



方康, 彭海涛, 胡琼波. 昆虫双杂交实验中家蚕 BmHSP83 和 BmMAD3 蛋白引起的假性现象 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (1): 170–176.

昆虫双杂交实验中家蚕 BmHSP83 和 BmMAD3 蛋白引起的假性现象

方康^{*}, 彭海涛^{*}, 胡琼波^{**}

(华南农业大学植物保护学院, 广州 510642)

摘要: 昆虫双杂交 (Insect two-hybrid, I2H) 技术是研究昆虫细胞蛋白质相互作用的一种方法。本研究利用 Gateway 克隆技术, 构建了家蚕 *Bombyx mori* 蛋白 BmHSP83 和 BmPDIA5, 以及 BmMAD3 和 BmMAN1 的 I2H 载体; 然后, 将载体与报告质粒 pUAS-Luc 一起转染 SF-9 细胞, 检测其发光值。结果表明, 转染 pIE2-AD-BmHSP83 或 pIE2-AD-BmMAD3 载体与转染 pUAS-Luc 的对照组的细胞发光值无明显差异, 报告基因未被激活; 分别单独用 pIE2-DBD-BmHSP83 或 pIE2-DBD-BmMAD3 质粒转染细胞时, 发光强度显著增加, 报告基因被激活, 说明 BmHSP83 和 BmMAD3 造成了假阳性结果; 并且当细胞共转染 pIE2-DBD-BmHSP83 和 pIE2-AD-BmPDIA5、pIE2-DBD-BmMAD3 和 pIE2-AD-BmMAN1 时报告基因的激活反应显著提高, 提示 BmHSP83 与 BmPDIA5、BmMAD3 与 BmMAN1 存在互作关系而引起阳性反应, 且与 BmHSP83 和 BmMAD3 的假阳性形成叠加效应; 然而, 当共转染 pIE2-AD-BmHSP83 和 pIE2-DBD-BmPDIA5、pIE2-AD-BmMAD3 和 pIE2-DBD-BmMAN1 时报告基因未被激活, 显示 pIE2-AD-BmHSP83/BmMAD3 导致了假阴性。BmHSP83 和 BmMAD3 引起 I2H 假性现象可能与该二种蛋白具有转录激活功能有关, 当其与 DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD) 融合表达时, 该融合体即具备了 DNA 结合及转录激活两个功能, 因而可以启动下游报告基因的表达; 反之, 当其与转录激活结构域 (AD) 融合表达时, 则阻止了他们各自与 BmPDIA5、BmMAN1 蛋白的互作。本研究结果为那些利用 I2H 体系研究具有转录激活功能的蛋白质相互作用提供借鉴。

关键词: 昆虫双杂交; 假性; 家蚕; HSP83; MAD3

中图分类号: Q965; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 01-0170-07

False phenomena of insect two-hybrid system caused by silkworm's proteins BmHSP83 and BmMAD3

FANG Kang^{*}, PENG Hai-Tao^{*}, HU Qiong-Bo^{**} (College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Insect two-hybrid system (I2H) is a technology used to explore the interactions of proteins in insect cells. In current experiment, I2H vectors of silkworm (*Bombyx mori*) proteins, BmHSP83, BmPDIA5, BmMAD3 and BmMAN1 were constructed by means of Gateway cloning technology. Then, these I2H vectors with the reporter plasmid pUAS-Luc were transferred to SF-9 cells for fluorescence detection. The results indicated that the reporter gene was not activated when pIE2-AD-BmHSP83 or pIE2-AD-BmMAD3 was transfected in the cells, because the light intensity in treatments and control (pUAS-Luc

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016B020234005); 国家自然科学基金面上项目 (31772184)

^{*} 作者简介: 方康, 男, 硕士研究生, 研究方向为农药学, E-mail: 1084128678@qq.com; 彭海涛, 男, 硕士研究生, E-mail: phtao2014@163.com

