

· 综述 ·

## 检测蛋白质相互作用方法的进展

陈佳丽, 夏天, 周其冈\*

南京医科大学药学院, 江苏 南京 211166

[摘要] 生物体的生命活动受蛋白质的控制和调节, 而绝大部分蛋白质都是通过与其他蛋白相互作用来实现其功能。文章系统总结基于生物化学与分子生物学、生物物理学以及生物信息学等原理检测蛋白相互作用的研究方法, 并对这些方法的特点进行了系统性评述。

[关键词] 蛋白相互作用; 偶联; 氨基酸

[中图分类号] R393

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)04-536-10

doi: 10.7655/NYDXBNSN230990

### Progress in methods of detecting protein-protein interaction

CHEN Jiali, XIA Tian, ZHOU Qigang\*

School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] The life activities of organisms are controlled and regulated by proteins, and the vast majority of proteins exert their function through interactions with other proteins. This article briefly describes research methods for detecting interactions of proteins based on principles of biochemistry and molecular biology, biophysics, and bioinformatics, and reviews the characteristics of these methods.

[Key words] protein-protein interaction; coupling; amino acid

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(04): 536-545]

蛋白质是由氨基酸以“脱水缩合”方式组成的多肽链经过盘曲折叠形成的具有一定空间结构的物质。蛋白质分子上的氨基酸序列和由此形成的立体结构造成了蛋白质结构的多样性。生物体的生理功能主要由细胞中的蛋白质执行和调节<sup>[1]</sup>。绝大部分蛋白质都不是单独发挥作用, 而是通过蛋白质与蛋白质之间的相互作用(protein-protein interactions, PPI)来实现<sup>[2]</sup>。异常的蛋白质相互作用会导致细胞毒性乃至疾病发生。研究显示PPI参与了细胞凋亡<sup>[3]</sup>、抑郁症<sup>[4]</sup>、癌症<sup>[5]</sup>、先天性心脏病<sup>[6]</sup>等疾病的发生, 因而检测PPI对于研究疾病的发病机制非

常重要。目前, 基于生物化学、微生物学、分子生物学、生物物理学和生物信息学的知识和技术, 科学家已经建立了多种检测蛋白质相互作用的方法<sup>[1]</sup>, 本文对这些方法及其优缺点进行系统性总结。

### 1 基于生物化学与分子生物学的研究方法

#### 1.1 酵母双杂交(yeast two-hybrid, Y2H)系统

Y2H系统是由Fields和Song<sup>[7]</sup>开发的一种细胞内遗传方法, 是通过激活报告基因表达来检测PPI的有效手段<sup>[8]</sup>。转录因子GAL4包含N端的DNA结合域(binding domain, BD)和C端的转录激活域(activation domain, AD)。单独的AD或BD并不能激活转录反应, 而二者在空间上足够靠近时即可行使转录因子功能<sup>[9]</sup>。将诱饵(Bait)蛋白X与BD融合, 猎物(Prey)蛋白Y与AD融合, 当诱饵蛋白X与猎物蛋白Y因相互作用而结合时, AD端与BD端也在空间

[基金项目] 科技部科技创新2030—重大项目(2022ZD0211700)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: qigangzhou@njmu.edu.cn

上相互靠近从而激活下游报告基因的转录(图1)。

Y2H系统广泛用于检测不同物种中任何两种蛋白质之间的物理相互作用<sup>[10]</sup>, 具有高度敏感性, 应用广泛。Sun等<sup>[11]</sup>使用Y2H系统鉴定出与沙眼衣原糖原合酶相互作用的HeLa细胞蛋白, Shi等<sup>[12]</sup>通过Y2H系统鉴定了小鼠精子发生过程中与cAMP依赖性蛋白激酶(cAMP-dependent protein kinase, PKA)调节亚基 I  $\alpha$  (regulatory subunit I  $\alpha$ , RI $\alpha$ )相互作用的蛋白, Omagari等<sup>[13]</sup>使用Y2H测定法评估了691种化合物拮抗人甲状腺受体(the human thyroid receptor, hTR)的活性。Y2H系统的一个常见问题是Y2H诱导的报告基因的自动激活, 导致结果可能存在高假阳性<sup>[14]</sup>, 因为当某些蛋白质本身可以激活Y2H报告基因转录时, 无论是否存在任何PPI, 都会激活报告基因, 从而产生阳性结果<sup>[15]</sup>。

### 1.2 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)

Co-IP实验可以通过直接或间接的方式识别PPI<sup>[16]</sup>。Co-IP是根据抗原和抗体特异性结合的原理<sup>[17]</sup>, 当细胞在非变性条件下被裂解时<sup>[18]</sup>, 细胞内存在的许多PPI被保留下来。如果用蛋白质X的抗

体免疫沉淀X, 那么在体内与X偶联的蛋白质Y也能被沉淀下来, 从而形成抗体-蛋白质X-蛋白质Y的三元或多元复合物。洗涤掉与蛋白质X没有相互作用的蛋白后, 再用洗脱液将互作蛋白复合物从珠子(Beads)上洗脱下来, 便得到免疫共沉淀产物(图2), 产物既可用Western blot检测已知蛋白, 也可用质谱技术鉴定未知蛋白<sup>[19]</sup>。

Co-IP技术使用非变性剂裂解细胞, 细胞内存在的PPI被最大限度地保留下来。基于抗原抗体原理的Co-IP技术可以比较准确地检测出与目的蛋白相互作用的蛋白质, 如Jia等<sup>[20]</sup>联用Co-IP与质谱技术(Co-IP/MS), 鉴定出23种与母羊卵巢提取物中FecB特异性作用的蛋白质。但是Co-IP也有其局限性: 无法判断PPI是直接还是间接的, 且不能分辨瞬时作用和低亲和力的PPI。

### 1.3 Pull-down

Pull-down实验适用于检查两种纯化蛋白质之间的直接PPI并评估亲和力的程度<sup>[21]</sup>。谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)蛋白是一种广泛使用的亲和标签<sup>[22]</sup>, GST Pull-down实验是利用

