

双分子荧光互补技术及其在蛋白质相互作用研究中的应用*

严 晶 霍克克**

(复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要 双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 分析技术, 是由 Hu 等在 2002 年最先报道的一种直观、快速地判断目标蛋白在活细胞中的定位和相互作用的新技术. 该技术巧妙地将荧光蛋白分子的两个互补片段分别与目标蛋白融合表达, 如果荧光蛋白活性恢复则表明两目标蛋白发生了相互作用. 其后发展出的多色荧光互补技术 (multicolor BiFC), 不仅能同时检测到多种蛋白质复合体的形成, 还能够对不同蛋白质间产生相互作用的强弱进行比较. 目前, 该技术已用于转录因子, G 蛋白 $\beta\gamma$ 亚基的二聚体形式, 不同蛋白质间产生相互作用强弱的比较以及蛋白质泛素化等方面的研究工作上.

关键词 双分子荧光互补(BiFC), 蛋白质相互作用, 亚细胞定位

学科分类号 Q6

活细胞中蛋白质之间的相互作用在何时何地如何发生, 一直是生物学家迫切想了解的问题之一. 而双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 分析技术, 为我们在荧光显微镜下直接观察蛋白质的相互作用提供了一种直接的途径^[1].

该方法利用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 及其突变体的特性作为报告基因, 将荧光蛋白分割成两个不具有荧光活性的分子片段, 再分别与目标蛋白连接. 如果两个目标蛋白因为有相互作用而靠近, 就使得荧光蛋白的两个分子片段在空间上相互靠近, 重新形成活性的荧光基团而发出荧光. 在荧光显微镜下, 就能直接观察到两目标蛋白是否具有相互作用, 并且在最接近活细胞生理状态的条件下观察到其相互作用发生的时间、位置、强弱、所形成蛋白质复合体的稳定性, 以及细胞信号分子对其相互作用的影响等, 这些信息对研究蛋白质相互作用有一定意义.

1 BiFC 原理

1.1 荧光蛋白的结构与特性

绿色荧光蛋白 (GFP) 来源于水母 (*Aequorea victoria*), 分子质量约为 27 ku, 能在各种细胞中表

达. 受到激发时, 不需要任何辅助因子, 就能在活体中发出绿色荧光. 1992 年, Prasher 等^[2]克隆了 GFP 基因. 随后, GFP 作为一种研究基因表达和蛋白质定位的活体可遗传标记, 在各种类型细胞的研究中得到了广泛的应用.

GFP 的一些定点突变能明显地改变其波长性质. 产生的突变体, 具有产生多色光的特性, 如: GFP66 位的酪氨酸突变为色氨酸后成为青色荧光蛋白 (cyan fluorescence protein, CFP), 203 位的苏氨酸突变为酪氨酸后成黄色荧光蛋白 (yellow fluorescence protein, YFP), 145 位酪氨酸突变为苯丙氨酸后成蓝色荧光蛋白 (blue fluorescence protein, BFP)^[3]. 2002 年 Hu 等^[1]最先报道了用 BiFC 技术在活细胞中观察 bZIP 和 Rel 家族蛋白的相互作用, 利用的就是 YFP 作标记, 在荧光显微镜下用 525 nm 波长直接检测黄色荧光.

GFP 家族还有一重要性质——循环排列

*国家重点基础研究发展计划(973)项目(2001CB510203), 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002BA711A11), 十五重大攻关项目中国人肝脏蛋白组计划(CNHLPP) (2004BA711A19)和上海市科技创新团队项目资助.

** 通讯联系人. Tel: 021-65643023, E-mail: kkhuo@fudan.edu.cn

收稿日期: 2005-12-22, 接受日期: 2006-02-09

(circular permutation)^[4]. GFP、YFP、CFP 和 BFP 都是由 238 个氨基酸组成的单体蛋白质, 荧光的产生主要归功于分子内第 65、66、67 位丝氨酸、酪氨酸、甘氨酸自环化形成生色团的功效, 而该过程大约在蛋白质形成后约 4 h 完成^[5]. 晶体结构显示, 蛋白质中央是一个圆桶形结构, 由 11 个围绕中心 α 螺旋的反平行 β 折叠组成. 荧光基团的形成就是从在这个螺旋开始的, 桶的顶部由 3 个短的垂直片段覆盖, 底部由一个短的垂直片段覆盖, 对荧光活性很重要的生色团则位于大空腔内. Geoffrey 等^[4]研究发现, 在 GFP 的两个 β 片层之间的环结构上至少有 10 个位点可以插入外源蛋白而不影响 GFP 的荧光活性, 但激发波长和发射波长会略有改变. 例如: 在 GFP 的第 144 个和 145 个氨基酸之间插入外源

蛋白序列, 用 487 nm 波长的光波激发后, 仍能产生波长为 512 nm 的荧光.