^{**} 通讯作者 Author for correspondence: 胡琼波, 博士, 教授, 研究方向为农药学, E-mail: hqbscau@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-10-30; 接受日期 Accepted: 2021-03-02

transfected) were not significantly different. However, when respectively transfected with pIE2-DBD-BmHSP83 or pIE2-DBD-BmMAD3 plasmid, the light intensity of cells were increased significantly because the reporter gene was activated, which suggested that BmHSP83 and BmMAD3 cause I2H false-positives. Furthermore, the activation of reporter gene were significantly promoted after co-transfected by pIE2-DBD-BmHSP83 and pIE2-AD-BmPDIA5, or pIE2-AD-BmMAD3 and pIE2-DBD-BmMAN1, which suggested that BmHSP83 interacts with BmPDIA5, BmMAD3 interacts with BmMAN1, which leads to true positive reaction, and forms an additive effect with the false positive of BmHSP83 and BmMAD3. However, the reporter genes were not activated when the vectors, pIE2-AD-BmHSP83 and pIE2-DBD-BmPDIA5, or pIE2-AD-BmMAD3 and pIE2-DBD-BmMAN1 were co-transfected, which suggested that the pIE2-AD-BmHSP83 / BmMAD3 lead to false-negative. Probably, the I2H fake phenomena is related to the transcription function of BmHSP83 / BmMAD3. Therefore, the fusion proteins of the BmHSP83 / BmMAD3 and DNA binding domain (DBD) will have two functions of DNA binding and transcriptional activation, so that trigger the expression of downstream reporter genes. On the contrary, the fusion proteins of the BmHSP83 / BmMAD3 and transcriptional activation domain (AD) will inhibit the expression of downstream reporter genes. Our research provides new insights to I2H experiments of proteins with the function of transcriptional activation.

Key words: Insect two-hybrid; false phenomenon; *Bombyx mori*; HSP83; MAD3

昆虫双杂交 (Insect two-hybrid, I2H) 技术是一种测定昆虫细胞蛋白质相互作用的方法 (Mon *et al.*, 2009), 该系统由 pIE2-AD、pIE2-DBD 和 pUAS-Luc 三个载体构成, pIE2-DBD 载体含有酵母 GAL4-DNA 结合域 (DNA binding domain, DBD), 而 pIE2-AD 载体含有小鼠核转录因子 NF- κ B 的转录激活域 (activating domain, AD), DBD 和 AD 结构域相互靠近时, 激活 pUAS-Luc 荧光素酶报告基因的表达 (图 1)。将两个待测蛋白 (X 和 Y) 分别构建成 pIE2-DBD-X 和 pIE2-AD-Y 两个载体, 与 pUAS-Luc 一起共转染昆虫细胞, 如果两个蛋白相互作用, 则触发下游报告基因的表达。昆虫双杂交依靠荧光素酶检测系统来反映昆虫细胞内蛋白质的相互作用特性, 因而在研究昆虫蛋白质相互作用方面具有独特的优势。

昆虫双杂交 (I2H) 是在酵母双杂交 (Y2H) 技术基础上发展起来的一种蛋白质互作分析技术, 使那些无法用 Y2H 分析的蛋白, 尤其是那些受到翻译后修饰 (如糖基化、磷酸化和乙酰化) 的蛋白, 可以用 I2H 进行互作检测 (Stynen *et al.*, 2012); I2H 还可用于分析 Y2H 系统中自激活蛋白 (Mon *et al.*, 2009; Stynen *et al.*, 2012)。

假性是生物学实验中常见的现象, 然而, I2H 实验中的假性现象则少有报导。本文作者在家蚕

蛋白 I2H 实验中发现了 BmHSP83 和 BmMAD3 蛋白导致的假性现象。HSP83 (Heat shock protein 83, 热休克蛋白 83) 也被称为 HSP90, 它是一种伴侣蛋白, 帮助其它蛋白质正常折叠, 稳定蛋白质抵抗热应激, 并帮助蛋白质降解 (Biebl and Buchner, 2019)。尽管对 HSP83 的研究已有几十年的历史, 但家蚕 BmHSP83 的报道却很少。为了进一步了解 BmHSP83 的功能, 本研究根据蛋白数据库 (<https://string-db.org/>) 的预测结果, 研究了 BmHSP83 与蛋白二硫键异构酶 A5 (BmPDIA5, XP_004933309.1, 得分 > 0.8) 的相互作用。MAD3 是 Smads 家族蛋白, 在将 TGF- β 信号从细胞表面受体传导至细胞核的过程中作为转录因子启动某些基因表达 (Verrecchia and Mauviel, 2002)。为了研究家蚕 BmMAD3 蛋白的功能, 本研究参考哺乳动物和人类中 MAD3 可以与 MAN1 (内核膜蛋白 MAN1) 相互作用 (Pan *et al.*, 2005; Moretti *et al.*, 2017; Miyazono *et al.*, 2018) 事实, 研究了 BmMAD3 与 BmMAN1 二者的相互作用。有趣的是, 在利用 I2H 系统研究上述蛋白互作过程中发现了 BmHSP83 和 BmMAD3 引起 I2H 假阳性现象, 并进一步分析了这种现象的原因。现将研究结果报告如下, 希望有助于 I2H 技术的应用。

