

# 蛋白互作研究方法在水稻中的应用及 主要互作数据库汇总

陈丽娟<sup>1</sup>, 刘西西<sup>2,3</sup>, 罗金金<sup>2,3</sup>, 陈明花<sup>1</sup>, 匡瑜<sup>4</sup>, 田志宏<sup>1</sup>, 张健<sup>2,3</sup>  
(1. 长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025; 2. 中国水稻研究所, 浙江 杭州 311400;  
3. 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 311400; 4. 醴陵市农业农村局,  
湖南 株洲 412205)

**摘要:** 实验设计时选择合适的方法, 有利提高科研效率。综述了多种研究蛋白质相互作用的方法, 分析了各类方法的优缺点以及在水稻中的研究应用, 归纳整理了现有大型蛋白互作数据库。

**关键词:** 水稻; 蛋白质的相互作用; 互作方法; 互作数据库

**中图分类号:** Q753

**文献标志码:** A

**文章编号:** 2097-2172(2023)01-0082-06

**doi:** 10.3969/j.issn.2097-2172.2023.01.019

## Application of Protein Interaction Research Methods in Rice Genetic Engineering and Summary of Large Interaction Network Database

CHEN Lijuan<sup>1</sup>, LIU Xixi<sup>2</sup>, LUO Jinjin<sup>2,3</sup>, CHEN Minghua<sup>3</sup>, KUANG Yu<sup>3</sup>, TIAN Zhihong<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>2,3</sup>  
(1. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou Hubei 434025, China; 2. China National Rice Research Institute, Hangzhou Zhejiang 311400, China; 3. State Key Laboratory of Rice Biology, Hangzhou Zhejiang 311400, China;  
4. Bureau of Agriculture and Rural Affairs of Liling, Zhuzhou Hunan 412205, China)

**Abstract:** Studying the interaction between proteins is very important for rice genetic improvement, disease resistance and yield increase, and improving rice quality. This paper introduces a variety of methods for studying protein-protein interaction, analyzes the advantages and disadvantages of various methods, as well as their research and application in rice. The existing large protein interaction database was summarized for reference by researchers.

**Key words:** Rice; Protein-protein interaction; Interaction method; Interaction database

蛋白质是各种基本功能的主要完成者, 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction) 几乎参与所有细胞生命活动的进程, 从分子层面研究细胞均离不开对互作蛋白的鉴定和功能解析。蛋白质是生命活动的承担者, 大部分蛋白质主要通过相互作用或形成蛋白复合物来行使功能。水稻作为重要的模式生物, 通过检测蛋白质之间的相互作用来探索其生长发育分子机制, 以改善水稻品质。随着蛋白组学的发展, 蛋白互作技术日新月异, 了解检测各种蛋白互作技术方法的优缺点, 在实验设计时选择合适的方法, 能大大提高科研效率。

### 1 蛋白质相互作用的研究方法及其在水稻中的应用

在水稻中筛选蛋白质互作的试验方法众多, 主要可以分为两个大类, 即活体内试验 (in vivo) 和生物活体外试验 (in vitro)<sup>[1]</sup>。

#### 1.1 活体内试验

体内试验能真实地反应生物体内的蛋白互作情况, 所以目前开发的方法多为体内试验, 主要包括酵母双杂交、分裂泛素系统、细菌双杂交、双分子荧光互补、免疫共沉淀、邻近标记、表面等离子共振技术、噬菌体展示技术、荧光共振能量转移技术等方法。

收稿日期: 2022-04-15; 修订日期: 2022-11-25

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目 (LZ21C130001)。

作者简介: 陈丽娟 (1995—), 女, 云南曲靖人, 硕士研究生在读, 研究方向为植物分子生物学与基因工程。Email: chenlijuan0723@163.com。

通信作者: 张健 (1979—), 男, 湖南宁远人, 研究员, 博士生导师, 研究方向为水稻生殖性状的遗传基础解析和育种利用。Email: zhangjian@caas.cn。

