

# 酵母双杂交筛选与果蝇 C(2)M 相互作用的蛋白

岳珊珊<sup>1,2</sup>, 夏来新<sup>1</sup>

1. 安徽大学生命科学学院, 安徽 230601;

2. 中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101

**摘要:** 同源染色体联会时形成的联会复合体(Synaptonemal complex, SC)是由减数分裂前期Ⅰ多种蛋白质聚集而成的超级复合结构。生殖细胞特异性的核蛋白 C(2)M(Crossover suppressor on 2 of Manheim)在染色体上高度聚集可以诱导 SC 的形成。本文采用酵母双杂交方法, 利用 C(2)M 的诱饵表达载体筛选果蝇 cDNA 文库, 共发现 40 个可能与 C(2)M 相互作用的蛋白, 包括多种 DNA 及组蛋白结合蛋白、ATPase、转录调节因子。从筛选的结果中, 选取 *wech* 和 *Psfl* 基因构建了转基因果蝇, 并在生殖细胞中进行了基因沉默, 结果显示联会复合体的消失受到延迟。上述结果表明 Wech 和 Psfl 蛋白可能与 C(2)M 形成复合物, 共同参与联会复合体的形成或其稳定性的维持。

**关键词:** 减数分裂; SC; C(2)M; 酵母双杂交; 蛋白相互作用

## Identification of C(2)M interacting proteins by yeast two-hybrid screening

Shanshan Yue<sup>1,2</sup>, Laixin Xia<sup>1</sup>

1. School of Life Sciences, Anhui University, Anhui 230601, China;

2. State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** The synaptonemal complex (SC) is a huge structure which assembles between the homologous chromosomes during meiotic prophase I. *Drosophila* germ cell-specific nucleoprotein C(2)M clustering at chromosomes can induce SC formation. To further study the molecular function and mechanism of C(2)M in meiosis, we constructed a bait vector for C(2)M and used the yeast two-hybrid system to identify C(2)M interacting proteins. Forty interacting proteins were obtained, including many DNA and histone binding proteins, ATP synthases and transcription factors. Gene silencing assays in *Drosophila* showed that two genes, *wech* and *Psfl*, may delay the disappearance of SC. These results indicate that Wech and Psfl may form a complex with C(2)M to participate in the formation or stabilization of the SC complex.

**Keywords:** meiosis; SC; C(2)M; yeast two-hybrid system; protein interaction

收稿日期: 2015-03-22; 修回日期: 2015-08-25

基金项目: SKLRB 青年杰俊科研创新主任基金项目资助

作者简介: 岳珊珊, 硕士研究生, 专业方向: RNA 代谢和干细胞。E-mail: yueshanshanyss@163.com

通讯作者: 夏来新, 教授, 博士生导师, 研究方向: RNA 代谢和干细胞。E-mail: xialx@ioz.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-118

网络出版时间: 2015-9-11 9:54:25

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150911.0954.002.html>

减数分裂是指染色体复制一次, 细胞连续分裂两次, 染色体数目减半的一种特殊分裂方式。它是保证物种染色体数目稳定的机制, 也促进着物种不断进化。减数分裂是由减数分裂 I 和减数分裂 II 两个时期组成, 其中减数分裂 II 又可细分为细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期 5 个时期。从偶线期起, 同源染色体紧密相贴进行配对, 称为联会, 在同源染色体间形成了联会复合体(Synaptonemal complex, SC)。目前, 对于 SC 的研究仅限于其本身组分相关的蛋白, 而对于 SC 的起始、装配以及其时空性的研究还不够深入。据报道, SC 的形成可分为 3 个时期<sup>[1]</sup>: 偶线期早期, 只能在着丝粒上观察到联会复合体; 偶线期中期, 联会复合体开始出现在常染色体的某些位点上; 偶线期晚期, 联会发生在染色体上的更多位点上。由此可见, SC 的形成有着严谨的机制。已有的研究证实, 偶线期早、中期 SC 的形成依赖于凝集蛋白 ORD(Orientation disruptor)<sup>[2]</sup>, 晚期 SC 的形成则依赖 C(2)M<sup>[3]</sup>。C(2)M 是 SC 中的纵向元件(Lateral elements, LEs)的组成成分<sup>[4]</sup>, 在减数分裂 S 期开始累积, 在减数分裂中期 I 消失, 说明 C(2)M 在联会复合体中发挥作用, 而并不参与染色体的分离<sup>[5,6]</sup>。目前, 对于 C(2)M 在联会这一事件中发挥怎样的功能仍知之甚少, 特别是关于 C(2)M 如何参与 SC 的形成、如何引导 SC 的组装。