1.2 BiFC 技术的基本原理

BiFC 技术正是利用该荧光蛋白家族的这一特性, 在环结构的特异位点将荧光蛋白切成 N 端片段和 C 端片段两部分后, 再由一小段氨基酸序列 (linker) 分别与目标蛋白连接. 重组好的基因构建入载体, 共转染细胞. 两段重组基因在细胞中融合表达, 若目标蛋白间存在相互作用, 通过 linker 牵引荧光蛋白的 N 端片段与 C 端片段就能够相互靠近, 进而形成荧光蛋白生色团重新发出荧光. 因此, 在荧光显微镜下检测是否有互补荧光产生, 就可以推断出两目标蛋白是否发生了相互作用 (图 1).

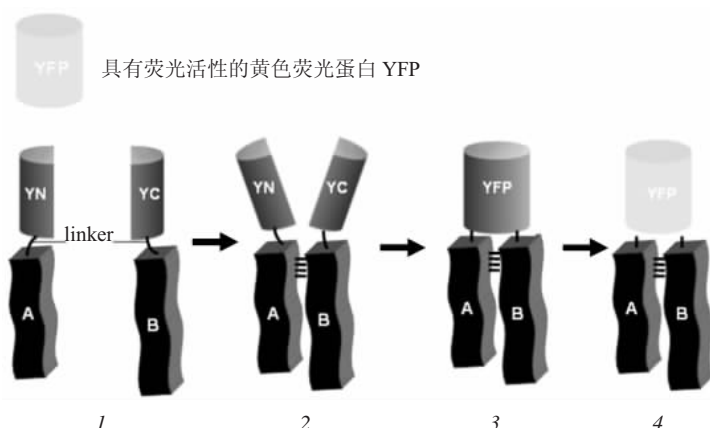


Fig. 1 Schematic representation of the principle of the BiFC assay

图 1 BiFC 分析技术原理示意图

1: 待测蛋白质 A、B 通过一段寡聚氨基酸序列 (linker) 分别与 YFP 荧光蛋白的 N 端和 C 端片段融合; 2, 3: 蛋白质 A 和 B 之间由于相互作用而牵引荧光蛋白片段 YN 和 YC 相互靠近, 并重新组合成完整的 YFP 分子; 4: 重新形成的完整 YFP 分子经孵育一段时间后, 生色团恢复活性并发出荧光.

2 BiFC 技术的基本实验操作

BiFC 技术的实验操作简便, 通过将目标蛋白构建入质粒, 共染细胞, 培养一定时间后直接进行荧光检测.

除 GFP 外, YFP、CFP 都可选作报告基因. 切割位点也同样在第 155 位和第 173 位氨基酸处. 目前文献报道的 BiFC 技术多使用 YFP 作报告基因, 因为使用 YFP 时有一个最大好处, 即观察细胞定位时, 染核试剂 TOTO-3 的激发光波长在 642~660 nm, 与 YFP 的激发波长 515~527 nm 有明显

差别, 荧光显微镜下观察时不会产生相互影响^[6], 有利于细胞定位观察.

质粒的构建是整个实验的关键步骤, 以 Hoff 等^[6]证明转录因子在细胞核中相互作用的实验来说明. 首先经 PCR 得到 YFP1~154 位氨基酸的 N 端片段 YN 和 155~238 位氨基酸的 C 端片段 YC, 并都引入上游的 *Not* I 酶切位点和下游的 *Spe* I 酶切位点. 同时上游引物中还引入编码 RSIAT 和 RPACKIPNDLKQKVMNH 的连接序列 linker. 由于 linker 的单链结构在空间位置上有一定的旋转活性, 这样就使得荧光蛋白在空间位置上靠近之后更

容易产生相互作用. 目标蛋白的两端也通过 PCR 引入 *Nco* I 的酶切位点. 通过 linker 连接起荧光蛋白片段和目的蛋白基因, 再将重组好的基因接入真核表达载体的多克隆位点. Hoff 等在该实验中采用了构槽曲霉菌(*Aspergillus nidulans*)的 *gpd* 启动子和 *trp* C 终止子来调控蛋白质表达. 质粒构建如图 2.