1.1.1 酵母双杂交 (Yeast two hybrid, Y2H) 酵母双杂交信号检测在酵母细胞内进行, 在一定程度上代表了体内真实的蛋白互作, 因此 Y2H 是目前识别和研究蛋白质与蛋白质相互作用的最简便、最快速、最经济和最直接的方法之一。在筛选蛋白质互作时, 只需转入酵母菌株, 无须蛋白抽提、纯化等复杂步骤, 方便快捷。但 Y2H 技术也存在一定局限, 当蛋白质本身已经具有转录活性, 不需要与另外的蛋白结合就能激活下游的效应基因表达时, 会导致结果出现假阳性。在生物化学实验中, 想要证实酵母双杂交筛选到的互作是否可靠, 往往还需要其他方法的验证结果作为补充证据。使用 Y2H 技术筛选蛋白质互作组已经在人类、小鼠、果蝇、秀丽隐杆线虫、拟南芥、疟原虫、病毒、鹧鸪、非洲爪蟾等多个物种中得到了广泛应用<sup>[2-9]</sup>。如 Liu 等<sup>[10]</sup>利用 Y2H 技术对水稻中 10 个 SAPKs(应激活化蛋白激酶)和 9 个 bZIP 转录因子(受脱落酸 ABA 信号诱导)进行了蛋白互作组分析, 最终鉴定到 14 个阳性互作, 为 ABA 调控水稻的机制提供了新的思路。

1.1.2 分裂泛素系统 (Split-ubiquitin system, Split-Ub) 传统的 Y2H 技术在研究膜蛋白的相互作用存在局限性, 于是以 Y2H 为基础的衍生系统 - 分裂泛素系统应运而生。Split-Ub 系统对泛素进行了截断, 因此被称为分裂泛素系统。传统的 Y2H 要求诱饵蛋白能稳定地表达为融合蛋白, 所检测的融合蛋白要转运于亲水性的核基质中, 而对于细胞质蛋白和细胞膜蛋白, 一旦离开特定的疏水环境, 其结构会变得极不稳定, 正常结构不稳定会阻碍与其他蛋白质的相互作用, Split-Ub 系统则弥补了缺陷, 被广泛用于检测膜蛋白之间的互作<sup>[11]</sup>。作为 Y2H 系统的衍生系统, 此系统也有相似的局限性, 实验结果也存在假阳性和假阴性。乙烯激素对水稻生长发育有多方面的调控作用, Ma 等<sup>[12]</sup>利用分裂泛素膜蛋白等互作实验发现, EIN2(乙烯信号转导调节因子)与 MHZ3(内质网基糖化膜蛋白)存在蛋白互作, 水稻突变体中, MHZ3 减弱了乙烯诱导的 OsEIN2 积累, 而过表达 MHZ3 则提高了 OsEIN2 蛋白的丰度, 表明 OsEIN2 跨膜结构域在水稻乙烯信号转导中的重要性。

1.1.3 细菌双杂交 (Bacterial two-hybrid, B2H) 细

菌双杂交是一种利用大肠杆菌研究蛋白互作的方法<sup>[13]</sup>, 与 Y2H 系统相比, B2H 系统具有以下几个优点: 使用的大肠杆菌生长周期短; 质粒转化效率高, 不易污染; 适用范围广, 可用于传统酵母双杂交不能运用的范围, 如膜蛋白的相互作用等。但 B2H 系统中的蛋白质缺乏翻译后修饰, 会导致其部分功能缺失影响蛋白质的相互作用。该系统与 Y2H 系统也存在相似的局限性, 特异性不强、灵敏度不高、难以实现高通量、实验结果容易出现假阴性和假阳性。在水稻中, 仅有的尝试为武汉大学使用红莲型水稻杂种 F1 幼穗构建了其细菌双杂交文库<sup>[14]</sup>, 但使用 B2H 技术来验证水稻中的蛋白互作还未见报道。