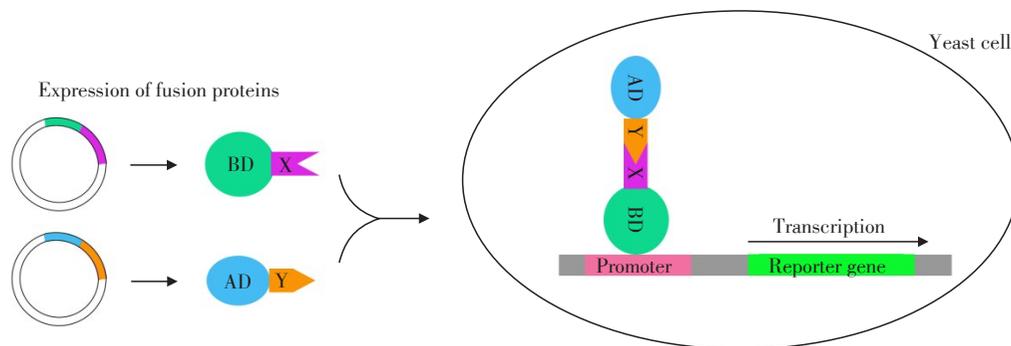


图1 酵母双杂交原理

Figure 1 Principle of yeast two-hybrid

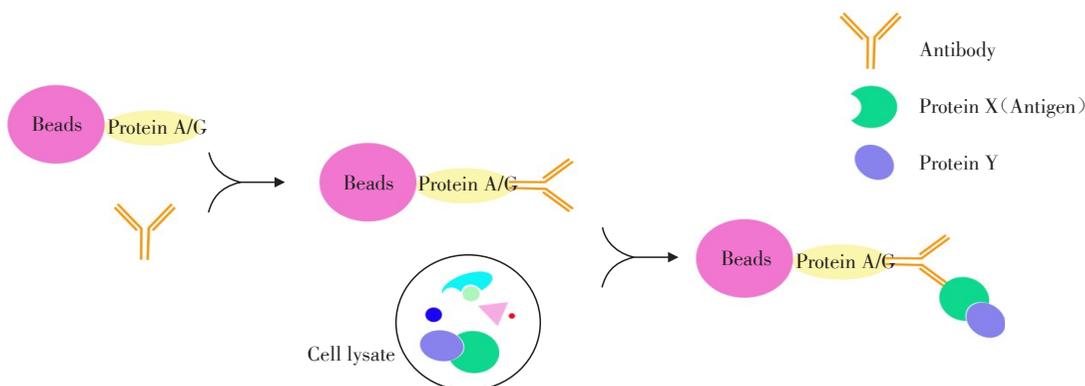


图2 免疫共沉淀原理

Figure Principle of co-immunoprecipitation

GST与固定在树脂上的谷胱甘肽(glutathione, GSH)结合的原理,通过重组技术将GST与诱饵蛋白融合,融合蛋白可与固相化在载体上的GSH亲和结合<sup>[23]</sup>,当与融合蛋白有PPI的蛋白通过层析柱或与此固相复合物混合时,可被吸附,形成GSH-GST-探针蛋白-猎物蛋白复合物,从而分离出与探针蛋白有相互作用的猎物蛋白(图3),可通过Western blot或质谱技术鉴定猎物蛋白<sup>[24]</sup>。

GST Pull-down实验可以验证蛋白质之间的直接PPI,只要猎物蛋白与诱饵蛋白之间有PPI的结构基础就可以被提取,徐国双等<sup>[25]</sup>利用GST Pull-down联合质谱技术筛选到39种与H7N9亚型禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)核糖体移码蛋白PA-X互作的候选蛋白,为深入探讨PA-X在AIV生命周期中的作用机制奠定基础。但是GST Pull-down是在体外进行生化反应验证蛋白质的相互作用,不能够完全反映细胞内蛋白真实的互作状态,且融合蛋白中的GST标签可能会影响诱饵蛋白原有的折叠结构<sup>[26]</sup>。

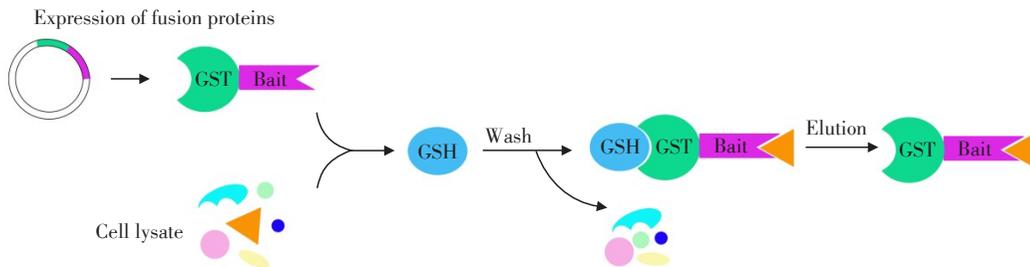


图3 Pull-down实验原理

Figure 3 Principle of Pull-down

白结合,提高了特异性<sup>[31]</sup>,Li等<sup>[32]</sup>通过TAP-MS联用技术,鉴定出了真菌细胞中非常低水平的PPI。TAP标签种类多样,适用广泛且实用性强,Berneking等<sup>[33]</sup>利用CBP和链霉亲和素结合肽(streptavidin-binding-peptide, SBP)标签鉴定与耶尔森菌效应蛋白YopM相互作用的新蛋白,Tani等<sup>[34]</sup>利用3×FLAG(DYKDDDDK肽)标签与人流感病毒血凝素(human-influenza-virus hemagglutinin, HA)标签并通过与质谱法相结合,以鉴定与肌动蛋白相关蛋白Arp2有相互作用的蛋白复合物的成分。TAP技术的局限性主要在于TAP标签的引入可能会影响靶蛋白和亲和柱的结合,纯化过程中TEV蛋白酶与EGTA或其他溶剂的使用可能会干扰复合物的完整性和活性。