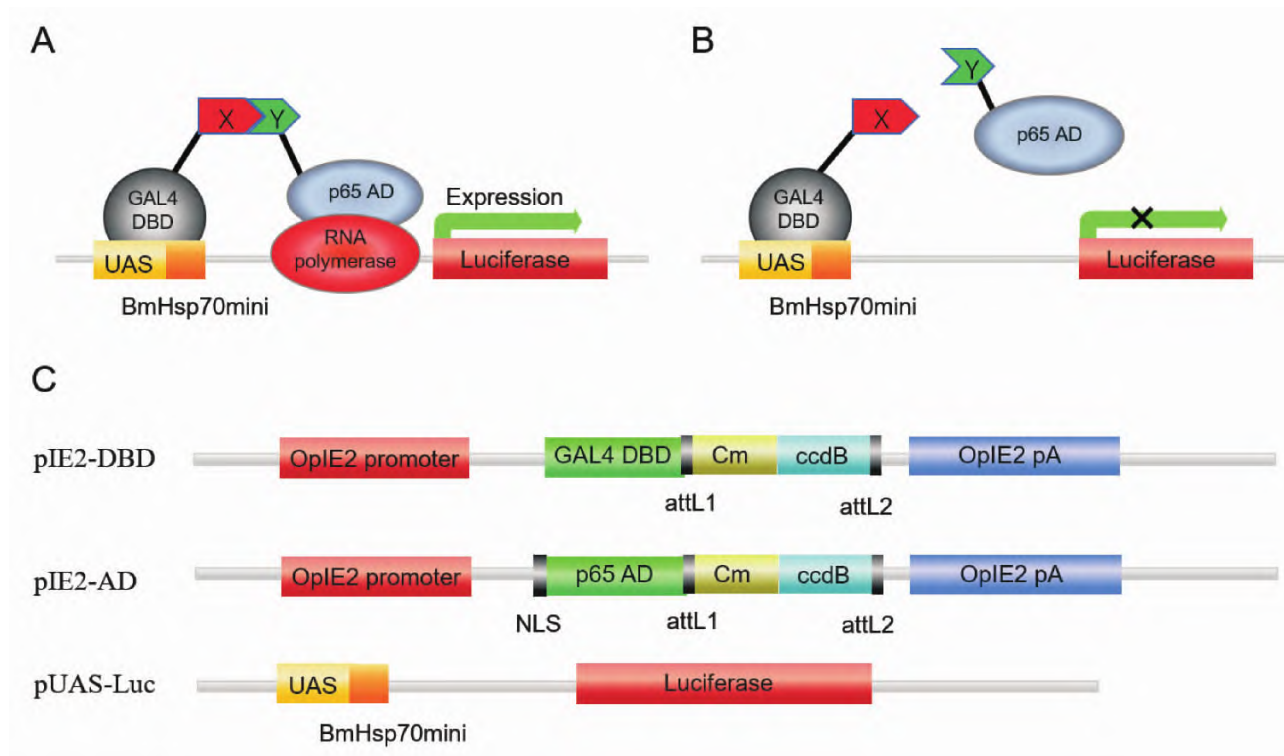


图1 昆虫双杂交技术原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of I2H analysis principle

注: A, 如果两种蛋白质相互作用, 报告基因就会被转录激活; B, 如果两个蛋白质不相互作用, 报告基因就不能表达; C, 昆虫双杂交载体 pIE2-DBD, pIE2-AD 和报告基因结构示意图 (仿 Mon *et al.*, 2009)。Note: A, If the two proteins interacted, the reporter gene was activated; B, If two proteins did not interact, the reporter gene could not express; C, Schematic diagram of pIE2-DBD, pIE2-AD and reporter genes of insect two-hybrid vectors (modified on the basis of Mon *et al.*, 2009) .

