技术方法

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000756

利用酵母双杂交技术筛选与转录因子 HOXA11 相互作用蛋白

程　志[1],高　蕊[2],马林强[2],黄慧哲[2]

(1. 重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室,重庆　400016;2. 重庆医科大学发育生物学研究室,重庆　400016)

【摘　要】**目的**:利用酵母双杂交技术从均一化的人肾透明细胞腺癌 cDNA 文库中筛选与转录因子 HOXA11 相互作用的蛋白。**方法**:培养人肾透明细胞腺癌细胞,提取 RNA,采用 SMART 技术制备均一化的人肾透明细胞腺癌 cDNA 文库。同时,聚合酶链反应扩增人 HOXA11 基因片段(1~846 bp),将此基因片段重组入 pGBKT7 载体,构建诱饵质粒 pGBKT7-HOXA11,经酶切和测序验证质粒构建正确。将诱饵质粒转化酵母菌 AH109,检测其有无毒性与自激活作用。随后,利用酵母双杂交系统从 cDNA 文库中筛选与 HOXA11 相互作用的蛋白。对筛选到的阳性克隆进行回转验证以及测序分析。**结果**:成功构建了人肾透明细胞腺癌 cDNA文库和 pGBKT7-HOXA11 诱饵质粒。在 AH109 酵母细胞中,该质粒无毒性、无自激活作用。酵母双杂交筛选获得了 5 个与 HOXA11 相互作用阳性克隆。**结论**:获得人肾透明细胞腺癌细胞中与 HOXA11 相互作用蛋白,为进一步研究 HOXA11 在个体发育以及癌症发生发展中的作用机制奠定了基础。

【关键词】HOXA11;SMART 技术;酵母双杂交

【中图分类号】R737.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-06-23

Screening of proteins interacting with HOXA11 by yeast two-hybrid system

Cheng Zhi[1], *Gao Rui*[2], *Ma Linqiang*[2], *Huang Huizhe*[2]

(*1. Teaching and Research Section of Cell Biology and Genetics, School of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University; 2. Laboratory of Developmental Biology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To screen proteins binding with HOXA11 from human renal clear cell adenocarcinoma cDNA library by yeast two-hybrid system. ***Methods***: The RNA of human renal clear cell adenocarcinoma cell was obtained and then transformed into cDNA library using SMART technology. Simultaneously, the cDNA fragments of HOXA11(1-846 bp) were amplified by polymerase chain reaction and constructed into pGBKT7 vector as the bait plasmid. The bait plasmid was transferred into yeast AH109 strain. Its toxicity and autoactivation were tested. Subsequently, the cDNA library was screened with pGBKT7-HOXA11 as bait plasmid by yeast two-hybrid system. Finally, the positive clones were sequenced and further analyzed. ***Results***: Human renal clear cell adenocarcinoma cDNA library and bait plasmid pGBKT7-HOXA11 were constructed successfully. The bait plasmid has no toxicity or autoactivation in AH109. Five positive clones were obtained and validated. ***Conclusion***: Proteins deduced to interact with HOXA11 are identified through yeast two-hybrid screening. These results help to elucidate the possible roles of HOXA11 in carcinogenesis and development.

【Key words】HOXA11; SMART technology; yeast two-hybrid

HOX基因编码一类进化上高度保守的转录因子,几乎存在于所有的后生动物中,在各个物种中已有 300 多个 HOX 基因被鉴定[1]。人类基因组含有 39个 HOX 基因,分别位于 HOXA、HOXB、HOXC 和 HOXD 等四个基因丛,每个基因丛含 9~12 个基因。HOX 基因都含有 183 bp 的 homeobox 序列,编码 61 个氨基酸残基的同源异形结构域(homeodomain, HD),HD 可以识别和结合 TTAT 或 TAAT 序列调控下游基因的表达[2-3]。