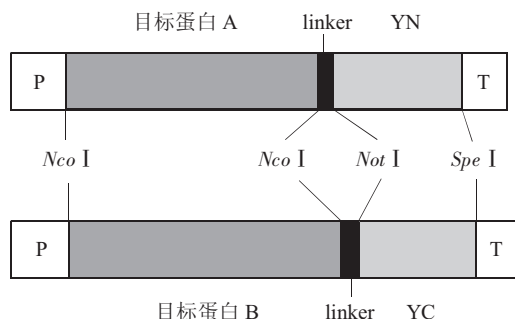


Fig. 2 Construction of the plasmids in BiFC assay

图 2 用于 BiFC 的质粒构建图

将构建好的质粒共转染细胞. BiFC 可以在很多哺乳动物细胞系(已报道过的有 COS-1, HEK293, HeLa, HeP3B, α TN4 和 NIH3T3 等)、植物细胞^[7]、真菌生物细胞(如构槽曲霉菌^[6])甚至大肠杆菌(*E. coli* DH5^[8])中检测蛋白质相互作用. 细胞在 37℃ 细胞培养箱中培养 12~36 h 后就能在荧光显微镜下进行荧光检测, 而在 30℃, 5% CO₂ 的环境下培养, 更能促进荧光生色团的形成, 增强荧光号^[9]. Hu 等^[9]建议在 37℃ 下培养 24 h 后, 再改用 30℃ 培养 4~16 h, 能有效提高荧光效果.

细胞产生的荧光强弱可以用 automated feature-recognition 软件进行定量分析. 但产生荧光的强弱并不能够绝对说明荧光互补产生的效率, 还需要排除转染效率、蛋白质表达水平等因素的影响. 因此, 还有必要加入内参. 即在共转染的同时, 再转染一个编码全长荧光蛋白的质粒, 该荧光蛋白与用来做互补检测的荧光蛋白光谱波长应该有明显差异, 镜检时才不会出现相互影响. 如 Hoff 在上述实验中用 YFP 做荧光互补, 就选用了 CFP 做内参. CFP 的荧光强度反映背景信号, 用 YFP 检测波长测到的荧光强度与 CFP 检测到的荧光强度的比值, 就能有效地将蛋白质复合物产生的荧光强度调整到等量蛋白质复合体的基础上, 从而反映出荧光互补的产生效率^[9]. 而目前一般是通过将重组基因构建到带有 myc、HA、Flag 等标记的质粒上, 再通过免疫共沉淀, 蛋白质印迹检测来确定蛋白质表达量.

3 BiFC 的应用

一些传统的研究方法虽然为蛋白质间相互作用的研究提供了极为有利的条件, 但同时这些研究手段也存在一定的缺陷: 如免疫共沉淀技术要求必须破碎细胞, 免疫荧光的透化过程也会对细胞造成损伤, 而双杂交技术只能检测到细胞核内的蛋白质相互作用, 对相互作用强弱的鉴定也需要裂解细胞以检测报告基因的表达水平. 它们都无法做到在活细胞生理条件下实时、直接、快速地对细胞内蛋白质间相互作用进行动态研究. BiFC 技术正好能弥补这一缺陷, 以下是已报道过的 BiFC 技术在相关生命科学领域中的具体应用.

3.1 研究转录因子间的相互作用及其亚细胞定位

碱性亮氨酸拉链(basic region leucine zipper, bZIP)蛋白是一类重要的转录因子, 参与基因表达与调控. 至今已报道的转录因子中最大的一类蛋白质是由一个与 DNA 结合的碱性结构域和一个二聚体化作用的亮氨酸拉链区域(bZIP)组成^[10]. bZIP 区域可能是转录因子中的转录激活区, 而其功能受二聚体化作用和翻译后修饰调节, 通过亮氨酸重复区域, 这些因子能够形成同源或异源二聚体^[11]. 那么, 哪些 bZIP 家族蛋白能相互作用? 结合后的蛋白质复合体细胞定位是否发生改变? 在缺失或增加一些序列基团后相互作用还能否存在? 细胞定位是否又会发生改变? BiFC 技术为解决这些问题提供了便利.

