

## 专题介绍 Special Topics

## 酵母双杂交技术及其在植物研究中的应用

朱金鑫 李小方\*

华东师范大学生命科学学院, 上海 200062

## Yeast Two-hybrid Technology and Its Applications in the Research of Plants

ZHU Jin-Xin, LI Xiao-Fang\*

College of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062

**提要** 酵母双杂交技术能有效地检测蛋白质之间的相互作用。该文简单介绍了此技术的工作原理和操作流程, 以及十几年来此项技术在植物功能基因组学和蛋白组学研究中的应用情况。

**关键词** 酵母双杂交; 植物研究; 应用

酵母双杂交体系简称双杂交体系(two-hybrid system), 又称相互作用陷阱(interaction trap), 是1989年由Fields和Song<sup>[1]</sup>提出并初步建立的。这一系统是在酿酒酵母中研究蛋白质间相互作用的一种非常有效的分子生物学方法。上个世纪90年代初期发展成为一种灵敏的真核细胞内鉴定基因的方法, 可有效地用来分离能与一种已知的靶蛋白相互作用的蛋白质的编码基因<sup>[2]</sup>。此技术以其简便、灵敏、高效以及能反映不同蛋白质之间在活细胞内的相互作用等特点得到广泛应用<sup>[3]</sup>。迄今为止, 在双杂交体系的基础上已发展了很多相关技术, 人们应用双杂交体系及相关技术已取得了许多科研成果。本文介绍这一技术在植物研究中的应用和前景。

1 工作原理<sup>[1]</sup>

酵母双杂交系统最初是根据真核转录调控的特点建立的。真核生长转录因子含有两个相对独立的功能区域: DNA结合结构域(DNA binding domain, DNA-BD)和转录激活结构域(activation domain, AD)。前者负责识别结合上游顺式激活序列(upstream activation sequence, UAS 如GAL4 UAS), 后者则与转录复合物的其它成分相互作用, 启动所调节基因的转录。BD与AD可以人为地分离, 分离的DNA-BD和AD单独分别作用, 并不能激活转录反应, 但是当二者在空间上较为接近时, 则呈现完整的转录因子的转录激活活性。将DNA-BD序列与一已知的蛋白质X(常称为

诱饵, bait)的基因结合, 构建出BD-X融合表达载体; 将AD序列与拟研究的另一蛋白Y——靶蛋

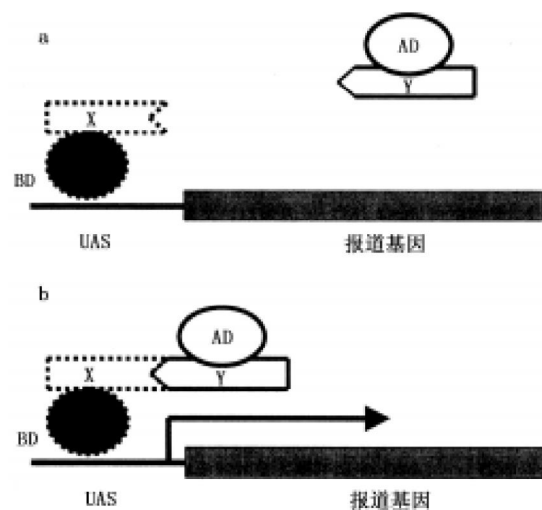


图1 酵母双杂交体系的原理

上游顺式激活序列(UAS)和报道基因整合在工程酵母菌的染色体上。(a)编码蛋白质X的基因与编码DNA结合结构域的序列(DNA-BD)融合形成一杂交体(BD-X), 该杂交体表达形成的融合蛋白能够与报道基因的UAS结合; 编码蛋白质Y的基因与转录激活结构域(AD)的序列融合形成的另一杂交体(AD-Y), 该融合蛋白不能与报道基因的UAS结合。(b)如果蛋白质X与Y能够相互作用, BD与AD就被结合在一起, 形成一完整的转录激活因子, 从而激活报道基因的表达。

