

## 邻近标记技术在膜蛋白相互作用中的研究进展

裴欣<sup>1,2</sup>, 李贵登<sup>2\*</sup>, 储卫华<sup>1\*\*</sup><sup>(1)</sup> 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198; <sup>(2)</sup> 中国医学科学院苏州系统医学研究所, 苏州 215123)

**摘要** 膜蛋白是细胞多种生命活动的主要承担者, 膜蛋白之间的相互作用参与调控细胞间的接触与信号传递, 并与细胞的分化、成熟息息相关。因此, 开发多种深入解析膜蛋白之间相互作用的方法具有重要的理论与现实意义。除了传统的免疫共沉淀方法之外, 新开发的邻近标记技术已经逐渐成为了研究膜蛋白相互作用的重要手段。邻近标记技术主要利用生物工具酶标记与诱饵蛋白相互作用的邻近蛋白, 并通过流式细胞术、质谱以及共聚焦显微成像技术等方法检测膜蛋白之间的相互作用。本文着重介绍了近些年来新开发的用于研究膜蛋白相互作用的多种邻近标记技术, 并展望了该类技术在膜蛋白相互作用领域未来的发展前景。

**关键词** 邻近标记技术; 细胞膜蛋白; 膜蛋白相互作用; 工具酶

中图分类号 Q26 文献标志码 A

文章编号 1000-5048(2024)02-0158-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023041303

引用本文 裴欣, 李贵登, 储卫华. 邻近标记技术在膜蛋白相互作用中的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(2): 158 – 166.

Cite this article as: PEI Xin, LI Guideng, CHU Weihua. Progress of proximity labeling technology in membrane protein interaction[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(2): 158 – 166.

## Progress of proximity labeling technology in membrane protein interaction

PEI Xin<sup>1,2</sup>, LI Guideng<sup>2\*</sup>, CHU Weihua<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup>School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; <sup>2</sup>Suzhou Institute of Systems Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Suzhou 215123, China

**Abstract** Membrane proteins, which play a critical role in various life processes, particularly in regulating cell-cell contact and signal transduction, are closely linked to cell differentiation and maturation. Therefore, it is of great theoretical and practical significance to develop a variety of methods to thoroughly explore the interactions between membrane proteins. In addition to traditional techniques such as immunoprecipitation, newly developed proximity labeling (PL) techniques have gradually become important means to study membrane protein interaction. PL methods are based on engineered enzymes fused with bait protein to catalyze small molecules, label neighboring target proteins, and detect the interactions by flow cytometry, mass spectrometry, confocal microscopic imaging, etc. This paper focuses on the recent developments in PL techniques for studying membrane protein interactions, with a prospect of the potential future directions for research in this area.

**Key words** proximity labeling; cell membrane protein; membrane protein interaction; engineered enzyme

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81972875, No.32270994) and the Natural Science Foundation Outstanding Youth Fund of Jiangsu Province (No. BK20211505)

膜蛋白是细胞各种生命活动的重要参与者, 并通过膜蛋白间的相互作用发挥其功能, 因此深入研究膜蛋白相互作用对探究细胞调节机制和细胞信号通路的传导具有重要意义。传统的膜蛋白相互作用研究方法可能会破坏膜蛋白结构, 遗漏某些膜蛋白相互作用。近些年来, 邻近标记技术(proximity

收稿日期 2023-04-13 通信作者 \*Tel: 13921443283 E-mail: chuweihua@cpu.edu.cn

\*\*Tel: 0512-62875052 E-mail: guidengl\_ism@163.com

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32270994, No. 81972875); 江苏省杰出青年基金项目 (No. BK20211505)

labeling, PL)得以快速发展,并随着生物化学及酶化学领域多种生物催化酶的不断发现,开发出多种研究膜蛋白相互作用的方法,弥补了传统研究方法的不足。

## 1 膜蛋白的相互作用

膜蛋白是一类以嵌入、贯穿或完全暴露的方式定位在细胞膜或细胞器膜上的蛋白<sup>[1]</sup>。根据其整合方式可将膜蛋白进一步分为外周膜蛋白、整合膜蛋白和脂锚定蛋白<sup>[2]</sup>。在人类基因组中,编码膜蛋白的基因占基因组中编码蛋白基因的 20%~30%<sup>[3]</sup>,其表达产物包括糖蛋白<sup>[4]</sup>、载体蛋白<sup>[5]</sup>和酶<sup>[6]</sup>等。膜蛋白参与调控多种生物功能,包括信号转导<sup>[7]</sup>、跨膜转运<sup>[8]</sup>、细胞黏附<sup>[9]</sup>、催化胞内生化反应<sup>[10]</sup>、细胞稳态调节<sup>[11]</sup>、免疫识别<sup>[12]</sup>和能量产生<sup>[13]</sup>等,在细胞生命过程中扮演重要角色。同时,膜蛋白发挥功能不仅与其自身功能相关,而且也通过彼此的相互作用参与调控细胞的多种生理过程<sup>[14-15]</sup>。因此,采取多种方法探究膜蛋白之间的相互作用,对深入研究细胞内生理生化过程、探究细胞内结构以及疾病治疗靶点预测等方面具有重要的意义<sup>[16]</sup>。

## 2 传统的膜蛋白相互作用研究方法

由于膜蛋白的跨膜结构具有很强的疏水性,所以膜蛋白的提取纯化较困难,而且膜蛋白与其互作蛋白间的相互作用时间较短且作用力微弱,这就增加了探索膜蛋白间相互作用的难度。传统的鉴定膜蛋白相互作用的方法主要包括免疫共沉淀技术(Co-IP)<sup>[17]</sup>、融合蛋白沉降技术(pull-down)<sup>[18]</sup>、质谱技术<sup>[19]</sup>、噬菌体展示技术<sup>[20]</sup>以及酵母双杂交技术<sup>[21]</sup>等等。其中结合质谱的免疫共沉淀技术与蛋白沉降技术灵敏度较低,可能无法检测到低亲和力或瞬时的蛋白相互作用,使得该类方法不完全适用于膜蛋白相互作用的鉴定。近年来,以噬菌体、酵母为载体的膜蛋白展示技术成为了研究膜蛋白相互作用的有力工具。