1 材料与方法

1.1 细胞与培养

家蚕卵巢组织 Bm12 细胞系来自华南农业大学曹阳教授课题组, 采用 TNM-FH 培养基 (Hyclone, 美国匹兹堡), 添加 10% 胎牛血清 (Gibco, 美国马萨诸塞州) 培养; 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* SF-9 细胞系采用 SFX 昆虫细胞培养基 (Hyclone, 美国犹他州) 和 5% 胎牛血清 (Gibco, 美国马萨诸塞州) 培养。培养温度 27℃, 细胞生长对数期时取用。

1.2 载体构建

采用 Gateway 技术构建载体 (包括入门载体与目的载体) (Katzen, 2007)。首先, 用总 RNA 试剂盒 II (Omega Bio-Tek, 美国佐治亚州) 从 Bm12 细胞中提取总 RNA (Khurad *et al.*, 2009), 用逆转录酶试剂盒 (Takara, 中国北京) 按照产品提示说明合成 cDNA, 根据目标蛋白的基因序列设计引物, 并在 5' 端加入 4 个碱基序列 (CACC)

(表 1), 采用 2 × PrimeSTAR Max Premix 试剂盒 (Takara, 中国北京) 及其所提示方法 PCR 克隆这 4 个基因, 反应体系 50 μL: 25 μL 2 × PrimeSTAR Max Premix、1 μL 引物、1 μL 模板, 加无菌双蒸水至 50 μL; 反应条件为: 98℃ 变性 10 s, 58℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 2 min, 32 个循环; 然后将纯化的 PCR 产物连接到 pENTR-TOPO 克隆载体 (Invitrogen, 美国加利福尼亚州) 并转化 TOP10 菌株 (中国北京青科), 在含卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性菌落, PCR 并测序其产物, 验证基因序列, 得到 4 个入门载体。

将上述入门载体与 I2H 载体 pIE2-AD、pIE2-DBD (Addgene, 美国马萨诸州) 反应, 得到 I2H 目的载体 pIE2-AD-BmPDIA5、pIE2-AD-BmHSP83、pIE2-AD-BmMAN1、pIE2-AD-BmMAD3、pIE2-DBD-BmPDIA5、pIE2-DBD-BmHSP83、pIE2-DBD-BmMAN1 和 pIE2-DBD-BmMAD3, 转化 *E. coli* DH5α (中国北京青科), 挑取单菌落, PCR 并测序其产物, 验证基因序列。

表 1 供试家蚕蛋白质信息
Table 1 Proteins information of silkworm in this study

蛋白 Protein		NCBI 序列号 NCBI accession number	引物 Primer sequence (5'-3')
名称 Name	描述 Description		
BmHSP83	Heat shock protein 83	NP_001036876. 1	F: CACC ATGCCGGAAGAAATGGAGA R: TTAATCAACGTCCTCCATGCCGAGATGCAT
BmPDIA5	Disulfide-isomerase A5	XP_021206134. 1	F: CACC ACCATCAGCCTGGTTCTG R: TCATTACAGCTCGTCTTTAACTTCCG
BmMAD3	Mothers against decapentaplegic homolog 3	XP_004933309. 1	F: CACC ATGTTCCCGTTAACTC R: CTAGGACATAGAGGAGCACC
BmMAN1	Inner nuclear membrane protein Man1	XP_021208957. 1	F: CACC GCCGATCAAGTCGAGTC R: TTACTCATCCCATGAGCGTTG

1.3 细胞转染

将上述目的载体与报告基因载体 pUAS-Luc 转染 SF-9 细胞, 首先, 将细胞转移到 96 孔板上, 每孔 100 μ L 培养基, 当 90% 以上细胞贴壁时方可进行转染。然后, 将 FuGENE[®] HD 转染试剂 (Promega, 美国威斯康辛州) 4 μ L 和上述载体 1 μ g 混合, 并在室温下静置 10 min。转染时, 向 96 孔板中每孔添加 10 μ L FuGENE[®]HD 转染试剂/载体混合物, 吹打均匀后继续培养 60 h, 再进行发光值检测。实验重复 3 次。

1.4 发光值检测与数据分析

将 100 μ L 细胞从 96 孔板中移入空白 96 孔板, 并加入荧光素酶 Bright-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega, 赛默飞中国) 100 μ L, 孵育 10 min 后, 用 Synergy H1 全功能酶标仪 (Bio-Tek, 美国弗吉尼亚州) 检测发光值, 并计算相对光单位

(Relative light unit, RLU), 即实际发光值与对照组 (仅转染报告质粒 pUAS-Luc) 的发光值之比, 采用新复极差法比较平均数显著性差异。