收稿 2003-06-04 修定 2003-10-23

资助 国家自然科学基金项目(30100009)。

\* 通讯作者(E-mail:xfli@bio.ecnu.edu.cn, Tel:021-62233225)。

白(target 或 prey)的基因结合,构建出AD-Y表达载体(图1-a)。将这两个表达载体共转化至酵母细胞内表达,此种酵母菌株即含有特定报道基因(如 *LacZ*、*His3*等),并且已是去掉相应转录因子的编码基因,因此本身无报道基因的转录活性。如果蛋白质 X 和 Y 可以相互作用,则即导致 BD 与 AD 在空间上的接近,从而激活 UAS 下游启动子调节的报道基因的表达(图1-b);反之,BD 与 AD 就不能结合,报道基因也不能被启动表达。因此,可以通过检测报道基因表达与否来研究蛋白质之间的相互作用。如果将 Y 换成 cDNA 文库,就可以从 cDNA 文库中筛选与已知蛋白质 X 相互作用的未知蛋白质的编码序列。

## 2 组成

酵母双杂交系统由3个部分组成:(1)与BD融合的蛋白表达载体,被表达的蛋白称诱饵蛋白(bait)。最常用的DNA-BD是GAL4和LEX蛋白的DNA-BD。(2)与AD融合的蛋白表达载体,被表达的蛋白称靶蛋白(pre y)。最常用的AD是GAL4和HSV VP16的AD。(3)带有一个或多个报道基因的宿主菌株。常用的报道基因有 *LacZ*和营养缺陷型标记如 *His3*等,前者可以方便地通过X-gal存在时的颜色反应筛选阳性克隆,后者则根据筛选培养基上的生长与否判断。目前常用的是选择两种或两种以上的报道基因,因而使检测更准确和有效。而双杂交质粒上分别带有不同的抗性基因和营养标记基因,这很有利于实验后期杂交质粒的鉴定与分离。

## 3 操作程序

现在已有几种改进的酵母双杂交系统的操作程序大同小异,这里只介绍比较通用的一种。

**3.1 受体菌的背景** 如酵母菌Y190,其染色体上整合有GAL4上游顺式激活序列(GAL4 UAS)和报道基因 *His3*。Y190同时还含有一质粒,此种质粒含有GAL4操纵基因和下游的 *LacZ*基因。这样Y190中就具备了同时受GAL4操纵基因调节的2个报道基因。

**3.2 表达诱饵蛋白质粒的构建** 将已知的诱饵蛋白编码基因按正确的取向和读码结构克隆进DNA-BD质粒如pGBT9中(GAL4 + Polylinker+Trp1+Amp<sup>r</sup>),构建成可表达GAL4-bait融合蛋白的质粒

pGAL4-bait,此融合蛋白即为双杂交系统中的第一个杂交蛋白。

**3.3 诱饵蛋白的鉴定** 将pGAL4-bait转化Y190,由于质粒pGBT9含有 *Trp1*基因,所以在缺 *Trp1*的培养基上可以筛选到pGAL4-bait质粒的酵母转化子。通过检测 *His3*和 *LacZ*基因的表达活性,可鉴定诱饵蛋白的特性。若此蛋白本身具有转录激活活性,那它就不适宜做诱饵蛋白,需重新设计或修饰;反之,就可以继续进行后续步骤。

**3.4 表达靶蛋白质粒的构建** 将有可能与诱饵蛋白相互作用的另一蛋白质的编码基因克隆到AD-质粒如pGAD424或pACT II中,如果是筛选未知蛋白,则把cDNA片段克隆在pGAD424或其他质粒载体上,构成cDNA表达文库。此种质粒含 *Lue2*基因,可在缺 *Lue2*的培养基上得到阳性转化子。此质粒可表达第二个杂交蛋白。

**3.5 蛋白质之间相互作用的鉴定或相互作用蛋白的猎取** 从大肠杆菌中分别提取这两种重组质粒DNA,并共转化给感受态的酿酒酵母寄主菌株(如Y190),再将此种共转化的酵母菌株涂布在Gal/His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>+</sup> 3-AT培养基上,呈现蓝色的则为阳性;如果是筛选文库,筛选呈蓝色的阳性菌落,并培养在仅缺 *Lue2*的培养基中即可获得只含靶蛋白或文库基因的质粒,提取其中的质粒转化大肠杆菌的DH5 $\alpha$ ,可获得只含靶蛋白或文库质粒的DH5 $\alpha$ ,然后进一步分离相应的质粒,并对其编码未知蛋白的cDNA进行序列分析,以期发现新基因。