### 2.1 噬菌体展示技术

1985 年,George Smith 首创了噬菌体展示技术,并将其用于多肽或蛋白的展示。目前该技术已成为一种研究膜蛋白相互作用的经典方法<sup>[22-23]</sup>,其原理是利用基因工程将外源编码多肽或蛋白的基因插入到噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置,使

外源多肽或蛋白与噬菌体外壳蛋白形成融合蛋白而被展示在噬菌体表面(图 1-A)<sup>[24]</sup>。展示在噬菌体表面的蛋白仍然具有相对独立的空间结构和生物活性,当与其固相靶蛋白识别并结合后,通过收集结合的噬菌体即可进一步测序得到与靶蛋白结合的蛋白序列信息<sup>[25]</sup>。得益于噬菌体的个体微小、增殖能力强等特点,噬菌体展示技术的筛选周期较短<sup>[26]</sup>,经过多轮筛选后,可高效富集与配体结合的蛋白。但是,噬菌体展示技术需要经过细菌转化、噬菌体包装等过程,这也限制了其文库容量与展示分子的多样性。其次,噬菌体的宿主大肠埃希菌的生物合成系统有自身的表达限制,其蛋白合成、折叠以及修饰机制不同于真核细胞,这可能影响真核膜蛋白与其共配体相互作用,从而降低筛选结果的准确度<sup>[27]</sup>。

### 2.2 分裂泛素化酵母双杂交展示系统

酵母表面展示系统是继噬菌体展示技术之后快速发展并得到广泛应用的一种真核蛋白展示系统。作为一种真核模式细胞,酵母的翻译后修饰机制更接近于哺乳动物细胞的蛋白修饰机制,使其能够产生与哺乳动物细胞的天然蛋白相同或高度相似的复杂蛋白,从而克服了噬菌体展示技术的部分不足<sup>[28]</sup>。酵母双杂交系统是将编码两个待测蛋白的基因分别与酵母细胞的 DNA 结合域或转录激活域相融合,通过检测在酵母细胞中报告基因的表达情况而对目的蛋白的相互作用进行鉴定的一种技术。但是传统的酵母双杂交系统并不适合研究无法被转运入核的蛋白,如膜蛋白。为解决这一问题,基于分裂的泛素蛋白再重组的膜酵母双杂交系统被开发出来。在膜酵母双杂交系统中,泛素被分为两部分,分别与诱饵蛋白和目的蛋白融合表达后在酵母细胞中杂交,通过诱饵蛋白和目的蛋白的相互作用而形成完整的泛素蛋白,从而被泛素特异性蛋白酶(ubiquitin-specific protease, UBP)识别并剪切,释放转录因子并激活报告基因的表达以反映膜蛋白间的相互作用<sup>[29]</sup>(图 1-B)。该方法对仪器要求低且通量较高,还避免了蛋白提纯引起的蛋白变性问题,但是该系统中诱饵蛋白和目的蛋白的过度表达很容易导致假阳性结果<sup>[30]</sup>。