HOXA11 位于 HOXA 基因丛。在发育过程中,HOXA11 基因缺失导致子宫发育缺陷,其突变会影响骨形态发生与造血干细胞增殖、分化[4-5]。近年来

作者介绍:程　志,Email:allan_ch@126.com,
研究方向:HOX 基因在个体发育以及癌症发生发展中的调控机制。

通信作者:黄慧哲,Email:devbiology@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81300463);重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:cstc2013jcyjA10086);重庆市杰出青年科学基金资助项目(编号:cstc2012jjjq10001)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150826.2050.002.html (2015-08-26)

研究还发现 HOXA11 基因启动子在子宫内膜癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、恶性胶质瘤等肿瘤中均发生超甲基化，引起其表达水平明显低于正常组织，提示HOXA11 与癌症的发生发展密切相关[6-10]。但目前对 HOXA11 如何发挥其转录调控功能还知之甚少。本研究利用酵母双杂交技术鉴定 HOXA11 相互作用蛋白为研究其在个体发育以及癌症发生发展中的作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌、质粒和细胞 感受态细胞 *E.coli* DH5α 和 *E.coli* Electro-cell、酵母 AH109 和 Y187 菌株、质粒 pGBKT7、pGADT7 和 pGADT7-SfiI、293FT 和 786-O 细胞均由本实验室保存。

1.1.2 试剂 DMEM 培养基及胎牛血清购自 Hyclone 公司；Trizol 购自 Invitrogen 公司；TIANprep yeast plasmids DNA kit 和 TIANprep yeast plasmids DNA kit 购自 TIANGEN 公司；NucleoBond Xtra Maxi EF Kit 购自 MACHEREY-NAGEL 公司；Trimmer-Direct cDNA Normalization Kit 购自 Evrogen 公司；QIAquick PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司；T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nde* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Sfi* Ⅰ、PrimeSTAR DNA聚合酶、DNA Marker、PrimeScript RT reagent Kit、Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit、CHROMA SPIN™+TE-400 columns、酵母 YPDA 培养基、SD/-Leu-Trp、SD/-Leu-Trp-His、SD/-Leu-Trp-His、SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 培养基均购自宝生物公司。引物合成以及 DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 人肾透明细胞腺癌酵母双杂交 cDNA 文库构建

1.2.1.1 全长 cDNA 合成 培养人肾透明细胞腺癌细胞 786-O，按 Trizol 试剂操作说明书提取总 RNA。以 1 μg 总RNA 为模板按照 Creator™ SMARTTM cDNA Library Construction Kit 说明书以 SMART Ⅳ Oligo-nucleotide 和 CDS Ⅲ/3' PCR Primer 合成 cDNA 第一链。然后以 cDNA 第一链为模板，以 5'PCR Primer 和 CDS Ⅲ/3' PCR Primer 为引物通过 LD-PCR（long distance PCR）合成双链 cDNA。引物序列如表 1 所示，反应条件为：95 ℃预变性 20 s；95 ℃变性 5 s，68 ℃退火 6 min，20 个循环。

1.2.1.2 全长 cDNA 的均一化 采用 QIAquick PCR Purification Kit 纯化上述双链 cDNA 产物，用 Mini-Q 水将 cDNA 最终浓度调整为 100 ng/μl。参照 Trimmer-Direct cDNA Normalization Kit 说明书对 cDNA 进行均一化处理，取 10 μl cDNA，加入 4 μl 4×杂交缓冲液、2 μl Mini-Q 水，混匀后等分至 4 管。98 ℃温浴 2 min，68 ℃温浴 5 h，每管分别加入 5 μl 68 ℃预热 DSN（duplex-specific nuclease）master buffer，然后加入经梯度稀释的 DSN 处理液，68 ℃温浴 25 min。最后每管加入 10 μl 终止液终止反应。对经 DSN 处理的 cDNA 进行 2 次扩增。第 1 次扩增反应体系为：cDNA 1 μl、10×Advantage 2 PCR 缓冲液 5 μl、50×dNTP Mix 1 μl、5' PCR Primer 1.5 μl、50×Advantage 2 Polymerase Mix 1 μl、40.5 μl Mini-Q 水。反应条件为：95 ℃预变性 1 min；95 ℃变性 15 s，66 ℃退火 20 s，72 ℃延伸 3 min，7 个循环。反应结束后，取 5 μl 产物用琼脂糖凝胶电泳检测均一化效果。取 2 μl 上述扩增产物，利用引物 Evrogen PCR primer M2 进行第 2 次扩增。反应条件为：95 ℃预变性 1 min；95 ℃变性 15 s，64 ℃退火 20 s，72 ℃延伸 3 min，12 个循环。

