



膜蛋白相互作用的原位分析技术*

康梓原** 余 彤** 李 超 张雪花 郭君慧 李其昌 郭景星*** 谢 浩***

(武汉理工大学化学化工与生命科学学院, 武汉 430070)

摘要 膜蛋白占哺乳动物蛋白质组的30%，占有药物靶点的60%。它们的功能相互作用是细胞进行多种生物功能的基础，分析膜蛋白相互作用对了解这些生物功能的具体机制十分重要。膜蛋白相互作用具有依赖细胞膜环境、空间不对称、强度较弱、高度动态和作用位点多样等特征，需要借助原位分析技术来真实反映其结构基础和动力学等信息。本文系统性总结了目前可被用于原位分析膜蛋白相互作用的技术，如免疫共沉淀 (Co-IP)、邻近连接技术 (PLA)、双分子荧光互补 (BiFC)、共振能量转移、邻近标记 (PL) 技术、冷冻电子断层成像 (Cryo-CT)、原位交联质谱 (*In situ* XL-MS)、拉曼光谱 (Raman spectroscopy)、电子顺磁共振 (EPR)、核磁共振 (NMR)、结构预测技术等，并且对各项技术的优缺点进行了评述；基于自身相关研究基础，进一步讨论了这些技术在应用中的关键问题和发展趋势，指出了借助多种技术联用可以克服单一技术的局限性，为膜蛋白领域研究提供了宝贵参考。

关键词 膜蛋白, 蛋白质-蛋白质相互作用, 原位分析

中图分类号 Q-3, O65

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0412

CSTR: 32369.14.pibb.20240412

膜蛋白是一类能够结合或整合到细胞膜或细胞器膜上的蛋白质，是生命体的重要组成部分^[1]。在哺乳动物中，膜蛋白约占整个蛋白质组的30%^[2]；在美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的抗疾病药物中，约有60%靶向膜蛋白^[3]。膜蛋白通常并非孤立地发挥作用，而是作为受体与其他配体发生蛋白质-蛋白质相互作用来实现其生物功能^[4]。膜蛋白相互作用的主要生物功能包括：a. 物质转运，例如细菌多药外排泵——周质连接蛋白 AcrA、内膜转运蛋白 AcrB、外膜通道蛋白 TolC (AcrAB-TolC) 组装成复合体排出抗生素^[5]；b. 信号转导，例如跨膜G蛋白偶联受体与激动剂结合后，活化G蛋白复合体从而激活胞内下游效应物^[6]；c. 催化反应，例如ATP合成酶借助跨膜质子动力，通过复合体旋转过程合成ATP^[7]；d. 细胞识别与黏附，例如整合素蛋白异源二聚体既可以结合细胞外基质蛋白，又可以连接到细胞骨架，从而介导细胞与细胞外基质的黏附^[8-9]；e. 细胞通讯，例如连接蛋白组装成六聚体通道，两端分别嵌入两个相邻细胞，帮助细胞交换小分子物质^[10]。更重要的是，膜蛋白相互

作用的异常往往与多种疾病的发生相关，例如感染、癌症和神经退行性疾病等^[11-12]。以近期肆虐的新型冠状病毒感染为例，严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 通过结合细胞膜上的血管紧张素转化酶2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 来入侵细胞^[13-14]。糖蛋白激素 α 多肽 (glycoprotein hormone α polypeptide, CGA) 则可与上皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 相互作用来激活EGFR信号，使得胃癌细胞在化疗中存活^[15]。 α 突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 第129位丝氨酸残基磷酸化会增强其与Rab-3A (Ras-related protein Rab-3A) 相互作用，抑制Rab3A的GTP水解酶活性，导致 α

* 国家自然科学基金 (22372127, 82127806), 中央高校基本科研业务费专项资金 (WUT: 233120002, WUT: 223120009) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

郭景星 Tel: 18362931882, E-mail: jxguo@whut.edu.cn

谢浩 Tel: 18971099976, E-mail: h.xie@whut.edu.cn

收稿日期: 2024-09-19, 接受日期: 2025-02-19

-syn 在膜上累积, 从而诱导帕金森病的发生^[16-20]。由此可见, 分析膜蛋白相互作用对了解生物功能和疾病产生机制十分重要。

相比于其他蛋白质之间的相互作用, 膜蛋白相互作用具有以下几个特点: a. 依赖细胞膜环境, 膜蛋白通常具有高度疏水的跨膜结构域, 必须借助细胞膜的磷脂双分子层环境来维持正确的结构和功能^[1, 21], 细胞膜上复杂的脂质、聚糖、蛋白质等成分还可能参与膜蛋白的相互作用^[22-23]; b. 空间不对称, 包括膜蛋白在内的细胞膜成分在细胞不同位置分布不均匀, 且在膜内外两侧分布不对称, 使膜蛋白相互作用在特定位置发生^[22]; c. 相互作用较弱, 膜蛋白的相互作用通常较弱, 在细胞膜上通过聚集来加强微弱的相互作用^[4, 22]; d. 高度动态, 细胞膜是高度动态的结构, 其上的膜蛋白等成分在不断地合成、降解、转运和重分布, 导致膜蛋白的相互作用较为短暂, 且可以随着细胞内外环境变化而改变^[22, 24]; e. 作用位点多样, 膜蛋白相互作用可能发生在胞外域、胞内域或跨膜域, 相对于膜的位置不同增加了相互作用的多样性^[25-26]。

