列融合表达DBD-X,用目的蛋白Y的核酸序列同AD的核酸序列融合表达AD-Y,如果X和Y相互作用,则使DBD和AD两结构域在物理空间上靠近,而重显完整的转录激活因子功能,激活其下游基因表达。因此,检测GAL4调控的半乳糖苷酶的活性就可判断X、Y是否相互作用。

从上可见,酵母双杂交技术研究蛋白质相互作用是细胞内实验,即不需提纯蛋白来研究蛋白的相互作用,消除了提纯过程引起的蛋白变性,因而研究的是有生物活性的蛋白-蛋白相互作用,反映体内的真实作用情况。因此,受到了许多科学工作者的关注和应用,促进了其应用于大规模蛋白-蛋白相互作用的研究。

## 2 大规模酵母双杂交技术的发展基础

大规模双杂交技术的发展与许多因素有关,其中一些技术的发展和应用于酵母双杂交技术向大规模、自动化方向发展打下了基础。

### 2.1 表达文库构建技术

表达文库构建技术出现较酵母双杂交技术早,到酵母双杂交技术出现时表达文库构建技术已基本成熟,因此,把表达文库应用于酵母双杂交筛选蛋白质相互作用得到了研究——单个诱饵对猎物 cDNA 文库/基因组文库筛选蛋白相互作用、或诱饵文库

(cDNA 文库/基因组文库)对猎物文库(cDNA 文库/基因组文库)筛选蛋白相互作用,结果大大提高了相互作用蛋白的筛选效率和规模,促进了酵母双杂交技术研究蛋白质相互作用向大规模方向发展。

### 2.2 Gateway 克隆技术

Gateway 克隆技术是利用 $\lambda$ 噬菌体 DNA 自然条件下可与其宿主大肠杆菌 DNA 发生位点特异性重组整合和可逆切割分离这一机制并加以改进创建的。相对酶切构建载体来说,该技术具有需时短、操作简单、易于各实验室交流的特点,即只需通过简单、高效的 BP 和 LR 反应就可实现把 PCR 产物定向转入克隆质粒和表达质粒,实现 PCR 产物在各种质粒间的转移。另外,这一技术得到了一些大生物公司的重视,不但有 BP Clonase、LR Clonase 和各种构建好的质粒载体出售,还有利用该技术建好的各种全长 ORF 克隆、全长 cDNA 文库等供选购,直接购买应用可简化准备工作。

### 2.3 PCR 技术和测序技术

PCR 技术和测序技术已经实现大规模和自动化,因此,使诱饵对文库的筛选或文库对文库的筛选的阳性克隆测序和鉴定变得容易、快速;另外,两项技术的发展使全基因组测序成为现实,产生了许多物种的基因组序列及预测的 ORF,因此,使人们对一种生物的所有预测 ORF 所编码蛋白进行大规模相互作用研究成为可能。

### 2.4 酵母交配技术

酵母单倍体菌株有两种相反的交配型,可交配形成二倍体酵母,因此,可把 DBD-X 转化入一种单倍体,AD-Y 转化入另一种单倍体,然后把分别含 DBD-X、AD-Y 的两种单倍体共接种到液体培养基培养、交配后再接种到二缺板上培养,这样只有含 DBD-X 和 AD-Y 的二倍体菌株生长,然后作表型鉴定判断 X、Y 有无相互作用。显而易见,这个过程相对顺序转化或共转化来说,不但显得简单、高效,而且易于大规模和自动化。

另外,适合阵列筛选的配套仪器已经出现,如 HiGro 摇床、Beckman 自动加样工作站、Genetix 公司 MegaMate 装置等,使大规模酵母双杂交技术变成现实。

### 3 大规模酵母双杂交技术的应用及筛选方式

随着技术的发展、进步和基因组测序的实现, 酵母双杂交技术用于大规模研究蛋白-蛋白相互作用的报道逐渐增多, 研究了从简单到复杂物种的蛋白质相互作用, 结果获得了大量宝贵的相互作用数据, 建立了一些物种的相互作用网络, 再现和拓展了许多生物通路规律, 揭示了许多未知蛋白的功能和已知蛋白的新功能。