### 1.5 噬菌体展示(phage display technology, PDT)

1985年,Smith<sup>[35]</sup>利用丝状噬菌体表达外源基

### 1.4 串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)

TAP技术最早由德国Rigaut等<sup>[27]</sup>发明,并在鉴定酵母菌蛋白复合物中获得成功,随后被应用于其他细胞系及组织<sup>[28]</sup>。TAP技术首先需通过基因工程给诱饵蛋白的N端或C端加一个TAP标签<sup>[29]</sup>,TAP标签由钙调蛋白结合肽(calmodulin binding peptide, CBP)-TEV蛋白酶切位点-金黄色葡萄球菌蛋白A的IgG结合结构域构成<sup>[30]</sup>。含有TAP标签的融合蛋白粗提取物通过IgG亲和柱,温和洗涤后,大多数无法与诱饵蛋白结合的蛋白质被洗涤掉,IgG亲和柱上吸附了蛋白A-TEV蛋白酶切位点-CBP-诱饵蛋白-猎物蛋白复合物(图4A)。加入TEV蛋白酶从蛋白复合物中切割掉第一标签即蛋白A,从柱中洗涤出CBP-诱饵蛋白-猎物蛋白复合物(图4B)。再将此复合物通过第2个含钙调蛋白的柱基质,在钙离子存在下,CBP就会与钙调蛋白紧密结合,用含有EGTA的洗脱液进行温和洗脱,即可得到高纯度的诱饵蛋白-猎物蛋白复合物(图4C)。

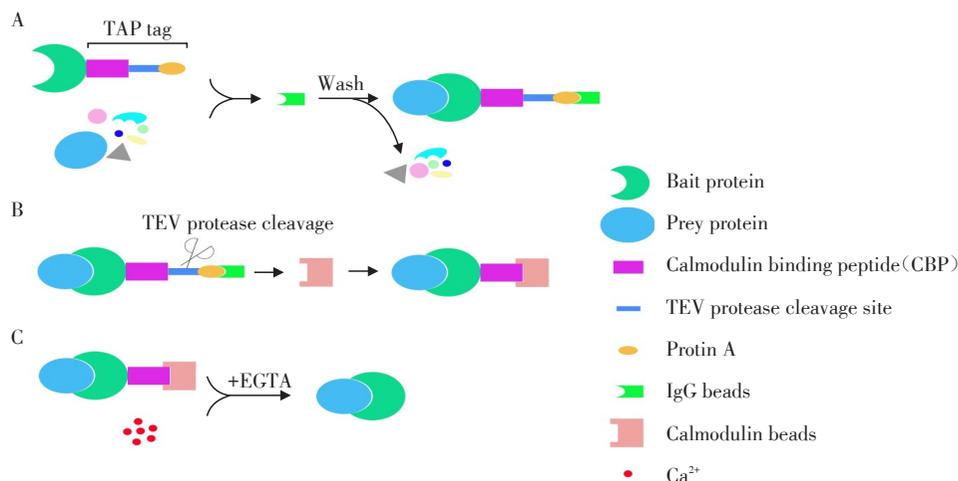
TAP技术经过两次洗脱,减少了非特异性的蛋

白结合,提高了特异性<sup>[31]</sup>,Li等<sup>[32]</sup>通过TAP-MS联用技术,鉴定出了真菌细胞中非常低水平的PPI。TAP标签种类多样,适用广泛且实用性强,Berneking等<sup>[33]</sup>利用CBP和链霉亲和素结合肽(streptavidin-binding-peptide, SBP)标签鉴定与耶尔森菌效应蛋白YopM相互作用的新蛋白,Tani等<sup>[34]</sup>利用3×FLAG(DYKDDDDK肽)标签与人流感病毒血凝素(human-influenza-virus hemagglutinin, HA)标签并通过与质谱法相结合,以鉴定与肌动蛋白相关蛋白Arp2有相互作用的蛋白复合物的成分。TAP技术的局限性主要在于TAP标签的引入可能会影响靶蛋白和亲和柱的结合,纯化过程中TEV蛋白酶与EGTA或其他溶剂的使用可能会干扰复合物的完整性和活性。

PDT是在噬菌体展示肽库建立之后才开始广泛应用到蛋白质相互作用研究中的<sup>[37]</sup>。该技术的突破性贡献在于可将基因型与表型紧密连接<sup>[38]</sup>。龙晨等<sup>[39]</sup>利用PDT筛选与草鱼呼肠孤病毒VP39蛋白相互作用的多肽,经过NCBI比对后发现草鱼基因组中有7个基因与筛出的多肽具有同源性,表明其可能与VP39存在相互作用。

### 1.6 蛋白质芯片

蛋白质芯片技术是指将蛋白质或多肽等固定和支持介质表面,捕获能与之特异性结合的待测蛋白,用于样品成分和蛋白质之间相互作用的分析,



A: First affinity column, binding of TAP labeled fusion proteins on IgG agarose affinity columns. B: Second affinity column, binding on a calmodulin agarose affinity column. C: Mild elution using eluent containing EGTA.

图4 串联亲和纯化原理

Figure 4 Principle of tandem affinity purification

亦称蛋白质微阵列<sup>[40]</sup>。张旭东等<sup>[41]</sup>使用蛋白质芯片技术结合多变量分析方法分析骨骼肌组织中的蛋白质变化来进行死亡时间推断。

### 1.7 双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)

BiFC是通过切割荧光蛋白的特定位点,形成没有荧光的N-端和C-端,分别与待研究的目标蛋白融合表达。若目标蛋白间发生相互作用,两个不完整的荧光片段则相互靠近形成完整的有活性的荧光基团,从而在激发光下发出荧光<sup>[42]</sup>。BiFC测定是一种将活细胞中PPI可视化的方法<sup>[43]</sup>。Feng等<sup>[44]</sup>利用BiFC技术通过标记内源性蛋白质将秀丽隐杆线虫中的内源性突触可视化,Don等<sup>[45]</sup>通过将BiFC与斑马鱼模型系统相结合,研究肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)中的蛋白聚集体形成和定位。

