

技术与方法

CFP荧光蛋白文库构建及FRET技术 筛选钙调素结合蛋白

孟凡力^{1,2} 关珊¹ 刘晓进¹ 李朝军^{3*}¹南京师范大学生命科学学院, 南京 210023; ²南京医科大学基础医学院, 南京 211166;³南京模式动物研究所, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 南京大学医学院, 南京 210093)

摘要 钙调素(Calmodulin, CaM)是细胞内Ca²⁺信号的主要受体, 能够与靶蛋白相互结合调节靶蛋白的活性, 在细胞增殖、分化、凋亡、迁移等过程中都起着重要作用。荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术是目前研究蛋白质相互作用比较成熟的方法之一。作者通过Cre-loxP位点特异性重组技术构建了带有CFP荧光蛋白标记的文库, 与YFP-CaM共同转染HEK293细胞, 应用荧光共振能量转移技术(FRET)进行检测, 挑取发生FRET作用的单个细胞, 并进行单细胞PCR检测。由此扩增出的片段通过测序和蛋白序列数据库NCBI进行序列比对后, 筛选出与CaM产生相互作用的蛋白。目前, 已经通过这种方法成功地筛选到了一些与CaM相结合的蛋白, 从而为进一步研究CaM蛋白在生理环境下的作用提供有利条件。

关键词 钙调素; Cre-loxP; 荧光共振能量转移; 单细胞PCR

Construction of CFP-labeled Protein Library and Screening Calmodulin Binding Proteins by FRET Technology

Meng Fanli^{1,2}, Guan Shan¹, Liu Xiaojin¹, Li Chaojun^{3*}

¹College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China; ²School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; ³Model Animal Research Center (MARC) and the School of Medicine, MOE Key Laboratory of Model Animal for Disease Studies, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Calmodulin (CaM), the main receptor for intracellular Ca²⁺ signals, regulates the activity of its target proteins by interacting with them and plays an important role in the cell proliferation, differentiation, apoptosis, migration, etc. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) technology is one of the mature methods for studying proteins interactions. By applying Cre-loxP site-specific recombination technology we constructed CFP-labeled library, cotransfected HEK293 cells with YFP-CaM plasmids, and used fluorescence resonance energy transfer (FRET) technology to detect the protein interaction. We picked up the cells which generated FRET and applied single-cell PCR detection. By sequencing the PCR products and comparing them with the database NCBI, we screened the unknown proteins which interacted with CaM. Taken together, we have found some CaM binding proteins through the construction of CFP-labeled protein library and applying the FRET technology. Our study pro-

收稿日期: 2013-08-09 接受日期: 2013-11-04

*通讯作者。Tel: 025-83596289, E-mail: licj@nju.edu.cn

Received: August 9, 2013 Accepted: November 4, 2013

*Corresponding author. Tel: +86-25-83596289, E-mail: licj@nju.edu.cn

网络出版时间: 2013-11-25 10:20 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131125.1020.004.html>

vides the conditions for further study of CaM protein in physical environment.

Key words Calmodulin; Cre-loxP; FRET; single cell PCR

钙离子作为细胞内重要的信号分子,参与细胞内多种生理生化反应。它可以调控包括细胞增殖、发育、迁移、学习记忆等一系列生理活动^[1-2]。钙调素(Calmodulin, CaM)作为钙离子的主要受体^[1],广泛存在于真核及原核生物中,是一类在结构和功能上具有高度保守性的钙离子结合蛋白。CaM本身并没有酶活性,但能够与靶蛋白结合并调节靶蛋白的活性从而使其发挥生物学功能。Ca²⁺/CaM信号在细胞周期调控中具有重要的作用,它参与调控了细胞周期有丝分裂期的进入,促进了核膜的破裂,同时也调控了细胞分裂中后期的转换,并且参与了胞质分裂的调控等。因此,CaM参与信号通路只能通过其与下游靶蛋白CaMBPs作用才能调节细胞功能^[3]。为了更好地研究CaM在细胞周期调控中的重要作用,我们试图找到CaM在周期细胞中的下游效应因子。在本研究中,我们设计了一种新型的结合了Cre-loxP技术和荧光共振能量转移(FRET)技术的大规模筛选CaM结合蛋白的实验方法。