## 3 邻近标记技术

虽然传统的膜蛋白相互作用研究方法已被广

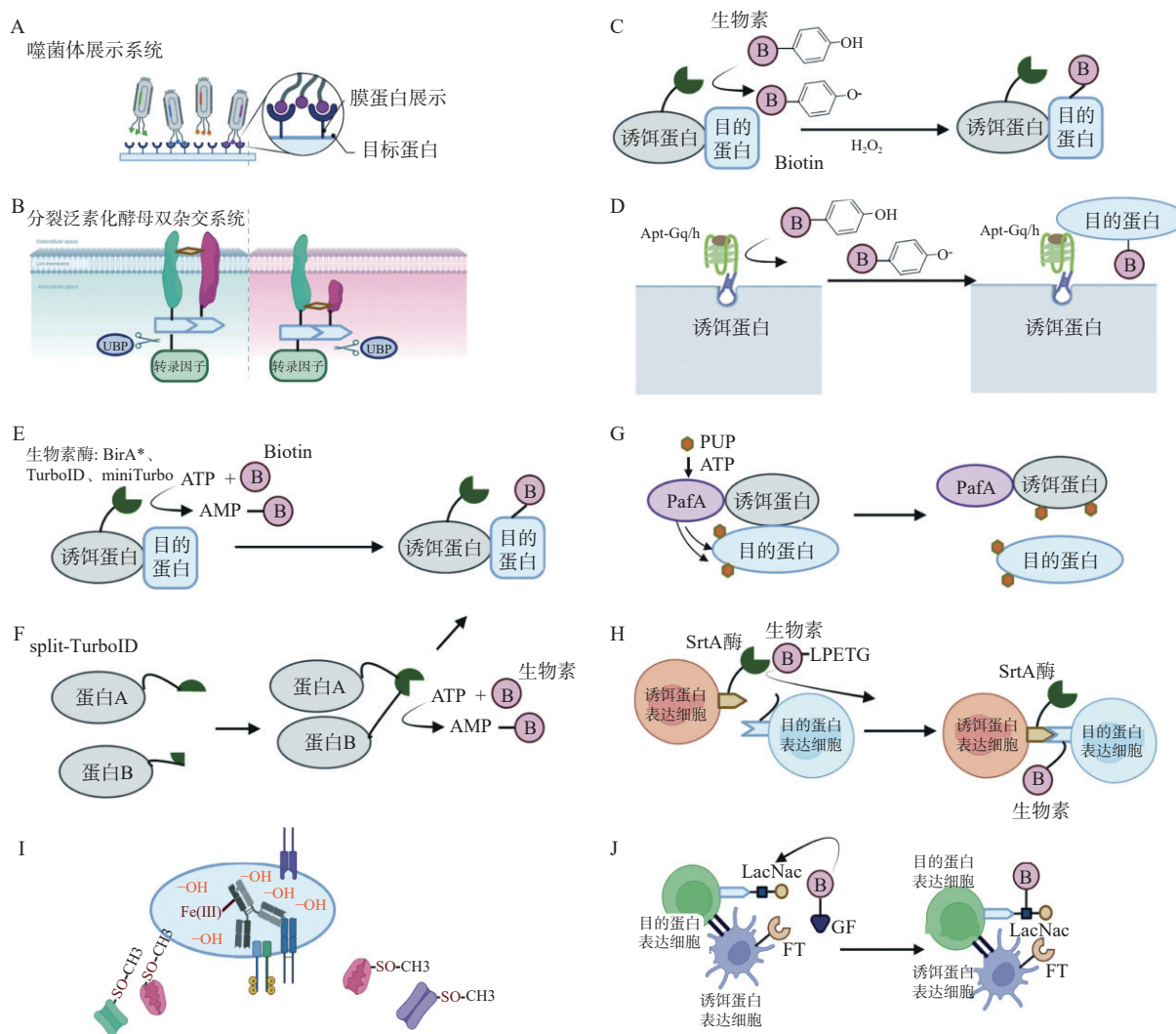


图 1 几种传统的膜蛋白相互作用研究方法与邻近标记技术

传统膜蛋白相互作用研究方法: (A)噬菌体展示技术; (B)分裂泛素化酵母双杂交系统; (C)基于过氧化物酶 APEX 的邻近标记技术; (D)基于 Apt-Gq/h (Aptamer against POI G-quadruplex/hemin, G-四链体-血红素复合物) 的邻近标记技术; (E)基于生物素连接酶的邻近标记技术, 包括 BirA\*, TurboID, miniTurbo; (F)基于分裂型生物素连接酶的 Split-TurboID 邻近标记技术; (G)基于细菌蛋白 PUP 连接酶 PafA (Proteasome accessory factor A, 蛋白酶体辅助因子 A) 的邻近标记技术; (H)基于 SrtA (Sortase A, 转肽酶) 的邻近标记技术; (I)基于 FT [*H. pylori* (1, 3) Fucosyltransferase, 岩藻糖基转移酶] 的邻近标记技术; (J)基于 Fe(III) 催化探针的邻近标记技术

泛使用,但它们仍存在一定的局限性,无法适用于各种类型的膜蛋白间相互作用的鉴定或筛选。为了准确全面地研究膜蛋白相互作用,一类以化学催化为基础的邻近标记技术被开发出来,并被应用于膜蛋白相互作用的研究中。邻近标记技术使用生物工具酶以及小分子探针对与特定的诱饵蛋白发生相互作用的目的蛋白进行共价标记<sup>[31]</sup>。邻近标记技术应用了多种生物工具酶,按照类型可分为过氧化物酶<sup>[32]</sup>和生物素连接酶,包括抗坏血酸过氧化物酶 (engineered ascorbate peroxidase, APEX)<sup>[33]</sup>、BirA\*及其突变体<sup>[34-37]</sup>等。这些生物工具酶能够将

惰性底物催化为半衰期短的活性小分子,促使它们定向扩散到邻近的标记位点上。在这些小分子与标记位点结合后,研究者可以通过流式细胞术<sup>[37]</sup>、激光扫描共聚焦显微镜成像<sup>[38]</sup>、质谱<sup>[39]</sup>等方法对被标记的膜蛋白进行测定<sup>[40-41, 31]</sup>。

接下来,将介绍邻近标记技术为基础的膜蛋白相互作用研究方法,并总结归纳它们各自的优点与不足之处(表 1)。

### 3.1 基于生物素连接酶的邻近标记技术

基于生物素连接酶的邻近标记技术通过在诱饵蛋白上融合一个具有特定催化活性的生物素连

表 1 传统的膜蛋白相互作用研究方法与邻近标记技术的优缺点及应用方向

分 类	研究方法	优 点	不 足	应用方向
传统的膜蛋白相互作用研究方法	噬菌体展示技术	操作简单, 筛选周期短	文库容量与多样性受限, 蛋白合成等机制与真核细胞不同	抗原表位筛选、抗体与疫苗制备等
	分裂泛素化酵母双杂交展示系统	通量高, 对仪器要求低, 适用于真核细胞蛋白的研究	易因蛋白过度表达导致假阳性结果	真核细胞蛋白相互作用研究、膜蛋白文库筛选等
基于生物素连接酶的邻近标记技术	BioID邻近标记技术	无细胞毒性, 适用于细胞膜蛋白弱相互作用研究	共孵育时间长、反应所需生物素浓度高	弱相互作用或瞬时相互作用筛选、蛋白互作网络构建等
	基于TurboID的邻近标记技术	标记速度快、标记半径大	产生一定的细胞毒性、易因内源性生物素导致非特异背景	低丰度膜蛋白相互作用、细胞筛选等
	基于miniTurbo的邻近标记技术	灵敏度与适用范围高于基于TurboID的邻近标记技术	生物素化活性低于TurboID	信号通路与信号转导研究
	基于分裂型生物素连接酶的Split-TurboID邻近标记技术	能够有效展示膜蛋白重组与相互作用的过程	易因酶的空间位阻造成假阴性结果	细胞膜蛋白或细胞器膜蛋白间相互作用等
基于过氧化物酶的邻近标记技术	基于抗坏血酸过氧化物酶APEX的邻近标记技术	催化标记效率高于BioID和基于TurboID的邻近标记技术	体系中引入了H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 易产生细胞毒性, 导致细胞氧化应激	目标蛋白互作网络构建、空间转录组分析等
	基于G-四链体/血红素复合物Apt-Gq/h的邻近标记技术	复合物制备方便, 相对分子质量小能够避免空间位阻导致的假阴性结果	受含酚底物标记半径限制	活细胞与组织切片胞间连接检测、生物标志物扩增检测等
基于其他工具酶的邻近标记技术	基于细菌蛋白PUP连接酶PafA的邻近标记技术	细胞毒性小, 能通过胞内遗传表达的方式应用于活体动物体内研究	不适于细胞器膜蛋白相互作用的研究, 且连接酶存在自我修饰情况, 易致自身失活与底物耗尽	胞间与活体动物体内的细胞膜蛋白相互作用检测
	基于转氨酶SrtA的邻近标记技术	底物易合成, 可结合多种标签, 且该反应细胞毒性低	催化速度慢, 需要较高浓度多肽底物维持可逆反应进行	胞间与活体动物体内细胞膜蛋白相互作用研究
	基于岩藻糖基转移酶FT的邻近标记技术	特异性高, 操作简单, 具有临床治疗 应用的潜力	标记时间较TurboID、APEX等更长, 标记范围小	抗原特异性T细胞的筛选与捕捉
基于小分子催化探针的邻近标记技术	基于Fe(Ⅲ)催化探针的邻近标记技术	该邻近标记技术的特异性高	底物H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 可能破坏膜蛋白, 且外因导致的蛋白氧化易造成假阳性结果	细胞膜蛋白参与的蛋白相互作用网络研究