许多传统的蛋白质相互作用分析技术, 例如酵母双杂交、噬菌体展示、拉下实验、蛋白质芯片等皆属于非原位分析技术, 需要更换蛋白质表达体系或提纯蛋白质等操作, 难以保持膜蛋白原有的结构和膜环境。因此, 膜蛋白相互作用更为依赖原位分析技术来真实反映其结构基础和动力学等信息。部分原位分析技术需要针对目标膜蛋白设计标记或抗体, 如免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP)、邻近连接技术 (proximity ligation assay, PLA)、双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC)、共振能量转移和邻近标记 (proximity labeling, PL) 技术等, 考虑到膜蛋白相互作用位点的多样性, 这些技术应当根据相互作用发生的具体位置和结构信息来设计标记或抗体^[27], 以满足标记或抗体的作用条件, 同时设置适当对照来避免对膜蛋白定位和相互作用的影响; 另一些技术则无需对膜蛋白进行标记或使用抗体, 如冷冻电子断层成像 (cryo-electron tomography, Cryo-ET)、拉曼光谱 (Raman spectroscopy)、电子顺磁共振 (electron paramagnetic resonance, EPR)、核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)、原位交联质谱 (*in situ* cross-linking mass spectrometry, *In situ* XL-MS) 和结构预测技术等^[28]。目前, 国内外尚未有综述讨论过此类分析

技术。本文系统性总结了目前可被用于原位分析膜蛋白相互作用的技术, 并且对其各自的优缺点进行了评述。此外, 本文还基于作者在原位分析技术领域的研究基础, 进一步讨论了这些技术在应用中的关键问题和发展趋势, 为未来相关研究提供参考。

1 基于标记的膜蛋白原位分析技术

1.1 免疫共沉淀 (Co-IP)

Co-IP 是一种经典的捕获相互作用蛋白质的技术。该技术通过非变性的方式裂解细胞来保持蛋白质在细胞内的生理状态和相互作用, 再用特异性抗体沉淀目标蛋白质, 目标蛋白质结合的蛋白质便可以一起被沉淀下来^[29], 随后利用质谱或免疫印迹法等技术进行鉴定^[30]。Co-IP 捕获的蛋白质复合体的相互作用发生在细胞内部, 且蛋白质没有经过额外标记或修饰, 是生理条件下的原位相互作用^[31]。但是, 该技术难以检测微弱的相互作用, 无法分辨蛋白质之间是否直接相互作用, 也不能提供相互作用的动力学性质^[32]。

该技术适用于大量筛选和鉴定与目标蛋白质相互作用的蛋白质, 例如 Wei 等^[33] 联用免疫沉淀-质谱和 Co-IP, 鉴定肌浆网/内质网钙离子 ATP 酶 2 (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2, SERCA2) 与西格玛非阿片类细胞内受体 1 (Sigma non-opioid intracellular receptor 1, Sigmar1) 相互作用, 并证实 SERCA2 的 Q615 是它们结合的关键残基。在使用该技术时, 应当注意: a. 采用温和的裂解条件, 冰上裂解细胞, 裂解液中应加入蛋白酶抑制剂 (如抑肽酶、亮抑酶肽) 和磷酸酶抑制剂 (如 Na_3VO_4 、 NaF), 以防止蛋白质降解和去磷酸化; b. 验证抗体的特异性, 并使用对照抗体 (如正常小鼠 IgG、正常兔 IgG), 以排除非特异性结合^[29, 31, 34]。目前, Co-IP 技术发展的方向主要是通过设计抗体或调整步骤来提高分离得到复合物的特异性^[34]。

1.2 邻近连接技术 (PLA)

PLA 是一种成熟且普遍适用的蛋白质相互作用分析技术。该技术分别采用两种一抗来特异性结合两个目标蛋白质, 接着用一对寡核苷酸链标记的二抗结合一抗, 并加入一段与二抗上寡核苷酸链互补的连接寡核苷酸链。当两个目标蛋白质足够接近时, 二抗上的寡核苷酸链与连接寡核苷酸链互补杂交, 在连接酶作用下形成封闭环状 DNA。该 DNA 经扩增后, 加入荧光标记的检测寡核苷酸链与其互

补配对来产生荧光信号, 实现对相互作用蛋白质的分析^[35] (图1)。PLA利用了免疫反应的特异性, 同时具有PCR反应的灵敏度, 不仅可以检测生理条件下的蛋白质相互作用, 也可以捕获短暂的蛋白质结合^[32, 35]。其缺点在于寡核苷酸链的非特异性结合易产生干扰, 且标记操作较为困难、样品孵育耗时, 同时无法提供相互作用的直接证据^[32]。

与Co-IP相似, PLA适用于大量筛选和鉴定与目标蛋白质相互作用的蛋白质。例如Tubbs等^[36]应用PLA检测线粒体相关内质网膜完整性变化, 发现1, 4, 5-三磷酸肌醇受体 (inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, IP3R) 与电压依赖性阴离子通道1 (voltage dependent anion channel 1, VDAC1)、葡萄糖调节蛋白75 (glucose-regulated protein 75, Grp75) 在膜界面的相互作用减少导致线粒体相关内质网膜完整性破坏。在使用该技术时, 应当注意: a. 抗体的表位不得重叠, 且两个一抗结合位点应位于膜的同一侧; b. 优化渗透剂的类型以及每次实验的暴露时间至关重要^[35, 37]。目前, PLA发展的方向主要有: a. 简化实验操作, 提高检测效率; b. 设计适用于多通道信号输出的寡核苷酸链, 满足高通量检测的需要^[37]。