酵母双杂交系统是 1989 年由 Fields 等<sup>[7]</sup>提出并初步建立的, 至今为止一直是研究蛋白间相互作用的重要实验手段。本研究利用酵母双杂技术, 以 C(2)M 为诱饵蛋白, 筛选果蝇文库中与之相互作用的蛋白, 旨在研究 C(2)M 调控 SC 组装的分子机制, 相关结果将有助于提高人们对同源配对分子基础及减数分裂启动的了解。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

酵母菌株 AH109, 质粒 pGBKT7 和 pACT2, 宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  由本实验室提供; cDNA 文库由上海海科生物技术有限公司构建; 酵母质粒小提试剂盒和鼠、兔免疫荧光二抗购自天根生物公司; C(3)G 抗体由本实验室自制, Orb 抗体购自 Developmental Studies Hybridoma Bank(美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 诱饵蛋白表达载体的构建

以果蝇 cDNA 为模板, 设计有含 *Nco* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点的引物 *c(2)M-Nco* -s 和 *c(2)M-Xho* -as(表 1), PCR 扩增 C(2)M 的 CDS(Coding sequence)序列(Gene ID:34964), 将扩增产物连接 pGBKT7 载体。

#### 1.2.2 诱饵质粒转化酵母 AH109 及文库筛选

醋酸锂法制备 AH109 感受态, 转入诱饵质粒, 铺于 SD/-Trp 缺陷培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 4~6 d; 取部分菌体用于检测蛋白表达; 制备含诱饵质粒的 AH109 感受态, 转入文库质粒, 铺于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 缺陷培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 5~7 d; 挑取直径 > 2 mm 的阳性克隆, 接于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 缺陷培养基上保种。

#### 1.2.3 酵母阳性克隆质粒提取及质粒的回复和自激活验证

因酵母具有质粒相容性, 可包含多种质粒, 所以提出酵母质粒后, 需转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 从中提取质粒; 将提出的质粒同 pGBKT7-c(2)M 回转 AH109, 验证阳性相互作用; 将质粒同 pGBKT7 回转 AH109, 验证阳性质粒能否自激活 *His* 和 *LacZ* 基因。

#### 1.2.4 阳性克隆的测序与分析

将重复验证结果为阳性而自激活验证为阴性的组别由北京擎科生物公司测序, 测序结果在 NCBI 和 Flybase 网站上进行序列比对, 利用生物信息学方法研究筛选结果。

#### 1.2.5 S2(Schneider 2)细胞内验证 C(2)M 和 Wech/Psf1 的相互作用

结合文献以及基因本身的表达特点, 从筛选结果中挑选 *wech* 和 *Psf1* 2 个目标基因, 在 S2 细胞内验证其与 C(2)M 的相互作用; 将这两个基因沉默后, 免疫荧光观察减数分裂进程是否受到影响。以果蝇 cDNA 为模板, 设计含有 *Not* I 和 *Xba* I 限制性酶切位点的引物 *c(2)M-Not* I -s、*c(2)M-Xba* I -as、*wech-Not* I -s、*wech-Xba* I -as、*Psf1-Not* I -s 和 *Psf1-Xba* I -as(引物信息见表 1), PCR 扩增 *c(2)M*、*wech*(Gene ID:44653)和 *Psf1*(Gene ID:38136)的 CDS 序列, 构建