2 结果与分析

2.1 载体的构建

入门载体: 从 4 个入门载体中通过 PCR 分别扩增了目标基因片段, 其分子量大小与 *BmMAN1* (2 328 bp)、*BmHSP83* (2 151 bp)、*BmPDIA5* (1 899 bp) 和 *BmMAD3* (1 335 bp) 基因的碱基序列长度一致 (图 2)。将 PCR 产物回收并连接到 pENTR-TOPO 克隆载体中, 选择阳性克隆转化子进行 PCR 鉴定, 经测序比对, 测序结果与目的基因序列一致, 说明入门载体构建成功。

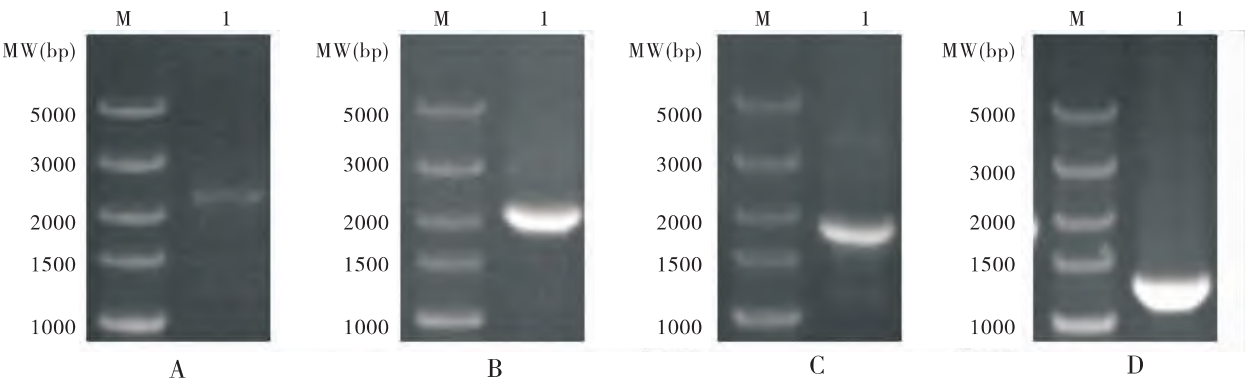


图 2 入门载体 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis profile of PCR products of entry vectors

注: M, DNA 标记 DL5000, marked DL5000; A-1, *BmMAN1*; B-1, *BmHSP83*; C-1, *BmPDIA5*; D-1, *BmMAD3*。

目的载体: 将入门载体与 I2H 载体 pIE2-AD、pIE2-DBD 反应构建 I2H 目的载体, 选择阳性菌落并进行 PCR 鉴定 (图 3), 测序结果与目标序列一致, 表明成功构建了目的载体 pIE2-AD-BmPDIA5、