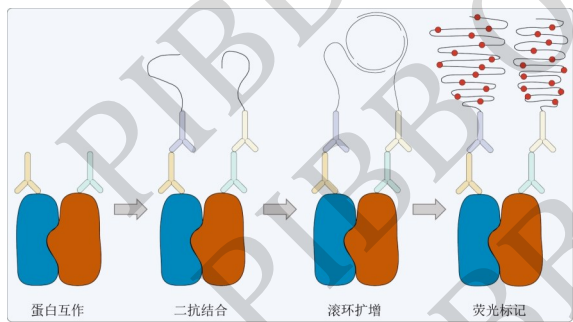


Fig.1 Schematic diagram of the working principle of PLA

图1 邻近连接技术的工作原理示意图

一抗、二抗分别结合两个目标蛋白质后, 加入连接寡核苷酸链, 当两个目标蛋白质足够接近时, 连接寡核苷酸链与二抗上寡核苷酸链互补配对, 通过连接酶产生封闭环状DNA后, 滚环扩增得到含大量重复序列的单链, 再用荧光标记的检测寡核苷酸链来产生荧光信号。

1.3 双分子荧光互补 (BiFC)

BiFC是一种利用荧光蛋白的特点来可视化蛋白质相互作用的技术。该技术将荧光蛋白分成两个非荧光片段分别连接到目标蛋白质上, 当两个目标蛋白质结合时, 片段重组成为完整的荧光蛋白, 从

而产生荧光信号, 进而实现对相互作用蛋白的可视化。BiFC的优点在于可以快速直观地通过荧光显微镜 (fluorescence microscope, FM) 直接观察到相互作用结果, 背景干净、操作便捷, 且适用于分析短暂或较弱的相互作用。然而连接额外的蛋白质片段可能会影响目标蛋白质的生理功能, 且由于发色团成熟滞后, 导致该技术无法实时观察蛋白质相互作用过程^[38]。

BiFC适用于高通量筛选和相互作用的可视化, 易于与其他技术结合使用。例如Yang等^[39]使用BiFC鉴定Sigmar1与自噬相关蛋白14 (autophagy related protein 14, ATG14)、突触融合蛋白17 (syntaxin 17, STX17) 和囊泡相关膜蛋白8 (vesicle associated membrane protein 8, VAMP8) 接近, 进而发现Sigmar1调节自噬体-溶酶体融合。Wu等^[40]则使用BiFC验证了膜类固醇结合蛋白1 (membrane steroid binding protein 1, MSBP1) 和微管相关蛋白4 (microtubule-associated protein 4, MARP4) 均与ATG8相互作用蛋白1 (ATG8-interacting protein 1, ATI1) 和ATG8相互作用蛋白2 (ATG8-interacting protein 2, ATI2) 相互作用, 进而鉴定了MSBP1作为拟南芥网状吞噬途径的自噬货物, 而ATI1和ATI2为其受体。在使用该技术时, 应当注意: a. 确保所选荧光蛋白片段在单独表达时不产生荧光, 避免假阳性; b. 荧光蛋白片段结合位点应位于膜的同一侧; c. 验证融合蛋白在细胞中的正确表达和定位^[38]。目前, 双分子荧光互补技术发展的方向主要有: a. 通过改变分裂位置, 减少荧光蛋白片段的自组装, 从而降低假阳性^[41]; b. 开发基于新荧光蛋白的探针, 提高信噪比和特异性^[42]。

1.4 共振能量转移

荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 是一种基于荧光分子间能量转移的相互作用检测技术。两个荧光发色基团 (供体-受体对) 距离足够近 (一般小于10 nm) 时, 当供体分子吸收光子激发到更高的电子能态, 在回到基态前, 通过偶极子相互作用, 供体分子将能量转移到受体分子^[43] (图2)。要发生FRET, 受体分子的吸收光谱应与供体分子的发射光谱重叠^[44]。FRET可以检测纳米级 (1~10 nm, 部分供受体对可达20 nm) 的接近, 技术简单, 设备要求低, 能达到纳秒级时间分辨率^[45-46]。但是, 和其他基于接近的技术类似, FRET需要仔细设计供受体对的

方向,无法直接检测相互作用,且难以避免假阳性,特别是当研究高密度的膜蛋白时^[38]。同时,该技术的通量较低,且信噪比不够理想^[47]。生物发光共振能量转移(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)供体采用荧光素酶生物发光,不再需要激发光,能提供更低的背景和更高的信噪比,然而其供受体对的选择限制较大^[47-48]。化学发光共振能量转移(chemiluminescence resonance energy transfer, CRET)则通过化学发光试剂发光,进一步解决了BRET供受体对选择受限的问题,具有低背景和高灵敏度^[48-49]。作者课题组曾对FRET分析膜蛋白复合物的组成和相互作用的研究进行了总结与讨论^[50],并利用单分子荧光技术观察了细菌多药外排泵AcrAB-TolC的动态装配过程^[51]。

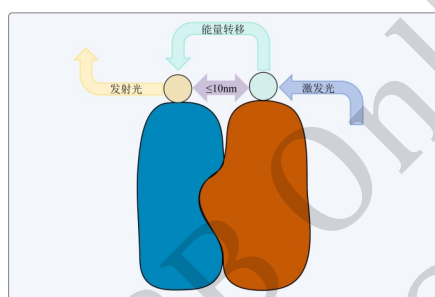


Fig. 2 Schematic diagram of the working principle of FRET

图2 荧光共振能量转移的工作原理示意图

两个目标蛋白质上分别偶联的荧光基团(供体和受体)足够接近($\leq 10\text{ nm}$)时,由于供体的发射光谱与受体的吸收光谱重叠,用激发光激发供体,其荧光被受体吸收,从而激发受体产生发射光。

共振能量转移适用于对蛋白质相互作用进行高时空分辨率检测。例如Stroik等^[52]采用时间分辨荧光共振能量转移(time-resolved fluorescence resonance energy transfer, TR-FRET)高通量鉴定靶向肌浆网/内质网钙离子ATP酶2a(sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a, SERCA2a)与受磷蛋白(phospholamban, PLB)之间相互作用的化合物。Wan等^[53]则采用BRET结合Co-IP技术,发现了新的组成型G蛋白耦联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)异源二聚体阿片受体-食欲素受体1(apelin receptor-orexin receptor type 1, APJ-OX1R)。在使用该技术时,应当注意:a. 供体的发射光谱与受体的吸收光谱必须有相