表 1 本研究所用的引物信息

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
<i>c(2)M-Nco</i> I -s	ATACCATGGAGATGAGCTTGAATTTATATGAGAGCAACATC	PCR 扩增 <i>c(2)M</i> 的 CDS 序列, 构建载体 pGBKT7- <i>c(2)M</i>
<i>c(2)M-Xho</i> I -as	ATACTCGAGTCACAGAGTCTCACTCAGCATAAGATTGTC	
<i>c(2)M-Not</i> I -s	ATAGCGGCCGCGCATGAGCTTGAATTTATATG	PCR 扩增 <i>c(2)M</i> 的 CDS 序列, 构建载体 pAC5.1-Flag- <i>c(2)M</i>
<i>c(2)M-Xba</i> I -as	GCTCTAGATCACAGAGTCTCACTCAGCA	
<i>wech-Not</i> I -s	ATAGCGGCCGCGCATGATGGAACCTTTGTCAAA	PCR 扩增 <i>wech</i> 的 CDS 序列, 构建载体 pAC5.1-Myc- <i>wech</i>
<i>wech-Xba</i> I -as	GCTCTAGATTAGAATACGTGCACAAAC	
<i>Psf1-Not</i> I -s	ATAGCGGCCGCGCATGAGCCGACAAACAAAAA	PCR 扩增 <i>Psf1</i> 的 CDS 序列, 构建载体 pAC5.1-Myc- <i>Psf1</i>
<i>Psf1-Xba</i> I -as	GCTCTAGACTAGGCTATGTGGTGAAGAA	
<i>wech</i> 发卡序列-s	CTAGCAGTGTCGCCAGAGACATCTAACTATAGTTATATTCAAGCATATTGTT	合成 <i>wech</i> 发卡
<i>wech</i> 发卡序列-as	AGATGACTCTGGCGACGCG AATTTCGCGTCGCCAGAGTCATCTAACAATATGCTTGAATATAACTATAGTT AGATGTCTCTGGCGACACTG	
<i>Psf1</i> 发卡序列-s	CTAGCAGTGATCAAGGCGTTATTCGAGCATAGTTATATTCAAGCATATCCT	合成 <i>Psf1</i> 发卡
<i>Psf1</i> 发卡序列-as	CGAATATCGCCTTGATCGCG AATTTCGCGATCAAGGCGATATTCGAGGATATGCTTGAATATAACTATGCTC GAATAACGCCTTGATCACTG	

载体 pAC5.1-Flag-*c(2)M* 和 pAC5.1-Myc-*wech*/*Psf1*。将其分别共转 S2 细胞, 29 °C 培养 48 h; 收集细胞, 用 PBS 洗涤 3 遍, 用细胞裂解液裂解细胞, 冰上放置 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清; 将上清与 Flag beads 4 °C 孵育 2 h, PBST 洗 3 次, 用 1×SDS loading buffer 重悬, 95 °C 煮样 10 min, 丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品, 将蛋白样品转至 PVDF 膜上, 5% 牛奶封闭 1 h, 以 c-Myc 抗体为一抗, 室温孵育 2 h, 以鼠抗为二抗, 室温孵育 30 min, 显影。

#### 1.2.6 候选基因的基因沉默型果蝇卵巢荧光观察

本研究采用 GAL4/UAS 系统快速获得可调控的 RNA 干扰果蝇。在 Gene Link 网站上设计 *wech* 和 *Psf1* mRNA 干扰序列; 引物稀释为 100 μmol/L, 各取 1 μL, *Taq* buffer 1 μL, 水 7 μL, 95 °C 变性 5 min, 室温复性 1 h; 将产物连入已有的表达载体 UASP-attB 中; 经大肠杆菌扩增后, 提取质粒, 通过显微注射的方法将载体注入果蝇的卵巢, 于 25 °C 培养箱中培养, 至其发育为成虫; 选择有干扰序列插入的果蝇, 与表达转录激活蛋白 GAL4 的果蝇品系杂交, 收集同时含有 *GAL4* 基因和 UAS 序列的 F<sub>1</sub> 代雌蝇, 显微镜下剥离卵巢, 甲醛固定 30 min, PBST 打孔 30 min, PBTA 封闭 1 h, C(3)G 和 Orb 一抗 4 °C 孵育过夜, 荧光二抗孵育 3 h, 制片观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 诱饵蛋白表达载体 pGBKT7-*c(2)M* 的构建