## 4 在植物研究中的应用

用酵母双杂交体系研究植物主要集中于模式植物拟南芥,也偶有用于研究烟草、矮牵牛和菠菜的报道。

**4.1 筛选** cDNA文库中编码与诱饵蛋白特异作用的未知蛋白并用于研究这些蛋白质的功能,这在植物研究中应用最多,并涉及诸多方面。

**4.1.1 植物发育生理** 作为开花生理研究中的重要里程碑之一的是1960年证实光敏色素的存在。光敏色素是植物一种重要的光受体,参与植物发育的光形态建成已被确认,但其在感受环境信息之后的进一步功能,一直是以假说解释的,研究也长期处于停滞状态。后来,随着双杂交系统的完

善, 人们开始用此技术筛选克隆与光敏色素相互作用的蛋白质。美国Quail实验室的Ni等<sup>[4]</sup>首先以光敏色素C末端序列为诱饵, 从拟南芥的cDNA文库中筛选到一个与光敏色素发生相互作用的蛋白PIF3, 是一个转录因子。马力耕和孙大业<sup>[5]</sup>也克隆到一种体内与光敏色素相互作用的转录因子, 并证实被光活化的光敏色素可直接进入细胞核与转录因子结合启动基因表达。Fankhauser等<sup>[6]</sup>和Choi等<sup>[7]</sup>用同样的方法, 分别检测到另外2种与光敏色素相互作用的蛋白: PSK1和NDPK2。Quail<sup>[8]</sup>用酵母双杂交系统筛选到与光敏色素家族成员相互作用的成分。根据对此种成分的分析, 他们提出了新的细胞内信号可能的传递途径。

近年来, 随着分子遗传学和分子生物学技术的迅速发展以及这些技术在植物发育过程中的广泛应用, 越来越多控制发育的基因, 尤其是控制花器官形成的基因相继得到克隆。其中很大一部分是含MADS-box的转录调控因子。研究这些基因的生物学功能, 如何对它们进行调控, 势必需对其相互作用的因子进行鉴定, 而酵母双杂交系统则可以方便地解决这一问题。Fearon等<sup>[9]</sup>用此种技术证实拟南芥花发育期间的器官特异性因子AGAMOUS与一特异蛋白质相互作用, 后者富含重复亮氨酸序列。这是首次证实植物中MADS-box的转录调控因子与非MADS-box蛋白之间发生作用。

花粉形成、花粉管萌发及其伸长生长机制也是近年来的研究热点。PRK1是矮牵牛花粉中特异表达的一种受体类似物(receptor-like)激酶。此种蛋白是有丝分裂后配子体发育和胚囊形成所必需的, 但是有关PRK1在此途径中的分子作用机制还知之甚少。Seong<sup>[10]</sup>用PRK1的激酶区域作诱饵筛选与PRK1相互作用的蛋白时, 得到一cDNA克隆, 其编码的蛋白与人和酵母的翻译起始因子eIF2B中的 $\beta$ 亚基有很高的同源性。这暗示, 在花粉发育过程中, 由PRK1介导产生的信号, 其所调节的基因表达在很大程度上是在翻译水平上进行的。

P颗粒(granule)的形成是植物育性所必需的, 而GLH蛋白是组成P颗粒的重要成分, Smith等<sup>[11]</sup>用酵母双杂交系统证实其与受粉必需蛋白CSN-5

