

生物素连接酶 BirA 及其突变体在病原与宿主互作研究中的应用进展

张含煜^{1,2,3#}, 李鹏飞^{1,2,3#}, 廖浙屿^{1,2,3}, 张梦佳^{1,2,3,4}, 孙玉梅^{1,2,3}, 张敏⁵,
何启盖^{1,2,3}, 李文涛^{1,2,3,4*}

- 1 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 湖北 武汉 430070
- 2 华中农业大学 动物医学院, 湖北 武汉 430070
- 3 农业农村部兽用诊断制剂创制重点实验室, 湖北 武汉 430070
- 4 湖北洪山实验室, 湖北 武汉 430070
- 5 宜昌市畜牧兽医中心, 湖北 宜昌 443000

张含煜, 李鹏飞, 廖浙屿, 张梦佳, 孙玉梅, 张敏, 何启盖, 李文涛. 生物素连接酶 BirA 及其突变体在病原与宿主互作研究中的应用进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 1981-1996.

ZHANG Hanyu, LI Pengfei, LIAO Zheyu, ZHANG Mengjia, SUN Yumei, ZHANG Min, HE Qigai, LI Wentao. Progress in research and application of the biotin ligase BirA and its mutants in pathogen-host interaction[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 1981-1996.

摘 要: 蛋白质是机体进行生命活动的主要承担者, 研究蛋白质的亚细胞定位及蛋白质之间的相互作用对了解蛋白质功能、阐述机体内分子机制至关重要。邻近标记技术是最新发展的能够在活细胞中检测蛋白质相互作用的有效方法之一。相较于传统研究蛋白质相互作用的方法, 邻近标记技术具有灵敏度高、特异性强和背景低等优势, 被广泛应用于病原与宿主间蛋白质的相互作用研究中。本文对近些年生物素连接酶 BirA 及其突变体的发展和应用进行了综述, 阐述了几种经典生物素连接酶的作用原理, 以期进一步明确基于 BirA 及其突变体的邻近标记技术在病原-宿主间蛋白质相互作用鉴定中的重要作用。

关键词: 蛋白质; 相互作用; 邻近标记; BirA; 生物素

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: wentao@mail.hzau.edu.cn

Received: 2023-12-12; Accepted: 2024-03-14; Published online: 2024-03-19

Progress in research and application of the biotin ligase BirA and its mutants in pathogen-host interaction

ZHANG Hanyu^{1,2,3#}, LI Pengfei^{1,2,3#}, LIAO Zheyu^{1,2,3}, ZHANG Mengjia^{1,2,3,4}, SUN Yumei^{1,2,3}, ZHANG Min⁵, HE Qigai^{1,2,3}, LI Wentao^{1,2,3,4*}

1 National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, Hubei, China

2 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

3 Key Laboratory of Development of Veterinary Diagnostic Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, Hubei, China

4 Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, Hubei, China

5 Yichang Animal Husbandry and Veterinary Center, Yichang 443000, Hubei, China

Abstract: Proteins serve as the primary executors of cellular activities in organisms, and thus investigating the subcellular localization and interactions of proteins is crucial for understanding protein functions and elucidating the molecular mechanisms in organisms. Proximity labeling is a recently developed effective method for detecting protein-protein interactions in live cells. Compared with the conventional methods for studying protein-protein interactions, proximity labeling demonstrates high sensitivity, strong specificity, and low background and is widely employed in the research of protein-protein interactions between pathogens and hosts. This article reviews the recent progress in the development and applications of the biotin ligase BirA and its mutants and elucidates the functioning principles of several classical biotin ligases. This review aims to clarify the role of proximity labeling based on BirA and its mutants in identifying protein-protein interactions between pathogens and hosts.

Keywords: protein; interaction; proximity labeling; BirA; biotin

现代分子生物学的主要研究方向之一是解析蛋白质的互作网络。鉴定蛋白质之间的互作关系是研究生物蛋白互作网络的关键,在此基础上才能更好地研究和解释细胞内分子信号通路及其作用。传统情况下,免疫沉淀-质谱联用技术(immunoprecipitation-mass spectrometry, IP-MS)是常用的测定蛋白与蛋白之间的互作的方法,然而此技术需要经过严苛的裂解条件来检测蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI),因此会遗漏大部分较弱的互作关系。而近年来被广泛应用于 PPI 研究的邻近标记技术能够克服这一缺点,表现出较大的应用前景。

邻近标记技术常用的两类标记酶为工程抗坏血酸过氧化物酶(engineered ascorbate peroxidase, APEX)和大肠杆菌生物素连接酶(BirA)。然而,基于 APEX 的邻近标记方法需要使用具有细胞毒性的过氧化氢作为反应底物,限制了其在活细胞内、蛋白质间相互作用研究上的应用;基于 BirA 的邻近标记方法也存在催化效率低和标记温度高等缺点。随着研究的深入和不断完善,研究者设计并合成了多种改良后的 BirA 突变体(图 1),如 TurboID,其在室温条件下仅需 10 min 就能够对蛋白质进行无毒且充分的生物素标记,克服了 APEX 和 BioID 的缺陷(图 2)。目前基于这

些突变体的邻近标记技术，即生物素邻近标记技术(biotin proximity labeling, BPL)已被广泛地

用于动植物以及微生物领域的蛋白质互作关系研究。

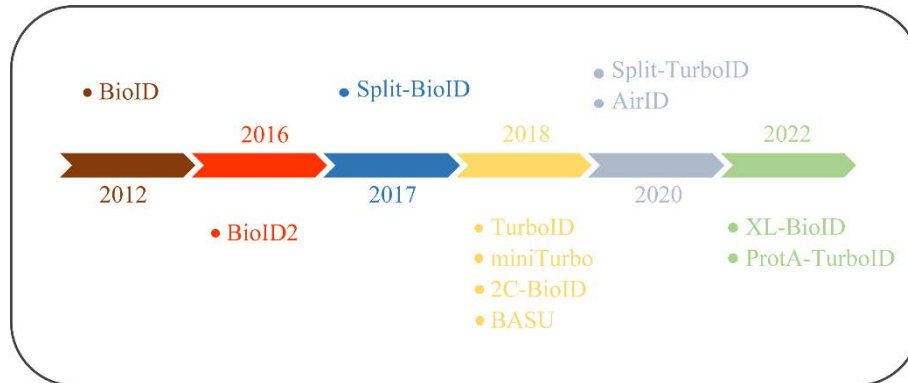


图 1 基于 BirA 的邻近标记技术的发展简史

Figure 1 Development history of proximity labeling technology based on BirA.