Cre-loxP系统是一种位点特异性重组,发生在两条DNA链特异位点之间,重组的发生需要一段同源序列即特异性位点和位点特异性的蛋白因子即重组酶Cre酶参与。Cre-loxP系统由于其简单易操作目前广泛受到青睐^[4]。本实验所采用的是Clontech公司的Cre-loxP系统,该系统采用基因的直接转移法,与传统的亚克隆技术相比,不会引起目的基因的删减。另外,它可以进行目的蛋白N-端或C-端标签。整个过程只需要一种重组酶,操作简单方便。该系统利用了氯霉素抗性的正筛选和蔗糖的负筛选作为筛选标记。其原理是,当发生Cre酶介导的重组反应时,供体载体上的两个loxP位点之间的氯霉素抗性也一起转入受体载体中,因而重组子上也含有氯霉素抗性。另外,供体载体上含有一个sacB基因,该基因能够编码一种将蔗糖转化为果聚糖的酶,当含有该基因的菌在一定浓度的蔗糖培养基上生长时,由于果聚糖积累在细胞周质空间,而导致大肠杆菌死亡。因此,我们可以利用氯霉素和蔗糖来筛选重组克隆。含有sacB基因的供体载体不能在蔗糖培养基里生长,同样不能编码氯霉素抗性的受体载体也无法在氯霉素抗性中生长。这种双筛选的机制在理论

上来说是可以保证99%的正确重组率。本实验拟通过Cre-loxP系统在体外构建一个带有青绿色荧光蛋白(CFP)标记的cDNA文库,再利用FRET技术去筛选与CaM在特定的时空条件下发生相互作用的蛋白。

FRET技术是在活细胞生理条件下对蛋白质相互作用进行实时、动态的研究技术。足够靠近(1~10 nm)的两种不同的荧光基团,其中一种荧光基团(供体)的发射谱与另一种荧光基团(受体)的激发谱有一定的重叠,当供体被激发时,供体和受体之间通过偶极-偶极耦合作用以非辐射方式将供体激发态能量转移到受体激发态的过程。如果发生FRET现象,则供体通路信号将淬灭而受体通路信号将激活或增强^[5]。以GFP的两个突变体CFP和YFP为例简要说明其原理:CFP的发射光谱与YFP的吸收光谱有相当的重叠,当它们足够接近时,用CFP的吸收波长激发,CFP的发色基团将会把能量高效率地共振转移至YFP的发色基团上,所以CFP的发射荧光将减弱或消失,主要发射的是YFP的荧光。两个发色基团之间的能量转换效率与它们之间的空间距离的6次方成反比,对空间位置的改变非常灵敏^[6-7]。FRET的发生通常要满足四个条件:(1)供体受体之间的距离 ≤ 10 nm;(2)供体的发射光谱与受体的激发光谱有一定的重叠;(3)供体的量子产率和受体的光吸收系数足够高;(4)供体与受体的偶极具有合适的相对取向。已有报道,研究者通过将受体与FRET受体、一个大的候选肽配体库与一种FRET供体进行基因融合,实现了在大肠杆菌细胞质中进行最佳相互作用伴侣的高通量光学筛选。此外,FRET杂交相互作用筛选也为发现细胞中可能具有重要意义的蛋白质配体提供了一种强大的工具^[8]。

我们通过Cre-loxP位点特异性重组技术构建了一个带有CFP荧光蛋白标记的文库,与YFP-CaM共同转染细胞,进行荧光能量共振转移(FRET)检测。FRET技术最大的优点就是能够在活体细胞生理条件下对蛋白质相互作用进行实时、动态和定量研究。鉴于CaM在时间和空间的特异分布对其功能重要性的考虑,我们采用FRET结合活细胞显微观察技术,建立可在时间和空间上对CaM结合蛋白进行实时检测分析的方法,以分离鉴定在特定时间、特定位置

与CaM发生相互作用的蛋白质。发生荧光能量共振转移并且计算结果在可信值范围内,则认为与CaM发生相互作用。

1 材料与方法

1.1 CFP和YFP荧光表达载体

构建plpAcCFP1-C真核表达质粒: 以pECFP-C1作为模板, *Nhe* I和*Xho* I双酶切获取*cfp*真核表达基因, 并将其构建到plpAcGFP1-C真核表达载体中, 双酶切鉴定, 测序验证。plpAcGFP1-C载体购自Clontech公司。pECFP-C1和YFP-CaM载体为本实验室保存。采用碱裂解方法大量制备上述构建的质粒^[15]。