接酶,并在孵育体系中加入其小分子底物——生物素,催化与诱饵蛋白发生相互作用的邻近蛋白发生生物素化修饰。最后,利用链霉素亲和素对生物素标记的蛋白进行富集与分析,即可获得与诱饵蛋白相互作用的蛋白信息<sup>[42]</sup>。

**3.1.1 基于生物素连接酶 BirA\*和 TurboID 的邻近标记技术** Roux 等<sup>[43]</sup>开发了一种能在活细胞中研究膜蛋白相互作用的邻近标记系统,称为 BioID。该系统利用一种高灵敏、高特异性的生物素连接酶 BirA\*,即大肠埃希菌连接酶 BirA 的 R118G 突变体,催化与诱饵蛋白发生相互作用的邻近蛋白生物素化。May 等<sup>[44]</sup>将生物素连接酶与诱饵蛋白相融合,并在体系中添加生物素底物。当诱饵蛋白与目的蛋白结合后,邻近的生物素底物被催化为高活性分子生物素酰-5'腺苷酸,并共价结合到目的蛋白的赖氨酸残基上而完成标记(图 1-E)。而后通过对生物素化的蛋白进行质谱分析,即可获得目的蛋白的信息。BioID 邻近标记技术能够鉴定细胞膜蛋白间的弱相互作用,且由于生物素-亲和素连接具有

高亲和力,通过多次洗涤的方式可以降低非特异性蛋白结合<sup>[45]</sup>,而且 BirA\*的细胞毒性较小,适用于活细胞膜蛋白相互作用的研究。但该方法所依赖的生物素连接酶突变体活性不高,通常要共孵育 16 h 以上才能成功标记,且体系中需添加高浓度的生物素。

在 BirA\*的基础上,Branon 等使用易错 PCR 技术生成突变体文库,利用酵母表面展示定向进化筛选改良的生物素连接酶。经过多轮筛选,得到了一种有 15 个突变的生物素连接酶,被称为 TurboID。TurboID 的活性要优于 BirA\*,仅用 10 min 即可在室温下完成蛋白的共价标记,且标记半径更大<sup>[46]</sup>。但是在某些情况下,TurboID 会产生一定细胞毒性,且标记结果中存在由内源性生物素导致的非特异标记。在对 BirA\*进行 13 个氨基酸位点突变并去掉一些 N 端序列后,得到了一个相对分子量更小的生物素连接酶——miniTurbo<sup>[37]</sup>。虽然 miniTurbo 的生物素化活性略低于 TurboID,但在无外源生物素添加的情况下,它的非特异性标记更少,背景更

干净,适用于有精确控制标记时间要求的细胞膜蛋白相互作用研究。

**3.1.2 基于分裂型生物素连接酶的 Split-TurboID 邻近标记技术** 在细胞的生理生化活动中,细胞器膜蛋白间的接触与信号传递也是一个重要的组成部分。为了提高邻近标记技术的特异性与多功能性,满足对细胞器膜蛋白相互作用的研究需求,Cho 等<sup>[6]</sup>开发了一种将生物素连接酶分裂为两个无活性的小分子的邻近标记技术,称为 Split-TurboID。他们将 TurboID 分裂后的两个无活性小分子片段分别与 FK506 结合蛋白(FK506 binding protein, FKBP)和 FKBP 雷帕霉素结合蛋白(FKBP-rapamycin binding, FRB)融合,过表达在两种细胞上,而后在体系中加入雷帕霉素,诱导 FRB-FKBP 二聚体的形成,促进小分子蛋白重组为 TurboID,并催化生物素分子共价连接到邻近的蛋白上(图 1-F)。最后通过共聚焦荧光成像对标记结果进行验证,再以链霉素亲和素磁珠富集并通过质谱分析细胞器膜蛋白相互作用情况。利用这一工具,Cho 等标记并探究了胞内线粒体与内质网的膜蛋白组成情况,并获得了若干个内质网-线粒体膜蛋白接触位点。Split-TurboID 在研究胞内离子运输<sup>[6]</sup>、线粒体分裂<sup>[6]</sup>和甾醇代谢<sup>[6]</sup>等方面发挥着重要的作用。然而,与基于 TurboID 的邻近标记技术类似,Split-TurboID 也存在因生物工具酶自身的空间位阻而造成假阴性结果的情况。

除了上述所介绍的几种生物素连接酶外,BirA\*的优化酶 BioID2<sup>[44]</sup>、AirID<sup>[47]</sup>、BASU<sup>[44]</sup>等也逐渐被开发出来,不断提高邻近标记技术的灵敏度,拓宽其应用范围。

### 3.2 基于过氧化物酶的邻近标记技术

在基于生物素连接酶的邻近标记技术中,生物素连接酶往往在与诱饵蛋白融合后发挥作用,但生物素连接酶分子本身的空间位阻会对膜蛋白间相互作用产生影响<sup>[48]</sup>,且生物素连接酶进行标记所花的时间较长。为了降低酶分子位阻对膜蛋白相互作用的影响,同时提高标记效率,研究者们开发了一系列基于过氧化物酶的邻近标记技术。

**3.2.1 基于抗坏血酸过氧化物酶 APEX 的邻近标记技术** APEX 是除生物素连接酶 BirA\*外的另一种常用工具酶。APEX 在与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及生物素-苯酚共孵育时,能够利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 将生物素-苯酚活化为活性

苯氧自由基,该自由基优先标记富含酪氨酸残基的相邻蛋白,在短短 1 min 内就能够将诱饵蛋白半径 20 nm 范围内的邻近蛋白生物素化<sup>[49]</sup>。利用 APEX 的邻近标记功能,Hung 等<sup>[49]</sup>构建了一种线粒体膜蛋白标记体系,他们将 APEX 与膜内丝氨酸  $\beta$ -内酰胺酶样蛋白 (serine  $\beta$ -lactamase-like protein, LACTB) 相融合,再将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与生物素-苯酚加入胞内,催化苯氧自由基的生成,标记邻近的内源性蛋白(图 1-C),最后通过质谱鉴定与线粒体膜蛋白发生相互作用的蛋白。APEX 的催化效率远高于 BirA\*和 TurboID,且相对分子质量小于生物素连接酶,其空间位阻更小,对膜蛋白间相互作用的影响更小<sup>[50]</sup>。但是 APEX 的反应过程需要 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的参与,易产生细胞毒性,引起细胞氧化应激。