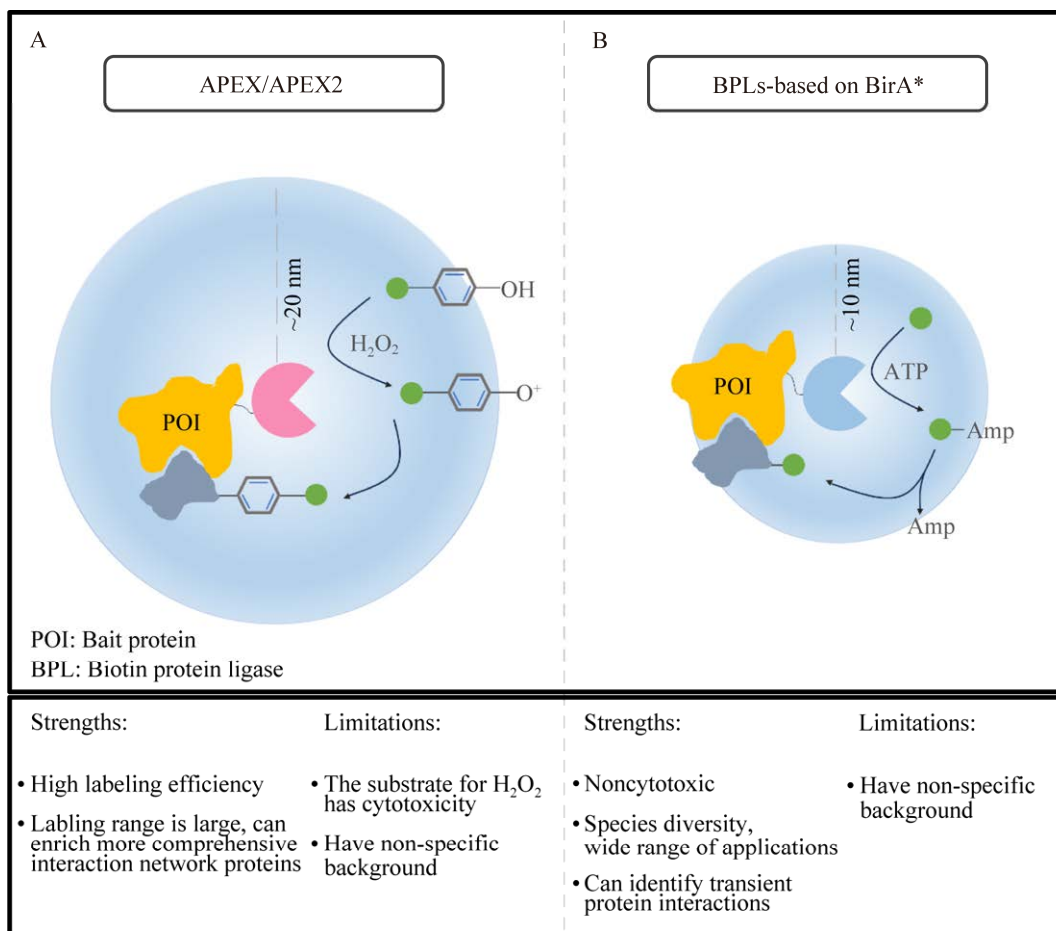


图 2 基于 BirA 的邻近标记技术与其他标记技术的比较

Figure 2 Comparison of BPL based on BirA with other labeling techniques.

1 基于 BirA 及其突变体邻近标记技术的发展

1.1 BirA 和 BirA*

BirA 是最早被发现的生物素连接酶,它可使生物素和 ATP 进行反应生成一种中间体——生物素酰-5'-AMP (Bio-5'-AMP), Bio-AMP 与 BirA 通过氢键结合,并且可与靶蛋白上特定的赖氨酸发生生物素化反应形成酰胺键^[1]。理论上 BirA 可作为生物素连接酶应用于邻近标记中,但由于 Bio-5'-AMP 和 BirA 间的结合强度过高,导致其与靶蛋白的结合变弱,催化效率低,限制了 BirA 的应用。1986 年, Buoncristiani 等^[2]发现 R118G 单氨基酸突变(BirA*)使 Bio-5'-AMP 和 BirA* 的亲合力大大降低,从而可有效地将 Bio-5'-AMP 释放到周围空间中,进而标记 BirA* 空间意义上的邻近蛋白。2004 年,研究人员运用该策略在体外和大肠杆菌中成功对 BirA 的底物——乙酰辅酶 A 的亚基生物素羧基载体蛋白 (biotin carboxyl carrier protein, BCCP) 之外的蛋白质进行了邻近标记^[3]。

1.2 BioID

2012 年 Roux 等^[4]成功在 BirA* 的基础上开发了一种用于真核细胞邻近蛋白标记的新技术——BioID (图 3A), 并应用该技术鉴定出多种与层粘连蛋白-A (laminin-A, LaA) 存在相互作用的蛋白质。BioID 技术的主要内容为: 将生物素连接酶与诱饵蛋白进行融合后在目的细胞中表达, 加入外源生物素后, 生物素连接酶将对与诱饵蛋白存在相互作用的蛋白质和邻近蛋白质进行生物素化标记, 利用生物素和链霉亲和素间的高亲和力富集并纯化被标记的蛋白, 通过质谱分析等常规方法鉴定被生物素化的蛋白质, 进而获取可能与诱饵蛋白存在相互作用的蛋白组信息。后期的研究发现, BioID 与诱饵蛋白融合表达可

能会干扰诱饵蛋白与目标蛋白结合, 为此 Kim 等^[5]改进了 BioID 方法: 他们将 BirA 人源化并突变了其生物素催化结构域(R40G)内的一个保守残基, 得到了一个更小的生物素连接酶, 基于此酶的邻近标记方法被称为 BioID2, 其生物素化靶蛋白的效率明显增强, 且标记范围较 BioID 更大。

1.2.1 2C-BioID 和 Split-BioID

鉴于 BioID 和 BioID2 方法中仍有一些蛋白存在与生物素连接酶融合表达后功能异常的问题, Chojnowski 等^[6]开发出了双组分 BioID (2 component BioID, 2C-BioID) 的方法(图 3B), 该方法将诱饵蛋白和生物素连接酶分别表达, 经诱导后二聚化形成生物素连接酶-诱饵蛋白复合物, 可对邻近蛋白进行标记。de Munter 等^[7]将目标蛋白分裂成两个互补的片段, 将这两个片段分别与生物素连接酶的调节亚基和催化亚基进行融合后在细胞中进行共表达, 只有当蛋白磷酸酶 PP1 的两个亚基形成二聚体时, 目标蛋白和 PP1 才能正常行使功能, 特异性地标记该复合物附近及相互作用的蛋白, 该技术被称为 Split-BioID (图 3C)。该技术不需要额外添加诱导试剂, 在一定程度上克服了 BioID2 非特异性背景较强的弊端。

1.2.2 XL-BioID

BioID 虽然能够把与诱饵蛋白邻近的蛋白质生物素化, 但当诱饵蛋白分子量较大时, 由于空间位阻等原因, 远离生物素邻近标记酶的一端或不在 BioID 10 nm 范围内的互作蛋白往往不能被有效地标记, 虽然可以通过改变 BioID 位置来对另一部分互作蛋白进行标记, 但会增加影响诱饵蛋白正常功能的风险, 在技术上也存在一定的挑战。为克服这些问题, Geoghegan 等^[8]将体内蛋白交联和 BioID 相结合, 创造出了互作蛋白富集率更高的临近标记方法 XL-BioID (图 3A), 该方法通过使用琥珀