1.2 细胞培养、质粒转染和荧光显微观察

HEK293细胞培养于含10%胎牛血清DMEM培养基中, 培养基添加100 IU的青霉素、链霉素, 在37 °C、含5% CO₂、湿度饱和的培养箱中培养。将细胞接种于直径35 mm、厚度0.17 mm的玻璃培养皿中, 细胞密度长至70%时, 采用磷酸钙共沉淀转染法将plpAcCFP1-C载体转染HEK293细胞, 转染前2~4 h换液, 转染后12~16 h换液。24 h后用Olympus IX81活细胞观察站进行青绿色CFP荧光观察。

1.3 CFP-cDNA荧光蛋白文库构建及鉴定

按照Clontech公司提供的DNA Cloning Kits进行Cre-loxP重组。供体为人睾丸组织cDNA文库pDNR-LIB, 由南京医科大学李建民老师馈赠。受体为上述构建的载体plpAcCFP1-C。Cre-loxP重组方法如下: 充分混合体系中液体, 室温22 °C孵育15 min, 70 °C加热5 min, 终止反应。取1 μL DNA混合物加入50 μL感受态细胞进行转化, 依次0 °C 30 min, 42 °C 90 s, 0 °C 2 min, 加入800 μL SOC培养基, 菌液于37 °C 180 r/min转速培养, 1 h后别取100 μL及300 μL涂板, 在含有7%蔗糖、30 μg/mL氯霉素抗性的培养皿上37 °C培养过夜。30 h左右挑取大菌落, 进行菌落PCR鉴定。小菌落可能为包含供体和受体载体的混合基因。通过PCR鉴定来判断是否重组上, 如果扩增出356 bp的条带, 则为阳性克隆。引物对序列: PCP-1: GCT CAC CGT CTT TCA TTG CC(供体文库pDNR-LIB载体上序列), PCP-2: TCC GCT CAT GAG ACA ATA ACC(受体载体pAcCFP1-C载体上序列)。

1.4 荧光观察FRETR值计算并标记细胞位置

将细胞接种于特制的直径35 mm、厚度0.17 mm的玻璃培养皿中, 转染24 h后用Olympus IX81活细胞

观察站进行荧光观察。共转YFP-CaM和CFP-cDNA文库, 使用Olympus IX81活细胞观察站进行FRET观察及拍照, 并且使用Metamoroh软件进行计算荧光能量共振转移效率FRETR值。从中挑选出FRETR值在可信范围内的细胞进行标记。根据带有特殊刻度的皿底, 确定细胞的具体位置。

1.5 单细胞PCR

使用膜片钳的微电极吸取已作标记的单个细胞, 放入5 μL浓度为400 ng/μL的蛋白酶K以及17 μmol/L的SDS混合溶液中; 50 °C孵育1 h, 然后99 °C灭活30 min; 于冰上加入40 μL PCR反应体系进行扩增, 其中包括25 pmol/L引物、5 mmol/L MgCl₂、300 nmol/L dNTPs和2 IU Taq酶; 取1 μL PCR反应产物加入20 μL的PCR反应体系, 其中包括10 pmol/L引物以及和上个步骤相同的MgCl₂、dNTPs和Taq酶, 再次进行扩增; 在浓度为2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。将扩增出的条带送到上海生工生物技术公司进行测序, 并将测序结果与已知基因序列库进行比对, 从而确认扩增出的基因名称。