当的重叠,同时供体和受体的激发光要足够分开;b. 供体和受体之间的距离足够小(一般小于 10 nm),且供体和受体的荧光生色团以适当的取向排列;c. 避免直接激发受体^[43-46]。目前,共振能量转移技术发展的方向主要有:a. 寻找更合适的供受体对,提高检测性能并拓展适用范围;b. 通过多路共振能量转移系统同时检测和分析多个目标蛋白质;c. 设计更实用的检测装置,如开发更灵敏的信号检测设备,或采用微流控器件、智能手机等使检测更加便捷^[54]。

1.5 邻近标记(PL)技术

PL是一种通过空间接近关系来标记邻近分子的技术。该技术将邻近标记酶(如过氧化氢酶或生物素连接酶)与目标蛋白质融合,通过酶催化将邻近的蛋白质标记上带生物素的短寿命活性基团,最后通过亲和素磁珠富集生物素标记蛋白进行质谱鉴定,获得邻近蛋白质的身份和距离(图3)。PL技术的时间分辨率较高,可以分析较短暂的相互作用以及相互作用的动态过程,还可鉴定目标蛋白质的邻近蛋白质组或相互作用组^[55]。然而,不同的邻近标记酶存在不同的缺陷,如BioID时间分辨率低、TurboID在特定条件下可能有细胞毒性或产生错误标记等,导致标记酶的选择高度依赖具体应用场景^[56]。

PL技术适用于绘制空间蛋白质图谱或鉴定目标蛋白质的相互作用组。Paek等^[57]采用过氧化物酶的PL结合同位素标记和质谱技术对活细胞中血管紧张素II型1受体和 $\beta 2$ 肾上腺素受体的激活和内化进行了定量时间分辨测量,并鉴定出含LMBR1结构域蛋白2(LMBR1 domain-containing protein 2, LMBRD2)为 $\beta 2$ 肾上腺素受体信号途径的潜在调节因子。在使用该技术时,应当注意:a. 使用不连接的单独或荧光标记的PL酶作为对照并进行充分的重复实验,并验证融合蛋白在细胞中的正确表达和定位;b. PL需要表面带负电的氨基酸残基(如赖氨酸和酪氨酸),同时标记酶可能会偏向于标记某些蛋白质,造成相互作用蛋白质未标记的假阴性;c. 生物素标记强度不一定反映相互作用强度;d. 通过初步实验优化标记时间^[55-56, 58]。目前,PL技术发展的方向主要有:a. 开发新的PL酶来适应不同的应用场景,或拓展PL酶的融合方式来适应更丰富的亚细胞定位^[59];b. 通过可调光催化等方式实现不同尺度的邻近蛋白质组分析。

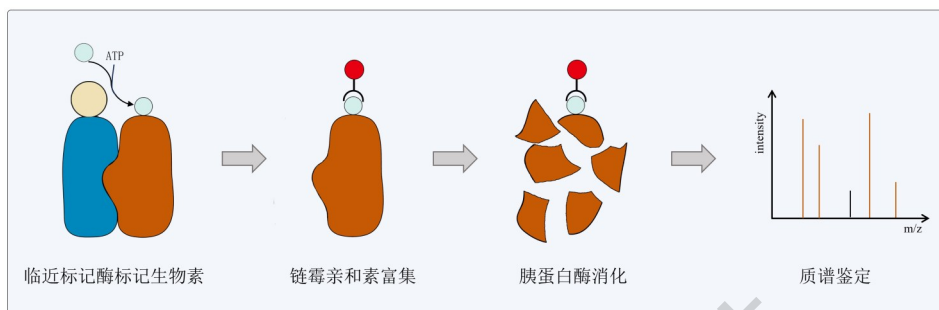


Fig.3 Schematic diagram of the working principle of PL

图3 邻近标记技术的工作原理示意图

通过目标蛋白质上融合的邻近标记酶, 将邻近的蛋白质标记上生物素, 使用链霉亲和素磁珠提取生物素化的蛋白质进行质谱分析, 获得邻近蛋白质的身份和距离。

2 无标记的膜蛋白原位分析技术

2.1 冷冻电子断层成像 (Cryo-ET)

Cryo-ET 是一种结合了冷冻电子显微镜 (cryo-electron microscopy, Cryo-EM) 和断层成像技术的先进成像技术。首先, 该技术在极低温度下冷冻样品以固定其生物状态, 对于厚度 $20\ \mu\text{m}$ 以内的样品可以直接通过快速冷冻处理, 而厚度 $20\sim 200\ \mu\text{m}$ 的样品则需要进行高压冷冻^[60]; 然后, 通过电子显微镜获取不同角度的断层图像; 最后, 通过计算机软件重建样品的三维结构。与 X 射线衍射晶体学、核磁共振波谱学和冷冻电镜单颗粒分析等传统测定蛋白质分子三维结构的技术相比, 它不需要制备晶体, 可以提供细胞内蛋白质的天然原位信息^[61]。此外, 该技术对样品的要求较低, 可以实现蛋白质及复合体的高分辨率三维结构分析^[62], 其空间分辨率可达 $3.5\ \text{\AA}$ 。然而, 不损伤样品的低剂量电子束穿透能力有限, 生物样品经冷冻后往往还需要使用聚焦离子束 (focused ion beam, FIB) 铣削至约 $100\sim 300\ \text{nm}$ ^[60]。此外, 该技术无法分析相互作用的动态过程, 在图像中鉴别目标蛋白质也存在一定困难^[63]。