pIE2-AD-BmHSP83、pIE2-AD-BmMAN1、pIE2-AD-BmMAD3、pIE2-DBD-BmPDIA5、pIE2-DBD-BmHSP83、pIE2-DBD-BmMAN1 和 pIE2-DBD-BmMAD3。

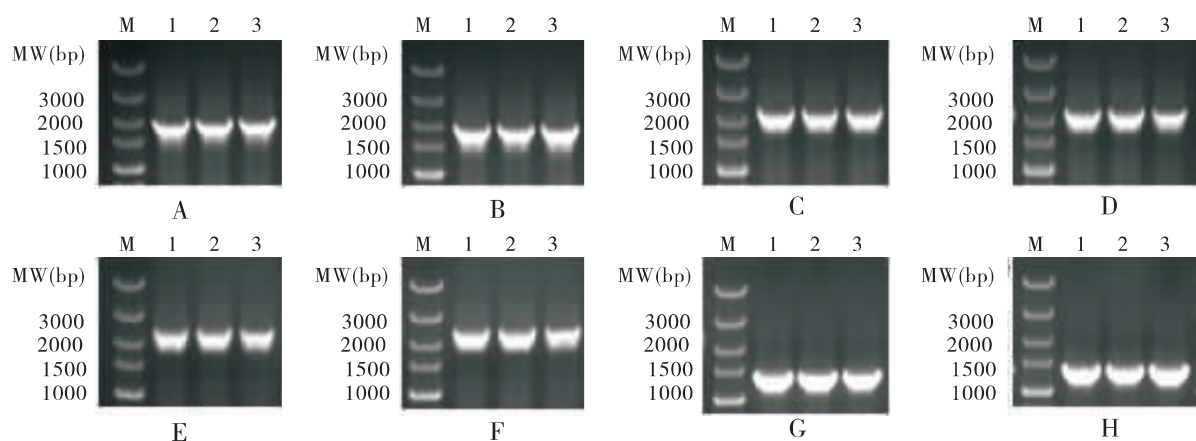


图 3 目的载体 PCR 产物电泳图

Fig. 3 Electrophoresis profile of PCR products of objective vectors

注: M, DNA 标记 DL5000, marked DL5000; A1-A3, pIE2-AD-BmHSP83; B1-B3, pIE2-DBD-BmHSP83; C1-C3, pIE2-AD-BmPDIA5; D1-D3, pIE2-DBD-BmPDIA5; E1-E3, pIE2-AD-BmMAN1; F1-F3, pIE2-DBD-BmMAN1; G1-G3, pIE2-AD-BmMAD3; H1-H3, pIE2-DBD-BmMAD3。

2.2 发光值检测

细胞转染 60 h 后测定发光值 (图 4)。当单独转染 pIE2-DBD-BmHSP83 时, 相对发光单位 (RLU) 达到 7.37, 但显著低于 pIE2-AD-BmPDIA5 和 pIE2-DBD-BmHSP83 共转染时 10.25 的 RLU 值。然而, 当转染单个 pIE2-AD-BmPDIA5、pIE2-DBD-BmPDIA5 和 pIE2-AD-BmHSP83, 或 pIE2-AD-BmHSP83 与 pIE2-DBD-BmPDIA5 共转染时, 其 RLU 与对照 (单独转染报告基因载体) 的 RLU 无显著性差异。

同样, 转染 pIE2-DBD-BmMAD3 或联合转染 pIE2-AD-BmMAN1 和 pIE2-DBD-BmMAD3 激活了报告基因的表达, RLU 分别为 92.49 和 123.04, 两者差异显著。同时, 单个 pIE2-AD-BmMAN1、pIE2-DBD-BmMAN1 和 pIE2-AD-BmMAD3 的转染, 以及 pIE2-AD-BmMAD3 和 pIE2-DBD-BmMAN1 的共转染时, RLU 值与对照的比没有显著变化 (图 4)。

3 结论与讨论

本实验发现 BmHSP83 和 BmMAD3 在 I2H 试验中引起假性现象, 这是怎样形成的呢? 毫无疑问, 这与该两种蛋白的功能有关。众所周知, HSP83

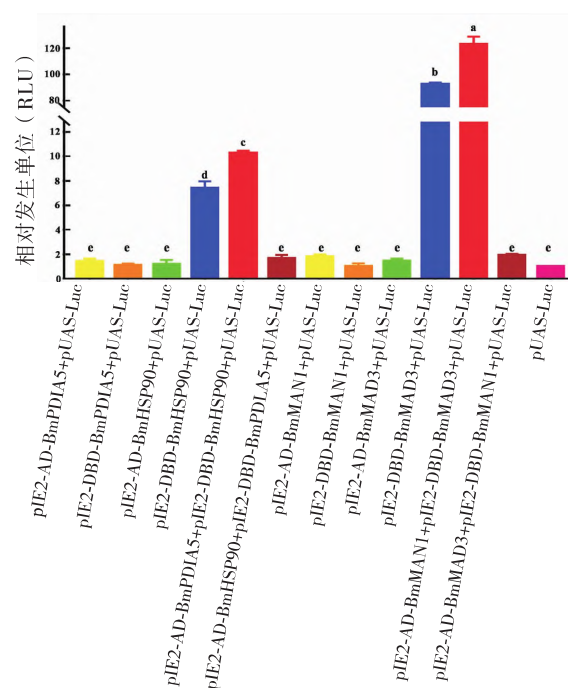


图 4 不同载体转染 SF-9 细胞时的发光值检测

Fig. 4 Luminescent value detection of SF-9 cells transfected by different vectors

注: 柱状图顶端不同字母表示显著性差异 (新复极差法)。Note: Different letters on the column indicated the significant difference (Duncan's multiple-range test, DMRT).