### 1.8 邻近连接测定(proximity ligation assay, PLA)

PLA也称为Duolink PLA技术,允许在内源性蛋白质水平上原位(距离 < 40 nm)检测PPI<sup>[46]</sup>。该方法依赖单个一抗与两种假定存在相互作用的蛋白质的特异性结合。一抗需要来自不同的宿主。含有互补寡核苷酸的针对两个宿主的二抗附着在一抗上。如果两种抗原非常接近(可能彼此相互作用),互补寡核苷酸可以退火,荧光核苷酸可以掺入单个DNA聚合步骤中(图5)。在显微镜下,这些反应显示为点状荧光斑点,表明PLA反应成功,并提示两种抗原之间存在PPI<sup>[47]</sup>。Jang等<sup>[48]</sup>利用Co-IP

测定和Duolink邻近连接测定发现耳聋相关蛋白TMEM43和TASK-1蛋白存在直接相互作用<sup>[48]</sup>。

### 1.9 邻近依赖性生物素化测定与质谱联用(proximity-dependent biotinylation coupled to mass spectrometry, PDB-MS)

在过去10年中,酶介导的邻近标记(proximity ligation, PL)技术已成为在活细胞中定位蛋白质和RNA的强大工具。在这些方法中,工程酶在特定亚细胞位置表达并催化高反应性小分子中间体的原位合成,随后扩散并与蛋白质和/或RNA反应产生共价标记<sup>[49]</sup>

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)在芳基叠氮化物-生物素试剂存在时会产生一种活性自由基物质,标记距离酶200~300 nm范围内的蛋白质<sup>[50]</sup>(图6)。

抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APEX)在过氧化氢存在下,将外源性添加的生物素-苯酚(也称为生物素基酪胺)转化为高反应性、不稳定的生物素-酚类自由基,进而将其附近的蛋白质生物素化<sup>[51]</sup>(图6)。

BioID是基于大肠杆菌中的混杂生物素连接酶BirA\*(R118G位点被突变)的融合诱饵蛋白,生物素连接酶通过生物素和三磷酸腺苷生成一种高活性的生物素酰-5'-AMP(Bio-AMP)中间体,Bio-AMP可以接近依赖性的方式与周围蛋白质上可接近的赖氨酸侧链反应,使蛋白质生物素化<sup>[52]</sup>(图6)。

BioID技术相对上述两种方法有简单、无毒的

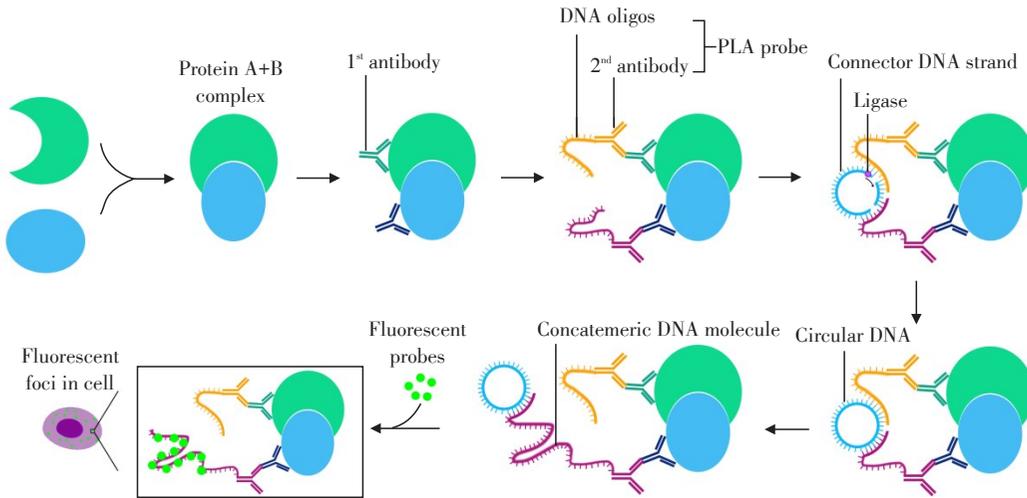


图5 邻近连接测定原理

Figure 5 Principle of proximity ligation assay

优势。HRP、APEX 与 BioID 产生的活性自由基或高能分子会导致相对较大的标记半径,导致不可避免的假阳性结果<sup>[53]</sup>。近年来,PDB-MS 还在不断优化和更新,例如 Kim 等<sup>[54]</sup>改进 BioID 方法,以 BioID2 为中心,能够选择性更强地靶向融合蛋白,对生物素的需求降低,并表现出对邻近蛋白的标记增强,提高了筛选 PPI 的效率。Larochelle 等<sup>[55]</sup>通过 TurboID 介导的邻近依赖性生物素化,鉴定酵母中的 PPI 网络。

基于生物化学与分子生物学的研究方法种类较多,适用范围和限制也不同,故对这些方法做了总结(表1)。

## 2 基于生物物理学的方法

### 2.1 荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)

FRET 原理是将诱饵蛋白和猎物蛋白分别缀合

供体和受体荧光团,诱饵蛋白和猎物蛋白因相互作用而靠近,供体和受体的荧光团也在空间上相互靠近,当两者的距离在 1~10 nm 时则诱导 FRET 信号<sup>[56]</sup>。FRET 是两个分子或原子相互作用的物理过程。供体必须处于激发态,并通过分子间长距离偶极-偶极耦合将能量转移到附近的受体<sup>[57]</sup>。FRET 可在活细胞中以单细胞分辨率检测到直接 PPI<sup>[58]</sup>。李慧等<sup>[59]</sup>通过 FRET 技术观测血小板衍生生长因子对气道平滑肌细胞中 RhoA 活性的下调作用,Kondo 等<sup>[60]</sup>利用 FRET 技术评价尼洛替尼治疗的药物敏感性,马廷政等<sup>[61]</sup>利用 FRET 技术检测膜受体与胞外配体的相互作用。