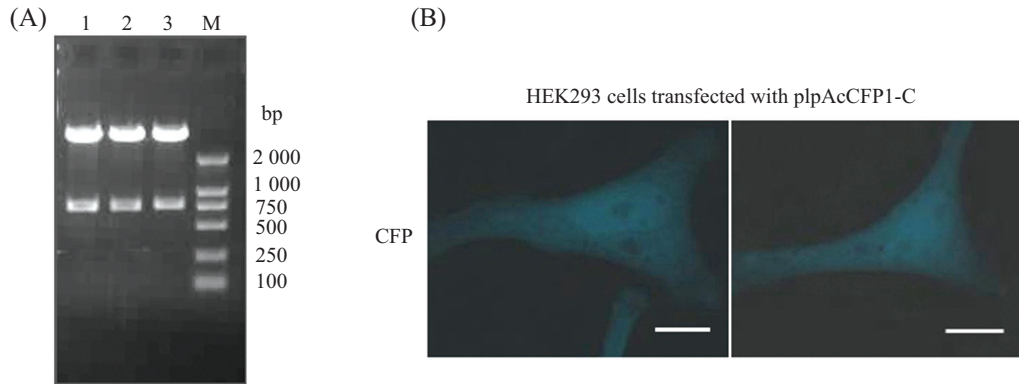
2 结果

2.1 CFP荧光表达载体的构建及其在HEK293细胞系中的表达

将*cfp*基因以正确的读码框插入表达载体plpAcGFP1-C中, 获得重组质粒plpAcCFP1-C。质粒经*Nhe* I和*Xho* I酶切鉴定后, 得到约750 bp的片段(图1A), 同预期的结果相一致。挑取单个菌落送上海英骏生物技术公司进行序列测定, 测序结果完全正确。将测序正确的plpAcCFP1-C载体以磷酸钙转染法转染HEK293细胞, 转染前2~4 h换液, 转染后12~16 h换液, 在转染24 h后用Olympus IX81活细胞观察站进行CFP荧光观察, 可观察到青绿色荧光(图1B)。

2.2 CFP-cDNA荧光蛋白文库构建和鉴定

2.2.1 Cre-loxP重组实验 按照Clontech公司提供的DNA Cloning Kits进行Cre-loxP重组, 重组后取2 μL转化100 μL DH5α感受态细胞(购自TaKaRa公司), 加入800 μL SOC培养基培养1 h, 分别取100 μL及300 μL涂板, 在含有7%蔗糖、30 μg/mL氯霉素抗性的培养皿上37 °C培养过夜。在培养皿中生长30 h左右, 可以看到大小差异明显的克隆, 其中大克隆为重组后的阳性克隆, 小克隆可能为文库和CFP载体的混合克隆。从培养皿上挑取大克隆进行PCR鉴定, 能够

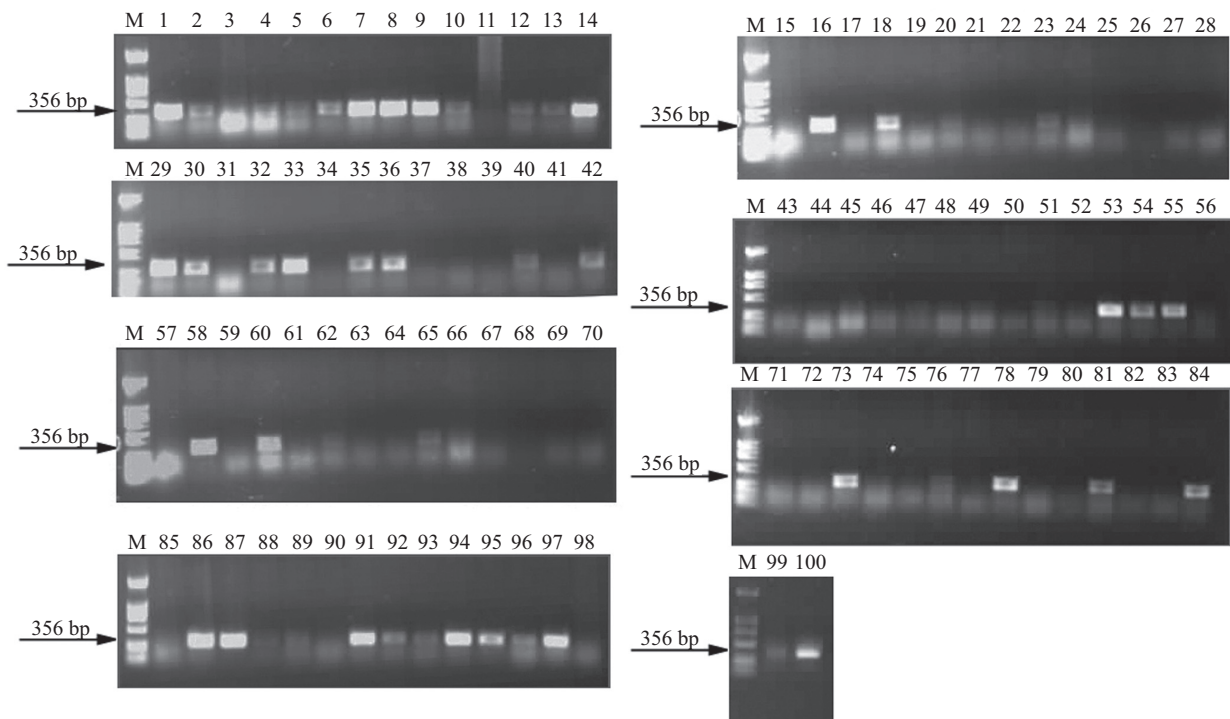


A: 泳道1~3: 重组后克隆进行*Nhe* I和*Xho* I双酶切, 释放出750 bp条带, 为阳性克隆; 泳道4: DNA marker, 2 Kb; B: plpAcGFP1-C质粒转染HEK293细胞, 24 h后观察CFP荧光。左右两图均为表达CFP荧光的HEK293细胞。标尺=10 μm。