以成体果蝇的 cDNA 为模板扩增基因 *c(2)M* 的

CDS 区, 片段长度为 1731 bp, 经 *Nco* 和 *Xho* 酶切后插入 pGBKT7 中, 以 T7 和下游引物作为鉴定引物, 阳性结果测序证实无移码突变。

### 2.2 阳性克隆的筛选、自激活及回复验证

取 50 μg cDNA 文库转入含目的基因 *c(2)M* 的 AH109 中, 采用 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 缺陷培养基高压筛选, 经过 1 周左右的时间, 在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 缺陷培养基上共长出直径 > 2 mm 的克隆 200 个, PCR 筛选阳性克隆, 文库基因大小在 500~3000 bp 之间(图 1A)。对这 200 个克隆分别进行自激活和回复验证实验(图 1B), 其中自激活的组别占总组别的 35%。除去自激活现象(70 个)和回复验证失败(39 个)的组别, 本研究最后获得 91 个阳性克隆, 对其进行测序。

### 2.3 阳性克隆的测序及生物信息学分析

由于酵母质粒浓度较低, 将质粒转入 *E. coli* DH5α 感受态后重新提取质粒, 以 T7 为引物进行测序, 最后将这 91 个测序结果在 Flybase 上进行比对, 得到 40 个不同的基因(表 2), 编码众多结合蛋白、热休克蛋白、ATP 酶、具有解旋酶活性的 *Psf1*、整合蛋白 *Wech* 以及染色体凝集蛋白 *Cap-G*。

### 2.4 S2 细胞内验证 C(2)M 和 Wech/Psf1 的相互作用

pAC5.1-Flag-*c(2)M* 和 pAC5.1-Myc-*wech*/*Psf1* 共转 S2 细胞 48 h 后, 提取蛋白, 沉淀 C(2)M 及其相互作用的蛋白, 结果见图 2。从图 2 可以看出,

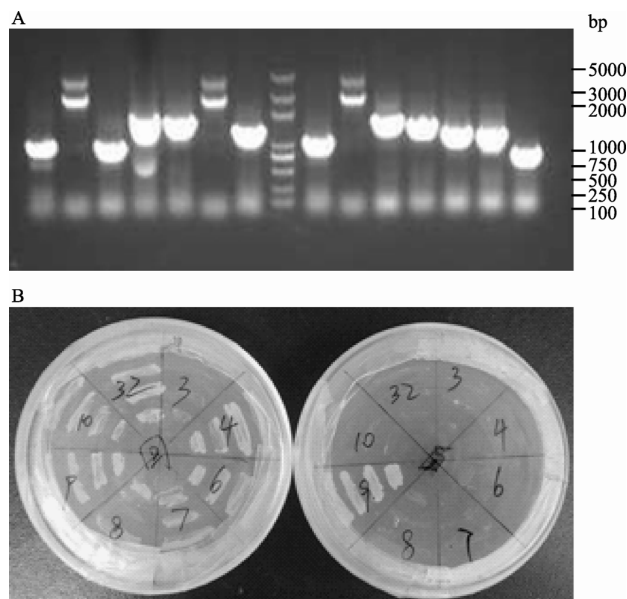


图1 酵母质粒PCR检测结果(A)及阳性克隆的回复验证(B)

A 图各泳道为随机选取的阳性质粒 PCR 检测结果; B 图左边平板是回转阳性文库质粒至含 pGBKT7-c(2)M 的 AH109 中, 右边是回转阳性文库质粒至含 pGBKT7 空载的 AH109 中。由图中可以看出 3 号克隆回复验证时不生长, 而 9 号克隆能够自激活报告基因。