### 2.2 表面等离子共振分析(surface plasmon resonance, SPR)

SPR 是基于物质间相互作用所致的芯片表面质量变化而产生的一种光学现象,能够简单、快速、准

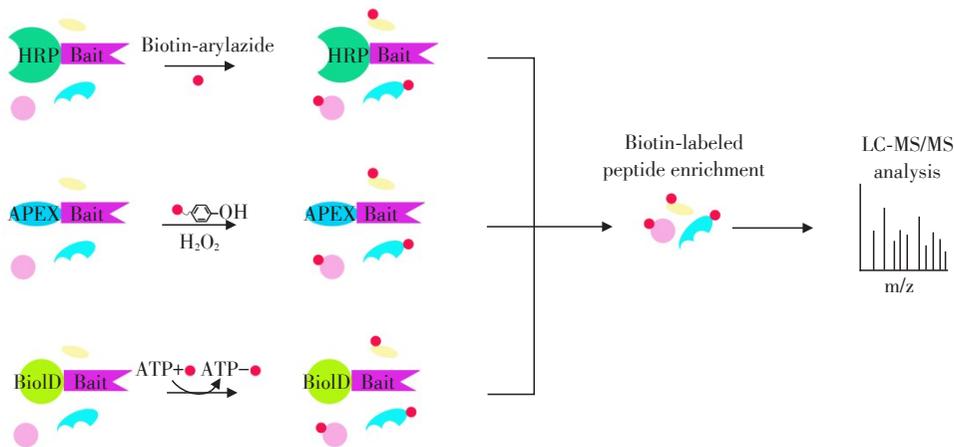


图6 基于邻近依赖性生物素化测定与质谱联用检测原理

Figure 6 Principle of proximity-dependent biotinylation coupled to mass spectrometry

表1 基于生物化学与分子生物学的研究方法的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of research methods based on biochemistry and molecular biology

Method	Advantage	Disadvantage
Yeast two-hybrid(Y2H)	Detecting physical interactions between any two proteins in different species	The automatic activation of reporter genes leads to high false positives in the results
Co-immunoprecipitation(Co-IP)	The detected protein interactions are formed in their natural state	Unable to determine whether PPI has a direct effect; unable to detect PPI with instantaneous action and low affinity
Pull-down	Detecting direct interactions between two purified proteins	Inability to fully reflect the true interaction state of intracellular proteins
Tandem affinity purification(TAP)	Increased specificity	TAP labeling and eluents during purification process may interfere with PPI
Phage display technology(PDT)	Tightly linking genotype and phenotype	Limited by the capacity and diversity of peptide libraries
Protein chip	Microization, high-through put	Excessive cost
Bimolecular fluorescence complementation(BiFC)	Visualize PPI in living cells	Temperature sensitive
Proximity ligation assay(PLA)	Visualize PPI	Cannot be used for living cells
PDB-MS(HRP)	Identifying PPI on the surface of living cells	Large marking radius leads to false positive results
PDB-MS(APEX)	Strong labeling specificity for mitochondrial proteins	Large marking radius leads to false positive results
PDB-MS(BioID)	Simple and non-toxic	Large marking radius leads to false positive results

确地对分子间作用的强度进行动态监测<sup>[62]</sup>。SPR由固定化识别分子、分析物分子和光棱镜3个主要部分组成。固定化分子与传感器芯片表面结合,通过棱镜的入射光波激发金属膜中的电子,形成表面等离子体,当分析物分子缓冲液流过传感器芯片表面,分析物分子结合固定化分子,会引起传感器表面折射率的改变,通过软件检测处理这些信号从而得到最终分析结果<sup>[63]</sup>。SPR现象因其对表面折射率变化的敏感性而受到广泛关注,可用于生物标志物的高灵敏度检测和快速检测<sup>[64]</sup>。

### 2.3 荧光偏振(fluorescence polarization, FP)技术

FP检测技术是通过分析体系中荧光分子的偏振信号变化差异,实现对分子间相互作用的研究以及所选目标物的检测<sup>[65]</sup>。荧光标记的小分子在溶液中快速旋转,在被偏振光激发时,发射光保持去偏振并产生低FP信号。当溶液中的荧光小分子与靶蛋白结合成为大分子复合物后,复合物的运动会变慢。当这样的复合体被偏振光激发时,由于复合体的缓慢运动,大部分发射光被偏振<sup>[66]</sup>。反应前后荧光偏振的差异与靶蛋白的浓度成比例<sup>[67]</sup>,通过荧光强度和样品浓度制作工作曲线,就可以进行定量

分析。FP允许全自动高通量分析<sup>[68]</sup>。An等<sup>[69]</sup>设计了一个基于荧光偏振的高通量筛选(high throughput screening, HTS)系统来鉴定脂多糖和 Caspase-4相互作用的抑制剂。

### 2.4 等温滴定量热技术(isothermal titration calorimetry, ITC)

ITC的原理是通过检测分子相互作用所释放或吸收的能量,通过单次滴定实验即可提供完整的热动力学信息,直接提供结合常数、化学计量比及反应焓变,揭示蛋白质分子间特异性的相互作用<sup>[70]</sup>。滴定前,仪器中的两个量热池(样品池和参比池)的预设温度相同,两者通过绝热装置隔开。在恒定温度下,加样针以一定速度向样品池中滴加靶蛋白受体溶液。靶蛋白受体溶液进入样品池后,因样品池中的靶蛋白与受体发生相互作用而产生热量变化,使体系的温度发生改变,从而导致样品池与参比池之间产生温度差<sup>[71-72]</sup>。ITC无需通过荧光标记或固定化技术对结合配体进行修饰,实验时间较短、操作简单,且所需样品用量小,灵敏度及精确度高。Matilla等<sup>[73]</sup>使用ITC揭示化学感觉系统的趋化信号作用机制,并认为ITC是研究结合过程的黄金标

准。Wang等<sup>[74]</sup>认为ITC能够提供传统生化测定难以获得的酶活性信息,并使用ITC来测量酶抑制剂的强度、结合模式、缔合和解离动力学。

### 2.5 微量热泳动(microscale thermophoresis, MST)

MST是一种表征生物分子特性的光学方法,反映粒子在微观温度梯度中的定向运动<sup>[75]</sup>。MST检测设备由Nano Temper公司发明,其工作原理是生物分子在毛细管中发生热泳动现象,发生相互作用的生物分子的水化层、分子大小、电荷等性质发生改变,进而引起反应体系中荧光分布的变化,以检测相互作用的生物分子间的亲和性<sup>[76]</sup>。MST允许使用非常小的样本量(微升范围)进行高通量筛选<sup>[77]</sup>。热泳动对分子属性的微小变化十分敏感,适合于蛋白质、核酸、小分子和离子等多种物质的相互作用研究<sup>[78]</sup>。Asmari等<sup>[79]</sup>通过MST技术测定铁螯合药物与乳铁蛋白的结合亲和力,预测母乳中铁螯合药物的分泌。