作为分子伴侣调节基因转录 (Khurana and Bhattacharyya, 2015)。在细菌中, HSP83 与 RNA 聚合酶相互作用, 引导可热诱导的基因转录 (Taipale *et al.*, 2010); 在大多数真核生物中, HSP83 可能通过与 NF- κ B p65、STA-Ts、Bcl-6、SP1 和 NF- κ B 等转录因子相互作用来调节基因的转录 (Wang *et al.*, 2009; Stark and Jr. Darnell, 2012; Taipale *et al.*, 2012; Khurana and Bhattacharyya, 2015)。因此, HSP83 似乎有转录激活结构域 (AD 结构域) 的功能, 但是, HSP83 由于缺乏 DNA 结合能力而不能与 DNA 结合 (Khurana and Bhattacharyya, 2015), 因此当它与含有 DBD 结构域的 pIE2-DBD 载体融合表达时

(pIE2-DBD-BmHSP83), 即可以触发下游的报告基因的表达, 而 pIE2-AD-BmHSP83 融合载体由于缺乏 BDB 结构域而无法启动下游报告基因表达 (图 5)。

同样, MAD3 是 TGF- β 途径的转录因子, 起转录激活剂的作用 (Liu *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 2005), 因此 pIE2-DBD-BmMAD3 可以激活报告基因的表达。尽管 MAD3 的 MH1 结构域可以与特定的 DNA 碱基序列结合 (Shi *et al.*, 1998; Zawel *et al.*, 1998), 但由于报告基因载体上缺少该特定序列, 因此 pIE2-AD-BmMAD3 不能启动报告基因转录, 而只有在与 DBD 结构域融合后才能激活报告基因的表达 (图 5)。

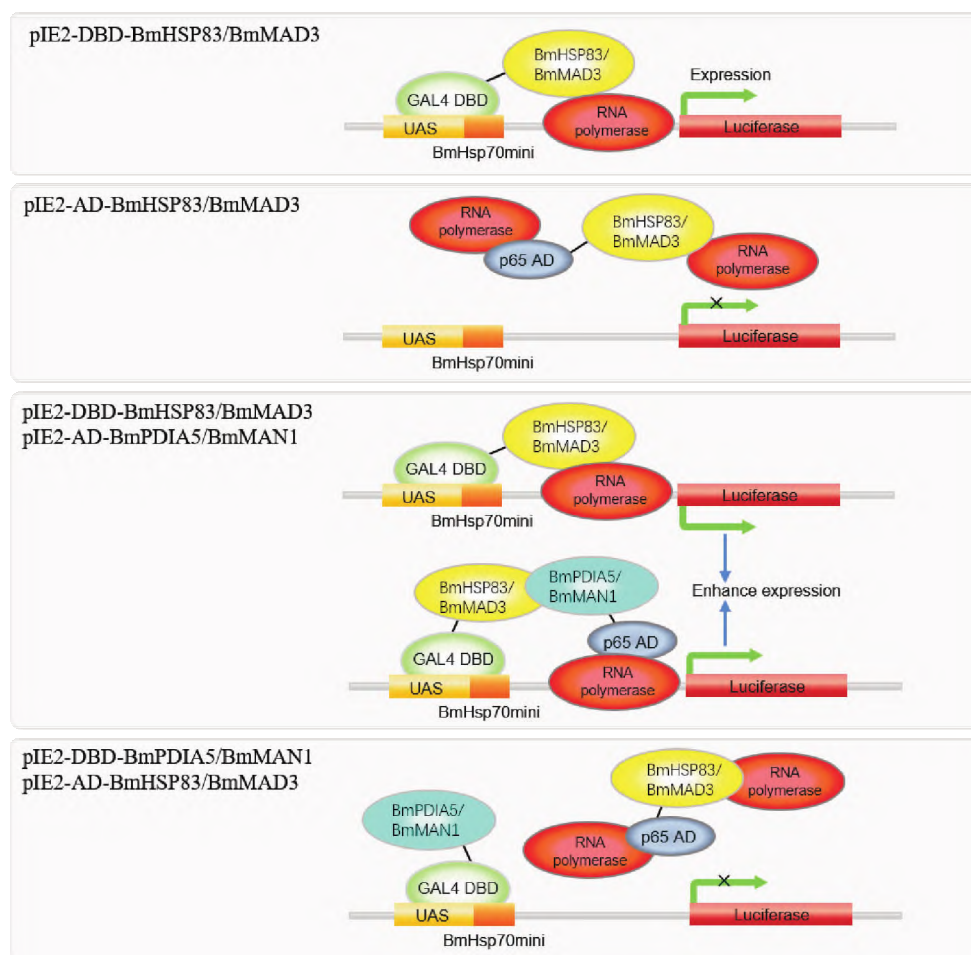


图 5 本实验 I2H 结果的分析

Fig. 5 Hypothesis analysis for this experimental result

有趣的是, 共转染 pIE2-DBD-BmHSP83/MAD3 和 pIE2-AD-BmPDIA5/BmMAN1 质粒时, 其发光值显著高于单独转染 pIE2-DBD-BmHSP83/MAD3 质粒时的发光值, 推测这可能是一种叠加效应。一