**3.2.2 基于 G-四链体/血红素复合物 Apt-Gq/h 的邻近标记技术** 在基于 APEX 的邻近标记过程中,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的加入可能影响胞内氧化还原平衡从而产生细胞毒性,因此研究者们一直在不断尝试开发细胞毒性低的邻近标记方法。Yang 等<sup>[51]</sup>构建了一种基于核酸的类辣根过氧化物酶工具,用于邻近标记技术的建立,该工具被称为 Apt-Gq/h (Aptamer against POI G-quadruplex/hemin)。Gq/h,即 G-四链体/血红素复合物,它被锚定在诱饵蛋白上,催化含酚底物产生苯氧自由基,共价标记与诱饵蛋白发生相互作用的目的蛋白(图 1-D)。研究者可通过对被标记的蛋白进行亲和力和富集与蛋白组学分析,获得膜蛋白相互作用的信息。Apt-Gq/h 系统能够识别膜蛋白细微的定量变化,可进一步用于活细胞或组织切片中胞间连接以及生物标志物扩增检测。Gq/h 分子经一步组装即可完成,制备方便,热稳定性好,其自身较小的相对分子质量也避免了因空间位阻引起的假阴性结果。但是受含酚底物标记半径的影响,该系统难以用于细胞膜蛋白相互作用的精确研究。

### 3.3 基于其他生物工具酶的邻近标记技术

邻近标记技术在细胞生物学研究中被广泛使用,但是常用的两类生物工具酶都有各自的局限性: BirA\*及一系列优化的生物素连接酶具有较大的空间位阻,而过氧化物酶则需要在反应体系中添加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,易产生细胞毒性。随着生物化学和邻近化学标记的不断发展,其他一些具有共价标记能力的工具酶也逐渐应用到邻近标记技术中。

**3.3.1 基于细菌蛋白 Pup 连接酶 PafA 的邻近标记技术** 研究人员在细菌内发现一种叫做 Pup 的小分子蛋白, 该蛋白由 64 个氨基酸组成, 其 C 端带有由甘氨酸(G, Gly)-甘氨酸-谷氨酰胺(Q, Gln)三氨基酸组成的末端残基<sup>[52]</sup>。在细菌内, Pup 最末端的 Gln 脱氨形成 Glu, 成为 PUP(E), 在 ATP 的辅助下, 被 Pup 连接酶——蛋白酶体辅助因子 A(proteasome accessory factor A, PafA)催化磷酸化, 并共价连接到邻近蛋白的赖氨酸残基侧链上。利用该反应过程, Liu 等<sup>[52]</sup>开发了一种全新的邻近标记系统并命名为 PUP-IT(pupylation-based interaction tagging)。他们将 PafA 蛋白与诱饵蛋白融合, 以 Pup 为底物, 标记与诱饵蛋白发生相互作用的目的蛋白, 实现对膜蛋白相互作用的捕捉(图 1-G)。利用该系统, 他们以细胞膜上 CD28 蛋白为研究对象, 鉴定得到多个已知可与 CD28 发生相互作用的蛋白, 同时也发现了大量目前未知但潜在的可能与 CD28 存在相互作用的细胞膜蛋白。PUP-IT 系统能够捕捉较弱的细胞膜蛋白相互作用, 且参与反应的各组分均可在细胞中表达, 能够通过基因转导的方式在活体动物体内表达并进行膜蛋白相互作用的研究。另外, 该系统的标记过程不需 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的参与, 细胞毒性小。但是底物 Pup 相对分子质量相对较大, 无法跨膜, 因此不能用于细胞器膜蛋白相互作用的鉴定。且 PUP-IT 系统中存在自我修饰的情况, 可能导致酶的失活与底物的耗尽, 在质谱分析中产生较大的非特异性背景。

**3.3.2 基于转氨酶 SrtA 的邻近标记技术** 细胞-细胞相互作用是生命过程中最基本的信息传递方式之一, 在免疫系统和神经系统的多种生理过程中承担着重要的角色<sup>[53]</sup>, 大多数的免疫反应都是通过细胞间的接触与信号交换来进行的, 细胞膜蛋白之间的相互作用就是其中一个重要途径。为了检测不同类型免疫细胞及其靶细胞间的膜蛋白相互作用, Pasqual 等<sup>[54]</sup>利用金黄色葡萄球菌分选酶 A(Sortase A, SrtA)和 5 个 N 端甘氨酸残基组成的标签(G5)构建了一种邻近标记方法, 称其为 LIPSTIC(Labelling Immune Partnerships by SorTagging Intercellular Contacts)。他们将 SrtA 和 G5 与不同的受体配体蛋白分别融合, 在 293T 细胞中过表达, 并以生物素-LPETG 肽作为标记底物。当在两种细胞因膜表面的受体配体作用而靠近时, SrtA

催化生物素-LPETG 肽与 G5 的共价连接, 以标记邻近细胞膜蛋白(图 1-H), 通过流式细胞术对生物素进行跟踪即可对细胞膜蛋白相互作用进行鉴定。利用 LIPSTIC 技术, 他们在体内和体外的情况下探究了树突状细胞(dendritic cell, DC)与 CD4<sup>+</sup>T 细胞间的相互作用。LIPSTIC 技术中的生物素底物易合成, 而且 SrtA 的细胞毒性低<sup>[55]</sup>, 适于动物体内进行活体研究。但是 SrtA 催化的共价连接是可逆的, 催化速度较慢, 且需要加入较高浓度的多肽底物来保证连接效率<sup>[56-57]</sup>。

