

蛋白质相互作用检测新方法——蛋白片段互补

彭琳², 张红, 蒋太交, 常城*

(1. 兰州大学生命科学学院, 甘肃兰州 730000; 2. 中国科学院生物物理研究所系统生物学研究中心, 北京 100101)

摘要 介绍了报告蛋白互补(Protein Complementation Assay, PCA)的原理, 对PCA关键步骤报告蛋白的选择进行了说明, 并详细阐述PCA方法的应用。

关键词 蛋白质相互作用; 片段互补; 功能重建

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)19-08023-03

Protein Fragment Complementation—a New Method for Detection of Protein-protein Interactions

PENG Lin et al (College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract Protein was the executor of life activities. Dynamical protein-protein interactions underpin all biochemical processes such as cell proliferation, differentiation, metabolism and immunity. The study of protein-protein interactions and its dynamics was the base to understand all kinds of life activities. Protein complementation assay (PCA) was introduced and this method could be used for quantification, real-time tracking and dynamical monitoring of protein-protein interactions.

Key words Protein-protein interaction; Fragment complementation; Function reconstitute

随着基因组学的发展, 对生命的研究逐渐由获取基因的序列信息过渡到揭示基因编码蛋白质的功能。蛋白质是生命活动的执行者, 它通过自身或与核酸之间的相互作用, 参与细胞的信号传导、增殖、分化、代谢调节及免疫等多种生命过程。了解蛋白质的相互作用, 对更深入地研究各种复杂的生命现象, 揭示生命的奥秘, 有着重要的意义。

迄今为止, 人们建立了多种方法研究蛋白质的相互作用。有经典的酵母双杂交(Y2H)和噬菌体展示; 近来发展的免疫共沉淀(Co-IP)、串联亲和纯化(TAP)和荧光共振能量转移(FRET); 此外, 还有表面等离子共振、原子力显微技术等生物物理学方法。这些方法为蛋白质相互作用的研究提供了丰富的检测手段, 但多是一些体外试验方法, Y2H只能研究核蛋白, FRET也因灵敏度低而受到限制。由于人们越来越希望了解细胞内实时发生的蛋白质复合体组装、定位、迁移、降解等动态过程, 一种新的方法——蛋白片段互补(PCA)应运而生。PCA不仅能检测蛋白质相互作用, 还能进行体内蛋白质相互作用的动态追踪。笔者介绍了这一方法的原理、目前应用于此的报告蛋白, 并在此基础上阐述了该方法的应用价值。

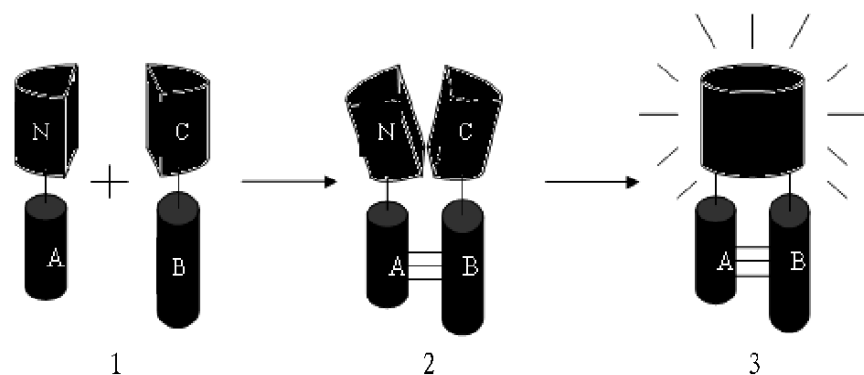
1 PCA原理

试验证明, 许多蛋白如果分割成2个片段后, 单个片段都没有活性, 蛋白质的功能丧失, 但当这2个片段充分靠近时, 蛋白质功能可以恢复。PCA就是基于此将一个功能蛋白报告蛋白合理地分割成N端和C端2个片段, 分别与目标蛋白连接。如果2个目标蛋白相互作用, 则报告蛋白片段互相靠近和重新折叠, 功能得到恢复^[1-2]。图1以荧光蛋白为例示意了这一原理。