A: Lane 1~3: recombination colonies after digestion by *Nhe* I and *Xho* I, which released 750 bp fragment; Lane 4: DNA marker, 2 Kb; B: expression of plpAcGFP1-C plasmid in HEK293 cells. HEK293 cells were transfected with plpAcGFP1-C plasmid, and CFP fluorescent can be detected after 24 h. Both the left and right photo indicated CFP fluorescence in HEK293 cells. Scale bars=10 μm.

图1 plpAcGFP1-C载体构建以及其在HEK293细胞系中的表达

Fig.1 Construction of plpAcGFP1-C plasmid and expression in HEK293 cells



泳道1~100: 重组文库中随机挑取100个克隆进行菌落PCR鉴定, 51个泳道扩增出阳性条带。M: DNA marker, 2 Kb。

Lane 1~100: PCR identification of 100 recombination colonies. M: DNA marker, 2 Kb.

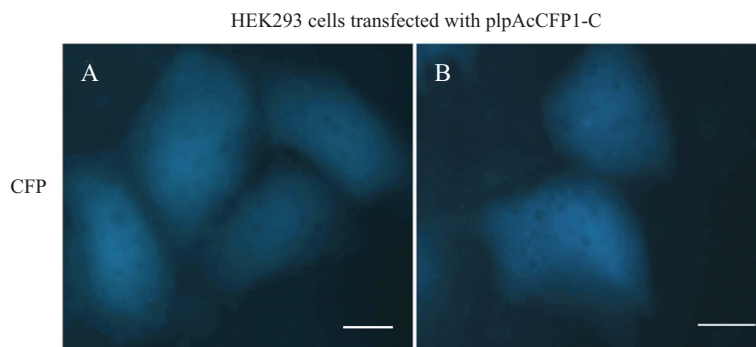
图2 PCR鉴定重组克隆

Fig.2 PCR identification of recombination colonies

扩增出356 bp条带的则为阳性克隆。随机挑取100个大克隆进行PCR鉴定, 从而大致确定重组文库的重组率。鉴定结果如图2和图3所示, 100个克隆中有51个扩增出阳性条带, 重组率为51%。

2.2.2 CFP-cDNA荧光蛋白文库的鉴定 将CFP荧光

标记的文库克隆cDNA进行混合大量提取, 使用磷酸钙转染法将cDNA转染HEK293细胞, 转染前2~4 h换液, 转染12~16 h后更换新鲜细胞培养液。转染24 h后用Olympus IX81活细胞观察荧光显微镜进行CFP荧光检测, 在100倍物镜下可观察到青绿色荧光(图3)。