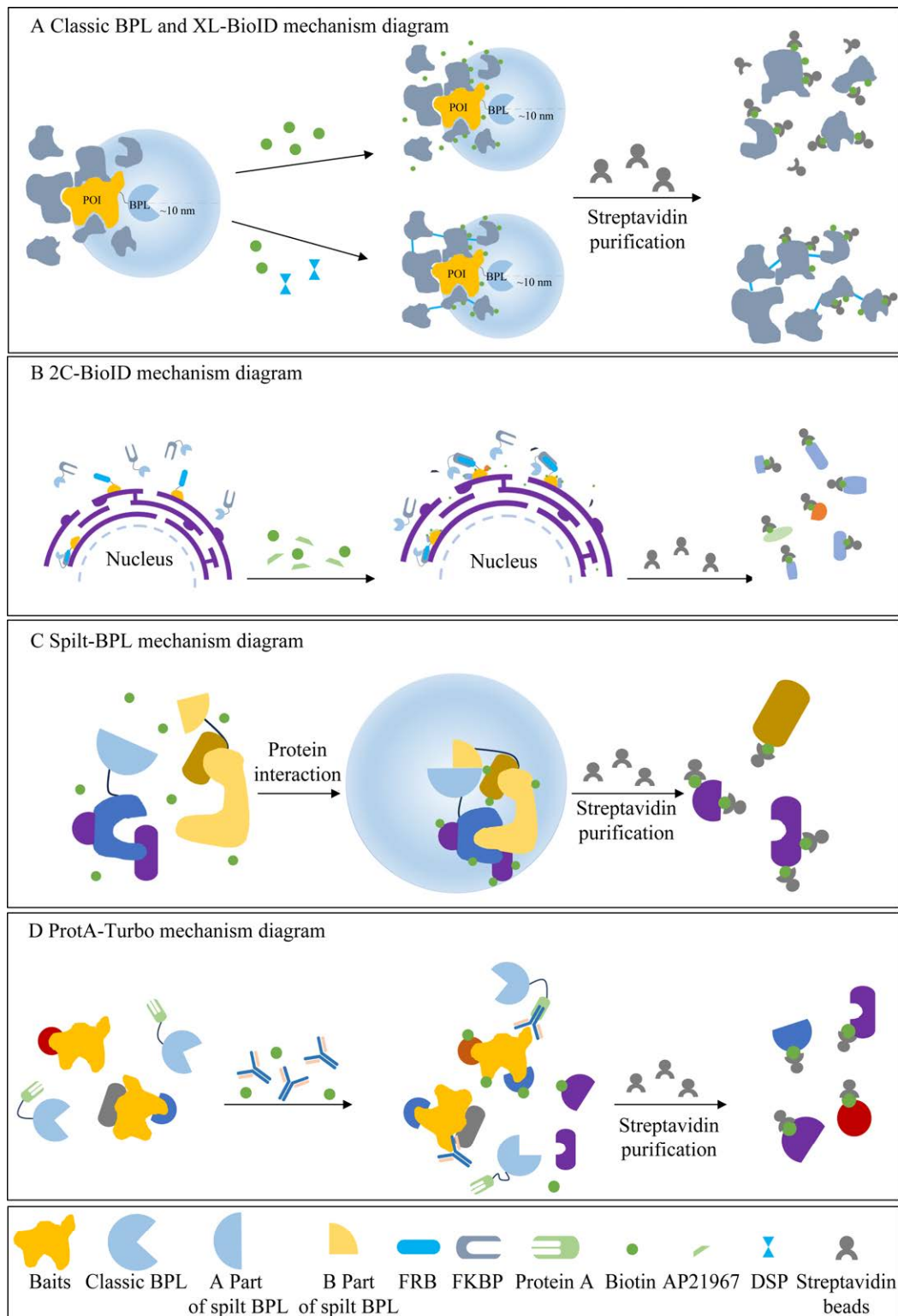


图3 基于 BirA 的邻近标记技术的工作原理图

Figure 3 Working schematic of proximity labeling technique based on BirA. A: Classic and XL-BioID. B: 2C-BioID. C: Spilt-BPL. D: ProtA-Turbo.

酰丙酸(dithio-bis-succinimidyl propionate, DSP)共价连接与诱饵蛋白邻近但未被生物素化的蛋白,这种共价连接能够耐受苛刻的裂解及洗涤环境;研究表明,相较于 BioID, XL-BioID 能够富集到 10 倍多的邻近蛋白,能够获得更全面的邻近蛋白信息。

1.3 BASU

在一些疾病的发生过程中, RNA 与蛋白质的互作研究也有着重要的意义。为了寻找能够鉴定 RNA 互作蛋白质的邻近标记方法, Ramanathan 等^[9]通过分析不同物种中生物素连接酶的序列以及结构,最终选择了来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的生物素连接酶,将其 DNA 结合区域进行缺失,设计出一个特别的酶——BASU。BASU 能快速生物素化与特定 RNA 基序结合的蛋白质,通过链霉亲和素富集被生物素化的蛋白,质谱分析鉴定与 RNA 特定序列相互作用的蛋白质。相较于 BirA*, BASU 的标记速率增加了 1 000 多倍,标记能力增加了 30 倍,研究发现, BASU 在染色质中的催化活性和 BioID/BioID2 相近^[10]。

1.4 TurboID 和 miniTurbo

限制 BioID 和 BioID2 应用的主要因素是过低的催化效率(实现充分标记需要长达 18–24 h)^[11],导致其不适用于动态 PPI 的研究。为了克服该限制, Kanzler 等^[11]通过易错 PCR 结合酵母显示定向进化技术,设计出了 BirA 突变体 TurboID 和 miniTurbo。TurboID 和 miniTurbo 的标记时间降低至 10 min^[12-13],因此, TurboID 和 miniTurbo 在研究动态、瞬时互作以及具有微弱、短暂或间接关联的 PPI 方面具有许多优势,并且成功应用于哺乳动物细胞^[14,15-16]、植物^[17-19]、酵母^[14,20]、蠕虫^[14]、苍蝇^[14]和病毒等多个物种中。

1.4.1 TurboID

TurboID 蛋白大小为 35 kDa,相较于 BioID 有 12 个突变位点。TurboID 催化效率极高,10 min

就可以完成 BioID 18–24 h 才能够达到的生物素标记水平。然而, TurboID 的高催化活性使其可以利用培养基或补充剂中含有的微量生物素,导致非特异性背景增加,即使用无生物素配方的培养基和过滤后的血清也不能完全消除背景标记^[21]。除了背景偏高外,还有一些关于 TurboID 在体外和体内模型中具有毒性的报道^[12,14], TurboID 在长时间标记和高生物素浓度情况下可能引起细胞毒性和高标记背景。

1.4.2 miniTurbo

miniTurbo 蛋白大小为 28 kDa,比 TurboID 小 20%,相较于 BirA*有 14 个突变位点并且缺失了由 63 个氨基酸构成的 DNA 结合域。由于 miniTurbo 体积较小,其可以最大限度地减少对融合蛋白正常功能的干扰。与 TurboID 相比, miniTurbo 背景较低,可以精确控制标记的时间,但 miniTurbo 活性较低,只有在添加足量的外源生物素时才能够有效地标记邻近的蛋白,在人类细胞系或成虫中表达时标记功能并不稳定。

1.4.3 Spilt-TurboID

与 Spilt-BioID 在 C 端的分裂位点不同, Spilt-TurboID 在 TurboID 的 N 端(第 78/79 位氨基酸)分裂为两个无功能片段^[22],在此位点下 Spilt-TurboID 可表现出最高的生物素催化活性,适用于细胞内特定细胞器或细胞膜与细胞膜之间的蛋白组学研究。然而 Spilt-TurboID 活性偏低,需要进行 4 h 的孵育才能获得与 TurboID 相近的标记效果。

1.4.4 ProtA-TurboID

上述的邻近标记方法大多依赖于诱饵蛋白和生物素连接酶的融合表达,且依赖于稳定的质粒表达方法,有些特殊蛋白难以表达或在融合表达后丧失原有的生物学功能,这些问题阻碍着邻近标记技术的广泛应用。Santos-Barriopedro 等^[23]基于金黄色葡萄球菌的 protein A (protA)与 Fc 间特异且稳定的相互作用,提出了一种新型融合蛋

白 ProtA-TurboID (图 3D), 此蛋白可通过原核系统表达, 在无质粒转染和基因操作的情况下与抗体的 Fc 区域结合, 适用于各种特性的细胞系包括临床样本, 可实现对细胞内蛋白质的高特异性标记。

1.4.5 AirID

鉴于 TurboID 在长期实验中依然表现出毒性以及非特异性背景高等缺点, Kido 等^[24]基于大型基因组数据集的祖先酶重建算法开发了一种新的邻近标记酶 AirID。结果表明, AirID 适用于细胞内的近距离生物素化实验。与 BioID 和 TurboID 不同, AirID 对细胞的毒性更小, 可用于生物体的长期实验。AirID 和 BioID 的同源性为 82%, 但 AirID 对互作蛋白有着更高的生物素化效率, 并且不会使自身生物素化(这可能是由于 AirID 的自身特性或 AirID 上缺乏赖氨酸残基)。AirID 在瞬时转染以及稳定转染细胞中能更加准确地对互作蛋白质进行生物素化, 有望提高邻近标记方法的准确性。

BirA 及其突变体的开发与应用意味着邻近标记技术的革新与发展, 为诸多领域中蛋白质间相互作用的研究提供了有力工具, 它们各自具有独特的优势, 也有实际应用中难以避免的劣势。如表 1 所示, 本文对 BirA 及其突变体的优劣势做了简要总结。

2 BirA 及其突变体在研究宿主-病原相互作用方面的应用

蛋白质是构成一切细胞和组织结构必不可少的成分, 参与几乎所有的细胞活动和生命过程, 如免疫应答、信号转导、基因调节等, 都离不开蛋白质-蛋白质的相互作用。宿主和病原体是涉及传染病的生命实体, 确定病原体和宿主间蛋白质-蛋白质相互作用有助于了解病原体感染途径, 可加速诊治方案的制定和预防措施的建立。关于 BirA 及其突变体邻近标记技术在病原