2 报告蛋白的选择

报告蛋白的功能是否得到重组是判断蛋白质相互作用的标准, 因此, 报告蛋白的选择和分割是PCA技术的关键, 否

则极易产生假阳性结果。报告蛋白的选择应严格遵循一个原则, 即其折叠必须完全依赖于目标蛋白之间的交互作用。1994年, Johansson最先利用泛素(Ubiquitin)作为报告蛋白检测体内的蛋白质相互作用^[3], 后来, 人们依照这个原则发展了多种报告蛋白系统, 主要是一些高灵敏和容易检测的酶和荧光蛋白等(表1)。



注: 1 表示待检测蛋白 A 和 B 分别与荧光蛋白 2 个片段融合; 2 表示蛋白质 A 和 B 的相互作用使荧光蛋白 2 个片段相互靠近; 3 表示荧光蛋白重新组合成完整的 GFP 分子, 并发出荧光。

Note: 1 represents the fusion of detecting protein A and B and 2 fragments of fluorescent protein; 2 represents the mutual approach of 2 fluorescent protein fragments caused by the interaction of protein A and B; 3 represents the recombined GFP molecular by fluorescent protein and its emissive fluorescence.

图1 荧光蛋白片段互补原理示意

Fig.1 Complementarity principle of fluorescent protein fragments

表1 几种报告蛋白及其检测方法和应用

Table 1 Several kinds of reporter proteins and their detection methods and applications

报告蛋白	检测手段	应用
Reporter protein	Detecting means	Application
二氢叶酸还原酶 Dihydrofolate reductase	荧光; 补充 dhfr 敲除	鉴定、定位、定量 ^[4-5]
- 半乳糖苷酶 -galactosidase	吸光度	鉴定、定量 ^[6]
- 内酰胺酶 -lactamase	荧光; 吸光度	鉴定、定量 ^[7]
荧光素酶 Luciferase	生物发光	鉴定 ^[8]
荧光蛋白 Fluorescent protein	荧光	鉴定、定位、定量 ^[9-14]

2.1 二氢叶酸还原酶(PHFR) DHFR 催化二氢叶酸还原成四氢叶酸, 是核酸合成中一种重要的酶, 缺失会造成细胞

基金项目 兰州大学生命科学学院资助项目。

作者简介 彭琳(1981-), 女, 湖南邵东人, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学。* 通讯作者。

收稿日期 2008-05-04

生长障碍。Reny 阐述了 DHFR 报告蛋白的 2 种检测方法^[4-5]。一种是存活试验:DHFR 敲除的细胞用 2 种融合蛋白质共转染,并用缺少核苷的培养基筛选,只有目标蛋白存在相互作用,细胞才能够生长。这种方法只能检测目标蛋白是否有作用,无法得知作用部位、动态过程。另一种是荧光检测方法:DHFR 片段分别与目标蛋白融合共转染细胞,再用荧光标记的底物氨甲蝶呤处理细胞。由于氨甲蝶呤只能与完整的 DHFR 结合,清洗掉未结合的氨甲蝶呤之后检测细胞的荧光,就知道目标蛋白是否相互作用,并且能显示作用部位以及动态过程。但是,抗肿瘤药物氨甲蝶呤破坏细胞正常的生理功能,在一定程度上使蛋白质结合受到影响。

2.2 - 半乳糖苷酶 大肠杆菌中的 - 半乳糖苷酶可以分割为 和 2 个片段,分别与 2 个相互作用的蛋白融合表达时,能诱导 2 个片段发生互补使半乳糖苷酶活性得到重组。- 半乳糖苷酶互补适用于哺乳动物细胞,而且酶联反应能将信号放大,灵敏度高,可以通过生化、荧光及化学发光的检测进行定量。但是这种方法不能进行体内实时检测,要裂解细胞体外检测酶活性,并且需要优化酶反应时间和底物数量,避免因酶底物反应时间太长产生的假阳性结果。

