

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01274

蛋白质相互作用实验技术的最新进展

王明强¹, 武金霞¹, 张玉红², 韩凝¹, 边红武¹, 朱睦元¹

1. 浙江大学生命科学院遗传学研究所, 杭州 310058;
2. 西藏自治区农牧科学院, 拉萨 850000

摘要: 蛋白质相互作用的研究, 是揭示生物体正常生长发育及其应对各种生物或(和)非生物胁迫的分子机制及其调控网络的重要途径。文章综述了近年来发展起来的研究蛋白质相互作用的常用实验性方法, 如酵母双杂交系统、串联亲和纯化、免疫共沉淀、GST Pull-down、双分子荧光互补、荧光共振能量转移、表面等离子共振分析, 介绍了其原理、发展进程, 并分析了其优缺点。

关键词: 蛋白质相互作用; 酵母双杂交系统; 串联亲和纯化; 免疫共沉淀; GST Pull-down; 双分子荧光互补; 荧光共振能量转移; 表面等离子共振分析

Recent advances in the techniques of protein-protein interaction study

WANG Ming-Qiang¹, WU Jin-Xia¹, ZHANG Yu-Hong², HAN Ning¹, BIAN Hong-Wu¹, ZHU Mu-Yuan¹

1. Institute of Genetics, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2. Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry sciences, Lhasa 850000, China

Abstract: Protein-protein interactions play key roles in the development of organisms and the response to biotic and abiotic stresses. Several wet-lab methods have been developed to study this challenging area, including yeast two-hybrid system, tandem affinity purification, Co-immunoprecipitation, GST Pull-down, bimolecular fluorescence complementation, fluorescence resonance energy transfer and surface plasmon resonance analysis. In this review, we discuss theoretical principles and relative advantages and disadvantages of these techniques, with an emphasis on recent advances to compensate for limitations.

Keywords: protein-protein interactions; yeast two-hybrid system; tandem affinity purification; Co-immunoprecipitation; GST Pull-down; bimolecular fluorescence complementation; fluorescence resonance energy transfer; surface plasmon resonance analysis

生物体是一个复杂的有机体。生物分子如蛋白质、DNA、RNA、脂类、多糖等常常同类分子间或(和)不同分子间形成结构复合体, 执行特定的生物功能。蛋白质间的相互作用及其构建的作用网络, 在

收稿日期: 2013-06-05; 修回日期: 2013-08-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31171615, 31171543)资助

作者简介: 王明强, 硕士研究生, 专业方向: 植物遗传学。E-mail: wmq@zju.edu.cn

通讯作者: 边红武, 博士, 副教授, 研究方向: 遗传学。E-mail: hwbian@zju.edu.cn

网络出版时间: 2013-9-2 11:50:29

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130902.1150.001.html>

很多生命过程中发挥着至关重要的作用。研究蛋白质之间的相互作用对于深入了解细胞功能的分子机制具有重要的意义。而蛋白质相互作用的研究可以分为实验性的方法技术和生物信息学的分析预测以及专业蛋白质相互作用数据库的构建^[1,2]等。本文综述了常用的蛋白质相互作用实验性技术的理论基础、最新进展及其优缺点,并绘制了多种技术的作用原理示意图。

1 蛋白质相互作用的实验技术

不同蛋白质相互作用分析技术具有各自的优点和缺点,特别是在灵敏度和特异性方面。较高的灵敏度意味着可以检测到较弱的相互作用,而高特异性则说明初步得到的相互作用结果是比较可信的。

1.1 酵母双杂交系统

酵母双杂交系统(Yeast two-hybrid system, Y2H)由Fields 和 Song 在 1989 年首次建立使用^[3]。它的理论基础是很多真核生物的转录因子如酵母Gal4 由两

个具有不同功能的结构域组成:转录激活结构域(Transcriptional activation domain, AD)和DNA 结合结构域(DNA binding domain, BD)。两种待检测蛋白分别和AD、BD融合表达,如果两者之间存在相互作用,就有可能使AD和BD结构域结合,行使转录功能^[3](图 1)。

酵母双杂交系统的主要优点是简便、易用、费用低廉,能检测到瞬时或较弱的蛋白质相互作用^[4],但酵母双杂交系统也有一些缺点,比如较高的假阳性^[5],不能真实反映蛋白质在自身细胞中的相互作用,表达的融合蛋白最终要运送到酵母细胞核,而有些蛋白可能具有其他亚细胞定位信号肽等。

为了克服上述缺点,很多改进方法和技术使得双杂交系统不仅可以运用于酵母细胞,还可以运用于哺乳动物细胞和细菌中^[6,7]。Luo等^[8]分别将p53 蛋白和GAL4 DNA 结合结构域、SV40 T抗原和VP16 转录激活结构域融合,在哺乳动物细胞中转染共表达,证明了p53 和SV40 T抗原存在相互作用。这种方法克服了酵母表达系统的限制,可以在动物