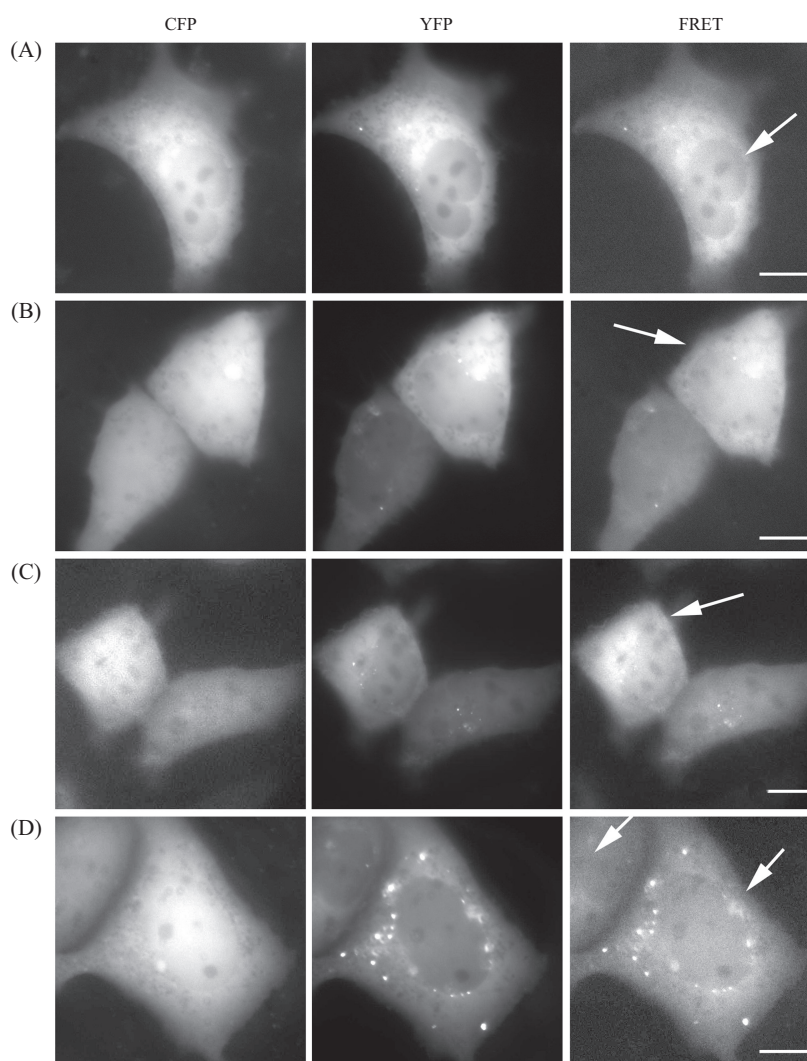


100个文库重组克隆混合质粒转染HEK293细胞, 24 h后检测荧光表达。100倍镜下有较多细胞可观察到CFP青绿色荧光。A和B均为表达CFP荧光的HEK293细胞。标尺=10 μm 。

The mixture of 100 recombination plasmids were transfected into HEK293 cells, and the CFP fluorescent can be detected after 24 h. A and B indicated CFP fluorescence in HEK293 cells. Scale bars=10 μm .

图3 重组克隆的荧光鉴定

Fig.3 The fluorescent identification of recombination colonies



A~D: 显微观察共同表达CFP和YFP荧光蛋白并发生FRET作用的单细胞, 见白色箭头所示。标尺=10 μm 。

A~D: microscopic observation of the co-expression of CFP and YFP fluorescent protein and FRET in HEK293 cells, represented by the white arrow. Scale bars=10 μm .

图4 HEK293细胞中共转YFP-CaM质粒和CFP-cDNA文库FRET成像

Fig.4 FRET imaging of YFP-CaM plasmids and CFP-cDNA library in HEK293 cells

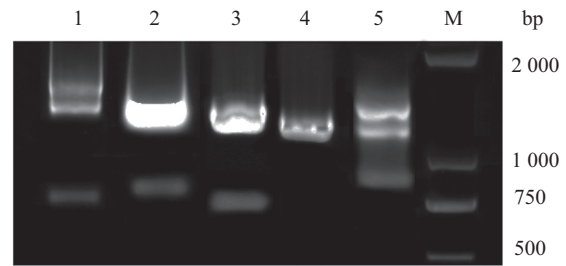
2.3 利用FRET技术筛选钙调素结合蛋白

2.3.1 FRET成像观察 共转YFP-CaM质粒和CFP标记cDNA文库, 使用Olympus IX81活细胞观察站进行FRET观察及获取图像(图4), 并使用Metamorph软件计算FRETR值。从中挑选出FRETR值在可信范围内的细胞进行标记。我们使用带有刻度的皿底标记细胞在皿底的具体位置。借助于膜片钳的微电极吸取做好标记的细胞, 放入到已经配好的蛋白酶K的溶液中, 裂解细胞并作为单细胞PCR扩增的模板。

2.3.2 单细胞PCR检测筛选出的蛋白基因 将吸取出的单个细胞放入5 μ L浓度为400 ng/ μ L的蛋白酶K及17 μ mol/L的SDS混合溶液中, 50 $^{\circ}$ C孵育1 h, 然后99 $^{\circ}$ C灭活30 min。将装有细胞的Eppendorf管放置于冰上, 加入40 μ L的PCR反应体系, 其中包括25 pmol/L引物、5 mmol/L MgCl₂、300 nmol/L dNTPs和2 IU Taq酶, 进行扩增。取1 μ L PCR反应产物加入20 μ L的PCR反应体系, 其中包括10 pmol/L引物以及和上个步骤相同的MgCl₂、dNTPs和Taq酶, 再次进行扩增。取5 μ L用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物(图5)。