2.3 绿荧光蛋白(GFP) GFP 是多管水母中的一种蛋白质,被蓝紫光激发发出肉眼可见的绿色荧光。由于在各种细胞中都能表达,对细胞无毒害且不影响细胞正常功能,并且不需要底物和足够灵敏的信号强度,GFP 广泛用于各种细胞的基因表达检测和蛋白质定位分析。2000 年,Ghosh 把 GFP 分成 2 段分别与亮氨酸拉链序列连接,在体外和体内都观察到了亮氨酸拉链诱导的荧光蛋白重新组装^[9],论证了荧光蛋白作为报告蛋白的可行性。此后,开始用荧光蛋白作为 PCA 报告蛋白检测、定位和追踪蛋白质相互作用,也称为双分子荧光互补(Bimolecular Fluorescence Complementation, BFC)。

3 PCA 的应用

3.1 检测和追踪蛋白相互作用 2002 年,Hu 首次用 BFC 研究 bZIP 和 Rel 转录因子家族的相互作用^[10],并在此基础上发展了多色荧光互补,不仅能同时观察细胞内的多蛋白复合物的相互作用,还能反映蛋白质相互作用之间的强弱关系。用 BFC 研究哺乳动物 bFos、bJun 和 bATF2 转录因子二聚体,发现正常细胞倾向于形成 bFos-bJun 异二聚体,胁迫条件下则更多地形成 Jun-ATF2 二聚体,这印证了以往的研究:Jun-ATF2 在细胞胁迫条件下能调节一系列基因的表达^[11]。一般认为,ATF2 和 c-Jun 都定位于细胞核内,受胞外环境信号刺激时被蛋白激酶磷酸化,形成 c-Jun-ATF2 二聚体激活多种靶基因,包括 c-Jun 自身的表达。BFC 研究发现,ATF2 含有一个出核信号肽和 2 个核内定位信号,使它能在核内和胞质之间转移。与 c-Jun 形成二聚体阻止了 ATF2 从核内到胞质的转移,这对 c-Jun 启动子的激活是必须的。同时,在维甲酸诱导的细胞分化和紫外线诱导的细胞凋亡过程中,均观察到 c-Jun 依赖的 ATF2 细胞核内定位,说明 c-Jun/ATF2 通过胞内定位的动态改变和转录激活来相互调节^[12]。

鸟苷酸结合调节蛋白(Guanine Nucleotide Binding Regulatory Protein, G 蛋白)是细胞信号转导途径中一个重要的分子,由 α 、 β 和 γ 亚基组成。Hynes 等利用 BFC 方法研究 G 蛋白亚

细胞定位在信号传导中的作用。研究发现, α_1 、 α_2 复合体存在于质膜, α_5 复合体存在于细胞质或内膜系统,暗示 α 亚基的不同亚型决定了 α 复合物在细胞中的定位^[13]。此外,研究证明,在信号转导过程中, α 复合物不同的组合方式能调节 G 蛋白对信号分子识别的特异性。Stacy 用多色荧光互补技术比较了人胚肾细胞中 α 亚基不同亚型与 β_1 亚基的作用强度,发现 α_{12} 最强, α_1 最弱;还说明不同的细胞中,起主导作用的复合体形式不一样,决定了信号转导的特异性^[14]。

PCA 能捕捉瞬时、低亲和性的蛋白质相互作用。细胞的分泌途径中,膜蛋白许多瞬时的蛋白质相互作用参与了蛋白质折叠、修饰、转运和分选过程。Nyfeler 用 BFC 检验细胞分泌过程中的蛋白质相互作用,发现 ERGIC53 能与 MCFD2 相互作用,也能通过 lectin 结构域与组织蛋白酶 Z 相互作用,如果把 lectin 结构域选择性突变,就会大大降低它与组织蛋白酶 Z 的相互作用,暗示 lectin 糖链介导了 ERGIC53 和组织蛋白酶 Z 的相互作用^[15]。此外,PCA 还可以用于细胞内 RNA 的定位和定量研究。目前,对基因表达动态的研究多局限于检测报告基因的翻译,少部分是直接检测 mRNA 的动态改变:在 mRNA 中整合多拷贝 MS2 衣壳蛋白结合序列,并表达与荧光蛋白相连的 MS2 衣壳蛋白,mRNA 与衣壳蛋白、荧光蛋白形成大的多聚蛋白复合体。但是,未结合的荧光蛋白产生的高背景降低了试验的灵敏度。Mria 发展了 PCA 方法在细菌中对 RNA 的检测和定位^[16]:真核起始因子 eIF4A 有 2 个球形结构域片段,能与特异的 RNA 适配子结合。将 GFP 分成 2 段,分别通过 linker 与 eIF4A 的 2 个片段融合,在细胞中共表达后,RNA 与 eIF4A 结合,促使荧光蛋白片段互相靠近,重组发出荧光。用这个系统对细胞中的 RNA 进行追踪和定位,同时,产生的重组荧光蛋白的分子数与细胞中 RNA 的分子数相关,据此可以对细胞中的 RNA 进行定量研究。