#### 3.1 研究病毒基因组的蛋白质连锁图谱

T7 噬菌体(*Enterobacteria phage T7*)基因组相对较小, 是酵母双杂交技术在全基因组水平上研究蛋白-蛋白相互作用的第一个物种, 通过其基因组文库对其基因组随机文库方式筛选得到 25 个相互作用, 其中 4 个是以前未曾报道的<sup>[2]</sup>。

#### 3.2 研究蛋白质功能复合体

Fromont-Racine M等<sup>[3]</sup>以 60 多个酵母ORF作诱饵对随机酵母基因组文库筛选相互作用蛋白, 构建了酵母mRNA剪接体蛋白的相互作用网络; 另外, Flores A等<sup>[4]</sup>以 17 个ORF作诱饵对随机酵母基因组文库筛选, 研究了RNA聚合酶III的蛋白质相互作用, 推测RNA聚合酶III的功能起始前复合体模型。

#### 3.3 研究与特定器官或功能发育有关的蛋白质相互作用图谱

Walhout A J等<sup>[5]</sup>选择外阴发育有关的 27 个蛋白分别筛选线虫cDNA文库, 筛选出的相互作用既有已知的白质相互作用也有新的蛋白质相互作用, 包括约 100 个未知功能蛋白质相互作用。在酵母细胞极性发育有关的蛋白质的研究中, Drees B L等<sup>[6]</sup>从肌动蛋白、分泌泡、细胞骨架、Rho型GTP酶蛋白中选择 68 个做诱饵, 对含约 90%酵母的ORF阵列筛选, 检测到 191 对相互作用, 其中 128 对是以前未曾报道过的, 44 对与细胞极性发育有关; 与极性有关的 44 对相互作用蛋白中, 有 20 个未知功能蛋白。

#### 3.4 研究细菌基因组的蛋白质相互作用图谱

Rain J C等<sup>[7]</sup>建立了 261 个ORF-BD克隆, 用幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)基因组的 26 695 个随机片段建立了融合激活域文库, 经自激活检测和

筛选培养条件摸索后, 用ORF-BD分别筛库, 结果得 13 962 个克隆, 测序 13 296 个, 分析猎物片段, 鉴定SID(selected interaction domain), 得到 2680SID, 其中 1 100 不在幽门螺旋杆菌的ORF编码区内而弃掉, 剩下 1280SID, 平均每个蛋白质筛到 3.36 个作用伴侣, 在此基础上, 作者对相互作用进行打分(PIM biological score), 构建蛋白相互作用图谱, 并深入分析通路、鉴定蛋白复合体。

#### 3.5 研究模式生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)基因组的蛋白质相互作用图谱

(1) Uetz P等<sup>[8]</sup>用 192 个酵母ORF与Gal4-DBD融合表达做诱饵, 酵母的 6 000 个ORF(几乎酵母的全部ORF)与Gal4-AD融合表达做猎物, 分别转化两种相反交配型的单倍体菌株, 把后者制成阵列, 与含DBD-X菌株一一对应交配形成二倍体, 筛选相互作用, 得到 87 个蛋白质的 281 对相互作用。

(2) Uetz P等<sup>[8]</sup>还用酵母的 5 341 个ORF与Gal4-DBD构建诱饵, 6 000 个酵母ORF与Gal4-AD构建猎物, 诱饵和猎物分别转化相反交配型的菌株, 然后集合猎物菌株成库, 用诱饵菌株分别对库筛选, 交配形成二倍体, 筛选相互作用。结果得 817 个蛋白的 691 对相互作用, 88 对是已知报道过的。