及KGB-1相关, 还与细胞骨架蛋白ZYG-1有关。

**4.1.2 细胞周期调控** 植物生长发育是以细胞的分裂、生长和分化为基础的, 因此在细胞水平上研究植物的发育必然要涉及到细胞周期的调控。近年研究得知, 控制细胞周期的关键酶是一种依赖于细胞周期蛋白的蛋白激酶(cyclin-dependent protein kinase, CDK), 因此研究植物发育过程中CDK活性的调节遂非常活跃。Doonan和Forbert<sup>[12]</sup>用双杂交技术分离了CDK的相互作用蛋白, 如cdk抑制子和suc1的同源物。Zhou等<sup>[13]</sup>研究植物CDK抑制因子ICK与细胞周期调节因子间相互作用的结果, 证实可能存在A组和B组两组CDK抑制因子, 与这两组抑制因子相互作用的细胞周期调节因子并不一样。人们已经知道, E2F是调节哺乳动物细胞周期的转录因子, 一些植物中的E2F同源基因也已相继得到克隆。Ramirez-Parra和Gutierrez等<sup>[14]</sup>以E2F作“诱饵”, 采用酵母双杂交技术在小麦中分离到一种编码小麦DP蛋白的cDNA克隆。Sekine等<sup>[15]</sup>在烟草中也证明NtE2F与烟草Rb(retinoblastoma)相关蛋白是相互作用的。

**4.1.3 信号转导** 蛋白质磷酸化是细胞间以及细胞内外信号转导的重要机制之一, 在原核细胞和动物细胞中已广泛进行了研究。但在植物细胞中研究的起步相对较晚。上个世纪90年代以来人们在研究植物激素作用的分子机制中, 逐步发现许多与动物细胞及原核细胞中磷酸化途径同源的基因, 如乙烯受体ETR1和细胞分裂素信号转导途径中的CKI1都是组氨酸激酶。但是这些基因的功能如何、在其作用过程中还有哪些因素参与都是有待解决的问题。双杂交系统的完善是对这方面研究的极大推进。Yamada等<sup>[16]</sup>在研究组氨酸到天冬氨酸的磷酸化信号转导途径时, 发现一拟南芥的AtDBP (*Arabidopsis thaliana* DNA-binding protein)蛋白可以与细胞分裂素诱导的ARR4反应调节因子相互作用。Urao等<sup>[17]</sup>从拟南芥中克隆到这一途径中的1个组氨酸激酶(ATHK1)、3个磷酸化中间产物(ATHP1~3)和4个反应调节因子(ATRR1~4)的编码基因, 并用酵母双杂交技术检测了它们之间的相互作用, 初步查清了拟南芥中从组氨酸转到天冬氨酸的磷酸化信号转导的可能路径。同样, Ichimura等<sup>[18]</sup>对拟南芥的MAPK信号级联系统也

作了研究。他们以 ATMEKK1 为诱饵, 筛选得到 MAPKK 同源物 ATMKK2 和 MAPK 的同源物 ATMPK4 以及一未知蛋白。ATMKK2 和拟南芥中的 MEK1 (一种 MAPKK) 同源性很高。这些结果表明 ATMEKK、ATMKK2/MEK1 和 ATMPK4 有可能组成拟南芥中的 MAPK 级联。

此外, 戴良英等<sup>[19]</sup>用酵母双杂交系统研究了从拟南芥的茉莉素信号转导链中分离得到的第一个基因——*CoII* 基因的互作基因。Yamazaki 等<sup>[20]</sup>研究藻类植物 *Perilla frutescens* 的花青素生物合成途径调节机制, 并证实特异 bHLH 因子 MYC-F3G1 可与另一 bHLH 因子 MYC-RP 以及含 WD40 重复序列的蛋白 PFWD 相互作用, 而与光诱导 MYB 因子 MYB-P1 则不发生作用。他们认为 MYC-F3G1、MYC-RP 和 PFWD 的蛋白复合体对 *P. frutescens* 中花青素生物合成基因有调节作用。