体与宿主蛋白互作研究上的应用, 本文将按照细菌、寄生虫、病毒 3 种病原体的分类展开综述。

2.1 细菌

由于邻近标记技术在植物蛋白互作领域的成功应用, 该技术已被证实是研究蛋白质-蛋白质相互作用的有力工具。因此, 邻近标记技术被越来越频繁地应用于细菌侵入宿主体内引发感染的过程探究。D'Costa 等^[25]利用 BioID 技术成功筛选出了沙门氏菌和人类细胞存在相互作用的效应蛋白, 确定了 632 种沙门氏菌蛋白与 381 种人类蛋白质有存在潜在的相互作用, 更高效、直接地获取了沙门氏菌与宿主间蛋白质互作信息, 为研究沙门氏菌效应蛋白的分泌机制提供了理论基础。研究人员运用 BioID2 鉴定出了 210 个可能与 Pdlim2 存在相互作用的蛋白质, 发现细菌感染中枢神经系统时影响了 Pdlim2 和 Mpr1p 蛋白的表达, 进而增强了菌体对宿主血脑屏障的穿透能力^[26]。近期, 本实验室将邻近标记技术应用到猪主要细菌病的基础研究中, 并取得一定进展: Jiang 等^[27]通过 TurboID 邻近标记技术, 首次绘制了猪格拉瑟氏菌 OmpP2 蛋白与宿主细胞互作蛋白质的全景图谱, 证实了宿主细胞膜蛋白 CAV1、ARF6 和 PPP2R1A 参与 iPAM 细胞对猪格拉瑟氏菌的识别与吞噬, 从宿主的角度揭示了猪格拉瑟氏菌入侵宿主细胞的关键蛋白; Hu 等^[28]利用 TurboID 邻近标记技术在 iPAM 细胞中鉴定出 318 种与胸膜肺炎放线杆菌外毒素 ApxIA 可能存在相互作用的宿主蛋白, 研究发现, 在这些蛋白中, CAV1 可以与 ApxIA 相互作用, 参与 ApxI 诱导的 iPAM 细胞凋亡。

在研究细菌侵入宿主引发感染的过程中, 基于 BirA 及其突变体的邻近标记技术被证明能够高效、直接地获取有关细菌与宿主间蛋白质互作信息, 为深入理解病原菌入侵机制和相关疾病的发病机制提供了理论基础。

表 1 BirA 及其突变体间的比较

Table 1 Comparison between BirA and its mutants

Method	Source	Size (kDa)	Labeling time	Mutant	Strengths	Limitations
BirA* ^[2]	<i>Escherichia coli</i>	35	15–24 h	R118G	No cytotoxicity	Low catalytic efficiency to characterize transient interactions
BioID2 ^[5]	<i>Aquifex aeolicus</i>	27	15–24 h	R40G	Low impact on bait protein function	Non-specific background
XL-BioID ^[8]	<i>Escherichia coli</i>	35	15–24 h	Capturing more neighboring proteins by adding DSPs (dithiobis succinimidyl propionate)	Ability to enrich more comprehensive neighboring proteins	Low catalytic efficiency to characterize transient interactions; need to add additional DSP, will add non-characteristic backgrounds
2C-BioID ^[6]	<i>Escherichia coli</i>	35	15–24 h	The bait protein and BioID fused with FRB and FKBP proteins respectively	Facilitates identification of protein complex	Need to add additional inducers
Split-BioID ^[7]	<i>Escherichia coli</i>	35	24 h	R118G (E256/G257 split site)	Facilitates identification of protein complex; easy operation	Low catalytic efficiency
BASU ^[9]	<i>Bacillus subtilis</i>	29	15–24 h	Mutation of R124G, E323S, G325R and deletion of the N-terminal DNA-binding region (1–65) on the basis of BirA*	High labeling capacity and catalytic efficiency	Can only be used to identify RNA and protein interactions
TurboID ^[14]	<i>Escherichia coli</i>	35	10 min	Q65P, I87V, R118S, E140K, Q141R, S150G, L151P, V160A, T192A, K194I, M209V, M241T, S263P, 130V	No cytotoxicity; high labeling capacity and catalytic efficiency; identification of transient protein interactions	Non-specific background
Mini TurboID ^[14]	<i>Escherichia coli</i>	28	10 min	Deletion of the N-terminal DNA binding region (1–65) on the basis of TurboID	Same as TurboID and less impact on bait protein function	Non-specific background
Split-TurboID ^[22]	<i>Escherichia coli</i>	35	4 h	Split from amino acids 78/79 on the basis of TurboID	Same as TurboID and higher spatial specificity	Low catalytic activity compared to TurboID
ProtA-TurboID ^[23]	<i>Escherichia coli</i>	35	10 min	Fusion of ProteinA on the basis of TurboID	Suitable for a wide range of cells; less impact on bait protein function	High non-specific background; steps are more complex than TurboID
AirID ^[24]	<i>Ancestral</i>	27	3 h	82% homology with TurboID	Low non-specific background	Low catalytic activity compared to TurboID

2.2 寄生虫

2.2.1 弓形虫

目前全世界最广泛流行的寄生虫主要包括锥虫、弓形虫以及疟原虫,均能够感染人类。弓形虫作为顶复门下的一种寄生虫,能够对几乎所有动物产生慢性感染。弓形虫的内膜复合物(inner membrane complex, IMC)参与寄生虫入侵、复制以及运动等多个重要生命过程,Chen 等^[29]通过将不同 IMC 蛋白作为 BioID 的诱饵,鉴定出了 19 种具有不同亚细胞器定位的 IMC 蛋白。Back 等^[30]发现 IMC29 缺失的弓形虫具有严重的复制缺陷,然后以 IMC29 为诱饵通过 BioID 鉴定出了 8 个从未报道过的 IMC 蛋白,拓展了 IMC 蛋白组信息。

弓形虫感染宿主的过程中需要寄生液泡在宿主细胞内进行复制,并通过释放致密颗粒蛋白(dense granule proteins, GRAs)来促进免疫逃避、营养吸收和维持寄生液泡的结构。BPL 是鉴定与寄生液泡相关蛋白的重要手段^[31-33]。Nadipuram 等^[34]将 GRA17 和裂殖子蛋白 MAG1 与 BioID 融合鉴定出了弓形虫的一些从未被报道过的蛋白,并通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术鉴定出 GRA39 和 GRA55 是维持弓形的虫组织囊胞形成和正常生长的关键蛋白,这两种蛋白可以作为潜在的治疗靶点。通过将 BirA* 融合至弓形虫的类椎体蛋白质组,研究人员鉴定出了类椎体的枢纽蛋白 CPH1 和形成类椎体的必要蛋白 AC9 和 AC10^[35-36]。Engelberg 等^[37]在一个称为顶环的细胞器中发现了几种信号蛋白和含有卷曲螺旋结构域的蛋白,后者嵌于 IMC 的孔状结构中。

2.2.2 疟原虫

除了弓形虫,顶复门还包括另一种危害巨大的寄生虫——疟原虫。疟原虫的一部分蛋白和其他同门寄生虫的蛋白几乎没有同源性,研究难度

很高。恶性疟原虫和伯氏疟原虫基因组自被发现 20 年以来,其蛋白质编码基因目前仍有 1/3 未被鉴定。在缺乏序列和结构同源性的情况下,可通过邻近标记技术在自然细胞环境中标记蛋白质复合物来促进这些未知蛋白的功能研究。Ambekar 等^[38]通过 TurboID 融合蛋白的邻近标记方法结合基因缺失实验,鉴定出了疟原虫的 5 个生存必需蛋白: Nup176、269、335、390 和 434,体现出邻近标记在解析蛋白质复合物构成和鉴定疟原虫蛋白质方面的强大功能。2023 年, Kimmel 等^[39]以多个未知蛋白作为诱饵利用 BioID 鉴定了与其在一定条件下存在相互作用的蛋白组,最终找到 4 种在疟原虫 DNA 复制和有丝分裂中起关键作用的蛋白。棒状体蛋白(pfARO)在疟原虫入侵宿主细胞过程中不可或缺。Geiger 等^[40]找到了与 pfARO 互作的蛋白 PFAIP,并通过突变 PFAIP 发现其在疟原虫入侵红细胞的过程中发挥一定的作用。在感染宿主细胞并完成复制后,疟原虫也有着独特的逃逸机制, Kehler 等^[41]将 BirA* 与嗜酸体蛋白 MDV1/PEG3 融合,鉴定出多个参与疟原虫逃逸的蛋白。细胞出口蛋白 1 (cell export protein 1, EXP1)是疟原虫逃逸细胞的关键蛋白之一,研究者借助 BioID 技术鉴定出 61 种与 EXP1 具有潜在互作关系的蛋白^[42],并揭示了 EXP1 在维持寄生液泡完整性中的新作用^[43]。一项关于恶性疟原虫顶质体的研究通过使用 BioID 鉴定出 346 个高可信度的候选互作蛋白,其中 ATP 结合盒转运蛋白(ABCF1)被证明是血液期疟原虫生存所必需的^[44]。