1.1.4 双分子荧光互补 (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) BiFC 技术的基本原理是选择某些不保守的氨基酸位点, 将荧光蛋白多肽链剪切成不能发荧光的 N 端和 C 端两个多肽片段, 这两个蛋白片段在细胞内共表达或者体外再次接近时不能自发组装成完整的、具有活性的荧光蛋白<sup>[15]</sup>。BiFC 技术能在活细胞中检测到一些较弱的或瞬时的蛋白相互作用, 且能够通过共聚焦显微镜等仪器直观看看到荧光信号。但 BiFC 技术系统对温度敏感, 最佳温度为 30 °C, 在高温条件下, 片段之间不易互补形成完整的荧光蛋白, 温度越高越不利于片段之间的互补, 严格的温度控制对 BiFC 技术在正常生理条件下研究活体细胞的蛋白互作的应用有一定限制。Chu 等<sup>[16]</sup>通过 BiFC 等试验, 鉴定了 KLP(激酶样蛋白)与 LPA1(控制松散株型)在水稻细胞核中的相互作用; WCR1(负调控水稻莖白)和 MT2b(金属硫蛋白)的相互作用通过双分子荧光互补 (BiFC)等实验得到证实, 揭示了水稻株型与莖白的部分分子调控机制<sup>[17]</sup>。伴随高新技术的发展, 由传统 BiFC 技术衍生出的多色荧光互补技术<sup>[18]</sup>, 能够可视化同一细胞中的多种蛋白质相互作用, 为研究植物复杂的调控网络提供了一个有用的新工具<sup>[19]</sup>。

1.1.5 免疫共沉淀 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP)

免疫共沉淀是利用抗原蛋白和抗体蛋白质之间的特异结合, 来检测完整细胞内蛋白质之间的互作<sup>[20]</sup>。这种实验方法可保留蛋白最原始翻译后修饰的状态, 避免了人为操作影响。但此技术有要求抗体特异、实验操作步骤繁杂和筛选到的互作

蛋白可能为间接互作等缺点, 导致其不适用于高通量蛋白的相互作用筛选。在实验中洗脱混合物的过程可能包含一些非特异结合的蛋白, 所以实验检测到的互作蛋白往往需要其他实验方法进行二次验证。前人在水稻中的研究发现, OsCBM1(麦芽糖素样结构域蛋白)可通过多种植物激素和非生物胁迫处理显著刺激, Co-IP 实验证明, OsCBM1 与特异性鸟嘌呤核苷酸交换因子 OsRacGEF1 发生蛋白相互作用, 并参与 NADPH 氧化酶介导的 ROS 酶产生, 促进了水稻的干旱耐受性<sup>[21]</sup>。

1.1.6 邻近标记(Proximity labeling, PL) PL技术是近年在生命科学领域新发展起来的技术, 其原理是将一个具有邻近标记功能的酶与目标蛋白融合, 通过酶催化的共价修饰将邻近的蛋白标记上生物素, 最后通过亲和素磁珠富集生物素标记蛋白进行质谱鉴定<sup>[22]</sup>。PL 技术特别的地方在于鉴定蛋白互作时对蛋白质的结构无稳定要求, 检测灵敏度也不依赖于蛋白互作的强度, 因此能检测一些传统方法检测不了的弱互作。相比 Y2H 系统筛选互作蛋白, 邻近标记技术无须构建文库, 更方便快捷; 能检测 Y2H 系统检测不了的膜蛋白互作。PL 技术还能与其他技术交叉联用, 能在时空上动态地监测活细胞内的蛋白互作。Lin 等<sup>[23]</sup>利用 PL 技术在水稻原生质体中建立了邻近依赖性生物素鉴定系统; 还使用该系统在水稻体内发现了多个与 OsFD2(水稻营养生长相关蛋白质)互作的蛋白。

1.1.7 其他方法 上述生物活体内研究蛋白质互作的方法都已在水稻中被普遍使用, 除此之外, 表面等离子共振技术(Surface plasmon resonance, SPR)、噬菌体展示技术(Phage display technology, PDT)、荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer, FRET)等高新技术检测方法虽尚未应用于水稻蛋白互作研究, 但在其他生命科学领域早已有相关研究报道。

表面等离子共振技术只需少量样品, 且无须纯化蛋白、标记蛋白, 就能在天然条件下实时动态检测蛋白之间发生相互作用的过程, 因此在医疗抗体—抗原分子相互作用的研究上比传统验证互作的技术展现出了一定优势。等离子共振技术检测互作目前在水稻中还未有报道, 但在医学抗体抗原上有重要应用<sup>[24]</sup>。噬菌体展示技术可应用