(3) Ito T等<sup>[9]</sup>构建了含酵母约 92%ORF的Gal4-DBD-ORF的诱饵载体(pGBK-RC)和Gal4-AD-ORF的猎物载体(pGAD-RC), 分别转化入MAT $\alpha$ 和MAT a菌株, 然后分别集合诱饵和猎物成亚库, 即每 96 个诱饵或猎物集合成一亚库, 各得 60 个亚库。然后诱饵亚库对猎物亚库一一相互作用, 产生二倍体, 筛选相互作用。初始筛选的 430 次亚库交配(约占全部所选ORF相互作用的 10%)产生 866 个克隆, 得到 175 对相互作用, 其中 12 对是已知的相互作用, 163 对是未报道过的。

(4) Ito T等<sup>[10]</sup>把所构全部亚库相互作用后, 共检测到 3 278 个蛋白的 4 549 对相互作用, 其中 841 对相互作用被检测到 3 次以上, 105 对是已知报道过的。

#### 3.6 研究模式生物线虫(*Caenorhabditis elegans*)的蛋白质相互作用图谱

Li S等<sup>[11]</sup>用Gateway克隆技术建立的 1 873 个线虫ORF作诱饵筛选线虫的AD-wr m cDNA库和AD-ORFeome1.0库, 阳性克隆测序, 共得约 16 000 个

相互作用序列标签(IST, Interaction sequence tag)。然后作者建立相互作用标准和对相互作用分型, 结果得 4 027 对不同的相互作用, 包括对 AD-wrmcDNA 库筛选得到的 2 783 对和对 AD-ORFeome1.0 库筛选得到的 1 505 对, 其中, 有 239 对相互作用二者均有; 为了验证所得相互作用数据的可靠性, 作者选取酵母双杂交方法筛选所得的部分相互作用作亲和纯化方法验证, 并进一步收集已知相互作用数据和转录组数据, 结合起来作深入分析。

### 3.7 研究模式生物果蝇(*Drosophila melanogaster*)的蛋白质相互作用图谱

用果蝇的 10 623 个预测转录本作为诱饵, 对 cDNA 文库筛选, 得 7 048 个蛋白的 20 405 对相互作用, 作者进一步开发蛋白质相互作用可信度计算方法来对这些相互作用分析处理, 提炼出更高可信度的相互作用图谱, 包括 4 679 个蛋白质的 4 780 对相互作用<sup>[12]</sup>; 该相互作用网络再现了许多已知通路, 也拓展了原有通路, 发现了通路的新成分。

### 3.8 研究人(*Homo sapiens*)的蛋白质相互作用网络

Stelzl U 等<sup>[13]</sup>主要用胎脑文库克隆构建了 4 456 个诱饵和 5 632 个猎物, 把 8 个不同诱饵编号并分配集成小库, 分别同 5 632 个猎物矩阵交配, 显阳性结果的猎物再同 8 个猎物的每一个交配, 鉴定阳性克隆, 结果得到 1 705 个蛋白质的 3 186 对相互作用所构成的巨大相互作用网络, 其中包扩 195 个疾病蛋白和 342 个未知蛋白。另外, 在选取酵母双杂交方法筛选所得的部分蛋白相互作用作亲和纯化方法验证后, 作者进一步建立了 6 个标准的打分系统来分析酵母双杂交筛选所得结果, 最后得到一包括 402 个蛋白质的 911 个相互作用对的可信度更高的相互作用网络, 该网络也具有大规模酵母双杂交方法所构建的酵母、线虫、果蝇的蛋白相互作用网络特征——无尺度、小世界、分级结构。几乎同时, 另一工作组用 8 100 个 ORF(对应 7 200 个基因)作猎物和诱饵, 把诱饵编号并分配集成 45 个小库(每个小库含 118 个基因), 每个诱饵对小库交配, 筛选阳性克隆, 部分测序鉴定猎物, 结果得到 2 800 个相互作用的网络, 然后也选取部分相互作用作亲和纯化验证, 并进一步评估所得相互作用的真实性和分析该网络与疾病蛋白的联系<sup>[14]</sup>。