3.2 cDNA 文库筛选和基因功能鉴定 与酵母双杂交(Yeast Two Hybrid, Y2H)一样,PCA 也是一种高通量的蛋白质文库筛选方法,PCA 技术最早的应用之一就是设计筛选与目标蛋白质特异相互作用的分子。Arndt 设计了 2 组互补的亮氨酸拉链序列文库,用 DHFR PCA 进行筛选,找出了有很强相互作用的亮氨酸拉链序列^[17]。Amstutz 用 PCA 结合核糖体展示,筛选出了一类与 MAP 激酶同源物特异结合的 DARPin 新型支架蛋白,它能特异性结合 JUNK2,却不能结合与 JUNK2 高度同源的 JUNK1^[18-19]。

酵母双杂交系统需要目标蛋白质在细胞核内发生相互作用。即使将膜蛋白整合转移到细胞核的信号肽,疏水的膜蛋白在细胞核水环境中也容易错误折叠。因此,很难用酵母双杂交法来大规模筛选膜蛋白的相互作用。但是,PCA 可以大规模地筛选胞质蛋白或膜蛋白的相互作用。把泛素分为 2 个片段,其中一个片段与转录因子连接,膜蛋白再与这 2 个片段相连,就成了一个改进的细胞膜上进行的酵母双杂交系统。相互作用的膜蛋白使泛素依赖的蛋白酶水解释放转录因子进入细胞核,激活报告基因的表达。Miller 首次用这种方法大规模筛选了膜整合蛋白的相互作用,并用 SVM 方法对这些相互作用进行分类,得到了具有高可信度的膜蛋白相互作用数据^[20]。在细胞生长、蛋白质合成、凋亡等许多细胞

应答过程中,有许多细胞表面受体及效应因子参与,蛋白激酶B(PKB)就是其中的一个关键分子。Remy用PCA从cDNA文库中筛选发现了新的PKB底物和调节因子hR1。PKB通过C端的非催化结构域与hR1结合,hR1促进PKB与其上游的激酶PDK1结合,增强PKB的磷酸化活性。进一步研究发现,hR1能通过PDK1/PKB/GSK3/NF- κ B信号的级联调节T细胞的分化,在发育和疾病过程中能调节PKB的抗凋亡功能^[21-22]。Ding用类似的方法发现了与PKB有物理和功能相互作用的ACTN4。用siRNA沉默ACTN4,阻止了PKB的迁移、磷酸化和信号转导,抑制了细胞的增殖,为ACTN4突变造成的病理过程提供了新的治疗方法^[23]。

3.3 蛋白质设计和药物筛选 由于可以捕捉胞内大量蛋白质相互作用强度和位置的微小动态变化,PCA在大规模药物筛选中也有突出的作用。

目前高通量药物筛选方法以药物作用靶点为主要对象,根据细胞和分子水平上样品与靶点结合表现来判断化合物的生物活性,快速筛选大量化合物。但由于检测模型建立在单个药物作用靶分子上,无法全面反映化合物各种生物活性特征,可能使某些药物在预期的治疗目标之外还存在潜在未知的靶位点,称为药物的脱靶效应。