2.2.3 锥虫

锥虫属于原生动物门,能够寄生在大部分动物以及人类的血液中、细胞内。锥虫感染者若不及时治疗阻断感染,生存概率几乎为 0。Morriswood 等^[45]用 BirA 标记了一种在布氏锥虫

细胞骨架结构中发现的蛋白质 TbMORN1, 发现了 9 种从未被鉴定过的蛋白质, 其中 7 种为新的双叶蛋白, 2 种定位于鞭毛。随后, de Pablos 等^[46]用 BioID 标记了布氏锥虫的两种 RNA 结合蛋白即 BirA*-RBP9 和 BirA*-RBP10, 通过 RNA 测序确定了 200 多个潜在互作蛋白。借助 BioID, 研究者们还鉴定了调节布氏锥虫极化和运动功能的蛋白质^[47-48]。Schock 等^[49]通过 BioID 绘制了布氏锥虫骨架蛋白 CAP50 的互作蛋白网络, 找到了从未被报道过的、对维持布氏锥虫细胞膜完整性至关重要的骨架蛋白 CAP52 和 CAP42。Soto-Gonzalez 等^[50]通过 BioID 鉴定出布氏锥虫线粒体内膜的蛋白转位酶 TbTIM17 的伴侣蛋白 TbTRAP1, 首次报道了 TRAP1 在真核生物 translocator of the inner mitochondrial membrane (TIM)复合体中的作用。

基于 BirA 及其突变体的邻近标记技术使得研究人员能够实时而详细地观察寄生虫蛋白与宿主蛋白之间的相互作用, 其高灵敏度和对复杂蛋白互作网络的深度洞察, 为解析寄生虫蛋白功能、揭示寄生虫的逃逸机制和宿主的抗寄生虫免疫应答提供了有力支持。然而, 在寄生虫中不能依赖于单一的方法来鉴定蛋白互作^[51], 基于 BirA 及其突变体的邻近标记技术作为一种新兴的高通量的研究 PPI 的方法, 并不能完全替代传统方法(如 CO-IP)的地位, 只有与传统方法相辅相成才能更好地发挥 BioID 研究蛋白质互作的潜力。

2.3 病毒

不同于细菌和寄生虫有独立的代谢系统, 病毒依靠宿主细胞完成自身的生命活动, 这无疑为病毒与宿主间相互作用的研究带来严峻挑战。尽管基于 BirA 及其突变体的邻近标记技术在病原-宿主相互作用的研究中已经展示出巨大潜力, 但在病毒学研究领域, 该技术的应用仍处于

探索阶段。

2.3.1 DNA 病毒

病毒只有寄生于生物体的活细胞中才能生存和繁殖, 在感染宿主细胞后, 病毒可通过劫持细胞的特定蛋白影响细胞正常的信号通路和作用机制。EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)的潜伏性膜蛋白(latent membrane proteins, LMP1)可通过结构性激活信号通路导致被感染的细胞处于异常的存活状态, 使宿主的非淋巴组织永生。Nkosi 等^[52]利用 BioID 技术验证了一种与 LMP1 存在相互作用的宿主肌动蛋白; 后期 Rider 等^[53]再次应用 BioID 技术鉴定出与 LMP1 相互作用的 1 862 个蛋白, 这些蛋白主要参与蛋白质的囊泡运输及信号转导, 为揭示 EBV 感染宿主细胞导致病变的机制奠定了基础。

通常情况下, 病毒的复制周期分为 6 个阶段: 吸附、侵入、脱壳、生物合成、组装和释放。应用 BioID 技术下, 多种 DNA 病毒的不同复制环节机制被成功发现。Bagchi 等^[54]发现内质网膜蛋白复合物亚基 EMC4 和 EMC7 通过与晚期内体相关的 Rab7 相互作用, 促进猴空泡病毒 40 (simian vacuolating virus 40, SV40)从晚期内体分选到内质网以引起感染, 这是病毒脱壳过程中的一个重要环节。

关于病毒的组装过程, Wang 等^[55]利用 BioID 研究了人 I 型博卡病毒(human bocavirus, HBoV)非结构蛋白 NP1 的相互作用组, 发现宿主因子 CPSF6 直接与 NP1 相互作用, 促进细胞核中衣壳蛋白编码 mRNA 的成熟, 调节 HBoV1 的组装。

cVAC 是一种细胞质病毒粒子组装复合物, 人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)蛋白 pUL103 介导组装复合物 cVAC 的形成过程。Ortiz 等^[56]使用 BioID 鉴定出与 pUL103 存在相互作用的蛋白, 其中, 有 13 种病毒蛋白为被膜

蛋白、核蛋白和 DNA 相关蛋白,有 18 种细胞蛋白与高尔基体转运、蛋白定位和先天免疫机制相关。

ICP18 是一种由新加坡石斑鱼虹膜病毒(singapore grouper iridovirus, SGIV) *ORF086R* 基因编码的蛋白质,可调节宿主细胞增殖和病毒组装。相关研究采用 BioID 方法探究 ICP18 的相互作用组,发现与 ICP18 相互作用的蛋白能够调节细胞周期和细胞黏附等多种细胞过程,使这些过程的发生更有利于病毒的组装,以此促进 SGIV 的复制^[57]。

关于病毒的释放过程, Boruchowicz 等^[58]研究了 I 型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type 1, HSV-1)糖蛋白 gM 的相互作用组,鉴定出 2 455 个候选蛋白,其中 35%与蛋白质运输有关,并发现输出蛋白(XPO6)是 gM 从核膜释放到反面高尔基网(reverse Golgi net, TGN)过程的必需蛋白。

2.3.2 RNA 病毒

邻近标记技术在研究 RNA 病毒与宿主间蛋白质相互作用上也显示出巨大的应用潜力。在关于可感染人类的 RNA 病毒研究中,研究人员利用邻近标记技术取得了一定的研究成果。

早在 2015 年, Kueck 等^[59]就利用 BirA 融合人类免疫缺陷病毒 I 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)的 Vpu 蛋白,证明了 Vpu 蛋白可在与宿主束缚蛋白形成复合物后和网格蛋白适配器 AP-1 相互作用,导致束缚蛋白发生内吞体运输和蛋白酶体降解,进而阻断束缚蛋白对 HIV-1 病毒粒子释放的抑制作用。Gag 蛋白是 HIV-1 的重要结构蛋白, HIV-1 感染后从机体血液中最先检出的抗体为抗 Gag 蛋白的抗体,因此该蛋白对获得性免疫缺陷综合征(acquire immune deficiency syndrome, AIDS)的检测有着重要作用。Ritchie 等^[60]和 Le Sage 等^[61]使用

BirA*标记的方法鉴定出 50 种可能与 Gag 发生相互作用的蛋白,获取到 Gag 蛋白在合成、运输、组装和释放的过程中可能存在相互作用的蛋白质信息,并且发现了只有缺失结构蛋白基质的 PrGag 蛋白可与 HIV-1 的包膜蛋白 Env 相互作用,证实了 HIV-1 Gag 蛋白和 DDX17 及 RPS6 蛋白存在相互作用。这些研究为 HIV-1 Gag 蛋白参与病毒形成的分子机制提供了新的理论,为 HIV-1 相关抗病毒研究和临床防控提供了新的潜在靶点。

2018 年, Coyaud 等^[62]在 10 种寨卡病毒(zika virus, ZIKV)蛋白的 N 端和 C 端添加 Flag-BirA*, 分别表达蛋白后进行 AE-MS 和 BioID, 经过分析,他们共鉴定出 1 224 个蛋白中的 3 033 种相互作用关系,其中有 60%为在其他病毒感染过程中已知的相互作用关系。此外, BioID 方法鉴定出的膜蛋白种类是 AE-MS 的 3 倍,显示出 BioID 在检测病毒蛋白相互作用方面的强大功能。

甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)具有广泛的宿主范围,对公共卫生构成严重威胁。该病毒通过抑制宿主基因表达来逃避免疫攻击,但通常不会抑制病毒复制所需的宿主蛋白。相关研究表明,核糖体移码蛋白 PA-X 与 IAV 感染后宿主免疫应答的调节有关, PA-X 蛋白 C 端特有的 X-ORF 区是其发挥活性的必需结构。Gaucherand 等^[63]假设 X-ORF 是 PA-X 与病毒靶 mRNA 相互作用的关键区域,利用 BioID 技术将 BirA*和不同种类的 X-ORF 融合,以此标记和鉴定与 PA-X 存在相互作用的宿主蛋白,发现 PA-X 和细胞 RNA 的加工蛋白相互作用,选择性地剪切新转录的 mRNA,为后期人们进一步探究流感病毒抑制宿主基因表达的机制提供了新思路。

2020 年, Anne-Claude Gingras 团队^[64]在预印本平台 BioRxiv 上发表了一篇关于 SARS-CoV-2

与宿主间蛋白相互作用关系的文章,作者用 miniTurbo 标记了 27 个 SARS-CoV-2 蛋白,检测到病毒蛋白与 2 242 个宿主蛋白间存在 7 810 种相互作用,其中有 7 382 种是新发现的相互作用关系。这些存在相互作用的蛋白中包含 17 个已知细胞定位信息的宿主蛋白,作者通过这些蛋白更为准确地分析了病毒蛋白在 A549 细胞中的定位,描述了这些病毒蛋白对宿主细胞功能产生影响的潜在机制。此外,邻近标记技术成功检测到与埃博拉病毒(Ebola virus, EBoV)基质蛋白 VP40 相互作用的宿主蛋白,证明 GTP 酶 Rab14 是 VP40 在 HeLa 细胞中进行胞内运输的新型调节因子^[65]。

在动物 RNA 病毒的研究中,V'kovski 等^[66]在小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV) nsp2 的阅读框内融合了具有 myc 标签的 BirA-R118G 蛋白,并利用反向遗传系统获得了该重组病毒,发现 MHV 的复制过程与宿主内质网-高尔基体运输途径、泛素依赖性降解途径以及自噬相关的代谢途径密切相关。通过 BirA-R118G 标记接近 MHV 复制转录复合体(replication transcriptional compounds, RTC)的宿主蛋白,发现其中有翻译起始因子参与,进一步说明了冠状病毒翻译起始因子的关键作用以及 MHV RNA 合成与宿主细胞生命过程的空间和功能联系。

利用这一革新性的邻近标记技术,人们得以在时间和空间维度探究病毒蛋白与宿主蛋白之间的互作关系,为揭示病原体侵入机制、感染过程中的关键蛋白互作关系以及宿主细胞的应激反应提供了突破口。该技术的不断创新和发展必将为病毒学和宿主免疫研究带来更深入的理解,有望为新型抗病毒药物的开发和治疗策略的制定提供帮助。

3 总结与展望

基于 BirA 及其突变体的邻近标记方法在各种蛋白互作领域得到越来越广泛的应用。与传统研究蛋白质互作方法相比, BioID/TurboID 及其衍生的方法具有无毒性、高催化效率和广泛适用的优势,这为科研人员研究蛋白互作提供了方便且高效的手段,使以前难以进行的生物学研究成为可能。在研究病原与宿主之间的分子互作和功能关系领域,这些方法也展现出巨大的应用潜力。

病毒在入侵细胞或者进入细胞后都需要借助劫持宿主蛋白来为自身的复制提供有利条件,这一入侵过程往往具备时间上的持续性和空间上的复杂性,给相关研究的开展增加了难度。BPL 的诞生和发展正在成功应对这一难题:该技术使得对病原-宿主蛋白质间相互作用进行动态研究成为可能,揭示了病毒蛋白与宿主蛋白之间多种相互作用; BPL 能够在宿主细胞感染病毒的过程中研究病毒蛋白与自身蛋白以及与宿主蛋白之间更真实的互作关系,而不是在过表达单一病毒蛋白的细胞中进行分析;通过对病毒生命活动进行时间性和空间性的详细剖析, BPL 极大地推动了病原-宿主间相互作用机制的研究进展。

尽管 BPL 在研究病原-宿主蛋白质互作方面具有显著优势,然而我们也必须认识到其自身的一些局限性。邻近标记技术无法直接揭示被标记蛋白的生物学特性,也不能直接阐明病原与宿主间相互作用蛋白的生物学相关性,通常需要利用 siRNA 干扰、CRISPR 基因敲除和过表达等方法进行验证。在使用 BPL 研究蛋白互作关系时,还需要仔细考虑被标记蛋白质与诱饵蛋白之间是否存在直接的互作关系,以及这种互作是否会对宿主蛋白的转运和功能产生

影响。因此,在充分利用 BPL 优势的同时,科研人员也需考虑其局限性,以确保研究结果的准确性和可靠性。

总之,随着相对简单、可靠的 BPL 方法的不断革新,我们相信其能够在未来成为研究病原与宿主蛋白质组学的主要选择,为疾病机制解析、药物研发以及诊疗策略的优化开拓崭新的研究领域。

REFERENCES

- [1] LANE MD, ROMINGER KL, YOUNG DL, LYNEN F. The enzymatic synthesis of holotranscarboxylase from apotranscarboxylase and (+)-biotin. i. purification of the apoenzyme and synthetase; characteristics of the reaction[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1964, 239: 2858-2864.
- [2] BUONCRISTIANI MR, HOWARD PK, OTSUKA AJ. DNA-binding and enzymatic domains of the bifunctional biotin operon repressor (BirA) of *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1986, 44(2/3): 255-261.
- [3] CHOI-RHEE E, SCHULMAN H, CRONAN JE. Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2004, 13(11): 3043-3050.
- [4] ROUX KJ, KIM DI, RAIDA M, BURKE B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2012, 196(6): 801-810.
- [5] KIM DI, JENSEN SC, NOBLE KA, KC B, ROUX KH, MOTAMEDCHABOKI K, ROUX KJ. An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 27(8): 1188-1196.
- [6] CHOJNOWSKI A, SOBOTA RM, ONG PF, XIE W, WONG X, DREESEN O, BURKE B, STEWART CL. 2C-BioID: an advanced two component BioID system for precision mapping of protein interactomes[J]. *iScience*, 2018, 10: 40-52.
- [7] de MUNTER S, GÖRNEMANN J, DERUA R, LESAGE B, QIAN JB, HEROES E, WAELKENS E, van EYNDE A, BEULLENS M, BOLLEN M. Split-BioID: a proximity biotinylation assay for dimerization-dependent protein interactions[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(2): 415-424.
- [8] GEOGHEGAN V, CARNIELLI JBT, JONES NG, SALDIVIA M, ANTONIOU S, HUGHES C, NEISH R, DOWLE A, MOTTRAM JC. CLK1/CLK2-driven signalling at the *Leishmania* kinetochore is captured by spatially referenced proximity phosphoproteomics[J]. *Communications Biology*, 2022, 5: 1305.
- [9] RAMANATHAN M, MAJZOUB K, RAO DS, NEELA PH, ZARNEGAR BJ, MONDAL S, ROTH JG, GAI H, KOVALSKI JR, SIPRASHVILI Z, PALMER TD, CARETTE JE, KHAVARI PA. RNA-protein interaction detection in living cells[J]. *Nature Methods*, 2018, 15: 207-212.
- [10] ZHOU Y, ZOU P. The evolving capabilities of enzyme-mediated proximity labeling[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2021, 60: 30-38.
- [11] KANZLER CR, DONOHUE M, DOWDLE ME, SHEETS MD. TurboID functions as an efficient biotin ligase for BioID applications in *Xenopus* embryos[J]. *Developmental Biology*, 2022, 492: 133-138.
- [12] DOERR A. Proximity labeling with TurboID[J]. *Nature Methods*, 2018, 15: 764.
- [13] MAY DG, SCOTT KL, CAMPOS AR, ROUX KJ. Comparative application of BioID and TurboID for protein-proximity biotinylation[J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1070.
- [14] BRANON TC, BOSCH JA, SANCHEZ AD, UDESHI ND, SVINKINA T, CARR SA, FELDMAN JL, PERRIMON N, TING AY. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36: 880-887.
- [15] CHUA XY, ABALLO T, ELNEMER W, TRAN M, SALOMON A. Quantitative interactomics of Ick-TurboID in living human T cells unveils T cell receptor stimulation-induced proximal Ick interactors[J]. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(1): 715-726.
- [16] BOZAL-BASTERRA L, GONZALEZ-SANTAMARTA M, MURATORE V, BERMEJO-ARTEAGABEITIA A, Da FONSECA C, BARROSO-GOMILA O, AZKARGORTA M, ILORO I, PAMPLIEGA O, ANDRADE R, MARTÍN-MARTÍN N, BRANON TC, TING AY, RODRÍGUEZ JA, CARRACEDO A, ELORTZA F, SUTHERLAND JD, BARRIO R. LUZP1, a novel regulator of primary cilia and the actin cytoskeleton, is a contributing factor in Townes-Brocks syndrome[J]. *eLife*, 2020, 9: e55957.
- [17] ARORA D, ABEL NB, LIU C, van DAMME P, YPERMAN K, EECKHOUT D, VU LD, WANG J, TORNKVIST A, IMPENS F, KORBEI B, van LEENE