**4.1.4 与植物蛋白相互作用的病毒蛋白** 自从上个世纪 40 年代提出从遗传上说明病原和寄主相互关系的基因对基因学说之后, 人们对致病和抗病机制的认识即一步步深入, 70 年代开始运用分子生物学观念和技术分析病原的无毒基因和致病基因以及寄主的防卫基因和抗病基因, 现在又开始研究病原诱导下寄主多种防卫反应发生的早期信号传导机制以及病原致病基因与植物反应基因间的互作。万曦等<sup>[21]</sup>用 Duplex-A 酵母双杂交系统克隆植物早期结瘤素基因 *ENOD40* 的受体基因, 得到 5 个克隆, 为进一步分析根瘤形成过程中信号转导打下了基础。Wittmann 等<sup>[22]</sup>通过拟南芥 cDNA 文库筛选证实芜菁镶嵌病毒与拟南芥真核转录起始因子 4E 之间可以相互作用。Wang 等<sup>[23]</sup>的实验表明夏南瓜黄色镶嵌病毒 (ZYMV) 的 RNA 依赖型 RNA 聚合酶和宿主多聚腺苷酸 (Poly-A) 结合蛋白 [Poly-(A) binding protein, PABP] 可以相互作用, 这一结果可以帮助人们了解病毒感染过程中宿主 PABP 的重要作用。用此技术研究植物抗病性, 在小麦、烟草、番茄和玉米中也均有报道<sup>[24~26]</sup>。

**4.2 检测两种或多种蛋白之间的相互作用** 随着分子遗传学和分子生物学技术的迅速发展和在研究植物生命过程中的广泛应用, 越来越多的不同功能基因在不同领域和不同的实验室中分离, 如控制发育的多种基因、调节植物抗性的基因、参与植

物感受外界因子的信号传导相关基因等。这些基因在相关的生物学功能中的关系是直接的或是间接的, 如何调控, 在解决这些问题之前往往要确定它们之间是否相互作用, 酵母双杂交系统可以快速而方便地解决这一问题, 并已在以下领域的研究中得到广泛运用。

**4.2.1 信号转导级联反应** 在植物中, 一些 MAP 激酶 (MAPK)、MAPK 激酶 (MAPKK) 和 MAPKK 激酶 (MAPKKK) 的同源物已有所报道, 但在高等植物中这些激酶之间的相互作用和 MAPK 级联的分子分析的报道还未见。Mizoguchi 等<sup>[27]</sup>用双杂交技术证明 ATMPK4 (一种 MAPK)、MEK1 (一种 MAPKK) 和 ATMEKK1 (一种 MAPKKK) 可以相互作用, 在拟南芥中形成一特殊的 MAPK 级联。这是首次报道植物中可能有 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 级联。Ichimura 等<sup>[18]</sup>以 ATMEKK1 为诱饵, 用双杂交系统筛选得到 MAPKK 同源物 ATMKK2 和 MAPK 的同源物 ATMPK4, 以及一未知蛋白。进一步分析这些蛋白质之间的相互作用, 发现 ATMPK4 与 ATMEKK1 的 N 末端的调节域相互作用, 而 ATMKK2/MEK1 和 ATMEKK1 的 C 末端的激酶活性域相互作用, 由此认为这 3 种蛋白有可能在体内形成复合物。

**4.2.2 植物发育调控基因的相关性** 植物发育调控基因的研究一直是植物科学中的研究热点, 运用不同的分子生物学手段和遗传方法, 越来越多的基因得到分离, 双杂交技术可以用于研究这些基因在生物功能上的相关性。目前这方面的应用还不是太多。Spillane 等<sup>[28]</sup>在研究拟南芥生殖发育时期调控细胞增殖的 polycomb group 蛋白 *FIE* 基因家族中, 发现其与 *MEA* (编码动物 Pc-G 蛋白基因的同源基因) 产物可以相互作用。

**4.2.3 多蛋白复合体亚基间的联系** 植物的很多生物学功能是由一系列蛋白质复合体执行的, 最典型的例子就是执行能量转换的光合作用的运行, 如光能的吸收、传递和转换是由在类囊体膜上具有一定分子排列方式及空间构象的膜脂蛋白复合体完成的。其中催化 ATP 合成的 ATP 合酶 (又称光合磷酸化反应耦联因子) 具有 CF<sub>0</sub> 和 CF<sub>1</sub> 两个部分共 9 种亚基, 每种亚基均行使其特有功能。研究高等植物 ATP 合酶各亚基间的相互作用对完善结构