2002 年 Hu 等^[1]最先报道了用 BiFC 技术研究 bZIP 蛋白家族中 Fos 和 Jun 两个成员蛋白质间的相互作用功能. 他们将 YFP 蛋白从氨基端第 155 位氨基酸—— β 桶状区(β -barrel)的环结构处切开成 YN (1~154 氨基酸)和 YC (155~238 氨基酸)两部分, 再分别与 Fos 和 Jun 的 bZIP 结构域片段(bFos, bJun)连接成 bFosYC 和 bJunYN, 并进行体内、体外检测. 结果发现, 只有当 bFosYC 和 bJunYN 同时存在时才能检测到荧光, 而 bFosYC 或 bJunYN 在细胞中单独存在时都无荧光活性. 另外他们还发现, 将 Fos 和 Jun 的 bZIP 结构域片段共转染细胞与它们的全长片段共转染细胞后荧光出现的位置不同. 前者荧光出现于细胞核, 而后者出现于细胞核外的细胞质区域. 可推测在 Fos 和 Jun 的 bZIP 结构域外, 有影响 bFos-bJun 复合物细胞定位的区域存在. 用 BiFC 技术研究亚细胞定位, 能够迅速得到直观而清晰的结果^[1].

3.2 利用 BiFC 寻找 G 蛋白可能存在相互作用的 β 和 γ 亚基

鸟苷酸结合调节蛋白 (guanine nucleotide binding regulatory protein, G 蛋白), 在信号转导过程中起着分子开关的作用, 参与细胞的多种生命活动, 如细胞通讯、核糖体与内质网的结合、小泡运输、蛋白质合成等. G 蛋白以 α 、 β 和 γ 亚基三聚体的形式存在于细胞质膜内侧. 目前已发现的 α 亚基有 20 余种, 分子质量为 36~52 ku. G 蛋白中的 β 和 γ 亚基亦有数种, 但不及 α 亚基种类多. 在细胞内, β 和 γ 亚基形成紧密结合的二聚体, 只有在蛋白质变性条件下方可解离, 因此可以认为它们是功能上的单体. β 和 γ 亚基的主要作用是与 α 亚基形成复合体并定位于质膜内侧. 近年来的研究表明, G 蛋白 α 、 β 和 γ 亚基的重组形式决定其特异识别并传递某种信号分子的能力. Hynes 等^[12]用 BiFC 技术作了进一步研究.

哺乳动物细胞中存在着 5 种 G 蛋白 β 亚基和 12 种 γ 亚基^[13], 所形成的大多数二聚体都有在体外调节效应分子 (如: 腺嘌呤环化酶, 磷脂酶 C, G 蛋白偶联内向整流钾通道(GIRK)) 的活性. α 亚基位于质膜上, β 亚基必须与 γ 亚基结合后才能定位到质膜, 而单独的 γ 亚基会结合到质膜或线粒体膜上的错误位置^[14]. 因此 Hynes 等在 HEK293 细胞中共转入 YN- β 和 YC- γ , 通过荧光的形成与否来判断这两个亚基是否能形成特异的二聚体. 他们用哺乳动物细胞中的 5 个 β 亚基与 12 个 γ 亚基两两配对实验后发现: 这些复合体存在着 3 种明显不同的细胞定位, 而由列表分析可看出 β 亚基决定了 $\beta\gamma$ 复合物是结合在质膜还是细胞内膜上 (含 $\beta 1$ 或 $\beta 2$ 的复合物都定位在质膜, 而含 $\beta 5$ 的复合物定位在细胞内膜), γ 亚基似乎决定着二聚体与膜结构结

合的紧密程度 (含 $\gamma 1$ 或 $\gamma 7$ 的复合物与细胞膜结合程度远大于 $\gamma 2$). 而不同的 $\beta\gamma$ 二聚体形式, 与不同的 α 亚基结合, 形成各异的 G 蛋白行使分子开关功能, 完成对信号的筛选.