## 3 基于生物信息学的研究方法

蛋白质相互作用错综复杂,形成巨大的PPI网络,将生物信息学技术运用在PPI检测中非常重要。Chen等<sup>[80]</sup>提出了一种基于序列的新型计算方法,称为DCSE(Double Channel-Siamese-Ensemble)来预测潜在的PPI。胡嘉伦等<sup>[81]</sup>采用计算机模拟的方法,对2类皂苷(达玛烷型皂苷和齐墩果型皂苷)和 $\alpha$ -乳白蛋白的相互作用进行研究,并获得其相互作用模式的相关图像。

## 4 总结与展望

PPI研究方法根据原理大致可分为以下3种:①通过抗体或添加表位标签亲和纯化,得到诱饵蛋白与猎物蛋白的蛋白复合物,再经过免疫蛋白印迹或质谱分析得到猎物蛋白的信息;②通过基因工程等手段加入报告基因或荧光信号,表征PPI的发生;③通过检测发生相互作用的蛋白质分子的光学信号、热力学变化、电荷改变等的函数变化来表征PPI。本文介绍的几种方法各有优势与不足,不同的方法可互为验证,互为补充。相信随着现代技术的不断发展,会产生更先进、准确的PPI研究方法,为人类探索生命奥秘提供更先进的工具。

### [参考文献]

- [1] 孙宇,贾凌云,任军. 蛋白质相互作用的研究方法[J]. 分析化学, 2007, 35(5): 760-766
- [2] 钱冰,马宝山,刘玉. 蛋白质与蛋白质相互作用预

测模型综述[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2023, 22(1): 25-32

- [3] HAN R C, LIANG L, QIN T, et al. Encephalomyocarditis virus 2A protein inhibited apoptosis by interaction with annexin A2 through JNK/c - Jun pathway [J]. Viruses, 2022, 14(2): 359
- [4] SUN N, QIN Y J, XU C, et al. Design of fast-onset antidepressant by dissociating SERT from nNOS in the DRN [J]. Science, 2022, 378(6618): 390-398
- [5] ELZEFZAFY W M, HUSSEIN M, MOHAMMED Z A Z, et al. The diagnostic value of Golgi protein-73 and DICKKOPF-1 in hepatocellular carcinoma [J]. J Immunoassay Immunochem, 2021, 42(2): 174-187
- [6] SOJKA S, AMIN N M, GIBBS D, et al. Congenital heart disease protein 5 associates with CASZ1 to maintain myocardial tissue integrity [J]. Development, 2014, 141(15): 3040-3049
- [7] FIELDS S, SONG O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. Nature, 1989, 340(6230): 245-246
- [8] CHEN Q, WEI T Y. Membrane and nuclear yeast two-hybrid systems [J]. Methods Mol Biol, 2022, 2400: 93-104
- [9] 沈竹,曹勤红. 酵母双杂交及其衍生技术应用研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(12): 2425-2433
- [10] JIA Y, KOWALSKI P, LOPEZ I. Using yeast two-hybrid system and molecular dynamics simulation to detect venom protein-protein interactions [J]. Curr Res Toxicol, 2021, 2: 93-98
- [11] SUN Z J, SUN Y H, LI Y M, et al. Identification of HeLa cell proteins that interact with Chlamydia trachomatis glycogen synthase using yeast two-hybrid assays [J]. Mol Med Rep, 2020, 21(3): 1572-1580
- [12] SHI K Y, YANG L L, ZHUANG X Q, et al. Yeast two-hybrid screen identifies PKA- $\alpha$  interacting proteins during mouse spermiogenesis [J]. Genes, 2021, 12(12): 1941
- [13] OMAGARI R, YAGISHITA M, SHIRAISHI F, et al. Evaluation of human thyroid hormone receptor-antagonist activity in 691 chemical compounds using a yeast two-hybrid assay with Saccharomyces cerevisiae Y190 [J]. Data Brief, 2022, 42: 108303
- [14] HEINTZ V J, WANG L, LACOUNT D J. NanoLuc luciferase as a quantitative yeast two-hybrid reporter [J]. FEMS Yeast Res, 2022, 21(8): foab069
- [15] SHIVHARE D, MUSIALAK-LANGE M, JULCA I, et al. Removing auto-activators from yeast-two-hybrid assays by conditional negative selection [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 5477
- [16] LIU Q, ZHENG J, SUN W P, et al. A proximity-tagging