在单独转染 pAC5.1-Myc-wech 或 pAC5.1-Myc-Psf1 时, 利用 Flag beads 免疫沉淀后, 没有检测到 Wech 或 Psf1 的表达; 而共转 pAC5.1-Flag-c(2)M 和 pAC5.1-Myc-wech/Psf1 后, 在经 Flag beads 沉淀后的 C(2)M 相互作用的蛋白中, 分别检测到 Wech 和 Psf1 的表达, 说明 C(2)M 和 Wech/Psf1 均存在相互作用。

## 2.5 *wech* 和 *Psf1* 基因沉默型果蝇卵巢的免疫荧光观察

本文成功制备了含有 *wech* 和 *Psf1* mRNA 干扰序列的转基因果蝇, 用能够标记联会复合体的 C(3)G 抗体, 染色 *wech* 和 *Psf1* 基因沉默后的卵巢, 发现与野生型果蝇不同的是, 在 *wech* 和 *Psf1* 基因沉默型果蝇的卵巢中, 其染色体联会受到了干扰, 即在卵母细胞形成的最后阶段, 会有两个细胞发育成为卵母细胞, 而在野生型果蝇中, 最终只形成一个卵母细胞(图 3)。

## 3 讨论

酵母双杂交技术自建立起一直是研究和鉴定两

表 2 酵母筛选阳性克隆比对结果

基因编号	功能	卵巢中 mRNA 表达水平
CG8448	DnaJ 参与蛋白折叠	610 ± 14
CG10578		1281 ± 29
CG5001		32 ± 1
CG14207	Hsp20	329 ± 7
CG4533		26 ± 1
CG11949	细胞骨架结合蛋白 Coracle	54 ± 1
CG18408	黏连蛋白结合蛋白 CAP	135 ± 4
CG4376	Actin 结合蛋白	283 ± 11
CG34438	染色体结合蛋白 CAP-G	
CG2961	DNA 甲基化相关蛋白 Interaction partner of Dnmt2	18 ± 2
CG18787	DNA 结合蛋白	260 ± 4
CG1469	铁离子结合蛋白 Fer2LCH	4 ± 1
CG2216		1679 ± 34
CG1403	GTP 结合蛋白 Septin1	407 ± 25
CG16838	基因组稳定性相关蛋白 Elg1	414 ± 9
CG6030	ATP 合成酶 ATPsynD	933 ± 11
CG2862	肿瘤抑制因子、DNA 损伤修复因子 HIT	667 ± 8
CG7697	RNA 结合修饰蛋白 CstF-64	122 ± 3
CG32423		203 ± 3
CG18259		344 ± 9
CG5121	RNA polymerase II 转录辅助因子 MED28	116 ± 2
CG3069	转录抑制因子 Taf10b	138 ± 2
CG3388	转录调节因子 Gooseberry	2049 ± 72
CG5591	组蛋白甲基化相关蛋白 LPT	69 ± 2

续表 2

基因编号	功能	卵巢中 mRNA 表达水平
CG9187	参与核酸复制蛋白 Psf1	80 ± 1
CG42396	整合蛋白 Wech	739 ± 13
CG8771	核孔蛋白	162 ± 2
CG1919	结构蛋白 表皮蛋白 Cpr62Bc	3 ± 1
CG12045	Crp100A	2 ± 0
CG9124	翻译起始因子 eIF-3p40	980 ± 17
CG12079	NADH 脱氢酶 ND-30	352 ± 8
CG5428	磺基转移酶 St1	2 ± 1
CG3810	糖苷水解酶 Edem1	99 ± 2
CG1728	线粒体转运蛋白 Tim8	2 ± 0
CG4108	液泡运输相关蛋白 Chmp1	157 ± 4
CG9423	核转运蛋白、信号传导相关蛋白 Kap- 3	82 ± 3
CG4788	Unknown	321 ± 5
CG15598	Unknown	2 ± 0
CG4230	Unknown	1 ± 0
CG17508	Unknown	687 ± 9