## 4 几种不同的筛选法

从上可知, 大规模酵母双杂交技术已用于研究了从病毒到人的蛋白质相互作用研究, 但从大规模酵母双杂交筛选方式来看, 却采用了几种不同的方式。

### 4.1 文库筛选法

一般用相对较少的已知或未知诱饵去筛选相对较大猎物库, 也可以在诱饵筛选出阳性猎物后, 再以猎物为诱饵筛库, 如此循环, 不断扩大谱图。诱饵可以一个或数个至数千个, 可以是 ORF、全长 cDNA 或它们的片段(含结构域); 猎物库一般很大, 可以是众多 ORF 集成成的库, 也可以是全长 cDNA 库或 cDNA 片段库, 或随机基因组片段库。文库筛选法优点是得到相互作用的结构域信息和降低假阴性率, 但同时也可能提高假阳性率<sup>[15]</sup>。

### 4.2 阵列筛选法

#### (1) 一对一阵列法。

所有含不同 DBD-X 的菌株和所有含不同 AD-Y 的菌株一一对应筛选。这种筛选方法工作量大, 但阳性克隆可从阵列位置推出序列信息而不需测序, 可自动化, 且理论上检测出蛋白质所有相互作用的可能性大。

#### (2) 高通量阵列法。

把所有不同 ORF-AD 集成库, 然后与排成阵列的不同 DBD-X 作用的筛选方法, 其实质是诱饵数量较大情况下的阵列化文库筛选。优点是较高通量, 但需测序鉴定阳性克隆。

#### (3) 亚库对亚库法(pool-to-pool)。

把总数较大的 DBD-X 和 AD-Y 的成员分别编号并分组, 每组含一定数量的成员, 然后集合每组成员形成亚库(pool), 再用猎物亚库对诱饵亚库一一作用, 筛选阳性克隆。此法在酵母基因组的 ORF 筛选中比高通量阵列法还高通量, 但对阳性克隆的猎物和诱饵都需测序鉴定。

### 4.3 两步法

结合文库筛选和阵列筛选, 发挥二者优势。先以单个猎物对诱饵亚库筛选, 然后把阳性克隆对应的猎物再同其作用的诱饵亚库的诱饵一对一作用以筛选阳性克隆。Stelzl U 等<sup>[13]</sup>对胎脑蛋白相互作用研究采用此法。优点相当于验证一次表型, 同时不需测序,

减少了工作量、耗材和费用<sup>[16]</sup>。

## 5 大规模酵母双杂交技术的局限性

酵母双杂交筛系统虽因其优点而广泛用于研究蛋白质相互作用,但也有其自身固有的缺点,如实验设计、结果处理和分析时都要考虑的假阳性和假阴性问题。

### 5.1 假阴性产生的原因

(1) 有些蛋白由于细胞定位特性可致假阴性结果,如细胞内定位不在细胞核的蛋白,尤其定位细胞膜和通过分泌泡分泌到细胞外的蛋白,难以检测。

(2) 蛋白未能正确修饰和折叠。融合表达可能会影响蛋白修饰和折叠,尤其在酵母双杂交系统中研究异源蛋白相互作用时,蛋白不一定能正确修饰和折叠。另外,还可能水解异源蛋白。