1.2.1.3 均一化 cDNA 文库构建与鉴定 采用 QIAquick PCR Purification Kit 纯化上述均一化 cDNA，用 *Sfi* Ⅰ酶切处理。采用 CHROMA SPINTM+TE-400 columns 分级分离酶切产物，去除 400 bp 以下小片段。处理后的 cDNA 在 16 ℃条件下与 pGADT7-*Sfi* Ⅰ载体连接过夜，取 0.5 μl 连接产物，电转化感受态细胞 *E.coli* Electro-cell。用 1 ml LB 培养基在 37 ℃、220 r/min 条件下培养 1 h。取 10 μl 菌液稀释后涂氨苄青霉素平板，计算文库库容。随机挑取 16 个克隆，利用引物pGADT7-F 和 pGADT7-R 进行菌落 PCR 鉴定，电泳检测插入片段大小并估算重组率。随机挑取 96 个克隆进行测序检测，估算冗余率。

1.2.1.4 酵母 cDNA 文库构建 根据文库库容在 LB 平板上扩增文库。收集扩增后的文库菌液，采用 NucleoBond Xtra Maxi EF Kit 抽提质粒，具体操作按说明书进行。取 5 μg 质粒转化酵母 Y187 菌株，涂布 SD/-Leu 固体培养基平板。用 100 ml YPDA 液体培养基收集平板上所有的菌体，即得到扩

表 1 酵母 cDNA 文库构建所用到的引物

Tab.1 Primers used for construction of cDNA library

引物名称	引物序列
SMART Ⅳ Oligo-nucleotide	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3'
CDS Ⅲ/3'PCR Primer	5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d$(T)_{30N-1}$N-3'
5'PCR Primer	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
Evrogen PCR primer M2	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAG-3'
pGADT7-F	5'-GGAGTACCCATACGACGTACC-3'
pGADT7-R	5'-TATCTACGATTCATCTGCAGC-3'

增的酵母文库。取稀释后的酵母文库样品 100 μl 涂布 SD/-Leu 固体培养基平板，计算酵母文库滴度。

1.2.2 诱饵质粒 pGBKT7-HOXA11 构建与鉴定 根据 GenBank 中人 HOXA11 基因序列和酵母表达载体 pGBKT7 的多克隆位点，设计针对人 HOXA11 基因 1~846 bp 的特异性引物。上下游分别引入 *Nde* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切位点。上游引物：5'-GAGGACCTGCATATGATGGATTTTGATGAGCGTG-3'，下游引物：5'-CCGCTGCAGGTCGACTTAATCAGTGAGGTTGAGC-ATG-3'。培养人胚肾细胞 293FT，按 Trizol 试剂操作说明书提取 RNA，逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板 PCR 扩增目的基因片段。反应条件为：98 ℃预变性 1 min；98 ℃变性 10 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环；72 ℃延伸 5 min。分别回收纯化 PCR 产物以及 *Nde* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切后的 pGBKT7 载体，利用不依赖于连接反应的克隆方法构建质粒并转入大肠杆菌 DH5α 中，在含氨苄青霉素抗性 LB 平板上培养过夜，挑取阳性克隆。经酶切和测序鉴定，得到诱饵质粒 pGBKT7-HOXA11。

1.2.3 诱饵质粒 pGBKT7-HOXA11 自激活性及其对酵母菌 AH109 毒性检测 将诱饵质粒 pGBKT7-HOXA11 和 pGBKT7 空载体分别转化感受态酵母菌 AH109，在 30 ℃培养 3~5 d 比较酵母菌落在 SD/-Trp 平板上的生长情况。将诱饵质粒 pGBKT7-HOXA11 和 pGADT7 空载体共转感受态酵母菌 AH109，挑选单克隆划线接种至 SD/-Leu-Trp、SD/-Leu-Trp-His、SD/-Leu-Trp-His-Ade 平板于 30 ℃培养 3~5 d 观察菌落生长情况。