常用的DNA芯片技术检测药物作用下基因表达水平的改变,可以较全面地鉴定药物的活性。但是,mRNA的改变并不能完全反映蛋白质的改变,细胞内定位、构象同样影响蛋白质的功能。PCA能直接观察蛋白质复合体数量、时间和空间的动态改变,反映药物对各种细胞通路的激活或抑制作用,最大程度上展现药物的生物活性。McDonald选取与细胞周期、凋亡、有丝分裂、DNA损伤修复等生理过程有关的蛋白质复合体,与EYFP构建了49种PCA报告蛋白,组合成127对蛋白质复合体,对治疗癌症、炎症、心血管疾病和糖尿病等不同疾病的107种药物进行活性鉴定。用高分辨率的荧光数码影像系统检测分析药物处理后细胞内参与各种信号转导过程的蛋白质复合体数量、定位的改变,得到了大量数据。对这些数据进行聚类分析,发现了与以前认识相一致的小分子化合物的结构-功能关系,即化学结构相似的化合物具有相似的药理活性^[24]。

PCA为细胞内蛋白质复合物的动态变化提供了大量的信息,据此可以预测药物的生物活性和毒性作用。观察发现,降血脂药非诺贝特、驱虫药氯硝柳胺等4种药物与抗癌药物一样,影响Cdc2-Cdc25C、Cdc2-Cdc25A、p53-p53等蛋白复合体数量。笔者预测,这几种药物具有潜在的抗增殖活性,随后的人肿瘤细胞系药理学试验证实了这种推测,说明PCA筛选药物能有效预测化合物的生物活性,迅速预测和排除与治疗目标无关、有毒性作用的化合物,节省人力物力。通过化学修饰优化先导化合物结构,增强药物靶向治疗效果,避免不良副作用和毒性的产生,加快药物筛选过程^[24]。

除此之外,PCA的另一个特点是可以根据报告蛋白三维结构预测其恢复活性所需距离。利用这一点,用DHFR PCA测试哺乳动物细胞二聚促红细胞生成素受体(EpoR)激活过程的空间变构模型^[25]。此外,EpoR PCA还能筛选特异性诱导EpoR变构过程的小分子。

4 前景与展望

PCA技术可以看作是传统的酵母双杂交技术的扩展,无论是检测方法还是适用范围都比酵母双杂交技术有所进步。检测手段上,由单一报告基因的表达发展为酶活性的重组,可以提供存活试验、酶活性检测、荧光检测等多种检测手段;在适用范围上,PCA技术不局限于定位于细胞核内的蛋白质,同样可以检测定位于胞质和胞膜的蛋白质相互作用,并且具有很高的灵敏度,能检测出瞬时的相互作用,在原核、真核和哺乳动物细胞内都能适用;而且通过报告蛋白的选择和组合,PCA技术不仅能研究蛋白质相互作用,还能研究蛋白质的变构过程,以及细胞内RNA的定量和动态分析。

PCA技术已开始用于大规模基因组文库的筛选,蛋白质设计和折叠,药物筛选,对RNA的追踪与定量研究也正在探索之中。在把现有技术应用到新的研究中去的同时,对现有技术进行积极改进,如在试验过程中由于信号放大产生的假阳性,以及外源蛋白质的过量表达对细胞产生毒害的问题,并发展新的报告蛋白来增强试验的灵敏度,减少噪音。因此,PCA作为一种常见的检测蛋白质相互作用和药物筛选技术,应该在生命科学研究领域中得到更广泛的发展和应