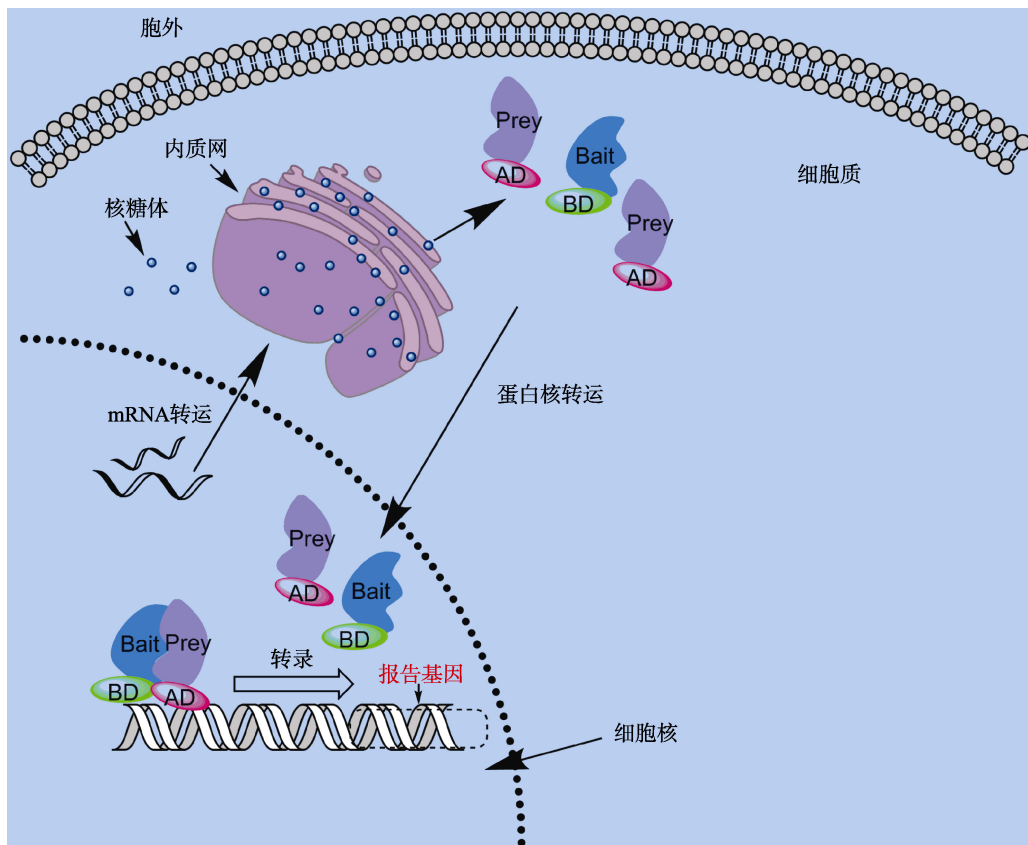


图 1 酵母双杂交系统检测蛋白质相互作用示意图

细胞体系中研究蛋白质在细胞核内的相互作用。而 Split TEV 方法克服了细胞核的限制, 可以研究在各个亚细胞部位发生的蛋白质相互作用^[9]。

酵母双杂交系统仍然是运用比较多的检测和验证蛋白质相互作用的方法之一^[10]。酵母双杂交系统在很多物种的蛋白质互作组(Protein interactome)得到了广泛应用, 如酵母^[11,12]、线虫^[13]、果蝇^[14]、人类^[15]、水稻^[16]。

1.2 串联亲和纯化

串联亲和纯化(Tandem affinity purification, TAP)是一种常用的纯化蛋白复合体的方法。Rigaut等^[20]在 1999 年首次报道了利用 TAP 技术分离纯化蛋白复合物。此后, 利用 TAP 技术大规模分析不同物种中蛋白质相互作用的报道已有很多^[17-19]。传统的 TAP 标签蛋白由 Protein A、TEV 蛋白酶可剪切序列和钙调蛋白结合肽(Calmodulin-binding peptide, CBP)组成^[20] (图 2a)。TAP 技术通过两步亲和纯化来减少非特异性蛋白结合。首先, TAP 标记的蛋白复合物通过第一个标签 Protein A 特异性结合到 IgG 琼脂珠, 经过清洗后, 用 TEV 蛋白酶孵育 IgG 琼脂珠以释放结合的蛋白复合物, 随后复合物通过第二个标签 CBP 结合到钙调蛋白琼脂珠(Calmodulin beads), 再次清洗后, 洗脱钙调蛋白琼脂珠结合的蛋白混合物^[20] (图 2c)。分离纯化的蛋白通过串联质谱、免疫杂交等方法进行鉴定分析。

与其他方法相比, TAP 具有如下优点: 首先, TAP 能减少非特异性蛋白结合; 其次, TAP 能保留蛋白复合物在细胞内的修饰和结合状态。而 TAP 的缺点是需要较多的样本材料来提取蛋白, 价格比较昂贵,