2.3.3 扩增出的条带进行测序并进行碱基序列比对 将单细胞PCR扩增出的条带送到上海生工生物技术公司进行测序, 得到结果后将序列与NCBI上Gene Bank进行比对, 从而确定扩增出的基因为何种基因, 其中一些比对结果见表1。

根据以上结果我们把这些基因序列在钙调素靶蛋白数据库(Calmodulin Target Database)进行钙调素结合位点比对, 结果显示, TTC29、PSMB7、MGC26647、Sestrin-1有钙调素结合位点, 其中Sestrin-1序列中有多个结合位点, 并且该基因在细胞的有丝分裂过程中起着重要的作用, 目前未有报道其跟钙调素结合。已知TTC29蛋白分布于细胞质和细胞核中, 但没有其功能的相关报道。PSMB7广泛分布于细胞质、细胞外、蛋白酶体核心复合物, 主



泳道1~5的条带代表能够与CaM结合的蛋白的基因片段。

Lane 1~5 indicated the gene fragments of unknown proteins which interacted with CaM.

图5 单细胞PCR电泳条带

Fig.5 Single-cell PCR

要功能是参与依赖于泛素的降解作用^[9]。PSMB7公认的结合蛋白是PLK1和PSMA2。MGC26647分布于细胞质中, 迄今没有其功能的相关报道。Ras-like without CAAX1则分布于细胞质、细胞质膜, 参与小G蛋白介导的信号转导, 能够与GTP、钙调素发生结合作用。Sestrin-1则为P53蛋白的靶基因, 在细胞有丝分裂过程中起着重要的作用, 其中已经明确的报道过对DNA的损伤刺激起调节作用, 可以导致细胞周期停滞并且对细胞增殖起负调控作用, 但目前未有与钙调素结合的报道。

3 讨论

Cre-loxP系统是一种位点特异性重组技术, 可以用来构建载体, 它比常规的亚克隆技术更为方便快捷, 仅需一种酶, 即可在短时间内完成DNA连接, 且筛选阳性克隆简单方便, 效率较高。国内外已有大量将Cre-loxP系统应用噬菌体抗体库和单链抗体库方面的研究, 并在不同程度上极大地提高了抗体库的多样性^[10-12]。1994年, Griffiths等^[13]首先将Cre-loxP重组系统应用于构建大容量抗体库, 他们应用双载体, 经过VL和VH的重组配对, 构建大容量抗体库。这提示我们在构建带荧光标记的cDNA文库时

表1 FRET技术筛选出与钙调素相结合的蛋白

Table 1 Calmodulin binding proteins screened by FRET technology

蛋白名称 Protein	编码基因 Gene
<i>Homo sapiens</i> tetratricopeptide repeat domain 29 (TTC29)	TTC29
<i>Homo sapiens</i> proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, PSMB7	PSMB7
<i>Homo sapiens</i> hypothetical protein MGC26647 (MGC26647)	MGC26647
Sestrin-1	Sestrin-1
Ras-like without CAAX1	—

可以使用这一技术, 从而简化构建文库的步骤, 提高实验的成功率。

在本实验中由于供体文库pDNR-LIB带有*sacB*基因, 导致蔗糖对其具有致死作用, 因而文库pDNR-LIB无法在蔗糖培养基上生长。然而在具体实验中我们发现, 蔗糖致死作用并不明显, 供体文库在蔗糖培养基上仍然有大量生长, 导致挑出克隆的重组率较低。经过试验, 我们在蔗糖培养基中加入了Kan⁺抗性作为筛选因子。由于pIpAcCFP空载带有Kan⁺抗性, 所以重组成功的克隆可以在培养基上生长, 而供体文库则不带此抗性, 因而不能生长。从而提高了挑取克隆的重组率, 后期的重组率达到了80%左右。我们总共挑取了大约8 000个重组克隆, 以此作为筛选钙调素结合蛋白的文库。经过分批混合在一起大量提取质粒, 并转染到HEK293细胞中, 观察到标记文库的CFP荧光表达正常。至此, 带有CFP荧光标记的cDNA文库构建完成, 我们可以利用FRET技术进行筛选钙调素结合蛋白。随着荧光成像技术的发展, FRET与其相互结合, 联合应用于细胞内蛋白质相互作用的研究中^[4]。将蛋白质标记上荧光探针, 当蛋白质间不发生相互作用时, 其相对距离较大, 无FRET现象, 而当蛋白质发生相互作用时, 则FRET发生。目前已有报道, 通过将受体与FRET受体、一个大的候选肽配体库与一种FRET供体进行基因融合, 实现了在大肠杆菌细胞质中进行最佳相互作用伴侣的高通量光学筛选。此外, FRET杂交相互作用筛选也为发现细胞中可能具有重要意义的蛋白质配体提供了一种强大的工具^[8]。