参考文献

- PELLEIER J N, MCHICKS W. A protein complementation assay for detection of protein-protein interactions in vivo[J]. *Protein Eng*, 1997, 10: 89.
- MCHICKS W, REMY I, CAMPBELL VALDIS FX, et al. Detection of protein-protein interactions by protein fragment complementation strategies[J]. *Methods Enzymol*, 2000, 328: 208-230.
- JOHANSSON N, VARSHAVSKY A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 10340-10344.
- REMY I, MCHICKS W. Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein fragment complementation assays[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 5394-5399.
- REMY I, GALARNEAU A, MCHICKS W. Detection and visualization of protein interactions with protein fragment complementation assays[J]. *Methods Mol Biol*, 2002, 185: 447-459.
- ROSS F, CHARLTON C A, BLAU H M. Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94: 8405-8410.
- WEHRMANT, KLEAVELAND B, HERJ H, et al. Protein-protein interactions monitored in mammalian cells via complementation of beta-lactamase enzyme fragments[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99: 3469-3474.
- KAHARA T, KAHARA A, SATO M, et al. Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing[J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 2516-2521.
- GHOSHI, HAMILTON A D, REGAN L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein[J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 5658-5659.
- REMY I, MCHICKS W. Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein fragment complementation assays[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 5394-5399.
- HUC D, KERPPOLA T K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 539-545.
- LIU H, DENG X H, SHYU Y J, et al. Mutual regulation of c-Jun and ATF2 by transcriptional activation and subcellular localization[J]. *EMBO*, 2006, 25: 1058-1069.
- HYNESTR, TANG L N, MERMES M, et al. Visualization of G-protein dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both in subcellular targeting[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 30279-30286.
- MERMES M, YOST E A, SABO J L, et al. Analysis of G-protein dimer formation in live cells using multicolor bimolecular fluorescence complementation demonstrates preferences of β 1 for particular subunits[J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70: 194-205.
- NYFLER B, MCHICKS W, HAURI H P. Capturing protein interactions in the secretory pathway of living cells[J]. *PNAS*, 2005, 102: 6350-6355.

俗的历史文化内涵和质朴本色,刻意追求表演效果和舞台效应。在民俗旅游开发中,由于片面追求经济效益,使传统文化商品化、庸俗化的现象时有发生。人为地再造民俗节目,使民俗旅游被机械地舞台化、节日化。民俗旅游项目过于庸俗,以至失去了民俗的本色与乡土气息。如每晚举行的摩梭“甲搓体”和对歌表演的民俗旅游项目,表演过于舞台化,刻意迎合外地游客的猎奇需要,仅仅重视表现民俗的形式,却忽略了其文化内涵。

3.5 资源开发发展日渐单一化 伴随着旅游产业及其配套设施的进一步发展完善,四川泸沽湖地区日益由封闭走向开放。在外部主流文化的冲击和过度开发的影响下,民俗的变异日益严重,构成了一种“发展性的破坏”。旅游开发实际上是多元文化的交汇行为,但大量旅游者带来的思想观念、生活方式以及外界信息的进入,却破坏了旅游地社会、生产和生活存在的和谐与平衡,外来文化与凉山地区本土的民族传统文化产生碰撞,甚至出现局部对立,从而干扰了民俗文化原有秩序和发展进程。旅游开发打破了原来的文化封闭氛围,加速了服饰、语言、建筑以及生活习俗等民族传统文化的变迁,最后可能导致某些传统民族文化特征被同化或消失。

4 对策与建议

针对四川泸沽湖景区在民俗旅游资源开发中存在的上述问题,笔者提出建议如下。

4.1 加大对四川泸沽湖景区的开发投入 在现有基础上,加大对泸沽湖景区的开发投入,除了改善现有的污水处理、景区自然景观保护等外,加强对当地民俗旅游资源的开发,本着凸显民俗文化内涵、保持民俗事象自身演化规律、力求真实性、当地社区和村民共同参与的原则,有效开发泸沽湖的民俗旅游资源。

4.2 尊重民俗,选择合理的开发模式,因地制宜 开发当地民俗旅游资源,不能盲目跟风模仿,不能胡编乱造,否则不仅难以满足游客的需求,而且最终会损害当地的利益。尊重民俗是指民俗旅游资源开发应该尊重民俗自身演化规律,尊重民俗本身的形式、内容和特征等,就地取材,充分发掘当地的民俗。在此基础上,突出当地最有特点的民俗事象,使之发展成为展现当地社会生活的历史与现实的窗口。

4.3 统一、合理地规划科学的整体开发格局 民俗旅游资源开发是一项非常严肃的科学实践与产业经济活动,不能马虎,必须合理地进行规划。鉴于四川泸沽湖景区的多方融资

开发模式,因此在开发规划上还应该统一各利益方思想。在开发新的民俗旅游项目前,应当邀请有关专家开展深入细致地调研,进行可行性论证。在开发项目立项后,再邀请有关专家和各利益方座谈,进行总体开发方案的详细规划。