Cryo-ET 适用于蛋白质及复合体的三维结构分析。例如, Mühleip 等^[64]通过 Cryo-ET 和亚断层图平均发现弓形虫线粒体 ATP 合酶会组装成环状六聚体, 这对形成其独特的嵴至关重要。Park 等^[65]则通过高通量 Cryo-ET 揭示了沙门氏菌接触宿主细胞膜并部署 III 型蛋白分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 过程的一系列细节。目前, Cryo-ET 技术发展的方向主要有: a. 通过自动化流程及

先进铣削技术, 加快切片样本制作, 改良断层成像仪器并实现自动数据采集; b. 将 FM 和 FIB 铣削集成到同一仪器中, 以消除样品转移中的污染风险, 并采用相关的超分辨率荧光显微镜-聚焦离子束铣削技术、基于深度学习的图像识别进行三维定位、基准标记辅助等方式提高信号的相关性; c. 优化成像方式, 例如使用增强对比度的相位板、根据样品厚度调节电子束剂量, 提高信噪比^[66]。

2.2 原位交联质谱 (In situ XL-MS)

In situ XL-MS 是一种强大的蛋白质组学技术, 用于研究蛋白质或蛋白质复合体的空间结构和相互作用界面。该技术向生物样品中加入能特异性连接靠近的氨基酸残基的化学交联剂或光交联剂, 在原位环境下将空间上接近的蛋白质或蛋白质内部的氨基酸残基连接起来, 然后利用质谱技术鉴定这些交联位点, 从而推断出蛋白质的空间结构和相互作用对象^[67]。In situ XL-MS 能够以高通量和高灵敏度的方式解析活细胞内膜蛋白相互作用动态结构信息^[68]。然而, 目前的交联剂细胞渗透性较低且需要较长的反应时间, 这可能影响交联效率和细胞状态^[69]。同时, 交联质谱提供的是蛋白质碎片信息, 而非完整结构, 因此需要结合其他技术 (如冷冻电镜等) 对结构解释进行验证^[60]。交联质谱的数据也比传统质谱更加复杂^[70-71]。

In situ XL-MS 适用于高通量蛋白质相互作用组定位及复合体结构解析。例如, Chen 等^[72]使用二甲基二十八烷基溴化铵功能化的聚乳酸-羟基乙酸纳米颗粒将蛋白质交联剂传递到线粒体, 通过 In situ XL-MS 确定了 STRING 数据库中不存在的 74 对蛋白质-蛋白质相互作用。在使用该技术时,

应当注意：需选择具有高生物相容性的交联剂以减少对细胞扰动；与此同时，交联剂需在质谱中易碎裂以便识别交联位点^[67]。目前，*In situ* XL-MS 技术发展的方向主要有：a. 改进细胞固定技术，减少交联过程对细胞的扰动，进而拓展交联剂的选择范围；b. 开发新的交联剂和递送体系，以解决交联剂穿透性差、反应时间长、生物相容性不佳等问题；c. 优化交联策略，例如通过多次交联或优化交联参数来提高检测能力^[68]。

2.3 拉曼光谱

拉曼光谱是一种基于拉曼散射现象的振动光谱技术。当用一定频率的激发光照射物质分子时，少部分散射光的频率与激发光不相同，其中频率变化较大的光即为拉曼散射光。由于拉曼散射光的频率与分子结构有关，拉曼光谱就犹如分子的“指纹”，可定性、定量探究蛋白质的组成、构象和相互作用等信息^[73]。相比于现有的膜蛋白相互作用原位分析技术，该技术具有以下显著特点：a. 可从分子结构角度直接分析蛋白质间的相互作用，例如氢键和疏水相互作用的强度变化^[74]；b. 无损、快速、不易受水干扰，可在生理环境下对各种类型蛋白质开展原位、动态、实时分析^[75]；c. 无需外源性标记，对样品自身结构影响小且样品制备简单^[76]。已有课题组尝试将拉曼光谱应用于蛋白质相互作用分析，例如 Schultz 课题组^[77]分析了不同整合素蛋白与靶向肽之间的相互作用差异，Xu 等^[78]实时监测了细胞色素 b5 同细胞色素 c、肌红蛋白之间的电子转移过程。在使用该技术时，应当注意：a. 根据样品性质和实际检测需要选择合适的激发波长，以获得更高信噪比的拉曼光谱信号；b. 选择合适的光谱采集参数，例如积分时间和激光功率等，避免大功率长时间的激光照射损伤样品；c. 对同一样品进行多点、多次测量，以确保数据的重现性和可靠性^[73-75]。

目前，拉曼光谱技术发展的方向主要有：a. 采用表面增强拉曼散射 (surface-enhanced Raman scattering, SERS)、针尖增强拉曼光谱术 (tip enhanced Raman spectroscopy, TERS)、共振拉曼散射 (resonance Raman scattering, RRS) 和受激拉曼散射 (stimulated Raman scattering, SRS) 等技术，并设计相应的传感器，提高检测灵敏度和信噪比^[79]；例如，作者课题组发展了一系列可显著增强生物分子拉曼光谱信号的 SERS 技术，进而实现了 DNA 构象^[80]、细菌种类^[81]、细菌气体代谢

物^[82]和细菌群体感应信号分子^[83]的原位表征；b. 利用现代信息学方法如机器学习等，简化和加速光谱数据的分析^[84]；本课题组在以往的工作中撰写了一种基于机器学习级联 (machine learning cascade, MLC) 算法，该算法由坐标定位系统、层次聚类分析、支持向量机和相似性分析四大模块组成，可快速解析癌细胞的拉曼光谱信号，进而精准评估其程序性死亡受体配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 的表达程度^[85]。