不能高效检测到瞬时或较弱的蛋白质相互作用^[21]。

泛素化是常见的蛋白质翻译后修饰, 对于调节蛋白质的丰度和功能具有重要作用^[22]。泛素化往往会在强变性条件下丢失, 因此不能用常规方法分离纯化来鉴定泛素化蛋白。Tagwerker等^[23]于 2006 年报道了一种新型的 TAP 标签 HB, HB 标签蛋白主要由 RGSH₆、6×His 和 BIO 3 个标签蛋白组成, 能兼容强变性条件如 8M 尿素、6M 氯化胍, 分别使用 Ni²⁺-Sepharose 和 streptavidin-agarose 两步纯化 HB 融合蛋白; 而使用 HB 标记泛素后, 成功从酵母中鉴定出 258 个泛素化标记蛋白。另外, 低分子量标签蛋白如 SH-TAP、Flag-HA 等空间结构很小, 可以尽量减少标签蛋白对蛋白质互作用可能存在的干扰。

为了适应不同的实验需要, 研究人员开发了不同的 TAP 标签。表 1 列举了常用的 TAP 标签并简单评价了其优点。

1.3 免疫共沉淀

免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation, Co-IP)利用抗体和抗原之间特异性的识别和结合, 通过一步亲和纯化, 分离出抗原蛋白和含有抗原蛋白的复合物(图 2, b 和 d)。商业化的通用标签蛋白(如 Flag、HA、c-myc、Protein A、GFP、6×His 等)的单克隆抗体减少了制备步骤, 缩短了实验周期。而将抗体直接或间接连接到亲和树脂、琼脂珠、磁珠等固相支持物上能进一步减少孵育时间, 提高结合和析出效率。

和常用的 Co-IP 标签蛋白相比, GFP 蛋白相对分子量较大(27 kDa), 常用于和目的蛋白融合以观察目的蛋白在细胞和组织器官中的表达分布或亚细胞定位等^[33-35], 很少作为 Co-IP 的标签蛋白。最近,

表 1 常用 TAP 标签及其评价

标签名	相对分子量(kDa)	Tag-1	Tag-2	剪切酶	评价	参考文献
AC-TAP	20	Protein A	CBP	TEV	最常用的 TAP tag	[20]
GS-TAP	19	Protein G	SBP	TEV	第二常用的亲和 tag	[24, 25]
LAP	36	EGFP	S-peptide/6xHIS	TEV/HR3C	利用 EGFP 观察蛋白表达和亚细胞定位等	[26]
SF-TAP	5	StrepII	FLAG	-	标签蛋白小, 降低干扰	[27]
SH-TAP	5	SBP	HA	-	标签蛋白小, 降低干扰	[28]
SPA	8	3×Flag	CBP	TEV	标签蛋白小, 降低干扰	[29]
Flag-HA	3	Flag	HA	-	标签蛋白小, 降低干扰	[30]
CHH	14	CBP	6×His 和 3×HA	-	3 个标签蛋白, 可选择使用	[31]
TAPa	26	Protein A	9×myc/6×His	HR3C	HR3C 在 4 有高活性	[32]
HB	6 或者 11	RGS6H 和 6×His	BIOH	TEV 或无内切酶	兼容强变性条件, 保留蛋白的修饰状态	[23]