1.2.4 酵母双杂交筛选阳性相互作用 挑取含有 pGBKT7-HOXA11 的 AH109 酵母单菌落，接种于 SD/-Trp 液体培养基，30 ℃摇床培养 16~24 h。待其 600 nm A 值为 0.8 时，与 2 ml Y187 文库菌液在 2 L 锥形瓶中混合均匀，加入 45 ml 2×YPDA 液体培养基，30 ℃缓慢摇床培养 24 h。1 000 r/min 离心 10 min 后，用 10 ml 0.5×YPDA 液体培养基重悬。将杂交菌液涂于 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 平板上，30 ℃培养 3 d~5 d 后，挑取阳性克隆，划线于 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 平板上，30 ℃培养 3~5 d。

1.2.5 回转酵母验证阳性相互作用 采用 TIANprep yeast plasmids DNA kit 提取阳性克隆质粒转化 *E.coli* DH5α，提取质粒与 pGBKT7-HOXA11 共转化酵母菌 AH109，涂布在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 平板上，30 ℃培养 3~5 d 观察其生长情况。对回转验证成功的阳性克隆进行测序，将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 分析，寻找同源序列，预测基因功能。

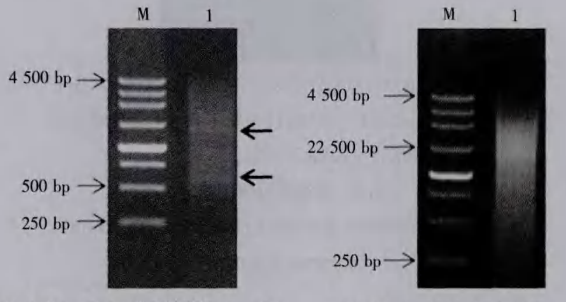
2 结 果

2.1 人肾透明细胞腺癌酵母双杂交 cDNA 文库构建

2.1.1 全长 cDNA 合成 用 Trizol 试剂提取人肾透明细胞腺癌细胞 786-O 总 RNA 后 1%琼脂糖凝胶电泳。总 RNA 含 3 条特异带，28 S rRNA 和 18 S rRNA 的特征条带整齐清晰，比值接近 2:1，说明 RNA 完整性较好，未降解。分光光度计测定总 RNA 的 $A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$ 在 1.9~2.0 之间，说明总 RNA 纯度较高。

以总 RNA 为模板进行反转录和 LD-PCR 扩增获得双链 cDNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测双链 cDNA，发现大小集中在 250~4 500 bp 之间（图 1A）。并且泳道中有一些高亮特异性条带（加粗箭头所示），表示高丰度基因，说明需要对cDNA 进行均一化处理。

2.1.2 cDNA 均一化处理 cDNA 经过均一化处理后，之前高亮的特异条带已基本消失，同时长片段 cDNA 扩增后亮度较之前有明显增加（图 1B）。说明均一化使原来高丰度cDNA 含量明显下降，原本丰度较低的 cDNA 相对含量得到了增加。



M. 250 bp DNA 分子标准；1. cDNA（加粗箭头表示高亮特异性条带）

A. 未经均一化处理的 cDNA

M. 250 bp DNA 分子标准；1. cDNA

B. 均一化处理后的 cDNA

图 1 cDNA 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of cDNA

2.1.3 酵母双杂交文库构建 将均一化 cDNA 用 *Sfi* Ⅰ酶切处理，去除 400 bp 以下的小片段后与载体连接并转化大肠杆菌涂板。根据平板的菌落数计算文库容量为 2.5×10^6 cfu。从平板中随机挑取 16 个克隆进行菌落 PCR 鉴定。经电泳检测，插入片段大小均集中在 750~2 250 bp，并且重组率达100%（图2）。随机挑取 96 个克隆进行测序检测，发现只有 1 个冗余克隆，冗余率为 1%。