注：基因编号为果蝇 Flybase 数据库给出的基因编号；卵巢 mRNA 表达水平为平均数±标准差。

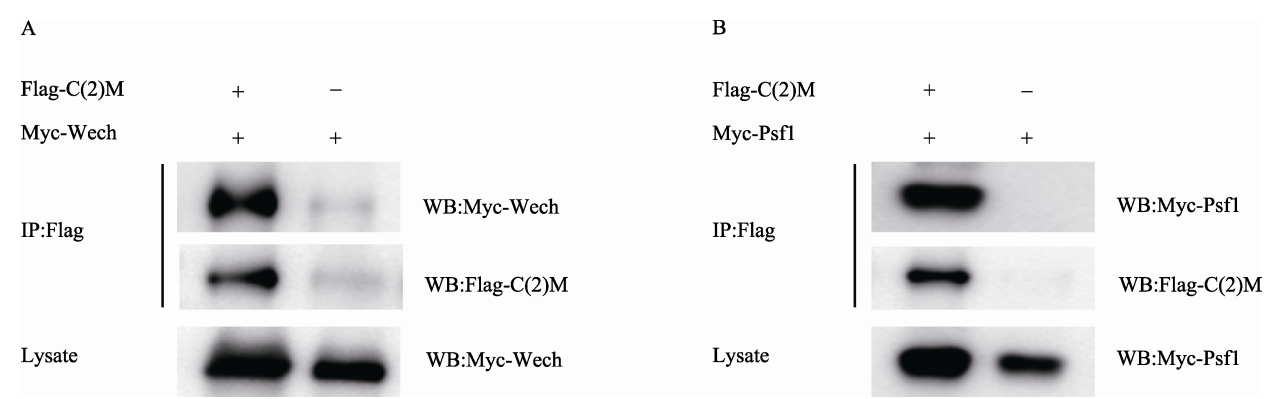


图 2 免疫共沉淀验证 C(2)M 和 Wech/Psf1 蛋白之间具有相互作用  
A：在 S2 细胞中过表达 Flag 标签的 C(2)M 蛋白和 Myc 标签的 Wech 蛋白；B：在 S2 细胞中过表达 Flag 标签的 C(2)M 蛋白和 Myc 标签的 Psf1 蛋白。

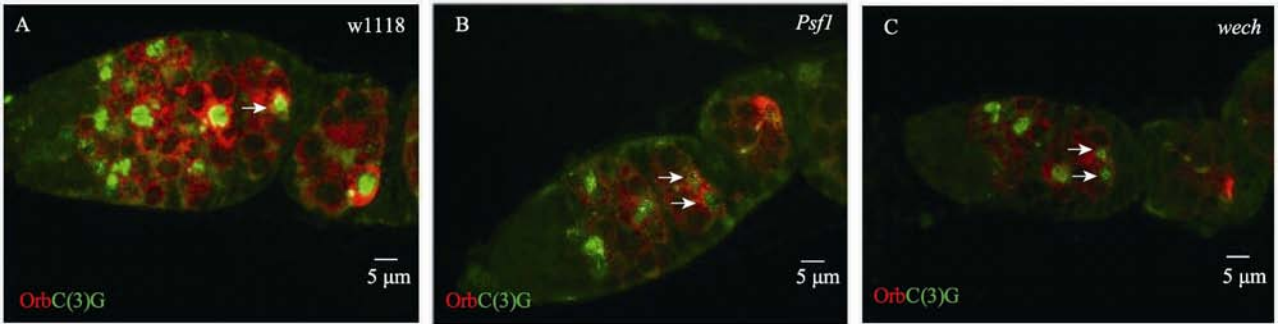


图 3 *wech* 和 *Psf1* 基因沉默型果蝇原卵区的荧光染色结果  
A：野生型果蝇原卵区；B：*Psf1* 基因沉默后的果蝇原卵区；C：*wech* 基因沉默后的果蝇原卵区。箭头均指向最后形成的卵母细胞。