**3.3.3 基于岩藻糖基转移酶 FT 的邻近标记技术** 邻近标记技术已经被广泛应用于膜蛋白相互作用以及空间蛋白组学的研究中, 但其在细胞间通讯方面的实际应用并不充分。下面, 介绍一种从细胞膜蛋白相互作用角度探究细胞间相互作用的技术。Wu 等<sup>[58]</sup>利用 DC 细胞能够吞噬、分解并呈递肿瘤抗原的特性, 构建了一种基于活细胞并以岩藻糖基转移酶 [*H. pylori* (1, 3)Fucosyltransferase, FT] 为核心的邻近标记技术, 为 FucoID。FT 可识别天然供体底物鸟苷二磷酸岩藻糖(guanosine 5'-diphosphofucose, GF)并将其与蛋白的偶联物转移到细胞膜的 N-乙酰乳糖胺(N-acetylglucosamine, LacNAc)上。利用这一反应, 研究者在 DC 上表达诱饵蛋白, 与化学合成的 GF-FT 复合物共孵育, 构建 DC-FT 细胞偶联物。当 DC 与表达目的蛋白的细胞发生相互作用后, FT 将生物素化的底物转移到表达目的蛋白的细胞表面的 LacNAc 上, 完成标记过程(图 1-I)。通过流式细胞术和 RNA 测序技术(RNA sequencing, RNA-Seq)即可鉴定细胞膜蛋白之间的相互作用。利用该技术, 研究者在黑色素瘤、乳腺癌和结肠癌模型中捕获了肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)反应性 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 并对其中的效应 T 细胞与旁观者 T 细胞加以区分。该系统能够兼容 MHC I 类和 MHC II 类分子, 特异性高且操作简单, 具有临床应用的潜力, 适用于原代细胞间相互作用的研究。但是与基于生物素连接酶或过氧化物酶的邻近标记技术相比, FucoID 标记所需时间较长, 且标记范围有限。

### 3.4 基于小分子催化探针的邻近标记技术

基于催化探针的邻近标记技术是一种依靠受体-配体蛋白相互作用进行标记的特异性邻近标记技术, 通过在受体与配体蛋白上分别结合标记反应基团和待标记氨基酸残基鉴定膜蛋白相互作用。

其标记过程与天然酶的邻近效应相似,在受体与配体蛋白足够接近的时候,通过小分子探针催化的共价交联反应即可实现蛋白的共价标记<sup>[59-60]</sup>。

基于 Fe(Ⅲ)催化探针的邻近标记技术就是这类邻近标记技术中的一种。在 Fe<sup>3+</sup>的催化作用下, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 被分解产生羟基自由基,氧化邻近的蛋白分子。结合羟基自由基蛋白印迹(hydroxyl radical protein footprint, HRPf)技术和邻近标记技术, Li 等<sup>[61]</sup> 构建了一种抗原抗体邻近标记方法(antigen-antibody proximity labeling, AAPL)。他们先将抗体通过共价修饰引入 Fe<sup>3+</sup>催化基团,构建 FeDBAb 抗体。而后,他们以 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATP 酶  $\alpha 1$  (ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting Subunit Alpha 1, ATP1A1)或表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)作为诱饵蛋白,将配对抗体加入培养液中与该蛋白特异性结合,在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在的情况下, Fe<sup>3+</sup>催化羟基自由基生成,氧化标记与诱饵蛋白发生相互作用的目的膜蛋白(图 1-J)。他们以两种细胞的正常蛋白氧化水平为标准,对细胞膜上蛋白氧化情况进行打分,得到了发生相互作用的目的膜蛋白库。通过该方法,研究者发现了与 ATP1A1 和 HER2 发生相互作用的已知的大部分膜蛋白,同时也发现了大量未知的具有相互作用的膜蛋白。该技术在研究细胞膜蛋白相互作用方面具有较高的特异性,适用于膜蛋白参与的蛋白相互作用网络的探究。但是该方法的标记反应需要 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 对细胞活力有一定影响。另外,其他因素导致的蛋白氧化也可能导致假阳性的标记结果。

#### 4 总结与展望

近年来,随着细胞膜蛋白相互作用在生理生化过程中的意义逐渐被人们所重视,多种邻近标记技术已经被开发出来,并被应用于细胞与细胞器膜蛋白相互作用的研究中。传统的邻近标记技术利用生物工具酶与诱饵蛋白融合,催化标记与诱饵蛋白发生相互作用的目的蛋白,其中生物素连接酶经过多代突变改良,其活性与标记效率有明显提高,但因相对分子质量大而产生的空间位阻仍可能对膜蛋白相互作用的鉴定造成一定影响。而过氧化物酶的标记效率高,空间位阻小,但其标记体系需要 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的参与,会产生细胞毒性。基于其他新开发催化酶与催化探针的邻近标记技术对传统的邻近标

记技术进行了补充,但也存在标记半径小、非特异性背景高等问题,仍具有改进的空间。随着分子生物学、生物化学与蛋白组学等学科的发展,细胞膜蛋白邻近标记技术由生物素与蛋白的共价连接向更丰富的方向发展,目前已出现利用金属离子催化氧化<sup>[61]</sup>、蛋白-糖基结合<sup>[58]</sup> 以及利用细菌蛋白进行邻近标记<sup>[52]</sup> 的方法。在生命科学的不断进步之下,还会有更多高特异性、高灵敏度的邻近标记技术被开发出来。

目前的邻近标记技术被广泛应用于信号通路分析、酶-底物相互作用研究、蛋白相互作用的解析以及对基因组特定位置的结合蛋白的分析等,但其在细胞相互作用领域的应用仍有较大发展空间。从这些邻近标记技术的应用方向中也可以发现,研究者们已经逐渐认识到它们在免疫学领域的应用价值,并开始在抗原特异性 TCR 筛选、抗体筛选等方面进行尝试。本文中基于 SrtA、岩藻糖基转移酶 FT 和 Fe(Ⅲ)催化探针的邻近标记技术在抗原特异性 T 细胞的筛选和肿瘤新靶点的获得的研究中具有巨大潜力,这也为未来邻近标记技术的构建与应用前景发展指引了方向。而且伴随着检测分析技术的发展,未来邻近标记技术将会通过与质谱技术、RNA-seq 技术、流式细胞术等技术相结合而不断进步,提高检测结果的准确性与灵敏度,获目的蛋白的基因序列信息,从分子水平上对膜蛋白相互作用进行更深一步的研究。