3.3 在植物细胞中应用 BiFC 技术

Walter 等^[15]将 BiFC 技术运用到了植物细胞中. 他们首先利用已报道过的能形成同源二聚体 bZIP 家族的 bZIP63, 来检验 BiFC 技术是否使用于植物细胞. 用根瘤杆菌悬液处理烟草叶表皮细胞, 共表达 bZIP63YN 与 bZIP63YC, 显出荧光, 而 bZIP63 的两个拉链结构域的氨基酸突变后, 荧光互补特性消失. 由此说明荧光信号仅出现于目标蛋白能发生相互作用 (即亮氨酸拉链结构完整且能发挥正常功能) 的时候. 在证明了 BiFC 技术能检测植物细胞中蛋白质相互作用后, Walter 等发现 14-3-3 蛋白能在烟草叶表皮细胞中形成同源二聚体, 而其 N 端缺失后该相互作用消失. 拟南芥锌指蛋白 LSD1 也能在烟草细胞中形成同源二聚体.

3.4 利用多色荧光互补技术同时检测多种蛋白质间的相互作用

多种蛋白质之间的选择性相互作用在生命领域研究中起着重要作用. 相对于 BiFC 技术只能检测两两蛋白质之间的相互作用, 多色荧光互补技术 (multicolor fluorescence complementation, MFC) 弥补了它的不足. Hu 等^[16]将 GFP, YFP, CFP, BFP 分别在 155 位或 173 位氨基酸处切开产生的 N 端片段和 C 端片段任意配对, 进行荧光互补检测. 结果不仅 YN155-YC155 中检测到荧光, YN155-CC155, YN173-YC155, YN173-CC155 中也同样能检测到荧光, 并且波长各异. 将所有能产生荧光互补的片段整理如表 1.

Table 1 Complementation between fragments of different fluorescent proteins

表 1 荧光蛋白互补检测

	YN155	CN155	GN155	BN155	YN173	CN173	GN173	BN173
YC155	+	-	-	-	+	+	+	-
CC155	+	+	-	-	+	+	+	+
GC155	-	-	-	-	-	-	-	-
BC155	-	-	-	-	-	-	-	-
YC173	-	-	-	-	+	+	+	-
CC173	-	-	-	-	-	-	-	-
GC173	-	-	-	-	-	-	-	-
BC173	-	-	-	-	-	-	-	-

“+”代表有荧光产生, 所对应的两个片段能够用于荧光检测标记, “-”对应的两个片段在相互靠近时不会产生荧光, 不适用于 BiFC 技术.

Hu等利用该技术再次检测了bZIP蛋白家族的Jun, Fos, ATF2蛋白成员的bZIP结构域:bJun, bFos, bATF2. 共表达等量的bJunCC155和bFosCN173, bATF2YN173, 所产生的青色荧光与共表达bJunCC155和bFosCN173相当, 而黄色荧光却只有共表达bJunCC155和bATF2YN173的不到1%. 换用bJunCC155, bFosCN155, bATF2YN1553实验, 得到相同结果. 再次共转bJunCC155, bFosCN155, bATF2YN1553入细胞, 并过表达bJunCC155, 就能同时检测到青色荧光和黄色荧光. 说明:bFos, bATF2都能与bJun发生相互作用, 并且bFos的结合能力远强于bATF2, 在bFos和bATF2同时存在时, bJun优先与bFos结合.