(3) 有的蛋白对酵母菌株有毒性或抑制菌株生长。

### 5.2 假阳性产生的原因

(1) DBD-X 有自激活作用。

(2) 有一些 AD-Y 融合蛋白中的 Y 可能结合 DBD 或启动子或启动子附近序列或蛋白并能激活转录。

(3) DBD-X 和 AD-Y 不是通过 DBD-X—Y-AD 直接激活转录,而是通过第 3 种蛋白或多蛋白的复合体把 X、Y 募集到一起,激活转录。

(4) 非特异 DBD-X—Y-AD 相互作用,因为有的蛋白表面具有成簇的疏水氨基酸或其他可引起 X、Y 非特异作用的结构。

(5) 有的蛋白不激活转录,但可以改变酵母生长活性、通透性、生长速率来使 LacZ 检测呈现阳性。

(6) 酵母菌株的一些适应性改变可导致无相互作用的菌株在营养缺陷选择培养基上生长。

大规模酵母双杂交筛选蛋白质相互作用同样存在假阳性和假阴性问题,甚至更严重和复杂。在 Uetz P 等<sup>[8]</sup>研究酵母蛋白质相互作用图谱的实验中,高通量阵列筛选法(大规模)所得的 817 个相互作用只有 12 个是一一对应(相对小规模)筛选的相互作用,说明大规模筛选会增加假阴性。假阴性率可评估,一般选择明确有相互作用的蛋白做诱饵和猎物来通过该系统筛选确定。上述的两组酵母大规模筛选,高达 90% 的已知蛋白相互作用未能检测到。Li S 等<sup>[11]</sup>的线虫大规模筛选数据,对已知蛋白相互作用的覆盖度也只

约 10%。假阳性同样会随筛选规模的增大而增加,尤其文库筛选法中,随机产生的 cDNA 片段转入 DBD 载体后,作自激活检测,结果有高达 10% 的有自激活作用,文库筛选法还有可能筛选到实际中无相互作用甚至无生物学意义的肽段。一般,假阳性率难以评估,现在主要是通过随机选取酵母双杂交筛到的部分相互作用,作另一亲和纯化方法验证来评估。

另外,大规模酵母双杂交筛选蛋白质相互作用还存在结果重复性低的问题。Uetz P 等<sup>[8]</sup>对酵母基因组 ORF 相互作用大规模筛选得相互作用 692 对, Ito T 等大规模筛选得 841 对,但两个实验共有的相互作用仅为 141 对,一致性不高。两篇大规模研究人蛋白相互作用结果的一致性更低,共有的相互作用只有 25 对。

## 6 结 语

酵母双杂交技术因具有操作相对简单,不需提纯蛋白,属于体内实验等优点,被广泛地用于蛋白质相互作用研究,迄今为止,是用于大规模研究蛋白质相互作用最多的方法。虽然,酵母双杂交实现了大规模筛选,有了自动工作站,但整个流程自动化程度还不高,还需要大量的人力辅助,因此,探索和改进大规模酵母双杂交自动化筛选过程的研究仍在进行<sup>[16,17]</sup>。另外,酵母双杂交技术大规模筛选的结果存在假阴性和假阳性高及重复性低的问题。为此,人们从实验规程到系统改进和结果处理等多方面考虑:如诱饵需经自激活检验来决定,无自激活的才可作为诱饵筛库;发展了一些新的酵母双杂交系统,如分离泛素系统、SOS 招募系统等;选取酵母双杂交筛选所得的部分相互作用作亲和纯化验证以评估所得全部互作用的可靠性;收集已有的蛋白相互作用来验证结果。但这些只一定程度解决了问题,所以,有条件的话应同时开展其他方法的大规模蛋白质相互作用研究或验证,如大规模 CO-IP、TAP、共定位实验、哺乳动物双杂交系统实验,这样,有利于验证和拓展相互作用结果而构建规模更大可信度更高的相互作用网络图,最终使我们更好地了解细胞复杂分子系统的联系特征和工作机制。

### 参 考 文 献(References):

- [1] Fields S, Song O A. Novel genetic system to detect protein-protein interaction. *Nature*, 1989, 340: 245-246. [DOI](#)