#### References

- [1] Nakamura K, Omori T, Ishikawa T. Shear-induced migration of a transmembrane protein within a vesicle[J]. *Biophys J*, 2019, **116**(8): 1483-1494.
- [2] Guo L, Wang SF, Li MY, et al. Accurate classification of membrane protein types based on sequence and evolutionary information using deep learning[J]. *BMC Bioinformatics*, 2019, **20**(Suppl 25): 700.
- [3] Suades A, Alcaraz A, Cruz E, et al. Structural biology workflow for the expression and characterization of functional human sodium glucose transporter type 1 in *Pichia pastoris*[J]. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 1203.
- [4] Simon F, Bork K, Gnanapragassam VS, et al. Increased expression of immature mannose-containing glycoproteins and sialic acid in aged mouse brains[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(24): 6118.
- [5] Krawczyk M, Pastuch-Gawolek G, Hadasik A, et al. 8-Hydroxyquinoline glycoconjugates containing sulfur at the sugar

- anomeric position-synthesis and preliminary evaluation of their cytotoxicity[J]. *Molecules*, 2020, **25**(18): 4174.
- [6] Cho KF, Branon TC, Rajeev S, *et al.* Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, **117**(22): 12143-12154.
- [7] Heenan PR, Yu H, Siewny MGW, *et al.* Improved free-energy landscape reconstruction of bacteriorhodopsin highlights local variations in unfolding energy[J]. *J Chem Phys*, 2018;148(12): 123313.
- [8] Roel-Touris J, Jiménez-García B, Bonvin AMJJ. Integrative modeling of membrane-associated protein assemblies[J]. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 6210.
- [9] Xu HJ, Zhang JR, Zhou YJ, *et al.* Mechanistic insights into membrane protein clustering revealed by visualizing EGFR secretion[J]. *Research*, 2022, **2022**: 9835035.
- [10] Kondrashov OV, Kuzmin PI, Akimov SA. Hydrophobic mismatch controls the mode of membrane-mediated interactions of transmembrane peptides[J]. *Membranes*, 2022, **12**(1): 89.
- [11] Xue MM, Cheng LS, Faustino I, *et al.* Molecular mechanism of lipid nanodisk formation by styrene-maleic acid copolymers[J]. *Biophys J*, 2018, **115**(3): 494-502.
- [12] Jenkins E, Santos AM, O'Brien-Ball C, *et al.* Reconstitution of immune cell interactions in free-standing membranes[J]. *J Cell Sci*, 2018, **132**(4): jcs219709.
- [13] Schenkel M, Treff A, Deber CM, *et al.* Heat treatment of thioredoxin fusions increases the purity of  $\alpha$ -helical transmembrane protein constructs[J]. *Protein Sci*, 2021, **30**(9): 1974-1982.
- [14] Anwar T, Samudrala G. Bioinformatics analysis and functional prediction of transmembrane proteins in *Entamoeba histolytica*[J]. *Genes*, 2018, **9**(10): 499.
- [15] Shi P, Li D, Chen HW, *et al.* In situ 19F NMR studies of an *E. coli* membrane protein[J]. *Protein Sci*, 2012, **21**(4): 596-600.
- [16] King C, Stoneman M, Raicu V, *et al.* Fully quantified spectral imaging reveals *in vivo* membrane protein interactions[J]. *Integr Biol*, 2016, **8**(2): 216-229.
- [17] Burckhardt CJ, Minna JD, Danuser G. Co-immunoprecipitation and semi-quantitative immunoblotting for the analysis of protein-protein interactions[J]. *STAR Protoc*, 2021, **2**(3): 100644.
- [18] Zhou Y, Hong W, Lu L. Imaging beads-retained prey assay for rapid and quantitative protein-protein interaction[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(3): e59727.
- [19] Boeri Erba E, Petosa C. The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes[J]. *Protein Sci*, 2015, **24**(8): 1176-1192.
- [20] Moreira GMSG, Köllner SMS, Helmsing S, *et al.* Pyruvate dehydrogenase complex-enzyme 2, a new target for *Listeria* spp. detection identified using combined phage display technologies[J]. *Sci Rep*, 2020,**10**(1): 15267.
- [21] Li QP, Wang S, Gou JY. A split ubiquitin system to reveal topology and released peptides of membrane proteins[J]. *BMC Biotechnol*, 2017, **17**(1): 69.
- [22] Beghetto E, Gargano N. Lambda-display: a powerful tool for antigen discovery[J]. *Molecules*, 2011, **16**(4): 3089-3105.
- [23] Beghetto E, Gargano N, Ricci S, *et al.* Discovery of novel *Streptococcus pneumoniae* antigens by screening a whole-genome lambda-display library[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **262**(1): 14-21.
- [24] Wu YT, Liu B, Liu ZW, *et al.* Construction, characterization, and application of a nonpathogenic virus-like model for SARS-CoV-2 nucleocapsid protein by phage display[J]. *Toxins*, 2022, **14**(10): 683.
- [25] Lu JC, Ge YM, Xu YH, *et al.* Screening of sperm antigen epitopes by phage display technique and its preliminary clinical application[J]. *Basic Clin Androl*, 2022, **32**(1): 22.
- [26] Liu TT, Li BJ, Jiang YY, *et al.* Screening and identification of novel specific markers of breast cancer stem cells[J]. *Oncol Lett*, 2019, **18**(3): 2262-2269.
- [27] Jaroszewicz W, Morcinek-Orłowska J, Pierzynowska K, *et al.* Phage display and other peptide display technologies[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2022, **46**(2): fuab052.
- [28] Kajiwara K, Aoki W, Ueda M. Evaluation of the yeast surface display system for screening of functional nanobodies[J]. *AMB Express*, 2020, **10**(1): 51.
- [29] Zhou J, Wang Z, Wang X, *et al.* Dicot-specific ATG8-interacting AT13 proteins interact with conserved UBAC2 proteins and play critical roles in plant stress responses[J]. *Autophagy*, 2018,**14**(3): 487-504.
- [30] Wang YW, Zhang S, Tang Y, *et al.* Screening of duck tembusu virus NS3 interacting host proteins and identification of its specific interplay domains[J]. *Viruses*, 2019, **11**(8): 740.
- [31] Qin W, Cho KF, Cavanagh PE, *et al.* Deciphering molecular interactions by proximity labeling[J]. *Nat Methods*, 2021, **18**(2): 133-143.
- [32] Mannix KM, Starble RM, Kaufman RS, *et al.* Proximity labeling reveals novel interactomes in live *Drosophila* tissue[J]. *Development*, 2019, **146**(14): dev176644.
- [33] Olson MG, Widner RE, Jorgenson LM, *et al.* Proximity labeling to map host-pathogen interactions at the membrane of a bacterium-containing vacuole in *Chlamydia trachomatis*-infected human cells[J]. *Infect Immun*, 2019, **87**(11): e00537-e00519.
- [34] Dong XD, Lim TK, Lin QS, *et al.* Basal body protein TbSAF<sub>1</sub> is required for microtubule quartet anchorage to the basal bodies in *Trypanosoma brucei*[J]. *mBio*, 2020, **11**(3): e00668-e00620.
- [35] Hémono M, Haller A, Chicher J, *et al.* The interactome of CLUH reveals its association to SPAG5 and its co-translational proximity to mitochondrial proteins[J]. *BMC Biol*, 2022, **20**(1): 13.
- [36] Ramanathan M, Majzoub K, Rao DS, *et al.* RNA-protein inter-