于蛋白质相互作用筛库, 史密斯因为发明了噬菌体展示技术在 2018 年获得了诺贝尔化学奖<sup>[25]</sup>。使用噬菌体展示技术能快速筛选结合蛋白的短肽, 该技术对于药物开发和抗体筛选极为重要<sup>[26]</sup>, 第一个获得美国食品药品监督管理局批准的 PD-L1 抗体(免疫疗法抗肿瘤)就是使用噬菌体展示技术筛选得到的。同时通过该技术筛选到的抗体可以直接用于活细胞、活体组织, 甚至体内实验。由于该技术不涉及蛋白纯化等过程, 避免了蛋白质变性的可能。荧光共振能量转移技术能够在活细胞的正常生理条件下进行检测<sup>[27]</sup>, 并具有灵敏度高、操作简便和实验周期短的优势, 在研究蛋白质相互作用过程中得到了广泛的应用, 但是在实验中需要给检测蛋白加上标记, 并且对荧光光谱要求也较高, 所以不适用于大批量检测互作蛋白。

## 1.2 生物活体外试验

1.2.1 融合蛋白沉降(Pull down) 融合蛋白沉降又称体外蛋白质结合, 原理是用谷胱甘肽亲和树脂固化目标蛋白标签的融合蛋白, 当混合溶液过柱时, 目标蛋白标签上的融合蛋白可以“捕捉”与其有相互作用的蛋白<sup>[28]</sup>。该方法运用较为广泛, 与 Y2H 系统相比, 特异性更强, 能排除一部分的假阳性。但是也存在一定局限, 不能模拟体内蛋白的真实情况、需要纯化蛋白等繁杂操作、不适用于大规模高通量筛选蛋白互作等。Lu 等<sup>[29]</sup>发现敲除基因 OsMFS1 后, 水稻的花粉和胚囊都在生殖阶段流产, 通过 Pull down 等实验发现 OsMFS1 可以与减数分裂同源配对蛋白 OsHOP2 发生蛋白相互作用, 形成稳定的复合物, 由此证明 OsMFS1 在水稻花药和胚囊的正常发育中发挥着重要作用。

1.2.2 亲和纯化结合 SWATH(AP-SWATH) 亲和纯化作为 SWATH 的衍生技术, 能够高特异性的准确富集到靶蛋白的特异性相互作用蛋白, 并实现复合蛋白质的准确鉴定和定量<sup>[30]</sup>。与传统方法相比, AP-SWATH 的优点在于能定量分析且灵敏度更高、通量更大、质谱技术能一次性检测 2 000 种蛋白、3 次重复之间差异极小, 重复性高。该技术在水稻中仅有的应用仅有 1 例, Zhang 等<sup>[31]</sup>使用 AP-SWATH 技术共定量了 1 872 个独特的蛋白质, 根据萌发 4 个阶段的羧基化强度, 对主要参与维持活性氧水平、脱落酸和种子储备的 66 个羧基化

蛋白进行了进一步分析, 揭示了种子萌发过程中羧基化蛋白的动态变化规律。

### 1.3 蛋白互作研究方法小结

各个方法与技术都有一些共性和差异性。例如, 酵母双杂交、分裂泛素系统和细菌双杂交都是通过直接与靶蛋白互作的方式来验证蛋白是否互作, 融合蛋白沉降、免疫共沉淀和串联亲和层析检测到的可能是间接互作。酵母双杂交、分裂泛素系统、细菌双杂交、融合蛋白沉降主要是在体外验证蛋白质互作并不能反应生物体内的真实情况, 而免疫共沉淀、双分子荧光互补则是在生理条件下反应蛋白质的互作。从目前来看, 单个研究蛋白互作的方法都具有一定的局限性, 例如使用酵母双杂交技术时需要费时费力地构建 cDNA 文库, 且不适用于鉴定转录因子的互作蛋白; 而免疫共沉淀技术只适用于检测高亲和力的互作蛋白, 对于弱的或瞬时的相互作用分析效率较低等。总的来说, 单一的研究方法并不能真实反映蛋白质互作情况, 需要多个研究方法和技术相结合才更具有说服力。