方面是因为 pIE2-DBD-BmHSP83/MAD3 启动报告基因表达造成的假阳性, 另一方面, 是共转染 pIE2-DBD-BmHSP83/BmMAD3 和 pIE2-AD-BmPDIA5/BmMAN1 时因为 BmHSP83 与 BmPDIA5 互作, 或

BmMAD3 与 BmMAN1 互作造成的真阳性 (图 5)。反之, 共转染 pIE2-AD-BmHSP83/MAD3 和 pIE2-DBD-BmPDIA5/BmMAN1 质粒时, 其发光值与对照比没有变化, 未启动报告基因表达, 造成了假阴性结果 (图 5)。

综上, 本实验发现 BmHSP83 和 BmMAD3 蛋白当与 BDB 结构域融合表达时, 可引起 I2H 实验的假阳性, 这可能与 BmHSP83 和 BmMAD3 蛋白的转录激活功能有关; 但是, 当融合 BDB 结构域的 BmHSP83 和 BmMAD3 蛋白与融合 AD 结构域的 BmPDIA5 或 BmMAN1 蛋白联合表达时, 则产生真假阳性的叠加效应, 因此证明 BmHSP83 和 BmPDIA5, 以及 BmMAD3 和 BmMAN1 是互作蛋白; 反之, 当融合 AD 结构域的 BmHSP83 或 BmMAD3 蛋白与 DBD 结构的 BmPDIA5 或 BmMAN1 蛋白联合表达时, 则产生假阴性结果。本研究结果值得那些利用 I2H 系统研究具有转录激活功能的蛋白质互作分析时借鉴。

参考文献 (References)

- Biebl MM, Buchner J. Structure, function, and regulation of the HSP90 machinery [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2019, 11.
- Katzen F. Gateway recombinational cloning: A biological operating system [J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2007, 2 (4): 571-589.
- Khurad AM, Zhang M, Deshmukh CG, et al. A new continuous cell line from larval ovaries of silkworm, *Bombyx mori* [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-animal*, 2009, 45 (8): 414-419.
- Khurana N, Bhattacharyya S. HSP90, the concertmaster: Tuning transcription [J]. *Frontiers in Oncology*, 2015, 5 (2015): 100-108.
- Liu F, Hata A, Baker JC, et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator [J]. *Nature*, 1996, 381 (6583): 620-623.
- Miyazono K, Ohno Y, Wada H, et al. Structural basis for receptor-regulated SMAD recognition by MAN1 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46 (22): 12139-12153.
- Mon H, Sugahara R, Hong S, et al. Analysis of protein interactions with two-hybrid system in cultured insect cells [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 392 (2): 180-182.
- Moretti L, Chambers DM, Barker TH. SMAD2/3 & MAN1 interactions are negatively regulated by substrate stiffness [J]. *Tissue Engineering Part A*, 2017, 231: S29.
- Pan D, Estevez-Salmeron LD, Stroschein SL, et al. The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor- β superfamily of cytokines [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (16): 15992-16001.
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, et al. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: Insights on DNA binding in TGF- β signaling [J]. *Cell*, 1998, 94 (5): 585-594.
- Stark GR, Jr. Darnell JE. The JAK-STAT pathway at twenty [J]. *Immunity*, 2012, 36 (4): 503-514.
- Stynen B, Tournu H, Tavernier J, et al. Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: From the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76 (2): 331-382.
- Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: Emerging mechanistic insights [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11 (7): 515-528.
- Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, et al. Quantitative analysis of hsp90-client interactions reveals principles of substrate recognition [J]. *Cell*, 2012, 150 (5): 987-1001.
- Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor- β signaling through the Smad pathway: Role in extracellular matrix gene expression and regulation [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 118 (2): 211-215.
- Wang S, Chuang J, Yeh S, et al. Heat shock protein 90 is important for Sp1 stability during mitosis [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 387 (5): 1106-1119.
- Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, et al. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators [J]. *Molecular Cell*, 1998, 1 (4): 611-617.