- system to identify membrane protein-protein interactions [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(9): 715-722
- [17] 王峻翔, 杨小祯, 何欢, 等. GST-pull Down和免疫共沉淀联合质谱鉴定埃及伊蚊中肠的Cry4Ba和Cry11Aa互作蛋白[J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(9): 1797-1809
- [18] BURCKHARDT C J, MINNA J D, DANUSER G. Co-immunoprecipitation and semi-quantitative immunoblotting for the analysis of protein-protein interactions [J]. *STAR Protoc*, 2021, 2(3): 100644
- [19] LO S F. Co-immunoprecipitation (Co-IP) in mammalian cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2655: 67-77
- [20] JIA J L, JIN J P, CHEN Q, et al. Eukaryotic expression, Co-IP and MS identify BMPR-1B protein-protein interaction network [J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 24
- [21] KIM S Y, HAKOSHIMA T. GST pull-down assay to measure complex formations [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1893: 273-280
- [22] GNANASEKARAN P, PAPPU H R. Detection of protein-protein interactions using glutathione-S-transferase (GST) pull-down assay technique [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2690: 111-115
- [23] 周鑫琦, 王颖洁, 张文慧, 等. GST pull-down联合质谱分析技术筛选鸡NOS2的互作蛋白[J]. *中国家禽*, 2020, 42(9): 19-25
- [24] 游金, 李艳萍, 王蒙, 等. GST pull-down联合质谱技术鉴定与calponin-3相互作用的蛋白质[J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(6): 1368-1376
- [25] 徐国双, 姜童潇, 郭艺迪, 等. 利用GST pull-down联合质谱技术鉴定H7N9禽流感病毒PA-X的互作蛋白[J]. *广东农业科学*, 2022, 49(1): 121-127
- [26] SCHÄFER F, SEIP N, MAERTENS B, et al. Purification of GST-tagged proteins [J]. *Methods Enzymol*, 2015, 559: 127-139
- [27] RIGAUT G, SHEVCHENKO A, RUTZ B, et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 1030-1032
- [28] 刘侠, 韦薇. 串联亲和纯化技术在研究细胞内相互作用蛋白质中的应用 [J]. *医学综述*, 2014, 20(7): 1153-1156
- [29] 陈谋通, 刘建军. 蛋白质相互作用的研究方法 [J]. *生物技术通报*, 2009, 25(1): 50-54
- [30] CIPAK L, SELICKY T, JURCIK J, et al. Tandem affinity purification protocol for isolation of protein complexes from *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *STAR Protoc*, 2022, 3(1): 101137
- [31] SORKIN M L, NUSINOW D A. Using tandem affinity purification to identify circadian clock protein complexes from *Arabidopsis* [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2398: 189-203
- [32] LI G, WILSON R A. Tandem affinity purification (TAP) of low-abundance protein complexes in filamentous fungi demonstrated using *Magnaporthe oryzae* [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2356: 97-108
- [33] BERNEKING L, SCHNAPP M, NAUTH T, et al. Tandem affinity purification of SBP-CBP-tagged type three secretion system effectors [J]. *Bio-protocol*, 2019, 9(12): e3277
- [34] TANI N, TANNON N, ISHIGURO K I. Tandem immunopurification of affinity-tagged proteins from mouse testis extracts for MS analysis [J]. *STAR Protoc*, 2022, 3(2): 101452
- [35] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317
- [36] 刘铭赫, 李巧玲, 李林姣, 等. 噬菌体展示技术及其在单克隆抗体制备中的应用 [J]. *中国兽药杂志*, 2022, 56(12): 82-89
- [37] 王海波, 安学丽, 张艳贞, 等. 蛋白质相互作用研究方法及其应用 [J]. *生物技术通报*, 2006, 22(增刊): 167-170
- [38] 赵梦瑶, 史增芳, 宋丽丽, 等. 噬菌体展示技术在现代医药应用的研究进展 [J]. *中国医药工业杂志*, 2023, 54(1): 19-28
- [39] 龙晨, 徐宁, 谢雅晴, 等. 利用噬菌体展示技术筛选草鱼呼肠孤病毒VP39蛋白相互作用多肽 [J]. *水生生物学报*, 2023, 47(6): 859-865
- [40] 陈艺心, 赵树铭. 蛋白质芯片构建技术的研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(8): 989-991
- [41] 张旭东, 姜壹如, 梁芯瑞, 等. 蛋白芯片检测技术结合多维统计方法推断死亡时间 [J]. *法医学杂志*, 2023, 39(2): 115-120
- [42] 周水娟, 郭忠建. 双分子荧光互补技术在动物病毒中的研究进展 [J]. *生物技术进展*, 2022, 12(6): 825-836
- [43] GNANASEKARAN P, PAPPU H R. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay to visualize protein-protein interactions in living cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2690: 117-120
- [44] FENG S Y, VARSHNEY A, COTO V D, et al. Bright split red fluorescent proteins for the visualization of endogenous proteins and synapses [J]. *Commun Biol*, 2019, 2: 344
- [45] DON E K, MASCHIROW A, RADFORD R A W, et al. *In vivo* validation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to investigate aggregate formation in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(5): 2061-2074
- [46] ALAM M S. Proximity ligation assay (PLA) [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2018, 123(1): e58