2.4 电子顺磁共振 (EPR)

EPR 是一种基于物质中未成对电子自旋特性的波谱学技术。未成对电子具有自旋磁矩，在外磁场中发生能级分裂，可吸收特定频率的电磁波，即发生共振吸收现象。该技术通过检测样品吸收电磁波后产生的信号，得到关于样品中未成对电子的数量、自旋状态和距离分布等信息，进而分析蛋白质相互作用中构象变化的动态过程^[86]。该技术的显著特点包括：a. 可分析蛋白质相互作用中构象的动态变化；b. 不受分子质量限制，可以处理分子质量较大的膜蛋白；c. 具有高灵敏度，能够检测在细胞膜中含量较低的蛋白质^[87-88]。该技术已经被用于原位分析膜蛋白相互作用，例如 Joseph 等^[89]使用脉冲偶极电子自旋共振光谱，结合 Gd³⁺-氮氧化物自旋对，观察到维生素 B12 在 ATP 结合盒转运蛋白 BtuCD (ATP-binding cassette transporter BtuCD) - 周质结合蛋白 BtuF (periplasmic binding protein BtuF) 转运复合体界面诱导构象转移。在使用该技术时，应当注意：a. 选择合适的顺磁性自旋标记物，这些标记物可以与膜蛋白的氨基酸残基连接，或者与膜结构相连；b. 确保标记物不会干扰膜蛋白的功能和相互作用^[86-88]。目前，EPR 技术发展的方向主要有：a. 发展新的自旋标签，以适用于标记不同的蛋白质和结构域；b. 开发新的自旋标记方法，使其可以由非专业有机实验室合成，并克服向细胞引入外源重组标记蛋白的繁琐步骤^[90]。

2.5 核磁共振 (NMR)

NMR 是一种基于原子核磁性的波谱学技术。在强磁场中，原子核发生能级分裂，当吸收与原子核自旋进动频率相同的电磁辐射时，发生能级跃迁，产生核磁共振现象。该技术通过测量和分析核磁共振信号的频率、强度和形状等波谱特征，获取原子核的种类、数量以及相互作用等信息，进而对物质的成分和结构进行定性和定量分析，可以检测蛋白质在细胞内的移动和动态结构^[86]。该技术在

以下方面优势显著：a. 检测蛋白质原子尺度的直接信息，可以表征蛋白质柔性或无序区域的残基特征和弱相互作用^[87, 91]；b. 能够以纳秒到秒的时间尺度报告结构和相互作用动态过程，还能分别揭示蛋白质在细胞内的旋转和平动现象^[87, 92]。该技术已经被用于原位分析膜蛋白相互作用，例如 Ward 等^[93]利用固态 NMR 等技术检测了大肠杆菌内膜上感觉视紫红质三聚体的结构，发现在大肠杆菌内膜和人工膜上形成了不同对称的二维晶格。Kulminskaya 等^[94]则利用二维和三维固体 NMR 的不同组合，分析了几丁质合成酶 A (chitin synthase A, CsmA) -细菌叶绿素 a 复合物中 CsmA 的结构和构象信息。在使用该技术时，应当注意：a. 膜蛋白分子质量不能太大，NMR 的信号灵敏度和分辨率会随着分子质量的增加而显著下降；b. 确保样品在 NMR 实验过程中保持稳定，保持在适当的环境中，避免变性和降解，在长时间的测量中需要定期检查样品的状态^[87, 91-92]。目前，NMR 技术发展的方向主要有：a. 发展新的标记策略、超高场强磁体、新的脉冲序列和快速 NMR 采集方法，提高检测灵敏度^[95]。B. 开发更强大的分析工具对 NMR 的数据集进行更精确的数据处理和统计分析^[96]。

2.6 结构预测技术

结构预测技术能够通过计算方法预测蛋白质的

结构和相互作用，可以为实验研究提供重要参考。以近年来发展较快的 AlphaFold 为例，它是一种基于深度学习的蛋白质结构预测模型，其核心在于通过大规模的生物分子结构数据进行训练，学习分子间相互作用的关键特征。相比于现有的实验分析技术，AlphaFold 分析速度快、更适用于相互作用的大规模筛选，以及对相互作用的结构基础进行解释。AlphaFold 的特点是多序列比对 (multiple sequence alignment, MSA) 结合神经网络架构，通过分析目标蛋白质的同源序列，捕捉氨基酸之间的“共进化”信息 (即当一个残基发生变化时，与之相互作用的另一个残基是否也随之变化)，揭示残基之间潜在的空间联系，为后续预测其三维结构提供基础。首个可预测蛋白质相互作用的版本：AlphaFold 2 能够应对复杂折叠的蛋白质，还可以对多亚基蛋白质或蛋白质相互作用进行预测。最新发布的 AlphaFold 3 则更进一步，不但能预测包含特殊氨基酸的蛋白质，还能拓展到蛋白质与 DNA、RNA、抗体、小分子和离子复合物结构的预测以及共价修饰^[97]。在使用此技术时，应当注意：a. 它输出的模型存在手性出错和产生重叠原子的趋势，在无序区域可能产生虚假的结构，且无法预测结构和相互作用的动态信息^[98]；b. 作为一种计算方法，它的预测结果需要经过实际实验进行验证。

表1 各原位分析技术产生年代及优缺点概览表

Table 1 The age of each *in-situ* analytical technology and their advantages and disadvantages