和调节酶的功能有重要意义。石晓冰等<sup>[29,30]</sup>用双杂交系统检测菠菜叶绿体 ATP 合成酶 CF<sub>1</sub> 各亚基 ( $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta$ ) 间相互作用的结果表明:  $\alpha$  与  $\beta$ 、 $\alpha$  与  $\epsilon$ 、 $\beta$  与  $\delta$  亚基间有稳定的相互作用;  $\gamma$  和  $\epsilon$  的相互作用较强;  $\gamma$  与  $\delta$ 、 $\delta$  与  $\epsilon$  间有微弱的或短暂的相互作用;  $\alpha$  与  $\gamma$ 、 $\alpha$  与  $\delta$ 、 $\beta$  与  $\gamma$  等亚基在酵母系统中无相互作用。由此, 他们认为高等植物叶绿体 CF<sub>1</sub> $\delta$  亚基的高级结构, 以及  $\delta$  亚基在 ATP 合酶上的空间位置可能与细菌 ATP 合酶有所不同。此外, 他们还检测了叶绿体 ATP 合酶 CF<sub>1</sub> 与 CF<sub>0</sub> 亚基间的相互作用。这些结果有助于研究 ATP 合酶在催化过程中的结构变化和亚基间的相互关系。

**4.3 确定蛋白质之间相互作用的特定区域** 在分子水平上有时候需要确定蛋白质相互作用所必需的结构域, 这对基因工程和分析突变原因相当必要。长期以来, 人们多选用分子生物学手段构建多个嵌套缺失突变体 (overlapping deletion mutants), 然后再将其导入生物体表达, 最后用免疫沉淀等方法检测, 或者用体外标记结合免疫沉淀。这些方法费时、费力, 在植物研究中除了模式植物拟南芥转基因方法比较成熟外, 多数还受到基因转化效率的限制。酵母双杂交系统可以快速、方便地解决这一问题。但目前这方面的应用还刚刚起步。Ehrhardt 等<sup>[31]</sup>筛选到 2 个特异的植物 K<sup>+</sup><sub>in</sub> 通道蛋白 SKT2 和 SKT3, 用此方法证明它们之间通过 C 末端相互作用, 该末端包含一保守区域。

## 5 结束语

酵母双杂交技术创立至今的十几年中, 在基因和蛋白质研究中已得到广泛应用, 并取得了许多有价值的结果。除了在酵母中应用外, 此项技术已扩展到哺乳动物和植物细胞的研究中<sup>[9]</sup>。用酵母双杂交技术鉴定的多种受体、转录因子、蛋白激酶、磷酸化酶、肿瘤发生蛋白、细胞骨架蛋白以及参与细胞周期调控的因子不胜枚举<sup>[32]</sup>。但从总体来说, 此项技术在免疫、细胞、动物、医学等领域中的应用明显多于植物, 国内在这方面的研究尤为欠缺。迄今, 人们对植物生长、发育和植物的一系列生理过程及机制, 还有许多问题不很清楚, 如花形态建成中的基因控制、营养生长的基因控制、生化代谢合成的基因调控等。尽管目前已经建立了各种克隆新基因的技术<sup>[33]</sup>, 克

隆了许多与植物生长发育过程相关的基因, 但酵母双杂交技术无疑会推动这些问题的研究。这一技术的最大优点是只需对细胞内环境蛋白——蛋白之间的相互作用进行分析, 不必像传统生化方法那样花费大量精力去纯化蛋白。相信今后借助此种系统, 可以圆满而有成效地解决植物生命活动中的许多难题。