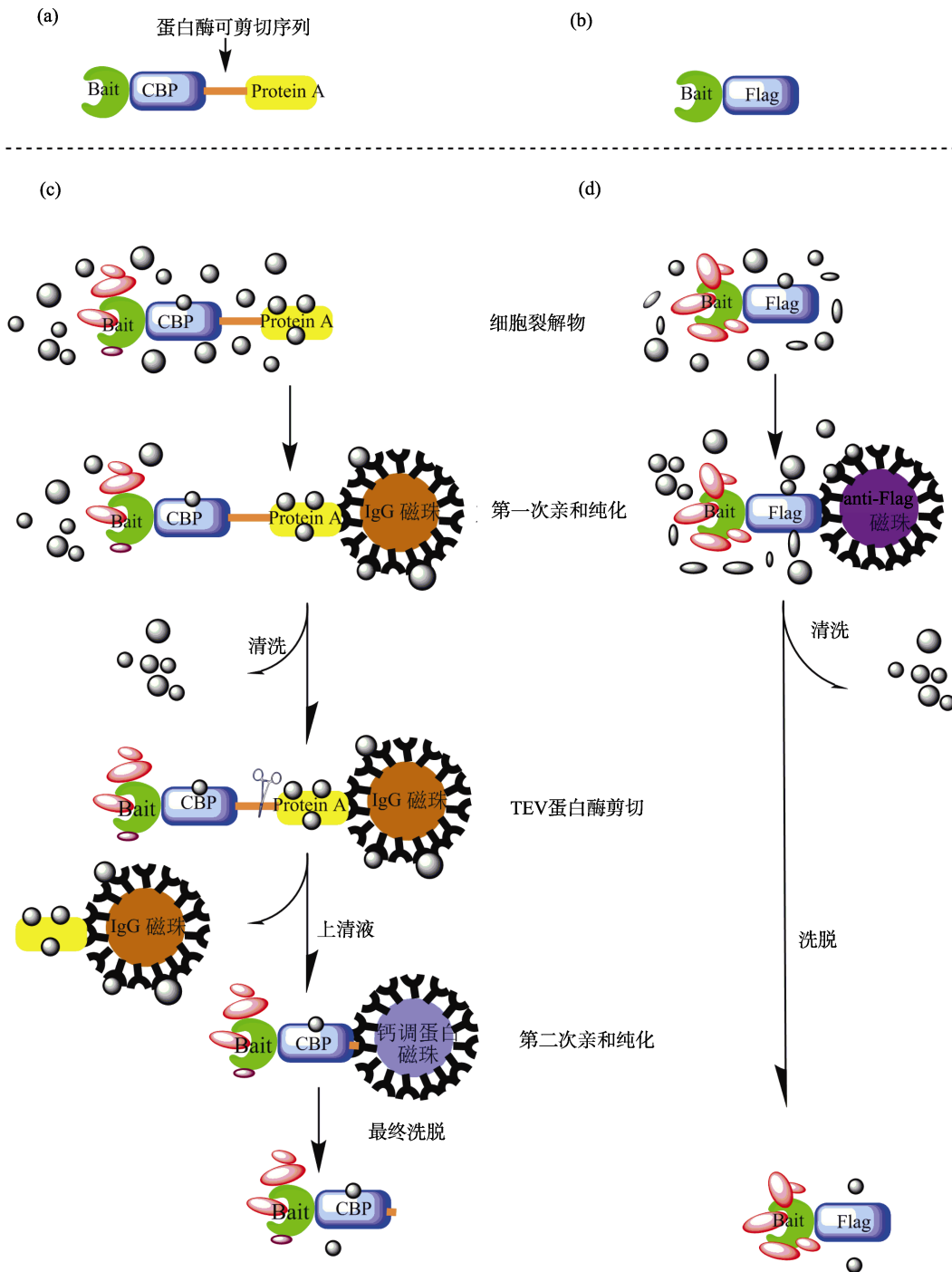


图 2 TAP、Co-IP 融合蛋白结构和 TAP、Co-IP 流程示意图

(a) : AC-TAP 融合蛋白示意图; (b) : Flag 融合蛋白示意图; (c) : TAP 流程示意图; (d) : Co-IP 流程示意图。

Rothbauer等^[36]将小分子量的 13 kDa骆驼GFP结合多肽(GFP-binding peptide, GBP)共价交联到N-羟基琥珀酰亚胺-琼脂糖(N-hydroxysuccinimide-sepharose), 并将其命名为GFP-nano-trap; 利用GFP-nano-trap能特异性分离GFP融合蛋白及其复合物。随后这种方

法在拟南芥^[37]、哺乳动物细胞系^[38]、线虫^[39]、果蝇^[40]等都有成功报道。很多实验室通常积累了大量的GFP融合蛋白的转基因材料, 因此这一新型高效小抗体将会大大促进包括蛋白质相互作用在内的一系列研究。

Co-IP与TAP相比,同样可以保留蛋白质的修饰和结合状态,同时所需的样本量较少,实验成本较低,减少了纯化步骤,能检测到瞬时和较弱的蛋白相互作用,但Co-IP特异性较低,洗脱混合物中往往含有较多的非特异结合蛋白。因此,Co-IP检测到的潜在相互作用蛋白需要通过BiFC、FRET等其他方法进行进一步验证^[2,41]。

1.4 GST Pull-down

GST Pull-down 是一种常用的研究蛋白质在生物体外相互作用的实验技术。GST Pull-down和免疫共沉淀基本原理相似:首先诱饵蛋白(Bait protein)和GST蛋白(Glutathione-S-transferase)在细菌、动物细胞等体系中融合表达,利用GST和谷胱甘肽亲和树脂之间的高亲和性,将诱饵蛋白固化在树脂上,而固化的诱饵蛋白可以捕获细胞裂解物中的互作靶蛋白^[42]。

和Co-IP相比,GST Pull-down的融合诱饵蛋白往往是在外源系统中表达,可能会缺少某些翻译后修饰,并且和靶蛋白的结合发生在体外环境,不能精确反映体内的相互作用;但GST Pull-down 外源表达系统简单易用、蛋白表达周期短,且GST融合蛋白和谷胱甘肽有很高的亲和性,易分离出大量融合蛋白进行批量实验^[43]。

1.5 双分子荧光互补(Bimolecular fluorescence complementation, BiFC)