- [47] MENDEZ R, BANERJEE S. Proximal ligation assay(PLA) on lung tissue and cultured macrophages to demonstrate protein-protein interaction[J]. *Bio-protocol*, 2017, 7(21): e2602
- [48] JANG M W, KIM T Y, SHARMA K, et al. A deafness associated protein TMEM43 interacts with KCNK3 (TASK-1) two-pore domain K<sup>+</sup>(K2P) channel in the cochlea[J]. *Exp Neurobiol*, 2021, 30(5): 319-328
- [49] ZHOU Y, ZOU P. The evolving capabilities of enzyme-mediated proximity labeling[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, 60: 30-38
- [50] 陈玉宛, 周雯, 李欣蔚, 等. 基于液质联用技术的蛋白质-蛋白质相互作用研究进展[J]. *化学学报*, 2022, 80(6): 817-826
- [51] LEE B R, LEE T J, OH S, et al. Ascorbate peroxidase-mediated in situ labelling of proteins in secreted exosomes[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(6): e12239
- [52] VARNAITÉ R, MACNEILL S A. Meet the neighbors: mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID[J]. *Proteomics*, 2016, 16(19): 2503-2518
- [53] GE Y, CHEN L, LIU S B, et al. Enzyme-mediated intercellular proximity labeling for detecting cell-cell interactions[J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(5): 1833-1837
- [54] KIM D I, JENSEN S C, NOBLE K A, et al. An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling[J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(8): 1188-1196
- [55] LAROCHELLE M, BERGERON D, ARCAND B, et al. Proximity-dependent biotinylation mediated by TurboID to identify protein-protein interaction networks in yeast[J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(11): jcs232249
- [56] ZADRAN S, STANDLEY S, WONG K, et al. Fluorescence resonance energy transfer(FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 96(4): 895-902
- [57] SZABÓ Á, SZÖLLŐSI J, NAGY P. Principles of resonance energy transfer[J]. *Curr Protoc*, 2022, 2(12): e625
- [58] BHAUMIK S R. Fluorescence resonance energy transfer in revealing protein-protein interactions in living cells[J]. *Emerg Top Life Sci*, 2021, 5(1): 49-59
- [59] 李慧, 郭佳, 邓林红, 等. 通过荧光共振能量转移观测血小板衍生生长因子对气道平滑肌细胞中RhoA活性的下调作用[J]. *生物医学工程研究*, 2023, 42(1): 15-22
- [60] KONDO T, FUJIOKA M, FUJISAWA S, et al. Clinical efficacy and safety of first-line nilotinib therapy and evaluation of the clinical utility of the FRET-based drug sensitivity test[J]. *Int J Hematol*, 2019, 110(4): 482-489
- [61] 马廷政, 曹平平, 汪徐春, 等. 利用FRET技术检测膜受体与胞外配体相互作用的优化策略[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(8): 1049-1054
- [62] 陈朗东, 董中云, 吕狄亚, 等. 表面等离子共振技术在定量分析中的应用和研究[J]. *药学实践杂志*, 2018, 36(1): 18-23
- [63] MURALI S, RUSTANDI R R, ZHENG X W, et al. Applications of surface plasmon resonance and bilayer interferometry for virus-ligand binding[J]. *Viruses*, 2022, 14(4): 717
- [64] WANG Q, REN Z H, ZHAO W M, et al. Research advances on surface plasmon resonance biosensors[J]. *Nanoscale*, 2022, 14(3): 564-591
- [65] 张怡雯, 韦汶言, 赵晶瑾. 荧光偏振技术在生化分析检测中的研究进展[J]. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 40(5): 216-226
- [66] DU Y H. Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions in an HTS format[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1278: 529-544
- [67] ZHANG Y Q, TANG H, CHEN W, et al. Nanomaterials used in fluorescence polarization based biosensors[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8625
- [68] SEIDEL S A I, DIJKMAN P M, LEA W A, et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions[J]. *Methods*, 2013, 59(3): 301-315
- [69] AN J S, KIM S Y, YANG E G, et al. A fluorescence-polarization-based lipopolysaccharide-caspase-4 interaction assay for the development of inhibitors[J]. *Molecules*, 2022, 27(8): 2458
- [70] 贾继阳, 徐爽, 申兰兰, 等. 等温滴定量热技术检测蛋白质间相互作用方法的优化[J]. *首都师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 40(3): 38-43
- [71] 黄妍, 张迎庆. 温滴定量热法在分子印迹技术中的应用[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(8): 153-156
- [72] 袁露萍, 方文秀, 李梦颖, 等. 中药药效物质识别与作用靶标的表征确证技术研究进展[J]. *中草药*, 2023, 54(10): 3370-3377
- [73] MATILLA M A, MARTÍN-MORA D, KRELL T. The use of isothermal titration calorimetry to unravel chemotactic signalling mechanisms[J]. *Environ Microbiol*, 2020, 22(8): 3005-3019
- [74] WANG Y, WANG G Y, MOITESSIER N, et al. Enzyme kinetics by isothermal titration calorimetry: allostery, inhibition, and dynamics[J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 583826
- [75] 李丽琴, 石童, 周国超, 等. MST技术在生命科学中的应用进展[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(32): 6393-

- 6397
- [76] 艾秋实, 张哲, 屈凌波, 等. 拟南芥 GCR2 参与感应 N-丁酰基高丝氨酸内酯过程的初步研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31(8): 94-101
- [77] DEEB E S, AL-HARRASI A, KHAN A, et al. Microscale thermophoresis as a powerful growing analytical technique for the investigation of biomolecular interaction and the determination of binding parameters [J]. *Methods Appl Fluoresc*, 2022, 10(4): 042001
- [78] 郑凤娇, 刘亚楠, 李亚, 等. 微量热泳动技术的生物医学研究进展[J]. 生命的化学, 2016, 36(4): 443-448
- [79] ASMARI M, WAQAS M, IBRAHIM A E, et al. Microscale thermophoresis and molecular modelling to explore the chelating drug transportation in the milk to infant[J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4604
- [80] CHEN W Q, WANG S, SONG T, et al. DCSE: double-channel-Siamese-Ensemble model for protein protein interaction prediction[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 555
- [81] 胡嘉伦, 姜瞻梅. 计算机软件模拟 $\alpha$ -乳白蛋白与皂苷的分子对接[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(4): 1-6
- [收稿日期] 2023-10-24  
(本文编辑: 陈汐敏)

(上接第 461 页)

- [20] LEBOFF M S, CHOU S H, RATLIFF K A, et al. Supplemental vitamin D and incident fractures in Midlife and Older Adults [J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(4): 299-309
- [21] ANBARCIOGLU E, KIRTILOGLU T, ÖZTÜRK A, et al. Vitamin D deficiency in patients with aggressive periodontitis[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(1): 242-249
- [22] GOLTZMAN D, MIAO D, PANDA D K, et al. Effects of calcium and of the vitamin D system on skeletal and calcium homeostasis: lessons from genetic models [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 89: 485-489
- [23] POLIDORO L, PROPERZI G, MARAMPON F, et al. Vitamin D protects human endothelial cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidant injury through the Mek/Erk - Sirt1 axis activation [J]. *J Cardiovasc Trans Res*, 2013; 6(2): 221-231
- [24] MANOLAGAS S C, PARFITT A M. What old means to bone[J]. *Trends Endocrin Met*, 2010, 21(6): 369-374
- [25] SHARMA P, KAUSHAL N, SALETH L R, et al. Oxidative stress - induced apoptosis and autophagy: balancing the contrary forces in spermatogenesis [J]. *biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2023, 1869(6): 166742
- [26] MOHAMMADZADEH A, MIRZA - AGHAZADEH - ATTARI M, HALLAJ S, et al. Crosstalk between p53 and DNA damage response in ageing [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2019, 80: 8-15
- [27] GILLMAN R, LOPES FLORO K, WANKELL M, et al. The role of DNA damage and repair in liver cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875 (1): 188493
- [收稿日期] 2023-10-25  
(本文编辑: 戴王娟)