- [2] Bartel P L, Roecklein J A, SenGupta D, Fields S. A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7. *Nat Genet*, 1996, 12(1): 72~77. [\[DOI\]](#)
- [3] Fromont-Racine M, Rain J C, Legrain P. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet*, 1997, 16: 277~282. [\[DOI\]](#)
- [4] Flores A, Briand J F, Gadal O, Andrau J C, Rubbi L, Van Mullem V, Boschiero C, Goussot M, Marck C, Carles C. A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *PNAS*, 1999, 96: 7815~7820. [\[DOI\]](#)
- [5] Walhout A J, Sordella R, Lu X, Hartley J L, Temple G F, Brasch M A, Thierry-Mieg N, Vidal M. Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science*, 2000, 287: 116~122. [\[DOI\]](#)
- [6] Drees B L, Sundin B, Brazeau E, Caviston J P, Chen G C, Guo W, Kozminski K G, Lau M W, Moskow J J, Tong A, Schenkman L R, McKenzie A 3rd, Brennwald P, Longtine M, Bi E, Chan C, Novick P, Boone C, Pringle J R, Davis T N, Fields S, Drubin D G. A protein interaction map for cell polarity development. *JCB*, 2001, 154: 549~576. [\[DOI\]](#)
- [7] Rain J C, Selig L, Reuse H D, Battaglia V, Reverdy C L, Simon S, Lenzen G, Petel F, Wojcik J, Vincent Schachter, Chemama Y, Labigne A, Legrain P. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*, 2001, 409: 211~215. [\[DOI\]](#)
- [8] Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield T A, Judson R S, Knight J R, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg J M. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 2000, 403(6770): 623~627. [\[DOI\]](#)
- [9] Ito T, Tashiro K, Muta S, Ozawa R, Chiba T, Nishizawa M, Yamamoto K, Kuhara S, Sakaki Y. Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *PNAS*, 2000, 97: 1143~1147. [\[DOI\]](#)
- [10] Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *PNAS*, 2001, 98: 4569~4574. [\[DOI\]](#)
- [11] Li S, Armstrong C M, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain P O, Han J D, Chesneau A, Hao T, Goldberg D S, Li N, Martinez M, Rual J F, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong S L, Zhang L V, Berriz G F, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel H W, Elewa A, Baumgartner B, Rose D J, Yu H, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango S E, Saxton W M, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhaute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus K C, Harper J W, Cusick M E, Roth F P, Hill D E, Vidal M. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science*, 2004, 303(5657): 540~543. [\[DOI\]](#)
- [12] Giot L, Bader J S, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao Y L, Ooi C E, Godwin B, Vitols E, Vijayadamar G, Pochart P, Machineni H, Welsh M, Kong Y, Zerhusen B, Malcolm R, Varrone Z, Collis A, Minto M, Burgess S, McDaniel L, Stimpson E, Spriggs F, Williams J, Neurath K, Ioime N, Agee M, Voss E, Furtak K, Renzulli R, Aanensen N, Carrola S, Bickelhaupt E, Lazovatsky Y, DaSilva A, Zhong J, Stanyon C A, Finley R L Jr, White K P, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets R A, McKenna M P, Chant J, Rothberg J M. A protein interaction map of drosophila melanogaster. *Science*, 2003, 302(5651): 1727~1736. [\[DOI\]](#)
- [13] Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck F H, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, Timm J, Mintzlaff S, Abraham C, Bock N, Kietzmann S, Goedde A, Toksoz E, Droege A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H, Wanker E E. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*, 2005, 122(6): 957~968. [\[DOI\]](#)
- [14] Rual J F, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz G F, Gibbons F D, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg D S, Zhang L V, Wong S L, Franklin G, Li S, Albalá J S, Lim J, Fraughton C, Llamas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski R S, Vandenhaute J, Zoghbi H Y, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick M E, Hill D E, Roth F P, Vidal M. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, 2005, 437: 1173~1178. [\[DOI\]](#)
- [15] Legrain P, Selig L. Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS Letters*, 2000, 480: 32~33. [\[DOI\]](#)
- [16] Diaz-Camino C, Risseuw E P, Liu E, Crosby W L. A high-throughput system for two-hybrid screening based on growth curve analysis in microtiter plates. *Analytical Biochemistry*, 2003, 316: 171~174. [\[DOI\]](#)
- [17] Zhong J, Zhang H, Stanyon C A, Tromp G, Finley R L Jr. Strategy for constructing large protein interaction maps using the yeast two-hybrid system: regulated expression arrays and two-phase mating. *Genome Res*, 2003, 13: 2691~2699. [\[DOI\]](#)