## 参考文献

- 1 Fields S, Song O-K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340:245~256
- 2 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 第2版. 北京: 科学出版社, 2002. 242~246
- 3 张迪, 霍克克, 顾科隆等. 酵母双杂交技术研究进展. *高技术通讯*, 2000, 10(3):98~101
- 4 Ni M, Tepperman JM, Quail PH. Binding of phytochrome B to its nuclear signaling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*, 1999, 400:781~784
- 5 马力耕, 孙大业. 光敏色素与转录因子结合直接调控植物基因表达和发育. *生命科学*, 2001, (4):148~150
- 6 Fankhauser C, Yeh KC, Lagarias JC et al. a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in arabidopsis. *Science*, 1999, 284: 1539~1541
- 7 Choi G, Yi H, Lee J et al. Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature*, 1999, 401: 610~613
- 8 Quail PH. Phytochrome-interacting factors. *Semin Cell Dev Biol*, 2000, 11:457~466
- 9 Fearon ER, Finkel T, Maura L et al. Karyoplasmic interaction selection strategy: A general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(17):7958~7962
- 10 Park SW, Yu SH, Kim MII et al. Interaction of PRK1 receptor-like kinase with a putative eIF2B  $\beta$ -subunit in tobacco. *Mol Cells*, 2000, 10:626~632
- 11 Smith P, Leung-Chiu WM, Montgomery R et al. The GLH Proteins, *Caenorhabditis elegans* P granule components, associate with CSN-5 and KGB-1, proteins necessary for fertility, and with ZYX-1, a predicted cytoskeletal protein. *Dev Biol*, 2002, 251:333~347
- 12 Doonan J, Fobert P. Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9:824~830
- 13 Zhou Y, Fowke L, Wang H. Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Rep*, 2002, 20:967~975

- 14 Ramirez-Parra E, Gutierrez C. Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBS Lett*, 2000, 486: 73~78
- 15 Sekine M, Ito M, Uemukai K et al. Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett*, 1999, 460:117~122
- 16 Yamada H, Hanaki N, Imamura A et al. An *Arabidopsis* protein that interacts with the cytokinin-inducible response regulator, ARR4, implicated in the His-Asp phosphorylation signal transduction. *FEBS Lett*, 1998, 436:76~80
- 17 Urao T, Miyata S, Yamaguchi-Shinozaki K et al. Possible His to Asp phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system. *FEBS Lett*, 2000, 478:227~232
- 18 Ichimura K, Mizoguchi T, Irie K et al. Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253:532~543
- 19 戴良英, 李梅, 罗宽. 拟南芥 *COI1* 互作基因的分离. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2002, (5):359~363
- 20 Yamazaki M, Makita Y, Springob K et al. Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crisp*. *Biochem Eng J*, 2003, 14:191~197
- 21 万曦, Vieghels I, Franssen H等. 克隆植物早期结瘤素基因 *ENOD40* 的受体基因. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 293~296
- 22 Wittmann S, Chatel H, Fortin MG. Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translation eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology*, 1997, 234:84~92
- 23 Wang X, Ullah Z, Grumet R. Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host Poly-(A) binding protein. *Virology*, 2000, 275:433~443
- 24 Collin S, Fernández-Lobato M, Gooding PS et al. The two nonstructural proteins from wheat dwarf virus involved in viral gene expression and replication are retinoblastoma-binding proteins. *Virology*, 1996, 219:324~329
- 25 Schaad MC, Anderberg RJ, Carrington JC. Strain-specific interaction of the tobacco Etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology*, 2000, 273:300~306
- 26 Liu L, Saunders K, Thomas CL et al. Bean yellow dwarf virus RepA, but not Rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. *Virology*, 1999, 256:270~279
- 27 Mizoguchi T, Ichimura K, Irie K et al. Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Lett*, 1998, 437:56~60
- 28 Spillane C, MacDougall C, Stock C et al. Interaction of the *Arabidopsis* polycomb group proteins FIE and MEA mediates their common phenotypes. *Curr Biol*, 2000, 10: 1535~1538
- 29 石晓冰, 魏家绵, 沈允钢. 酵母双杂交系统检测菠菜叶绿体 ATP 合酶 CF-1 各亚基间的相互作用. 中国科学 C 辑, 2000, (3):276~281
- 30 石晓冰, 魏家绵, 沈允钢. 叶绿体 ATP 合酶 CF<sub>1</sub> 与 CF<sub>0</sub> 亚基间的相互作用. 科学通报, 2001, (18):1550~1554
- 31 Ehrhardt T, Zimmermann S, Müller-Rober B. Association of plant K<sup>+</sup><sub>in</sub> channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Lett*, 1997, 409:166~170
- 32 张树民, 陈英碚. 酵母双杂交体系的新发展. 国外医学遗传学, 1999, 22(5): 225~227
- 33 白书农, 谭克辉. 高等植物开花调控的分子基础. 见: 余叔文, 汤章城主编. 植物生理与分子生物学. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998. 566