双分子荧光互补(Bimolecular fluorescence complementation, BiFC)是一种检测活细胞内蛋白质相互作用的技术,在很多物种中得到了应用。双分子荧光互补原理是将荧光蛋白分成两个无独立功能的片段,分别与bait蛋白和prey蛋白融合表达,如果bait融合蛋白和prey融合蛋白存在相互结合作用,而这种结合促使荧光蛋白的两个片段相互作用发出荧光^[44,45](图3)。

Ghosh等^[45]通过将细菌两个反向平行的亮氨酸拉链分别融合到GFP的无功能的两个片段发现了BiFC现象。Hu等^[46]在哺乳动物系统中利用EYFP证实BiFC能应用于蛋白质相互作用的研究。随后很多研究人员开发了不同的荧光报告系统,如N-terminal GFP-S65T+ C-terminal CFP^[47]、mRFP1-Q66T^[48]、mCherry^[49]等。不同荧光蛋白的结合使用

可以同时观察多组蛋白组内的相互作用^[50,51]。而BiFC-FRET将BiFC和FRET检测技术结合,能检测在两蛋白相互作用的基础上与第3个蛋白质的相互作用^[52]。

BiFC和其他分子互补技术相比,具有明显的优势,即能简单方便地通过观察荧光鉴定蛋白质相互作用,不依赖外源的荧光素或显色剂等,能检测到瞬时或者较弱的相互作用,并且可以检测到相互作用的位点^[44~46]。但BiFC也有一些缺陷,比如融合蛋白的相互结合和荧光发生有一定时间延迟,一些融合蛋白的结合是不可逆的,不能实时反应蛋白质的结合和分离情况^[46]。而这些缺点是未来BiFC技术改进的方向。

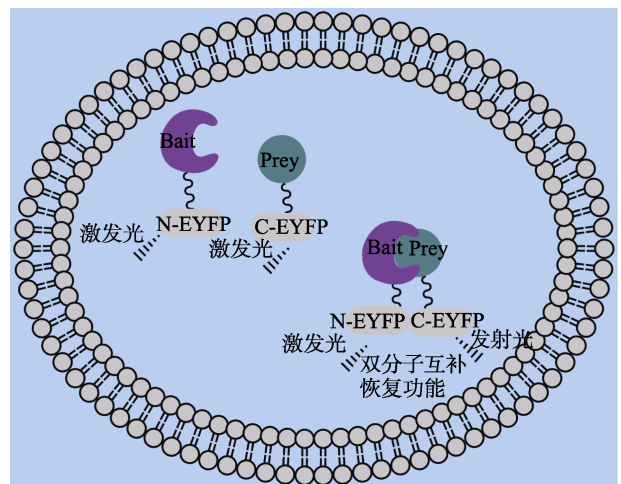


图3 BiFC检测蛋白质相互作用示意图

1.6 荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)

荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)是一种检测分子间距离的高效方法,由Förster在1948年首先发现^[53],现已成为一种检测细胞中分子内或分子间相互作用的有效手段。FRET在蛋白质相互作用研究的基本原理是分别将bait蛋白、prey蛋白与相应的供体荧光基团(如ECFP)和受体荧光基团(如EYFP)融合,当bait蛋白和prey蛋白相互结合作用时,供体基团和受体基团两者之间的距离很近(约10 nm),供体基团的发射光激发受体基团发射荧光^[54,55](图4)。常用的供体荧光蛋白和受体荧光蛋白对有BFP-GFP、BFP-EGFP、

CFP-YFP等^[56]。

FRET与其蛋白质互作技术相比,其优点如下:能比较可靠地反映蛋白质相互作用时的距离;能检测到瞬时、较弱的蛋白质相互作用;能同时检测到两蛋白的细胞分布和作用位点。而缺点是供体蛋白的激发光谱和受体蛋白的光谱可能存在重叠,影响实验结果^[57];供体蛋白和受体蛋白的空间结构较大,限制了两者的距离,导致FRET发生效率低(约40%),且易出现假阴性^[58];供体蛋白和受体蛋白的荧光亮度可能差异较大,易导致较高的背景信号。

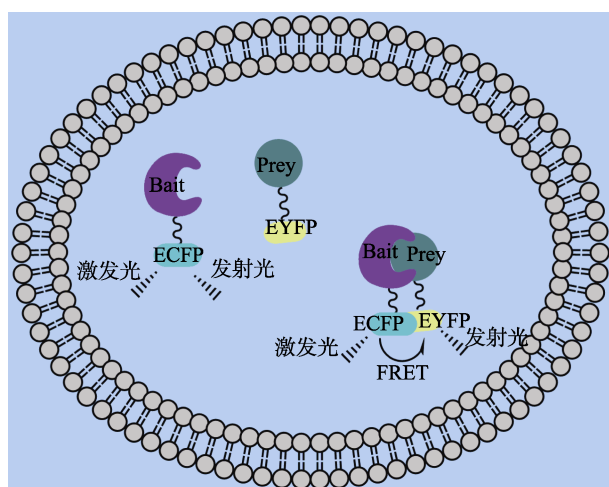


图 4 FRET 检测蛋白质相互作用示意图

1.7 表面等离子共振分析(Surface plasmon resonance analysis)