- J, GOOSSENS A, de JAEGER G, OTT T, MOSCHOU PN, van DAMME D. Establishment of proximity-dependent biotinylation approaches in different plant model systems[J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(11): 3388-3407.
- [18] MAIR A, XU SL, BRANON TC, TING AY, BERGMANN DC. Proximity labeling of protein complexes and cell-type-specific organellar proteomes in *Arabidopsis* enabled by TurboID[J]. *eLife*, 2019, 8: e47864.
- [19] ZHANG YL, SONG GY, LAL NK, NAGALAKSHMI U, LI YY, ZHENG WJ, HUANG PJ, BRANON TC, TING AY, WALLEY JW, DINESH-KUMAR SP. TurboID-based proximity labeling reveals that UBR7 is a regulator of N NLR immune receptor-mediated immunity[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3252.
- [20] LAROCHELLE M, BERGERON D, ARCAND B, BACHAND F. Proximity-dependent biotinylation mediated by TurboID to identify protein-protein interaction networks in yeast[J]. *Journal of Cell Science*, 2019, 132(11): jcs232249.
- [21] JOHNSON BS, CHAFIN L, FARKAS D, ADAIR J, ELHANCE A, FARKAS L, BEDNASH JS, LONDINO JD. MicroID2: a novel biotin ligase enables rapid proximity-dependent proteomics[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2022, 21(7): 100256.
- [22] CHO KF, BRANON TC, UDESHI ND, MYERS SA, CARR SA, TING AY. Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15(12): 3971-3999.
- [23] SANTOS-BARRIOPEDEO I, van MIERLO G, VERMEULEN M. Off-the-shelf proximity biotinylation using ProtA-TurboID[J]. *Nature Protocols*, 2023, 18(1): 36-57.
- [24] KIDO K, YAMANAKA S, NAKANO S, MOTANI K, SHINOHARA S, NOZAWA A, KOSAKO H, ITO S, SAWASAKI T. AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein-protein interactions[J]. *eLife*, 2020, 9: e54983.
- [25] D' COSTA VM, COYAUD E, BODDY KC, LAURENT EMN, ST-GERMAIN J, LI T, GRINSTEIN S, RAUGHT B, BRUMELL JH. BioID screen of *Salmonella* type 3 secreted effectors reveals host factors involved in vacuole positioning and stability during infection[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(12): 2511-2522.
- [26] LI ZM, BRUNO VM, KIM KS. Central nervous system-infecting pathogens *Escherichia coli* and *Cryptococcus neoformans* exploit the host Pdlim2 for intracellular traversal and exocytosis in the blood-brain barrier[J]. *Infection and Immunity*, 2021, 89(10): e0012821.
- [27] JIANG CS, MA NN, CAO H, ZENG W, REN JP, HU YF, ZHOU JR, ZHANG MJ, LI C, LANG YF, LI WT, HE QG. TurboID screening of the OmpP2 protein reveals host proteins involved in recognition and phagocytosis of *Glaesserella parasuis* by iPAM cells[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(5): e0230722.
- [28] HU YF, JIANG CS, ZHAO YQ, CAO H, REN JP, ZENG W, ZHANG MJ, LI YT, HE QG, LI WT. TurboID screening of ApxI toxin interactants identifies host proteins involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae*-induced apoptosis of immortalized porcine alveolar macrophages[J]. *Veterinary Research*, 2023, 54(1): 62.
- [29] CHEN AL, KIM EW, TOH JY, VASHISHT AA, RASHOFF AQ, VAN C, HUANG AS, MOON AS, BELL HN, BENTOLILA LA, WOHLSCHEGEL JA, BRADLEY PJ. Novel components of the *Toxoplasma* inner membrane complex revealed by BioID[J]. *mBio*, 2015, 6(1): e02357-14.
- [30] BACK PS, MOON AS, PASQUARELLI RR, BELL HN, TORRES JA, CHEN AL, SHA JH, VASHISHT AA, WOHLSCHEGEL JA, BRADLEY PJ. IMC29 plays an important role in *Toxoplasma* endodyogeny and reveals new components of the daughter-enriched IMC proteome[J]. *mBio*, 2023, 14(1): e0304222.
- [31] PAN M, LI MJ, LI LJ, SONG YL, HOU L, ZHAO JL, SHEN B. Identification of novel dense-granule proteins in *Toxoplasma gondii* by two proximity-based biotinylation approaches[J]. *Journal of Proteome Research*, 2019, 18(1): 319-330.
- [32] NADIPURAM SM, THIND AC, RAYATPISHEH S, WOHLSCHEGEL JA, BRADLEY PJ. Proximity biotinylation reveals novel secreted dense granule proteins of *Toxoplasma gondii* bradyzoites[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232552.
- [33] TU V, TOMITA T, SUGI T, MAYORAL J, HAN B, YAKUBU RR, WILLIAMS T, HORTA A, MA YF, WEISS LM. The *Toxoplasma gondii* cyst wall interactome[J]. *mBio*, 2020, 11(1): e02699-19.
- [34] NADIPURAM SM, KIM EW, VASHISHT AA, LIN AH, BELL HN, COPPENS I, WOHLSCHEGEL JA, BRADLEY PJ. *In vivo* biotinylation of the *Toxoplasma* parasitophorous vacuole reveals novel dense granule proteins important for parasite growth and