提取扩增后的文库质粒转化 Y187 酵母菌获得酵母文库。取 100 μl 文库样品 100 000 倍稀释后涂板，计数菌落数为 60 个。因此，酵母文库的滴度为 6×10^7 cfu/ml。



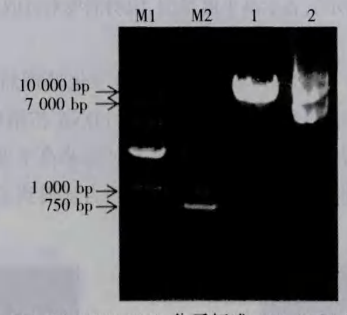
M. 250 bp DNA 分子标准；1~16. 克隆菌落 PCR 产物

图 2 均一化文库插入片段大小检测

Fig.2 PCR identification of cDNA inserts in the normalized library

2.2 诱饵质粒构建与鉴定

以 293FT cDNA 为模板，以带有 *Nde* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切位点引物扩增获得 HOXA11 1~846 bp 片段。将此片段克隆入 pGBKT7 载体，筛选阳性克隆，得到 pGBKT7-HOXA11 诱饵质粒。诱饵质粒经 *Nde* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切成 7.3 kb 和 846 bp 两个片段，片段大小与预计相符（图 3）。测序分析结果显示阅读框无误，表明质粒构建成功。



M1. DL10000 DNA 分子标准；M2. DL2000 DNA 分子标准；1. pGBKT7-HOXA11 *Nde* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切鉴定；2. pGBKT7-HOXA11 质粒

图 3 诱饵质粒酶切鉴定

Fig.3 Verification of the bait plasmid by restriction enzyme digestion

2.3 诱饵质粒毒性与自激活检测

将转化 pGBKT7-HOXA11 的酵母菌同对照（转化 pGBKT7 的酵母菌）分别在 SD/-Trp 平板上培养后，发现二者的生长没有明显差别。结果表明诱饵质粒在酵母细胞中无毒性。

将共转化 pGBKT7-HOXA11 和 pGADT7 的酵母菌同阳性对照（共转化 pGBKT7-53 和 pGADT7-T 的酵母菌）以及阴性对照（共转化 pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T 的酵母菌）分别在三种营养缺陷型培养基平板上培养，发现含 pGBKT7-HOXA11 和 pGADT7 的酵母菌同阴性对照一样可以在 SD/-Leu-Trp 平板上正常生长，而在 SD/-Leu-Trp-His、SD/-Leu-Trp-His-Ade 平板上不能生长（图 4）。结果表明诱饵质粒无自激活活性。

2.4 酵母双杂交筛选及阳性克隆回转验证

将含 pGBKT7-HOXA11 的 AH109 酵母菌同 Y187 文库杂交，经过 3 次营养缺陷型培养基的初步筛选，获得了 6 个阳性克隆。将这 6 个阳性克隆进行回转验证，最终得到了 5 个阳性克隆（图 4）。通过对阳性克隆进行测序和序列比对分析，得到了 5 个与 HOXA11 相互作用蛋白（表 2）。在这 5 个蛋白中，3 个是功能已知蛋白，2 个是功能未知蛋白。

表 2 酵母双杂交筛选到的阳性克隆

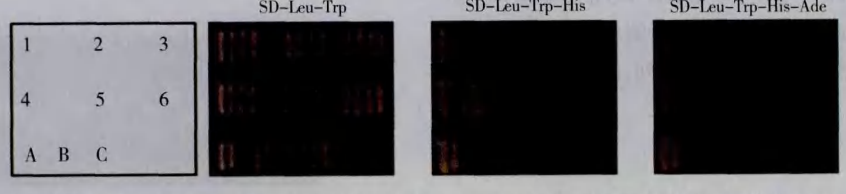
Tab.2 Positive clones identified by yeast two-hybrid