本文主要目的在于研究一种新型的大规模筛选相互作用蛋白质的方法, 此方法能够在活细胞中进行操作。在真核细胞中这种具有时间和空间特异性地研究蛋白相互作用的作用更接近于生理条件下的真实情况。大规模筛选蛋白质相互作用的方法很多, 研究时要根据不同的实验目的及条件选择不同的实施策略。常规的研究方法主要有酵母双杂交、免疫共沉、化学交联法、噬菌体表面展示、荧光共振能量转移(FRET)、质谱法等, 但各自有其优势及局限。本文着重阐述了一种利用FRET技术的在活细胞体内进行的具有时空特异性的大规模的筛选方法, 并且成功地筛选出了已有报道的和几种未有报道的跟钙调素结合的蛋白。其中, *Sestrin-1*基因在细胞有丝分裂过程中起着重要的作用, 其中已经明

确的作用中包含其对DNA的损伤刺激起到一定的调控作用, 可导致细胞周期停滞并且对细胞增殖起负调控作用。我们相信, 结合荧光蛋白文库构建和FRET技术不仅可以成功运用在筛选与钙调素结合的蛋白, 同时由于这种技术采用活细胞实时检测方法, 最接近于细胞真实的生理条件, 该方法适用于高通量大规模筛选出相互作用的蛋白质, 较常规的体外蛋白质结合技术具有更加深远的意义。

参考文献 (References)

- 1 Zheng JQ, Poo MM. Calcium signaling in neuronal motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 375-404.
- 2 Sakamoto H, Nishio K, Tomisako M, Kuwayama H, Tanaka Y, Suetake I, *et al.* Identification and characterization of novel calcium-binding proteins of *Dictyostelium* and their spatial expression patterns during development. *Dev Growth Differ* 2003; 45(5/6): 507-14.
- 3 Singh P, Virdi AS. Ca²⁺, Calmodulin and plant-specific calmodulin-binding proteins: Implications in abiotic stress adaptation. stress signaling in plants: Genomics and proteomics perspective, New York: Volume 1: Springer; 2013, 1-23.
- 4 Kühn R, Torres RM. Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Transgenesis Techniques*, New York: Springer; 2002, 175-204.
- 5 Herman B, Gordon G, Mahajan N, Centonze V. Measurement of fluorescence resonance energy transfer in the optical microscope. *Methods in Cellular Imaging*, New York: Springer, 2001, 257-72.
- 6 Pollok BA, Heim R. Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol* 1999; 9(2): 57-60.
- 7 Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*, New York: Springer; 2009.
- 8 You X, Nguyen AW, Jabaiah A, Sheff MA, Thorn KS, Daugherty PS. Intracellular protein interaction mapping with FRET hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(49): 18458-63.
- 9 Munkacsy G, Abdul-Ghani R, Mihaly Z, Tegze B, Tchernitsa O, Surowiak P, *et al.* PSMB7 is associated with anthracycline resistance and is a prognostic biomarker in breast cancer. *Brit J Cancer* 2009; 102(2): 361-8.
- 10 Tsurushita N, Fu H, Warren C. Phage display vectors for *in vivo* recombination of immunoglobulin heavy and light chain genes to make large combinatorial libraries. *Gene* 1996; 172(1): 59-63.
- 11 Sblattero D, Lou J, Marzari R, Bradbury A. *In vivo* recombination as a tool to generate molecular diversity in phage antibody libraries. *Rev Mol Biotechnol* 2001; 74(4): 303-15.
- 12 Cen X, Bi Q, Zhu S. Construction of a large phage display antibody library by *in vitro* package and *in vivo* recombination. *Appl Microbiol Biot* 2006; 71(5): 767-72.
- 13 Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 1994; 12(1): 433-55.
- 14 Day RN. Imaging protein behavior inside the living cell. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 230(1): 1-6.
- 15 J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔, 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社(Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Beijing: Science Press), 2005.