表面等离子共振分析是一种新型的生物分析技术,不需要对样品进行标记,通过传感器实时检测生物分子如蛋白质、寡核苷酸、类脂等^[59]。此技术的核心SPR 生物传感器由 3 部分组成:SPR光学监测系统、微射流卡盘、传感器芯片。其工作原理是首先将蛋白质(配体)固定在芯片表面,通过微射流卡盘将蛋白质溶液输送到芯片表面,实时监测溶液与传感器芯片表面的配体蛋白结合和分离的全过程,最后通过配套软件处理监测到的信号,得出最终的实验结果^[60]。而表面等离子共振分析和质谱分析联用可以鉴定出和配体蛋白结合的蛋白质序列^[61]。主要优点有:不需要标记样品、实时高效等;而缺点是需要分离纯化配体并根据其性质优化与芯片的交联条件等^[60]。

2 展望

在后基因组时代,研究蛋白质间相互作用及作用网络成为蛋白质组学的热门课题。在过去的研究中,蛋白质相互作用研究的方法和技术取得了很大进步,已在多种物种中建立了初步的蛋白质相互作用网络,但仍存在着一些问题,比如通量低、准确度不高、灵敏度不够等。目前建立的蛋白质相互作用网络往往局限于生物体发育进程中的某一时空点。我们相信通过对现有研究方法和技术的改进、不同方法和技术的结合使用、以及新技术的发明将会不断完善生命活动中的蛋白质时空互作网络。

参考文献(References):

- [1] Hu ZJ. Analysis strategy of protein-protein interaction networks. *Methods Mol Biol*, 2013, 939: 141–181. [\[DOI\]](#)
- [2] De Las Rivas J, Fontanillo C. Protein-protein interaction networks: unraveling the wiring of molecular machines within the cell. *Brief Funct Genomics*, 2012, 11(6): 489–496. [\[DOI\]](#)
- [3] Fields S, Song OK. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340(6230): 245–246. [\[DOI\]](#)
- [4] Miller JP, Lo RS, Ben-Hur A, Desmarais C, Stagljar I, Noble WS, Fields S. Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(34): 12123–12128. [\[DOI\]](#)
- [5] Natsume T, Nakayama H, Jansson Ö, Isobe T, Takio K, Mikoshiba K. Combination of biomolecular interaction analysis and mass spectrometric amino acid sequencing. *Anal Chem*, 2000, 72(17): 4193–4198. [\[DOI\]](#)
- [6] Kanno A, Ozawa T, Umezawa Y. Detection of protein-protein interactions in bacteria by GFP-fragment reconstitution. *Methods Mol Biol*, 2011, 705: 251–258. [\[DOI\]](#)
- [7] Suter B, Kittanakom S, Stagljar I. Two-hybrid technologies in proteomics research. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19(4): 316–323. [\[DOI\]](#)
- [8] Luo Y, Batalao A, Zhou H, Zhu L. Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system. *Biotechniques*, 1997, 22(2): 350–352. [\[DOI\]](#)
- [9] Wehr MC, Laage R, Bolz U, Fischer TM, Grünwald S, Scheek S, Bach A, Nave KA, Rossner MJ. Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nat Methods*, 2006, 3(12): 985–993. [\[DOI\]](#)
- [10] Dreze M, Monachello D, Lurin C, Cusick ME, Hill DE, Vidal M, Braun P. High-quality binary interactome