Grinberg等^[17]还利用该技术进一步研究转录因子Myc、Max、Mad三个蛋白质家族蛋白质间在活细胞中形成的竞争性二聚体, 将如何利用多色的BiFC技术研究蛋白质间的竞争性相互作用作了很好的诠释. 他们首先利用荧光互补快速检测三个蛋白质家族蛋白中两两之间的相互作用, 发现Myc和Mad家族成员之间不存在相互作用关系, Max家族蛋白能与Myc和Mad家族的所有成员结合, 而且形成的蛋白质复合体细胞定位发生了改变. 而作者又通过特异性的缺失蛋白中与DNA结合的结构域, 再进行荧光互补检测, 发现仍然能产生荧光, 而且荧光在细胞中产生的位置并未发生改变, 因而说明Myc-Max和Mad-Max复合体的形成及其亚细胞定位并不需要结合DNA. 而在细胞中等量表达另一种蛋白质后, 蛋白质复合体的亚细胞定位发生改变. 所有Myc, Max, Mad蛋白家族的蛋白质都定位于细胞核, 唯一一个例外是Mad家族中的Mad4蛋白, 它定位于细胞质. 对Mad4蛋白的出核机制进行检测, 作者将Mad4与Mad家族其他蛋白进行氨基酸序列比对, 发现Mad4的N端序列存在着差异. 特异地缺失其N端序列后, Mad4定位出现了改变, 免疫荧光出现于细胞核区域. 因此确定了Mad4的N端序列是一个核定位信号. 而缺失该信号是否影响Mad4与Max的相互作用呢? BiFC检测显示, Mad4Δ-Max复合体形成于细胞质, 蛋白质相互作用并未受到影响, 但作用位置发生改变. 同样, 缺失掉Max的C端核信号肽序列, 荧光互补检测到相同结果. 由此说明, Mad4与Max的相互作用并不会影响他们各自的核定位信号肽的功能, 而Max的入核表达信号强于Mad4

的出核表达信号.

多色荧光互补技术不仅能够活细胞中直接观察蛋白质相互作用的发生位置, 而且直观地表现出检测蛋白质或蛋白质基团之间相互作用的强弱关系, 全面直观地反映出在活细胞最接近生理条件下的蛋白质功能.

3.5 检测泛素化途径

泛素(ubiquitin, Ub)是含76个氨基酸残基的多肽, 分子质量约8.5 ku, 高度保守, 广泛存在于各种真核细胞中^[18]. 它的主要作用是以多聚泛素链的形式与要降解的底物蛋白结合, 从而标记底物蛋白. Muller等^[19]还发现一种类泛素蛋白SUMO, 它也标记底物, 但不促进其降解.

一个或多个泛素分子在一系列酶的作用下与其他蛋白质分子共价结合就称为泛素化. 泛素化可直接影响蛋白质的活性及其细胞内定位. 细胞内许多蛋白质均可被泛素化系统识别和修饰, 包括细胞表面受体、信号传导蛋白、转录因子等^[20]. 泛素化过程是一个由多种酶参与的级联反应. 首先, 在ATP的参与下, 泛素激活酶(E1)作用于泛素羧基端的谷氨酸残基, 并将其激活. 接着, 活化了的泛素蛋白利用高能巯基键与泛素结合酶(E2)的半胱氨酸残基结合. 最后, E2直接或者通过泛素连接酶(E3)将泛素与靶蛋白连接, 从而完成泛素化的过程. 泛素化的靶蛋白可被细胞中的26S蛋白酶体识别, 从而将其降解^[20]. 目前越来越多的研究发现, 泛素化系统的改变和细胞的转化与肿瘤的发生、神经退行性疾病、免疫和炎症反应等有密切关系.

BiFC技术为泛素化途径检测提供了一种简便方法. Fang等^[21]用YN标记泛素分子, YC标记泛素作用底物Jun, pFLAG-CMV2(γ)-YN-Ub和pFLAG-CMV2(γ)-YC-Jun共染细胞COS-1, 37℃培养24h, 再30℃培养4~16h后进行荧光检测. 若出现荧光, 则表明泛素结合到了底物蛋白上, 即底物蛋白被泛素化. 经对表达YN-Ub(带Flag标记)的细胞提取物和表达HA-Ub的细胞提取物作蛋白质印迹分析, 发现电泳后的蛋白质条带亮度和弥散情况基本相同, 仅有由于YN分子质量较HA大而引起的条带稍微滞后, 该结果说明, 在泛素分子上融合表达一段荧光蛋白不会影响泛素与其底物的结合.

BiFC技术利用GFP荧光蛋白家族的报告基因特性、其特殊的分子结构和多色突变的特性, 通过在待检测的蛋白质上标记没有荧光活性的报告基因

片段,再使它们共表达于活细胞中,检测是否有荧光出现来判定蛋白质间的相互作用存在与否.实验简单、快捷、直观,并适用于原核、真菌、植物、动物等多种组织、细胞.该技术的完善与发展必然会为蛋白质组学、蛋白质相互作用连锁图的建立带来福音.但是,该技术与大多检测蛋白质相互作用的技术一样,也存在着假阴性和假阳性的问题,需要在实验中仔细验证.