原位分析技术	产生年代	主要优点	主要缺点
免疫共沉淀 ^[29, 31-32]	1975	相互作用不受影响、高通量	灵敏度低、无法直接检测相互作用
邻近连接技术 ^[32, 35]	2002	灵敏度高、高通量	易受干扰、无法直接检测相互作用
双分子荧光互补 ^[38]	2000	直观可视、灵敏度高、背景干净、高通量	无法实时观察、蛋白质功能可能受影响
共振能量转移 ^[43-47]	1948	时空分辨率高	存在假阳性、无法直接检测相互作用
邻近标记技术 ^[55-56]	2012	可分析空间分布及动态过程	需根据场景选择邻近标记酶
冷冻电子断层成像 ^[60-63]	1975	能提供细胞结构信息、可观察蛋白质不同状态	鉴别目标蛋白质困难、信噪比低
原位交联质谱 ^[60, 67-71]	2000	灵敏度高、可反映分子结构、高通量	交联剂渗透性差、反应时间长、信号复杂
拉曼光谱 ^[73-76]	1928	无损、快速、可反映分子结构	灵敏度低、信号复杂
电子顺磁共振 ^[86-88]	1944	可反映构象变化、灵敏度高	信号复杂
核磁共振 ^[91-92]	1946	时空分辨率高、可反映分子结构、能检测蛋白质定位	信号复杂、受分子质量限制
AlphaFold ^[97-98]	2018	速度快、适用广、可解释性强	可能存在错误、需要实验验证

3 总结与展望

膜蛋白是进入细胞的门户，也是细胞的控制中心^[99]，其生物学功能往往通过膜蛋白相互作用来

实现^[4]。由于膜蛋白定位于细胞的膜结构上，其结构和功能需要靠膜环境来维持^[1, 21]，唯有原位分析技术才能准确探究其相互作用。目前，可用于原位分析膜蛋白相互作用的技术可以大致分为两类：a. 基于标记的膜蛋白原位分析技术，其中包括

Co-IP、PLA、BiFC、共振能量转移和PL技术；b. 无标记的膜蛋白原位分析技术，其中包括Cryo-ET、*In situ* XL-MS、拉曼光谱、EPR、NMR和结构预测技术。我们将上述分析技术的产生年代、主要优点和缺点进行了总结（表1）。

虽然膜蛋白相互作用的原位分析对了解生物功能和疾病产生机制十分重要，但现有分析技术仍存在一些普遍短板，例如：a. 现有技术多为对目标蛋白质上附加的标记进行检测，或基于目标蛋白质之间的距离开展间接检测，无法直接检测相互作用；b. 难以在活细胞原本的环境中实现同一膜蛋白的连续动态监测；c. 通常需要对蛋白质进行标记，或在检测前对样品进行前处理，可能影响膜蛋白原本的结构以及相互作用。这些技术短板依然限制着对膜蛋白原位相互作用的进一步认识和理解。

随着科学研究的发展，新的膜蛋白相互作用原位分析技术不断涌现，已有的分析技术也在逐步革新。然而，单一分析技术总归存在其固有缺陷。将多种分析技术联用，往往可以达到取长补短的效果，从而获得膜蛋白相互作用更加真实、全面的信息。例如，*In situ* XL-MS结合PL技术，可以同时克服*In situ* XL-MS难以捕获低丰度膜蛋白相互作用和PL技术难以获得全局相互作用信息的缺点，能实现高通量的空间分辨亚细胞相互作用组分析^[100]；FERT技术结合NMR和人工智能模拟，可以分别获得膜蛋白相互作用的结构动态信息、蛋白质界面信息和原子细节信息，获得更加深入的理解^[101]。由此可见，在日益强大的人工智能和多种多样的原位分析技术加持下，多技术联用将成为未来发展趋势，借此研究人员有望从多角度、多模态、跨尺度、动态性层面对膜蛋白相互作用开展更加深入的研究，从而精准解读这一重要分子事件。

参考文献

- [1] Hegde R S, Keenan R J. The mechanisms of integral membrane protein biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, **23**(2): 107-124
- [2] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes 1 1 Edited by F. Cohen. *J Mol Biol*, 2001, **305**(3): 567-580
- [3] Overington J P, Al-Lazikani B, Hopkins A L. How many drug targets are there?. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, **5**(12): 993-996
- [4] Liu Q, Zheng J, Sun W, *et al.* A proximity-tagging system to identify membrane protein - protein interactions. *Nat Meth*, 2018, **15**(9): 715-722
- [5] Klenotic P A, Moseng M A, Morgan C E, *et al.* Structural and functional diversity of resistance-nodulation-cell division transporters. *Chem Rev*, 2021, **121**(9): 5378-5416
- [6] Jiang H, Galtes D, Wang J, *et al.* G protein-coupled receptor signaling: transducers and effectors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, **323**(3): C731-C748
- [7] Lai Y, Zhang Y, Zhou S, *et al.* Structure of the human ATP synthase. *Mol Cell*, 2023, **83**(12): 2137-2147.e4
- [8] Kanchanawong P, Calderwood D A. Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell - ECM adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, **24**(2): 142-161
- [9] Slack R J, MacDonald S J F, Roper J A, *et al.* Emerging therapeutic opportunities for integrin inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, **21**(1): 60-78
- [10] Lee H J, Jeong H, Hyun J, *et al.* Cryo-EM structure of human Cx31.3/GJC3 connexin hemichannel. *Sci Adv*, 2020, **6**(35): eaba4996
- [11] Zaucha J, Heinzinger M, Kulandaisamy A, *et al.* Mutations in transmembrane proteins: diseases, evolutionary insights, prediction and comparison with globular proteins. *Brief Bioinform*, 2021, **22**(3): bbaa132
- [12] Lu H, Zhou Q, He J, *et al.* Recent advances in the development of protein - protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, **5**: 213
- [13] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 2020, **181**(2): 271-280.e8
- [14] 张晓铮, 高颖, 刘玉, 等. 基于处方挖掘与分子动力学模拟筛选严重急性呼吸综合征冠状病毒2潜在抑制剂分子的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(10): 1889-1900
Zhang X Z, Gao Y, Liu Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(10): 1889-1900
- [15] Cao T, Lu Y, Wang Q, *et al.* A CGA/EGFR/GATA2 positive feedback circuit confers chemoresistance in gastric cancer. *J Clin Invest*, 2022, **132**(6): e154074
- [16] Kaur U, Lee J C. Unroofing site-specific α -synuclein-lipid interactions at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(32): 18977-18983
- [17] Lv G, Ko M S, Das T, *et al.* Molecular and functional interactions of α -synuclein with Rab3a. *J Biol Chem*, 2022, **298**(9): 102239
- [18] Ray S, Singh N, Kumar R, *et al.* α -Synuclein aggregation nucleates through liquid - liquid phase separation. *Nat Chem*, 2020, **12**(8): 705-716
- [19] Burré J, Sharma M, Südhof T C. Definition of a molecular pathway mediating α -synuclein neurotoxicity. *J Neurosci*, 2015, **35**(13): 5221-5232
- [20] Luan M Y, Wang Z X, Deng J W. α -Synuclein as a Diagnostic Marker and Therapeutic Target for Parkinson Disease. *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(1): 86-99
- [21] Corin K, Bowie J U. How bilayer properties influence membrane protein folding. *Protein Sci*, 2020, **29**(12): 2348-2362
- [22] Cao S, Peterson S M, Müller S, *et al.* A membrane protein display