## 2 蛋白互作网络数据库 (protein-protein interaction database)

随着高通量时代的来临, 验证单个互作蛋白已经不能满足科研人员的需求, 使用上述技术在家族、库与库之间筛选互作蛋白互作组构建蛋白互作网络逐渐成为趋势。蛋白互作网络是单个蛋白质通过与其他蛋白彼此互作串联组成的系统网络参与生命活动的多个环节, 主要包括体内信号传导、转录水平调控和正常机体代谢等; 结构化地分析蛋白质之间的相互作用, 深入蛋白质在生物系统中的作用机制; 了解疾病等特殊生理条件下生物信号转导与能量代谢的相互作用机制, 这些研究对未来生物化学发展具有重要意义。通过蛋白互作研究方法构建互作网络搭建互作数据库, 借助于蛋白互作检测和质谱技术, 迄今已有多种物种的蛋白互作组被鉴定, 也常被用于两个家族之间的互作研究, 如 Singh 等<sup>[32]</sup>运用互作技术在 MAPKK-MAPK 中筛到了 20 组互作数据。

蛋白互作组学在基因组、蛋白组等组学技术发展应用的基础上, 成为目前生物技术的研究方向和热点, 除实验验证互作外, 还可通过查询数据库来挖掘互作信息。前人通过生物信息技术整

合数据构建了部分蛋白质相互作用数据库, 但数据库的相对数量还处于发展阶段, 且物种主要集中在模式生物——哺乳动物以人类为代表, 植物物种中以拟南芥为代表。数据库中的互作组信息主要来自于已发表的期刊文献, 大多为零散的蛋白互作验证, 极少数为大规模酵母双杂交筛库以及测序技术验证, 互作数据通量不高。除了实验技术验证两个蛋白之间是否发生互作, 还可以根据家族、同源、结构来进行预测, 查询前人整理的蛋白互作数据库, 利用这些数据结合生物信息学技术可以预测水稻中部分蛋白之间的互作, 此种方法互作数据通量高, 速度快, 但准确性不高。蛋白互作数据库中查询到蛋白质的来源物种、蛋白质具体的序列与注释、互作蛋白的数据来源(文献报道或智能预测)、使用的实验技术等。STRING 作为全球最大的蛋白互作数据库<sup>[33]</sup>, 目前的最新版本中包含了 14 094 个生物体, 67 592 464 种蛋白, 共 20 052 394 042 个相互作用的信息。该数据库包含了从已发表的文献中挖掘出的实验结果、从其他互作蛋白数据库中提取的数据、基于生物信息学预测的互作数据 3 个部分。但 STRING 中数据大多来源于人机交互预测, 互作信息的准确性可能会大打折扣。除 STRING 数据库外, 还存在一些公共蛋白互作数据库。我们归纳整理了库容量可观且能正常搜索使用的蛋白互作数据库(表 1), 利用这些数据库结合生信技术预测互作蛋白组, 可以在一定程度上提高科研效率。

## 3 展望

在水稻生物学研究中, 目前还尚未出现大型的水稻蛋白互作数据库。但近年来, 蛋白互作组学已经被广泛运用于生命科学的其他多个领域, 和多个学科之间产生交叉, 相信在不远的将来, 蛋白质互作组学的研究可能会填补关于水稻互作组学数据库的空白。在公共蛋白互作数据的基础上, 互作数据库未来可能会朝向通量高、灵敏度高、准确率高、可重复性高、物种范围更广的蛋白质组学研究领域上发展。蛋白质组学研究方法结合基因组学、合成生物学、生物信息学等邻近学科交叉, 多种技术并存, 齐头并进, 共同发展, 利用自己的优势互补局限, 推动更多高新技术的发展。多学科交叉互相发展为将来的蛋白质组学提供了新的思路, 并有望在