克隆编号	蛋白名称	功能描述
1	ACTG1	actin gamma 1，参与细胞运动和维持细胞骨架
2	USP11	ubiquitin specific peptidase 11，去泛素化酶
3	未知功能蛋白	
4	ATAD5	ATPase family, AAA domain containing 5，调控 DNA 复制和重组以及维持基因组稳定性
5	未知功能蛋白	

3 讨 论

酵母双杂交是研究蛋白质相互作用的主要方法之一，可用来筛选与某一已知蛋白或结构域相互作用的新蛋白。虽然该方法存在着一定的局限性，比如不能检测到需要翻译后加工才能相互作用的蛋白，但仍然是从 cDNA 文库中寻找新的相互作用蛋白的有效方法[11]。目前鉴定的几个 HOX 相互作用蛋白，如 Geminin、YY1、Smad1 和 Smad5 等，都是通过酵母双杂交筛选得到的[12-15]。本研究通过构建均一化的人肾透明细胞腺癌 cDNA 文库，利用酵母双杂交技术筛选到 3 个与 HOXA11 相互作用的候选蛋白，为研究 HOXA11 调控的分子机制奠定了基础。

在子宫发育过程中，Hoxa11 通过调控细胞周期基因 cyclin E 和 p27 的表达，调控子宫基质细胞增殖[4]。近年来，许多研究表明 HOXA11 在一些肿瘤中的表达水平明显低于正常组织。在肺癌细胞中过表达 HOXA11 抑制细胞的增殖和迁移，表明 HOXA11 可能扮演着肿瘤抑制因子的角色[7]。但是 HOXA11 作用的分子机制目前尚不清晰。本研究筛选到的一



1~6. 酵母双杂交阳性克隆；A. 共转 pGBKT7-53 和 pGADT7-T 的酵母菌（阳性对照）；B. 共转 pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T 的酵母菌（阴性对照）；C. 共转 pGBKT7-HOXA11 和 pGADT7 的酵母菌（自激活检测）

图 4 诱饵质粒自激活检测及酵母双杂交阳性克隆回转验证

Fig.4 Test of autoactivation for bait plasmid and verification of positive interactions

个与 HOXA11 相互作用蛋白是 ATAD5。ATAD5 是酵母 Elg1 的人类同源蛋白，Elg1 是调控 DNA 复制、DNA 重组、端粒长度和维持基因组稳定性的重要因子[16-17]。在细胞中，ATAD5 可募集泛素特异蛋白酶 1（USP1）及其相关因子 UAF1 调控增殖细胞核抗原的去泛素化[18]。ATAD5 功能缺陷会降低 DNA 复制率，延迟细胞周期进程[19]。此外，Atad5 基因杂合缺失小鼠表现出高度的基因组不稳定性，90%的小鼠罹患肉瘤癌、基底细胞癌或腺癌[20]。HOXA11 可能与 ATAD5 作用参与调控细胞周期进程以及维持基因组的稳定。

USP11 是泛素水解酶家族成员之一，能将泛素分子特异性地从靶蛋白上水解下来，起到去泛素化的作用，对蛋白降解进行反向调节。研究表明，USP11 通过对 BRCA2 进行去泛素化，参与 DNA 损伤修复[21]。此外，USP11 可通过调控 IκBα 的泛素化水平，参与 NF-κB 信号通路[22]。本研究通过酵母双杂交筛选及回转验证确定 USP11 和 HOXA11 存在着相互作用，说明在细胞内 USP11 可能对 HOXA11 进行去泛素化，增强 HOXA11 的稳定性，参与调控许多重要的生物进程。

酵母细胞是简单的真核细胞，其蛋白质加工、修饰类型及程度与哺乳动物的相应过程有一定差异，因此酵母双杂交的结果仅仅是提示相互作用的可能性。后期将利用 Co-IP、Pull-down 的方法对 HOXA11 与 ATAD5 和 USP11 的相互作用进行验证，确定 HOXA11 是否通过与它们相互作用参与调控个体发育以及癌症发生发展过程。

参 考 文 献

[1] Carroll SB. Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates[J]. Nature, 1995, 376(6540): 479-485.