- mapping. *Methods Enzymol*, 2010, 470: 281–315. [\[DOI\]](#)
- [11] Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamar G, Yang MJ, Johnston M, Fields S, Rothberg JM. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 2000, 403(6770): 623–627. [\[DOI\]](#)
- [12] Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(8): 4569–4574. [\[DOI\]](#)
- [13] Li SM, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T, Goldberg DS, Li N, Martinez M, Rual JF, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong SL, Zhang LV, Berriz GF, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li QR, Gabel HW, Elewa A, Baumgartner B, Rose DJ, Yu HY, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango SE, Saxton WM, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhaute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus KC, Harper JW, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Vidal M. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science*, 2004, 303(5657): 540–543. [\[DOI\]](#)
- [14] Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao YL, Ooi CE, 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 CA, Finley RL Jr, White KP, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets RA, McKenna MP, Chant J, Rothberg JM. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2003, 302(5651): 1727–1736. [\[DOI\]](#)
- [15] Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, Timm J, Mintzlaff S, Abraham C, Bock N, Kietzmann S, Goedde A, Toksöz E, Droege A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H, Wanker EE. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*, 2005, 122(6): 957–968. [\[DOI\]](#)
- [16] Singh R, Lee MO, Lee JE, Choi J, Park JH, Kim EH, Yoo RH, Cho JI, Jeon JS, Rakwal R, Agrawal GK, Moon JS, Jwa NS. Rice mitogen-activated protein kinase interactome analysis using the yeast two-hybrid system. *Plant Physiol*, 2012, 160(1): 477–487. [\[DOI\]](#)
- [17] Forler D, Köcher T, Rode M, Gentzel M, Izaurralde E, Wilm M. An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(1): 89–92. [\[DOI\]](#)
- [18] Veraksa A, Bauer A, Artavanis-Tsakonas S. Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev Dyn*, 2005, 232(3): 827–834. [\[DOI\]](#)
- [19] Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G. A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(2): 97–105. [\[DOI\]](#)
- [20] Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 1030–1032. [\[DOI\]](#)
- [21] Berggård T Dr, Linse S, James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*, 2007, 7(16): 2833–2842. [\[DOI\]](#)
- [22] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 425–479. [\[DOI\]](#)
- [23] Tagwerker C, Flick K, Cui M, Guerrero C, Dou Y, Auer B, Baldi P, Huang L, Kaiser P. A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(4): 737–748. [\[DOI\]](#)
- [24] Burckstümmer T, Bennett KL, Preradovic A, Schütze G, Hantschel O, Superti-Furga G, Bauch A. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods*, 2006, 3(12): 1013–1019. [\[DOI\]](#)
- [25] van Leene J, Hollunder J, Eeckhout D, Persiau G, van de Slijke E, Stals H, van Isterdael G, Verkest A, Neiryneck S, Buffel Y, de Bodt S, Maere S, Laukens K, Pharazyn A, Ferreira PCG, Eloy N, Renne C, Meyer C, Faure JD, Steinbrenner J, Beynon J, Larkin JC, van de Peer Y, Hilson P, Kuiper M, de Veylder L, Van Onckelen H, Inzé D, Witters E, de Jaeger G. Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol*, 2010, 6(1): 397. [\[DOI\]](#)
- [26] Poser I, Sarov M, Hutchins JRA, Hérliche JK, Toyoda Y, Pozniakovskiy A, Weigl D, Nitzsche A, Hegemann B, Bird AW, Pelletier L, Kittler R, Hua SJ, Naumann R, Augsburg

- M, Sykora MM, Hofemeister H, Zhang YM, Nasmyth K, White KP, Dietzel S, Mechtler K, Durbin R, Stewart AF, Peters JM, Buchholz F, Hyman AA. BAC TransgeneOmics: a high-throughput method for exploration of protein function in mammals. *Nat Methods*, 2008, 5(5): 409–415. [\[DOI\]](#)
- [27] Gloeckner CJ, Boldt K, Schumacher A, Roepman R, Ueffing M Dr. A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics*, 2007, 7(23): 4228–4234. [\[DOI\]](#)
- [28] Glatter T, Wepf A, Aebersold R, Gstaiger M. An integrated workflow for charting the human interaction proteome: insights into the PP2A system. *Mol Syst Biol*, 2009, 5(1): 237. [\[DOI\]](#)
- [29] Hu PZ, Janga SC, Babu M, Díaz-Mejía JJ, Butland G, Yang WH, Pogoutse O, Guo XH, Phanse S, Wong P, Chandran S, Christopoulos C, Nazarians-Armavil A, Nasserri NK, Musso G, Ali M, Nazemof N, Eroukova V, Golshani A, Paccanaro A, Greenblatt JF, Moreno-Hagelsieb G, Emili A. Global functional atlas of *Escherichia coli* encompassing previously uncharacterized proteins. *PLoS Biol*, 2009, 7(4): E96. [\[DOI\]](#)
- [30] Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, Harper JW. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*, 2009, 138(2): 389–403. [\[DOI\]](#)
- [31] Honey S, Schneider BL, Schieltz DM, Yates JR, Futcher B. A novel multiple affinity purification tag and its use in identification of proteins associated with a cyclin-CDK complex. *Nucl Acids Res*, 2001, 29(4): E24. [\[DOI\]](#)
- [32] Rubio V, Shen YP, Saijo Y, Liu YL, Gusmaroli G, Dinesh-Kumar SP, Deng XW. An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation. *Plant J*, 2005, 41(5): 767–778. [\[DOI\]](#)
- [33] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263(5148): 802–805. [\[DOI\]](#)
- [34] Misteli T, Spector DL. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(10): 961–964. [\[DOI\]](#)
- [35] van Roessel P, Brand AH. Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(1): E15–E20. [\[DOI\]](#)
- [36] Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H. A versatile nanotrapp for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(2): 282–289. [\[DOI\]](#)
- [37] Ye RQ, Wang W, Iki T, Liu C, Wu Y, Ishikawa M, Zhou XP, Qi YJ. Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* ARGONAUTE4/siRNA complexes. *Mol Cell*, 2012, 46(6): 859–870. [\[DOI\]](#)
- [38] Maier B, Kirsch M, Anderhub S, Zentgraf H, Krämer A. The novel actin/focal adhesion-associated protein MISP is involved in mitotic spindle positioning in human cells. *Cell Cycle*, 2013, 12(9): 1457–1471. [\[DOI\]](#)
- [39] Sonnevile R, Querenet M, Craig A, Gartner A, Blow JJ. The dynamics of replication licensing in live *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol*, 2012, 196(2): 233–246. [\[DOI\]](#)
- [40] Neumüller RA, Wirtz-Peitz F, Lee S, Kwon Y, Buckner M, Hoskins RA, Venken KJT, Bellen HJ, Moh SE, Perrimon N. Stringent analysis of gene function and protein-protein interactions using fluorescently tagged genes. *Genetics*, 2012, 190(3): 931–940. [\[DOI\]](#)
- [41] Oeffinger M. Two steps forward-one step back: Advances in affinity purification mass spectrometry of macromolecular complexes. *Proteomics*, 2012, 12(10): 1591–1608. [\[DOI\]](#)
- [42] Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. *Gene*, 1988, 67(1): 31–40. [\[DOI\]](#)
- [43] Einarson MB, Pugacheva EN, Orlinick JR. Identification of protein-protein interactions with glutathione-S-transferase (GST) fusion proteins. *CSH Protoc*, 2007, doi: 10.1101/pdb.top11. [\[DOI\]](#)
- [44] Giese B, Roderburg C, Sommerauer M, Wortmann SB, Metz S, Heinrich PC, Müller-Newen G. Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *J Cell Sci*, 2005, 118(21): 5129–5140. [\[DOI\]](#)
- [45] Ghosh I, Hamilton AD, Regan L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(23): 5658–5659. [\[DOI\]](#)
- [46] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 2002, 9(4): 789. [\[DOI\]](#)
- [47] Kodama Y. A bright green-colored bimolecular fluorescence complementation assay in living plant cells. *Plant Biotechnol*, 2011, 28(1): 95–98. [\[DOI\]](#)
- [48] Jach G, Pesch M, Richter K, Frings S, Uhrig JF. An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nat Methods*, 2006, 3(8): 597–600. [\[DOI\]](#)