表 1 蛋白质-蛋白质相互作用数据库

数据库	网址	物种	交互组数量	数据来源
STRING	https://string-db.org/	14 094个生物体	6 759万个蛋白质;200亿5 239万交互信息	文本挖掘实验数据
SIGnAL	http://signal.salk.edu/interactome.html	拟南芥	9 023交互	蛋白阵列实验数据
Susan McCouch-PLATE-seq	http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1918068117	水稻	289种蛋白质之间的322种相互作用	plate-seq测序
CCSB interactome database	http://interactome.dfci.harvard.edu/index.php?page=home	人类、病毒、拟南芥、线虫、酿酒酵母	人类17 000蛋白交互、53个病毒蛋白和307个人类靶蛋白之间的454个经过验证的二元相互作用信息、拟南芥2 700种蛋白质之间的约6 200种交互、秀丽隐杆线虫3 864种交互	实验
AtPID	http://119.3.41.228/atpid/webfile/	拟南芥	4 457 个交互	预测
HPRD	http://www.hprd.org/	人类	30 047蛋白、41 327交互信息	发表文献数据
HuRI	http://www.interactome-atlas.org/	人类	9 094个不同的蛋白质,64 006个比较可信的蛋白交互	发表文献数据
IntAct	https://www.ebi.ac.uk/intact/	人类、小鼠、酿酒酵母、果蝇、线虫、拟南芥、疟原虫、病毒	118万多条交互	已发表文章实验数据, 数据库提取
DIP	https://dip.mbi.ucla.edu/dip/	生物体数量834	28 850个蛋白、81 923条交互信息	实验
sheen lab-Protein Interactions	https://molbio.mgh.harvard.edu/sheenweb/protein_interactions.html	拟南芥	70 944个预测和4 300个确认的相互蛋白	发表文献数据
PIPs	http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-pips/	人类	有可能发生的37 606个交互	算法预测
APID	http://bioinfow.dep.usal.es/apid	人类、小鼠、斑马鱼、非洲爪蟾、果蝇等25种	90 379种不同蛋白质和678 441种相互作用	实验数据库汇总
BioGRID	http://www.thebiogrid.org/	拟南芥、小鼠、人类等20种	2 398 355种蛋白质和29 417种相互作用	实验数据汇总
OPHID	http://ophid.utoronto.ca/ophidv2.204/	蝇、家鼠、大鼠、蠕虫、酵母、人类	数据库687 072、预测619 398、总交互1 279 157	在线预测, 人机交互数据
HPID	http://wilab.inha.ac.kr/hpid/	人类		预测
HIV -1 Human Interaction Database	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/retroviruses/hiv-1/interactions/	人类HIV病毒与靶蛋白		在线预测, 人机交互数据

水稻蛋白质组学领域产生更重大的发现。

#### 参考文献:

- [1] JANIN J, BONVIN A M. Protein-protein interactions [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2013, 23(6): 859-861.
- [2] LUCK K, KIM D K, LAMBOURNE L, et al. A reference map of the human binary protein interactome [J]. *Nature*, 2020, 580(7803): 402-408.
- [3] SKINNIDER M A, SCOTT N E, PRUDOVA A, et al. An atlas of protein-protein interactions across mouse tissues [J]. *Cell*, 2021, 184(15): 4073-4089.
- [4] GURUHARSHA K G, RUAL J F, ZHAI B, et al. A protein complex network of *Drosophila melanogaster* [J]. *Cell*, 2011, 147(3): 690-703.
- [5] KOTLYAR M, PASTRELLO C, SHEAHAN N, et al. Integrated interactions database: tissue-specific view of the human and model organism interactomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(1): 536-541.
- [6] LV Q, LAN Y, SHI Y, et al. AtPID: a genome-scale resource for genotype-phenotype associations in *Arabidopsis* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(1): 1060-1063.
- [7] RAMAPRASAD A, PAIN A, RAVASI T. Defining the protein interaction network of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. *Genomics*, 2012, 99(2): 69-75.
- [8] CALDERONE A, LICATA L, CESARENI G. VirusMen-