个蛋白相互作用的有效方法。其原理是依赖于转录激活因子 GAL4 的 DNA 结合结构域和转录激活结构域在空间上充分靠近, 从而激活下游基因表达<sup>[8,9]</sup>。C(2)M 是细胞核内减数分裂相关蛋白, 为了进一步分析其功能和作用机制, 本文采用了酵母双杂交的方法筛选与其相互作用的蛋白。

果蝇卵细胞始于卵巢顶部的 2~3 个原始生殖细胞, 原始生殖细胞不对称分裂, 一个继续位于卵巢顶部, 维持干性。另一个则离开顶部开始分化形成囊胚细胞, 经过 4 次有丝分裂形成一个由 16 个细胞组成的包囊。16 个细胞里只有 1 个细胞形成卵母细胞, 并进行减数分裂, 其余细胞则为滋养细胞。C(2)M 是 SC 形成的必要因子, 在本研究结果中可以看出, *wech* 和 *Psf1* 基因沉默后, SC 的消失发生了延迟, 说明 *wech* 和 *Psf1* 可能参与 SC 解体的过程。

Cap-G 属于 condensin 蛋白家族中非染色体结构维持蛋白<sup>[10,11]</sup>。据报道在缺乏 Cap-G 的突变体中, 染色体的凝集和压缩受到阻碍, 从而导致姊妹染色单体不能正常分离, 并且会引起着丝粒粘附力的减弱<sup>[12,13]</sup>。说明 Cap-G 在染色体轴形成过程中发挥重要的功能。本课题组通过酵母双杂交筛选出染色体凝集相关蛋白 Cap-G, 说明 Cap-G 有可能也参与减数分裂染色体轴的形成。然而就其如何与 C(2)M 共同发挥作用还需要进一步研究。

Wech 属于 RBCC/TRIM 超家族<sup>[14]</sup>, 该蛋白家族含有一个锌指元件、卷曲螺旋结构域和 5~6 个 NHL (NCL-1, HT2A, LIN-41) 重复结构, 在果蝇中, 只有 4 个蛋白属于该家族, 分别是 Wech<sup>[15,16]</sup>、减数分裂相关蛋白 Mei-P26<sup>[17]</sup>、肿瘤抑制蛋白 Brat<sup>[18]</sup> 和锌指串联蛋白 ABBA。缺少 Brat 会引起脑瘤, 缺少 Mei-P26 会导致卵巢肿瘤, 研究发现 Brat 的肿瘤抑制功能域是 NHL 结构域<sup>[19]</sup>。而本研究测序结果发现与 C(2)M 相互作用的区域正好是 Wech 的 C 端 NHL 结构, 猜测其与 C(2)M 的相互作用正是它们共同行使减数分裂相关功能的基础。Psf1 作为 GINS 复合体中的一员<sup>[20]</sup>, 参与 DNA 复制的起始和延伸, 而其在果蝇卵子发生过程中, 是否通过调控 DNA 的复制来起始有丝分裂向减数分裂的转换, 还需要深入研究。由于基因沉默受多方面因素影响, 所以本文的表型并不是很强, 对于 Wech 及 Psf1 是否同 C(2)M 共同参

与减数分裂相关过程以及其具体的分子机制, 还需要后期通过制备抗体和突变体等大量实验来证明。

C(2)M 作为减数分裂的上游因子, 研究与其相互作用的蛋白有助于人们了解 C(2)M 调控减数分裂的具体机制以及加深对减数分裂的认识。同时还可能为相关的卵巢性生殖疾病的预防和治疗, 提供新的线索。