[2] Müller M, Affolter M, Leupin W, et al. Isolation and sequence-specific DNA binding of the Antennapedia homeodomain[J]. EMBO J, 1988, 7(13): 4299-4304.

[3] Mann RS, Affolter M. Hox proteins meet more partners[J]. Curr Opin Genet Dev, 1998, 8(4): 423-429.

[4] Wong KH, Wintch HD, Capecchi MR. Hoxa11 regulates stromal cell death and proliferation during neonatal uterine development[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(1): 184-193.

[5] Thompson AA, Nguyen LT. Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation[J]. Nat Genet, 2000, 26(4): 397-398.

[6] Whitcomb BP, Mutch DG, Herzog TJ, et al. Frequent HOXA11 and THBS2 promoter methylation, and a methylator phenotype in endometrial adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(6): 2277-2287.

[7] Hwang JA, Lee BB, Kim Y, et al. HOXA11 hypermethylation is associated with progression of non-small cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2013, 4(12): 2317-2325.

[8] Cui Y, Gao D, Linghu E, et al. Epigenetic changes and functional study of HOXA11 in human gastric cancer[J]. Epigenomics, 2015, 7(2): 201-213.

[9] Fiegl H, Windbichler G, Mueller-Holzner E, et al. HOXA11 DNA methylation-a novel prognostic biomarker in ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2008, 123(3): 725-729.

[10] Skiriutė D, Vaitkienė P, Ašmonienė V, et al. Promoter methylation of AREG, HOXA11, hMLH1, NDRG2, NPTX2 and Tes genes in glioblastoma[J]. J Neurooncol, 2013, 113(3): 441-449.

[11] 邱志刚，除兆师，郑天慧，等. 小麦 ERF 转录因子 W17 互作蛋白的筛选和解析[J]. 作物学报，2011，37(5)：803-810.

[12] Luo L, Yang X, Takihara Y, et al. The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions[J]. Nature, 2004, 427(6976): 749-753.

[13] Luke MP, Sui G, Liu H, et al. Yin Yang 1 physically interacts with Hoxa11 and represses Hoxa11-dependent transcription[J]. J Biol Chem, 2006, 281(44): 33226-33232.

[14] Shi X, Yang X, Chen D, et al. Smad1 interacts with homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling[J]. J Biol Chem, 1999, 274(19): 13711-13717.

[15] Williams TM, Williams ME, Heaton JH, et al. Group 13 HOX proteins interact with the MH2 domain of R-Smads and modulate Smad transcriptional activation functions independent of HOX DNA-binding capability[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(14): 4475-4484.

[16] Banerjee S, Myung K. Increased genome instability and telomere length in the elg1-deficient Saccharomyces cerevisiae mutant are regulated by S-phase checkpoints[J]. Eukaryot Cell, 2004, 3(6): 1557-1566.

[17] Smolikov S, Mazor Y, Krauskopf A. ELG1, a regulator of genome stability, has a role in telomere length regulation and in silencing[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(6): 1656-1661.

[18] Lee KY, Yang K, Cohn MA, et al. Human ELG1 regulates the level of ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA) through Its interactions with PCNA and USP1[J]. J Biol Chem, 2010, 285(14): 10362-10369.

[19] Lee KY, Fu H, Aladjem MI, et al. ATAD5 regulates the lifespan of DNA replication factories by modulating PCNA level on the chromatin[J]. J Cell Biol, 2013, 200(1): 31-44.

[20] Bell DW, Sikdar N, Lee KY, et al. Predisposition to cancer caused by genetic and functional defects of mammalian Atad5[J]. PLoS Genet, 2011, 7(8): e1002245.

[21] Schoenfeld AR, Apgar S, Dolios G, et al. BRCA2 is ubiquitinated in vivo and interacts with USP11, a deubiquitinating enzyme that exhibits prosurvival function in the cellular response to DNA damage[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(17): 7444-7455.

[22] Sun W, Tan X, Shi Y, et al. USP11 negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation by targeting on IkappaBalpha[J]. Cell Signal, 2010, 22(3): 386-394.

（责任编辑：张辉洁）