- tha: a new resource for virus–host protein interactions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 588–592.
- [9] ALONSO–LÓPEZ D, GUTIÉRREZ M A, LOPES K P, et al. APID interactomes: providing proteome–based interactomes with controlled quality for multiple species and derived networks[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(1): 529–535.
- [10] LIU X, LI Z, HOU Y, et al. Protein interactomic analysis of SAPKs and ABA–inducible bZIPs revealed key roles of SAPK10 in rice flowering[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1427.
- [11] ASSECK L Y, WALLMERTH N, GREFFEN C. ER membrane protein interactions using the split–ubiquitin system(SUS)[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1691: 191–203.
- [12] MA B, ZHOU Y, CHEN H, et al. Membrane protein MHZ3 stabilizes OsEIN2 in rice by interacting with its Nramp–like domain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(10): 2520–2525.
- [13] KARIMOVA G, GAULIARD E, DAVI M, et al. Protein–protein interaction: bacterial two–hybrid[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1615: 159–176.
- [14] 王 坤, 胡 骏, 彭晓珏, 等. 红莲型杂交水稻细菌双杂交系统文库的构建[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2009, 55(3): 365–369.
- [15] MILLER K E, KIM Y, HUH W K, et al. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis: advances and recent applications for genome–wide interaction studies[J]. *J Mol Biol*, 2015, 427(11): 2039–2055.
- [16] CHU J, XU H, DONG H, et al. Loose Plant Architecture 1–interacting kinesin–like protein KLP promotes rice resistance to sheath blight disease[J]. *Rice(N Y)*, 2021, 14(1): 60.
- [17] WU B, YUN P, ZHOU H, et al. Natural variation in WHITE–CORE RATE 1 regulates redox homeostasis in rice endosperm to affect grain quality[J]. *Plant Cell*, 2022, 34(5): 1912–1932.
- [18] JIA Y, BLEICHER F, REBOULET J, et al. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) and multiplexed imaging of protein–protein interactions in human living cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2350: 173–190.
- [19] FUJII Y, YOSHIMURA A, KODAMA Y. A novel orange–colored bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay using monomeric Kusabira–Orange protein[J]. *Biotechniques*, 2018, 64(4): 153–161.
- [20] LIN J S, LAI E M. Protein–protein interactions: Co–immunoprecipitation[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1615: 211–219.
- [21] JING X Q, LI W Q, ZHOU M R, et al. Rice carbohydrate–binding malectin–like protein, OsCBM1, contributes to drought–stress tolerance by participating in NADPH oxidase–mediated ROS production[J]. *Rice (N Y)*, 2021, 14(1): 100.
- [22] QIN W, CHO K F, CAVANAGH P E, et al. Deciphering molecular interactions by proximity labeling[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(2): 133–143.
- [23] LIN Q, ZHOU Z, LUO W, et al. Screening of proximal and interacting proteins in rice protoplasts by proximity–dependent biotinylation[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 749.
- [24] PUIU M, BALA C. SPR and SPR imaging: Recent trends in developing nanodevices for detection and real–time monitoring of biomolecular events[J]. *Sensors (Basel)*, 2016, 16(6): 870.
- [25] LEDSGAARD L, KILSTRUP M, KARATT–VELLATT A, et al. Basics of antibody phage display technology[J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(236): 3–5.
- [26] SAW P E, SONG E W. Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy[J]. *Protein Cell*, 2019, 10(11): 787–807.
- [27] BAJAR B T, WANG E S, ZHANG S, et al. A guide to fluorescent protein FRET pairs[J]. *Sensors(Basel)*, 2016, 16(9): 1488.
- [28] LOUCHE A, SALCEDO S P, BIGOT S. Protein–protein interactions: pull–down assays[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1615: 247–255.
- [29] LU J, WANG C, WANG H, et al. OsMFS1/OsHOP2 complex participates in rice male and female development [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 518.
- [30] CARON E, RONCAGALLI R, HASE T, et al. Precise temporal profiling of signaling complexes in primary cells using SWATH mass spectrometry[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(13): 3219–3226.
- [31] ZHANG H, HE D, YU J, et al. Analysis of dynamic protein carbonylation in rice embryo during germination through AP–SWATH[J]. *Proteomics*, 2016, 16(6): 989–1000.
- [32] SINGH R, JWA N S. The rice MAPKK–MAPK interactome: the biological significance of MAPK components in hormone signal transduction[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(6): 923–931.
- [33] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user–uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(1): 605–612.