- action detection in living cells[J]. *Nat Methods*, 2018, **15**(3): 207-212.
- [37] Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, *et al.* Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**(9): 880-887.
- [38] Kotani N, Nakano T, Kuwahara R. Host cell membrane proteins located near SARS-CoV-2 spike protein attachment sites are identified using proximity labeling and proteomic analysis[J]. *J Biol Chem*, 2022, **298**(11): 102500.
- [39] Schaack GA, Sullivan OM, Mehle A. Identifying Protein-Protein Interactions by Proximity Biotinylation with AirID and splitAirID[J]. *Curr Protoc*, 2023, **3**(3): e702.
- [40] Zafra F, Piniella D. Proximity labeling methods for proteomic analysis of membrane proteins[J]. *J Proteomics*, 2022, **264**: 104620.
- [41] McDevitt RI, Ruaux CG, Baltzer WI. Influence of transfusion technique on survival of autologous red blood cells in the dog[J]. *J Vet Emerg Crit Care*, 2011, **21**(3): 209-216.
- [42] Li MY, Peng F, Wang GQ, *et al.* Coupling of cell surface biotinylation and SILAC-based quantitative proteomics identified myoferlin as a potential therapeutic target for nasopharyngeal carcinoma metastasis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, **9**: 621810.
- [43] Kumar A, Salemi M, Bhullar R, *et al.* Proximity biotin labeling reveals Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interferon regulatory factor networks[J]. *J Virol*, 2021, **95**(9): e02049-e02020.
- [44] May DG, Scott KL, Campos AR, *et al.* Comparative application of BioID and TurboID for protein-proximity biotinylation[J]. *Cells*, 2020, **9**(5): 1070.
- [45] Chojnowski A, Sobota RM, Ong PF, *et al.* 2C-BioID: an advanced two component BioID system for precision mapping of protein interactomes[J]. *iScience*, 2018, **10**: 40-52.
- [46] Ke M, Yuan X, He A, *et al.* Spatiotemporal profiling of cytosolic signaling complexes in living cells by selective proximity proteomics[J]. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 71.
- [47] Zada A, Khan I, Zhang M, *et al.* AirID-based proximity labeling for protein-protein interaction in plants[J]. *J Vis Exp*, 2022(187): 10.3791/64428.
- [48] May DG, Roux KJ. BioID: a method to generate a history of protein associations[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, **2008**: 83-95.
- [49] Hung V, Zou P, Rhee HW, *et al.* Proteomic mapping of the human mitochondrial intermembrane space in live cells via ratio-metric APEX tagging[J]. *Mol Cell*, 2014, **55**(2): 332-341.
- [50] Kang MG, Rhee HW. Molecular spatiomics by proximity labeling[J]. *Acc Chem Res*, 2022, **55**(10): 1411-1422.
- [51] Yang W, Huang ZX, Xu ZF, *et al.* Selective and nongenetic peroxidase tag of membrane protein: a nucleic acid tool for proximity labeling[J]. *Anal Chem*, 2022, **94**(2): 1101-1107.
- [52] Liu Q, Zheng J, Sun WP, *et al.* A proximity-tagging system to identify membrane protein-protein interactions[J]. *Nat Methods*, 2018, **15**(9): 715-722.
- [53] Lee M, Lee YH, Song J, *et al.* Deep-learning-based three-dimensional label-free tracking and analysis of immunological synapses of CAR-T cells[J]. *eLife*, 2020, **9**: e49023.
- [54] Pasqual G, Chudnovskiy A, Tas JMJ, *et al.* Monitoring T cell-dendritic cell interactions *in vivo* by intercellular enzymatic labelling[J]. *Nature*, 2018, **553**(7689): 496-500.
- [55] Wang X, Chen JL, Otting G, *et al.* Conversion of an amide to a high-energy thioester by *Staphylococcus aureus* sortase A is powered by variable binding affinity for calcium[J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 16371.
- [56] Schmidt M, Toplak A, Quaedflieg PJLM, *et al.* Enzyme-catalyzed peptide cyclization[J]. *Drug Discov Today Technol*, 2017, **26**: 11-16.
- [57] Schmohl L, Schwarzer D. Sortase-mediated ligations for the site-specific modification of proteins[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, **22**: 122-128.
- [58] Liu ZL, Li JP, Chen MK, *et al.* Detecting tumor antigen-specific T cells via interaction-dependent fucosyl-biotinylation[J]. *Cell*, 2020, **183**(4): 1117-1133. e19.
- [59] Tamura T, Ueda T, Goto T, *et al.* Rapid labelling and covalent inhibition of intracellular native proteins using ligand-directed *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide[J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1870.
- [60] Lee YH, Yu E, Park CM. Programmable site-selective labeling of oligonucleotides based on carbene catalysis[J]. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 1681.
- [61] Li QY, Xie YX, Rice R, *et al.* A proximity labeling method for protein-protein interactions on cell membrane[J]. *Chem Sci*, 2022, **13**(20): 6028-6038.