参考文献

- Hu C D, Chinenov Y, Kerppola T. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, 2002, **9** (4): 789~798
- Prasher D C, Echenrode V K, Ward W W, *et al.* Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992, **111** (2): 229~233
- Abedi M, Caponigro G, Shen J X, *et al.* Transcriptional transactivation by selected short random peptides attached to lexA-GFP fusion proteins. *BMC Mol Biol*, 2001, **2** (10): 1~10
- Geoffrey S B, David A Z, Roger Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (20): 11241~11246
- 周盛海, 孟凡国, 黄大年, 等. 绿色荧光蛋白及其应用. *生物工程进展*, 1999, **19** (2): 56~60
Zhou S H, Meng F G, Huang D N, *et al.* *Bioengineering Advancing*, 1999, **19** (2): 56~60
- Hoff B, Kuck U. Use of bimolecular fluorescence complementation to demonstrate transcription factor interaction in nuclei of living cells from the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Curr Genet*, 2005, **47** (2): 132~138
- Drori K B, Shichrur K, Katz A. Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*, 2004, **40** (3): 419~427
- Tsuchisaka A, Theologis A. Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the *Arabidopsis* gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (8): 2275~2280
- Hu C D, Grinberg A V, Kerppola T K. Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis. In: Bonifacino S J, eds. *Current Protocols in Cell Biology*. New York: John Wiley & Son, 2005. 21.3.1~21.3.21
- Foster R, Izawa T, Chua N H. Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB*, 1994, **8** (2): 192~200
- Niu X, Gegg L, Miller L. Bipartite determinants of DNA binding specificity of plant basic leucine zipper proteins. *Plant Molecular Biology*, 1999, **41** (1): 1~13
- Hynes T R, Tang L N, Mervine S M, *et al.* Visualization of G protein $\beta\gamma$ dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both β and γ in subcellular targeting. *J Biol Chem*, 2004, **279** (29): 30279~302864
- Iniguez-Lluhi J A, Simon M I, Robishaw J D. G protein beta gamma subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of gamma subunit. *J Biol Chem*, 1992, **267** (32): 23409~23417
- Simon M, Shizuya H. Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein α , β and γ subunit genes. *DNA Res*, 2000, **7** (2): 111~120
- Walter M, Chaban C, Schu K, *et al.* Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*, 2004, **40** (3): 428~438
- Hu C D, Kerppola K T. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology*, 2003, **21** (5): 539~545
- Grinberg V A, Hu C D, Kerppola K T. Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Mol Cell Biol*, 2004, **24** (10): 4294~4308
- Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2** (3): 195~201
- Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, **2** (3): 202~213
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, *et al.* A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 1999, **96** (5): 635~644
- Fang D Y, Kerppola K T. Ubiquitin-mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch/AIP4 is localized to lysosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (41): 14782~14787

Bimolecular Fluorescence Complementation Assay: Application in The Study of Protein-protein Interaction*

YAN Jing, HUO Ke-Ke**

(State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay is an innovative approach to investigate protein interactions, based on the reassembly of protein fragments of the fluorescent proteins which directly report interactions. The fluorescent proteins tolerate circular permutation and insertions of foreign proteins with maintenance of fluorescence. So when the proteins fused to the reporter fragments interact with each other, a direct readout of the association would be given from the facilitating reassembly of the active reporter protein. Moreover, with distinct spectra difference of the fluorescent protein family members, BiFC assay is expanded to multicolor BiFC assay which enables visualization of interactions between different proteins in the same cell and comparison of the efficiencies of complex formation with alternative interaction partners. From it first reported in *Molecular Cell* in 2002 till now, this approach has been used on the networks of protein interaction in mammal cells, plant cells or even *E.coli*, and researches on transcription factors, G protein $\beta\gamma$ dimmers, protein ubiquitination and so on.

Key words bimolecular fluorescence complementation (BiFC), protein interactions, cellular localization

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2001CB510203), Hi-Tech Research and Development Program of China (2002BA711A11). Chinese Human Liver Proteome Project (CNHLPP)(2004BA711A19).

**Corresponding author . Tel: 86-21-65643023, E-mail: kkhuo@fudan.edu.cn

Received: December 22, 2005 Accepted: February 9, 2006