4.4 走精品路线,防止开发中的低俗化、单一化 从国内外长期的民俗旅游资源开发实践证明,在系统开发的基础上,走精品化道路是民俗旅游开发的重要策略。首先,要深入挖掘民俗旅游资源的深厚历史文化内涵,用当地独特的民族风情、健康的情趣、丰富的形式,赋予民俗旅游产品与旅游商品高尚的文化品位。其次,必须抓住旅游市场,了解游客需求,在同质文化和异质文化²方面下功夫,一方面可开发原生态或模拟景观,另一方面可开发高品质的民俗表演活动,为国内外游客提供满意的民俗旅游项目和旅游商品。

4.5 在开发的同时,制定科学、合理的民俗文化环境保护规划 民俗旅游资源一旦开发过度,不注重保护就会枯竭乃至消失。为了避免发展性破坏,政府相关部门一方面应及时组织有关专家确定民俗文化环境保护措施,正确评估民俗文化环境的现状,规划旅游接待量,确定民俗旅游发展的最终目标和阶段性目标,把民俗文化环境保护与社会经济、文化的发展协调起来;另一方面要以政府和媒体的力量,宣传优秀的民俗文化,向公众进行民族传统道德教育,增强当地少数民族意识,树立民族自信,使他们能辩证地对待自身传统和生活方式,剔除糟粕,吸取精华,传承民族优秀的文化传统,改变盲从的行为,遏制民俗的被同化趋势。

5 结语

民俗旅游资源的开发是一项非常严肃的科学实践与产业经济活动,涉及内容纷繁复杂,与旅游地的经济、文化、社会发展关系密切。因此,针对四川泸沽湖景区的民俗旅游资源的开发,只有在尊重当地民俗、对当地民俗旅游资源价值的充分认识基础上,选择可持续发展的战略,科学规划、合理开发,做到民俗文化的开发、利用和保护相结合,使民俗旅游真正成为朝阳产业,积极推动泸沽湖景区的旅游和经济发展。

参考文献

- [1] 陈烈,黄海.论民俗旅游资源的基本特征及其开发原则[J].热带地理,1995(3):272-277.
- [2] 邓永进.民俗风情旅游[M].昆明:云南大学出版社,1997.
- [3] 巴兆祥.中国民俗旅游[M].福州:福建人民出版社,1999.
- [4] 邱扶东.民俗旅游学[M].上海:立信会计出版社,2006.
- [5] 薛群慧.民俗风情旅游资源的保护与开发探悉[J].思想战线,1997(5):56-59.
- [6] integral membrane protein interactions[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102:12123-12128.
- [7] REMY I, MICHNICK S. A cDNA library functional screening strategy based on fluorescent protein complementation assays to identify novel components of signaling pathways[J]. Methods, 2004, 32:381-388.
- [8] REMY I, MICHNICK S W. Regulation of apoptosis by the H1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24:1493-1504.
- [9] DING Z Y, HANG J Y, LUY L, et al. A retrovirus-based protein complementation assay screen reveals functional AKT1-binding partners[J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103:15014-15019.
- [10] MARNE L, JANE L, STEPHEN O, et al. Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells[J]. Nature Chemical Biology, 2006, 2:329-337.
- [11] REMY I, WILSON I, MICHNICK S. Erythropoietin receptor activation by ligand-induced conformation change[J]. Science, 1999, 283:990-993.
- [12] BURTON MV, MCCULLOUGH R M, CANTOR C R. RNA visualization in live bacterial cells using fluorescent protein complementation[J]. Nature Methods, 2007, 4:421-427.
- [13] PELLEIER J N, ARNDT K M, PLUCKHUN A, et al. An in vivo library versus library selection of optimized protein-protein interactions[J]. Nat Biotech, 1999, 17:683-690.
- [14] AMSTUIZ P, KOCH H, HENZ H K, et al. Rapid selection of specific MAP kinase binders from designed ankyrin repeat protein libraries[J]. Protein Eng Des Sel, 2006, 19:219-229.
- [15] KOCH H, GRAFE N, SCHESS R, et al. Direct selection of antibodies from complex libraries with the protein fragment complementation assay[J]. J Mol Biol, 2006, 357:427-441.
- [16] MILLER J P, LOP S, BEN HUR A, et al. Large scale identification of yeast

(上接第8025页)