- pathogenesis[J]. *mBio*, 2016, 7(4): e00808-e00816.
- [35] LONG SJ, ANTHONY B, DREWRY LL, SIBLEY LD. A conserved ankyrin repeat-containing protein regulates conoid stability, motility and cell invasion in *Toxoplasma gondii*[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 2236.
- [36] TOSETTI N, dos SANTOS PACHECO N, BERTIAUX E, MACO B, BOURNONVILLE L, HAMEL V, GUICHARD P, SOLDATI-FAVRE D. Essential function of the alveolin network in the subpellicular microtubules and conoid assembly in *Toxoplasma gondii*[J]. *eLife*, 2020, 9: e56635.
- [37] ENGELBERG K, CHEN CT, BECHTEL T, GUZMÁN VS, DROZDA AA, CHAVAN S, WEERAPANA E, GUBBELS MJ. The apical annuli of *Toxoplasma gondii* are composed of coiled-coil and signalling proteins embedded in the inner membrane complex sutures[J]. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(1): e13112.
- [38] AMBEKAR SV, BECK JR, MAIR GR. TurboID identification of evolutionarily divergent components of the nuclear pore complex in the malaria model *Plasmodium berghei*[J]. *mBio*, 2022, 13(5): e0181522.
- [39] KIMMEL J, SCHMITT M, SINNER A, JANSEN PWTC, MAINYE S, RAMÓN-ZAMORANO G, TOENHAKÉ CG, WICHERS-MISTEREK JS, CRONSHAGEN J, SABITZKI R, MESÉN-RAMÍREZ P, BEHRENS HM, BÁRTFAI R, SPIELMANN T. Gene-by-gene screen of the unknown proteins encoded on *Plasmodium falciparum* chromosome 3[J]. *Cell Systems*, 2023, 14(1): 9-23.e7.
- [40] GEIGER M, BROWN C, WICHERS JS, STRAUSS J, LILL A, THUENAUER R, LIFFNER B, WILCKE L, LEMCKE S, HEINCKE D, PAZICKY S, BACHMANN A, LÖW C, WILSON DW, FILARSKY M, BURDA PC, ZHANG K, JUNOP M, GILBERGER TW. Structural insights into PfARO and characterization of its interaction with PfaIP[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(4): 878-896.
- [41] KEHRER J, FRISCHKNECHT F, MAIR GR. Proteomic analysis of the *Plasmodium berghei* gametocyte egressome and vesicular bioID of osmiophilic body proteins identifies merozoite TRAP-like protein (MTRAP) as an essential factor for parasite transmission[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2016, 15(9): 2852-2862.
- [42] SCHNIDER CB, BAUSCH-FLUCK D, BRÜHLMANN F, HEUSSLER VT, BURDA PC. BioID reveals novel proteins of the *Plasmodium* parasitophorous vacuole membrane[J]. *mSphere*, 2018, 3(1): e00522-17.
- [43] NESSEL T, BECK JM, RAYATPISHEH S, JAMI-ALAHMADI Y, WOHLSCHLEGEL JA, GOLDBERG DE, BECK JR. EXP1 is required for organisation of EXP2 in the intraerythrocytic malaria parasite vacuole[J]. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(5): e13168.
- [44] BOUCHER MJ, GHOSH S, ZHANG LC, LAL A, JANG SW, JU A, ZHANG SY, WANG XZ, RALPH SA, ZOU J, ELIAS JE, YEH E. Integrative proteomics and bioinformatic prediction enable a high-confidence apicoplast proteome in malaria parasites[J]. *PLoS Biology*, 2018, 16(9): e2005895.
- [45] MORRISWOOD B, HAVLICEK K, DEMMEL L, YAVUZ S, SEALEY-CARDONA M, VIDILASERIS K, ANRATHER D, KOSTAN J, DJINOVIC-CARUGO K, ROUX KJ, WARREN G. Novel bilobe components in *Trypanosoma brucei* identified using proximity-dependent biotinylation[J]. *Eukaryotic Cell*, 2013, 12(2): 356-367.
- [46] de PABLOS LM, KELLY S, de FREITAS NASCIMENTO J, SUNTER J, CARRINGTON M. Characterization of RBP9 and RBP10, two developmentally regulated RNA-binding proteins in *Trypanosoma brucei*[J]. *Open Biology*, 2017, 7(4): 160159.
- [47] DONG XD, LIM TK, LIN QS, HE CY. Basal body protein TbSAF1 is required for microtubule quartet anchorage to the basal bodies in *Trypanosoma brucei*[J]. *mBio*, 2020, 11(3): e00668-20.
- [48] HILTON NA, SLADEWSKI TE, PERRY JA, PATAKI Z, SINCLAIR-DAVIS AN, MUNIZ RS, TRAN HL, WURSTER JI, SEO J, de GRAFFENRIED CL. Identification of TOEFAZ1-interacting proteins reveals key regulators of *Trypanosoma brucei* cytokinesis[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 109(3): 306-326.
- [49] SCHOCK M, SCHMIDT S, ERSFELD K. Novel cytoskeleton-associated proteins in *Trypanosoma brucei* are essential for cell morphogenesis and cytokinesis[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(11): 2234.
- [50] SOTO-GONZALEZ F, TRIPATHI A, COOLEY A, PAROMOV V, RANA TN, CHAUDHURI M. A novel connection between *Trypanosoma brucei* mitochondrial proteins TbTim17 and TbTRAP1 is discovered using biotinylation identification (BioID)[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(12): 102647.

- [51] MOREIRA CMDN, KELEMEN CD, OBADO SO, ZAHEDIFARD F, ZHANG N, HOLETZ FB, GAUGLITZ L, DALLAGIOVANNA B, FIELD MC, KRAMER S, ZOLTNER M. Impact of inherent biases built into proteomic techniques: proximity labeling and affinity capture compared[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(1): 102726.
- [52] NKOSI D, SUN L, DUKE LC, PATEL N, SURAPANENI SK, SINGH M, JR MECKES DG. Epstein-barr virus LMP1 promotes syntenin-1- and hrs-induced extracellular vesicle formation for its own secretion to increase cell proliferation and migration[J]. *mBio*, 2020, 11(3): e00589-20.
- [53] RIDER MA, CHEERATHODI MR, HURWITZ SN, NKOSI D, HOWELL LA, TREMBLAY DC, LIU X, ZHU FX, MECKES DG Jr. The interactome of EBV LMP1 evaluated by proximity-based BioID approach[J]. *Virology*, 2018, 516: 55-70.
- [54] BAGCHI P, TORRES M, QI L, TSAI B. Selective EMC subunits act as molecular tethers of intracellular organelles exploited during viral entry[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1127.
- [55] WANG XM, XU P, CHENG F, LI Y, WANG ZK, HAO SY, WANG JK, NING K, GANAIE SS, ENGELHARDT JF, YAN ZY, QIU JM. Cellular cleavage and polyadenylation specificity factor 6 (CPSF₆) mediates nuclear import of human bocavirus 1 NP1 protein and modulates viral capsid protein expression[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(2): e01444-19.
- [56] ORTIZ DA, GLASSBROOK JE, PELLETT PE. Protein-protein interactions suggest novel activities of human cytomegalovirus tegument protein pUL103[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(17): 7798-7810.
- [57] WU GC, LIN QS, LIM TK, ZHANG YL, AWEYA JJ, ZHU JH, YAO DF. The interactome of Singapore grouper iridovirus protein ICP18 as revealed by proximity-dependent BioID approach[J]. *Virus Research*, 2021, 291: 198218.
- [58] BORUCHOWICZ H, HAWKINS J, CRUZ-PALOMAR K, LIPPÉ R. The XPO6 exportin mediates herpes simplex virus 1 gM nuclear release late in infection[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(21): e00753-20.
- [59] KUECK T, FOSTER TL, WEINELT J, SUMNER JC, PICKERING S, NEIL SJD. Serine phosphorylation of HIV-1 vpu and its binding to tetherin regulates interaction with clathrin adaptors[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(8): e1005141.
- [60] RITCHIE C, CYLINDER I, PLATT EJ, BARKLIS E. Analysis of HIV-1 Gag protein interactions *via* biotin ligase tagging[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(7): 3988-4001.
- [61] Le SAGE V, CINTI A, VALIENTE-ECHEVERRÍA F, MOULAND AJ. Proteomic analysis of HIV-1 Gag interacting partners using proximity-dependent biotinylation[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 138.
- [62] COYAUD E, RANADHEERA C, CHENG D, GONÇALVES J, DYAKOV BJA, LAURENT EMN, ST-GERMAIN J, PELLETIER L, GINGRAS AC, BRUMELL JH, KIM PK, SAFRONETZ D, RAUGHT B. Global interactomics uncovers extensive organellar targeting by zika virus[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2018, 17(11): 2242-2255.
- [63] GAUCHERAND L, PORTER BK, LEVENE RE, PRICE EL, SCHMALING SK, RYCROFT CH, KEVORKIAN Y, McCORMICK C, KHAPERSKY DA, GAGLIA MM. The influenza A virus endoribonuclease PA-X usurps host mRNA processing machinery to limit host gene expression[J]. *Cell Reports*, 2019, 27(3): 776-792.e7.
- [64] SAMAVARCHI-TEHRANI P, ABDOUNI H, KNIGHT JDR, ASTORI A, SAMSON R, LIN Z-Y, KIM D-K, KNAPP JJ, ST-GERMAIN J, GO CD, LARSEN B, WONG CJ, CASSONNET P, DEMERET C, JACOB Y, ROTH FP, RAUGHT B, GINGRAS, A-C. A SARS-CoV-2-host proximity interactome.[J] *BioRxiv*. 2020.
- [65] FAN JN, LIU XC, MAO FF, YUE XH, LEE I, XU YK. Proximity proteomics identifies novel function of Rab14 in trafficking of Ebola virus matrix protein VP40[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 527(2): 387-392.
- [66] V'KOVSKI P, GERBER M, KELLY J, PFAENDER S, EBERT N, BRAGA LAGACHE S, SIMILLION C, PORTMANN J, STALDER H, GASCHEN V, BRUGGMANN R, STOFFEL MH, HELLER M, DIJKMAN R, THIEL V. Determination of host proteins composing the microenvironment of coronavirus replicase complexes by proximity-labeling[J]. *eLife*, 2019, 8: e42037.

(本文责编 陈宏宇)