- [49] Fan JY, Cui ZQ, Wei HP, Zhang ZP, Zhou YF, Wang YP, Zhang XE. Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(1): 47–53. [\[DOI\]](#)
- [50] Shyu YJ, Liu H, Deng XH, Hu CD. Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *Biotechniques*, 2006, 40(1): 61–66. [\[DOI\]](#)
- [51] Shyu YJ, Hu CD. Fluorescence complementation: an emerging tool for biological research. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(11): 622–630. [\[DOI\]](#)
- [52] Shyu YJ, Suarez CD, Hu CD. Visualization of AP-1–NF- κ B ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(1): 151–156. [\[DOI\]](#)
- [53] Förster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann phys*, 1948, 437(1–2): 55–75. [\[DOI\]](#)
- [54] Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem*, 1978, 47: 819–846. [\[DOI\]](#)
- [55] Sekar RB, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol*, 2003, 160(5): 629–633. [\[DOI\]](#)
- [56] Wallrabe H, Periasamy A. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(1): 19–27. [\[DOI\]](#)
- [57] Miyawaki A, Tsien RY. Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol*, 2000, 327: 472–500. [\[DOI\]](#)
- [58] Chen HM, Puhl HL 3rd, Koushik SV, Vogel SS, Ikeda SR. Measurement of FRET efficiency and ratio of donor to acceptor concentration in living cells. *Biophys J*, 2006, 91(5): L39–L41. [\[DOI\]](#)
- [59] Karlsson R, Michaelsson A, Mattsson L. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods*, 1991, 145(1–2): 229–240. [\[DOI\]](#)
- [60] Cooper MA. Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377(5): 834–842. [\[DOI\]](#)
- [61] Gilligan JJ, Schuck P, Yergey AL. Mass spectrometry after capture and small-volume elution of analyte from a surface plasmon resonance biosensor. *Anal Chem*, 2002, 74(9): 2041–2047. [\[DOI\]](#)

•综合信息•

《森林遗传学》

作者：(美) T. L. 怀特等编著；崔建国等译

ISBN: 9787030383884 定价: 138 丛书名: 生命科学名著 开本: 16 装帧: 平装

页码: 616 初版时间: 8/1/2013

内容介绍

《森林遗传学》不仅系统介绍了森林遗传学原理与林木改良方法，同时，还吸收了林木基因组学、林木分子育种等领域的最新研究成果，充分反映学科发展的新知识、新技术与新成果。全书共 20 章，第 1 章介绍森林遗传学的概念、范畴、历史和重要性，第 2~6 章概括介绍森林遗传学的基本原理，第 7~10 章介绍林木的遗传变异和基因保存策略，第 11~17 章详细阐述实用林木遗传改良的理论和方法，第 18~20 章介绍林木基因组学、标记辅助选择和育种及林木基因工程。

购书指南:

学士书店: <http://www.xueshi.com.cn>

科学出版社 科学销售中心

联系人: 周文宇 E-mail: zhouwenyu@mail.sciencep.com