## 参考文献

- [1] Tanneti NS, Landy K, Joyce EF, McKim KS. A pathway for synapsis initiation during zygotene in *Drosophila* Oocytes. *Curr Biol*, 2011, 21(21): 1852–1857. [DOI]
- [2] Balicky EM, Endres MW, Lai C, Bickel SE. Meiotic cohesion requires accumulation of ORD on chromosomes before condensation. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(11): 3890–3900. [DOI]
- [3] Anderson LK, Royer SM, Page SL, McKim KS, Lai A, Lily MA, Hawley RS. Juxtaposition of C(2)M and the transverse filament protein C(3)G within the central region of *Drosophila* synaptonemal complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(12): 4482–4487. [DOI]
- [4] Lake CM, Hawley RS. The molecular control of ic chromosomal behavior: events in early meiotic prophase in *Drosophila* Oocytes. *Annu Rev Physiol*, 2012, 74: 425–451. [DOI]
- [5] Heidmann D, Horn S, Heidmann S, Schleiffer A, Nasmyth K, Lehner CF. The *Drosophila* meiotic kleisin C(2)M functions before the meiotic divisions. *Chromosoma*, 2004, 113(4): 177–187. [DOI]
- [6] Manheim EA, McKim KS. The synaptonemal complex component C(2)M regulates meiotic crossing over in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2003, 13(4): 276–285. [DOI]
- [7] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340(6230): 245–246. [DOI]
- [8] 杨姗姗, 孙晓丽, 于洋, 才华, 纪巍, 柏锡, 朱延明. 酵母双杂交筛选与 GsCBRLK 相互作用的蛋白质. *遗传*, 2013, 35(3): 388–394. [DOI]
- [9] 都建, 陈立建, 沈继龙, 花沙沙, 姚雪彪. 用酵母双杂交系统筛选 CENP2E 相互作用蛋白. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(8): 719–726. [DOI]
- [10] Lee JY, Orr-Weaver TL. The molecular basis of sister chromatid cohesion. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 753–777. [DOI]
- [11] Ono T, Losada A, Hirano M, Myers MP, Neuwald AF, Hi-



- rano T. Differential contributions of condensin and condensin to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*, 2003, 115(1): 109–121. [DOI]
- [12] Dej KJ, Ahn C, Orr-Weaver TL. Mutations in the *Drosophila* condensin subunit dCAP-G: defining the role of condensin for chromosome condensation in mitosis and gene expression in interphase. *Genetics*, 2004, 168(2): 895–906. [DOI]
- [13] Herzog S, Jaiswal SN, Urban E, Riemer A, Fischer S, Heidmann SK. Functional dissection of the *Drosophila* melanogaster condensin subunit Cap-G reveals its exclusive association with condensin. *PLoS Genet*, 2013, 9(4): e1003463. [DOI]
- [14] Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of “single protein Ring finger” E3 ubiquitin ligases. *BioEssays*, 2005, 27(11): 1147–1157. [DOI]
- [15] Löer B, Bauer R, Bornheim R, Grell J, Kremmer E, Kolanus W, Hoch M. The NHL-domain protein Wech is crucial for the integrin-cytoskeleton link. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(4): 422–428. [DOI]
- [16] Löer B, Hoch M. Wech proteins: roles in integrin functions and beyond. *Cell Adhes Migr*, 2008, 2(3): 177–179. [DOI]
- [17] Li Y, Zhang Q, Carreira-Rosario A, Maines JZ, McKearin DM, Buszczak M. Mei-p26 cooperates with Bam, Bgcn and Sxl to promote early germline development in the *Drosophila* ovary. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58301. [DOI]
- [18] Lee CY, Wilkinson BD, Siegrist SE, Wharton RP, Doe CQ. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev Cell*, 2006, 10(4): 441–449. [DOI]
- [19] Arama E, Dickman D, Kimchie Z, Shearn A, Lev Z. Mutations in the  $\beta$ -propeller domain of the *Drosophila* brain tumor (*brat*) protein induce neoplasm in the larval brain. *Oncogene*, 2000, 19(33): 3706–3716. [DOI]
- [20] Grabowska E, Wronska U, Denkiewicz M, Jaszczur M, Respondek A, Alabrudzinska M, Suski C, Makiela-Dzbeńska K, Jonczyk P, Fijalkowska IJ. Proper functioning of the GINS complex is important for the fidelity of DNA replication in yeast. *Mol Microbiol*, 2014, 92(4): 659–680. [DOI]

(责任编辑: 史庆华)