- platform for receptor interactome discovery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(39): e2025451118
- [23] Shi X, Chen M, Yu Z, *et al.* *In situ* structure and assembly of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Nat Commun*, 2019, **10**: 2635
- [24] Tan D C, Wijaya I P M, Andreasson-Ochsner M, *et al.* A novel microfluidics-based method for probing weak protein – protein interactions. *Lab Chip*, 2012, **12**(15): 2726
- [25] Kjaergaard M, Kragelund B B. Functions of intrinsic disorder in transmembrane proteins. *Cell Mol Life Sci*, 2017, **74**(17): 3205-3224
- [26] Langosch D, Arkin I T. Interaction and conformational dynamics of membrane-spanning protein helices. *Protein Sci*, 2009, **18**(7): 1343-1358
- [27] Pan X, Vachet R W. Membrane protein structures and interactions from covalent labeling coupled with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2022, **41**(1): 51-69
- [28] Huang C, Zhang J, Liu Z, *et al.* *In situ* and label-free quantification of membrane protein-ligand interactions using optical imaging techniques: a review. *Biosensors: Basel*, 2024, **14**(11): 537
- [29] Lin J S, Lai E M. Protein-protein interactions: co-immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*, 2017, 1615: 211-219
- [30] Demirdizen E, Al-Ali R, Narayanan A, *et al.* TRIM67 drives tumorigenesis in oligodendrogliomas through Rho GTPase-dependent membrane blebbing. *Neuro Oncol*, 2023, **25**(6): 1031-1043
- [31] Gnanasekaran P, Pappu H R. Affinity purification-mass spectrometry (AP-MS) and co-immunoprecipitation (co-IP) technique to study protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*, 2023, 2690: 81-85
- [32] Christie S, Shi X, Smith A W. Resolving membrane protein-protein interactions in live cells with pulsed interleaved excitation fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Acc Chem Res*, 2020, **53**(4): 792-799
- [33] Wei X, Zheng Z, Feng Z, *et al.* Sigma-1 receptor attenuates osteoclastogenesis by promoting ER-associated degradation of SERCA2. *EMBO Mol Med*, 2022, **14**(7): e15373
- [34] Sciuto M R, Coppola V, Iannolo G, *et al.* Two-step co-immunoprecipitation (TIP). *Curr Protoc Mol Biol*, 2019, **125**(1): e80
- [35] Alam M S. Proximity ligation assay (PLA). *Curr Protoc Immunol*, 2018, **123**(1): e58
- [36] Tubbs E, Theurey P, Vial G, *et al.* Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes*, 2014, **63**(10): 3279-3294
- [37] Wang P, Yang Y, Hong T, *et al.* Proximity ligation assay: an ultrasensitive method for protein quantification and its applications in pathogen detection. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, **105**(3): 923-935
- [38] Miller K E, Kim Y, Huh W K, *et al.* Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis: advances and recent applications for genome-wide interaction studies. *J Mol Biol*, 2015, **427**(11): 2039-2055
- [39] Yang H, Shen H, Li J, *et al.* SIGMAR1/Sigma-1 receptor ablation impairs autophagosome clearance. *Autophagy*, 2019, **15**(9): 1539-1557
- [40] Wu J, Michaeli S, Picchianti L, *et al.* ATI1 (ATG8-interacting protein 1) and ATI2 define a plant starvation-induced reticulophagy pathway and serve as MSBP1/MAPR5 cargo receptors. *Autophagy*, 2021, **17**(11): 3375-3388
- [41] Strotmann V I, Stahl Y. Visualization of *in vivo* protein-protein interactions in plants. *J Exp Bot*, 2022, **73**(12): 3866-3880
- [42] Sun Y, Wang Y, Chen K, *et al.* Rational engineering and synthetic applications of a high specificity BiFC probe derived from Springgreen-M. *Analyst*, 2022, **147**(19): 4326-4336
- [43] Cao J. Generalized resonance energy transfer theory: applications to vibrational energy flow in optical cavities. *J Phys Chem Lett*, 2022, **13**(47): 10943-10951
- [44] Takkinen K, Žvirblienė A. Recent advances in homogenous immunoassays based on resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 55: 16-22
- [45] Duan Z, Li K, Duan W, *et al.* Probing membrane protein interactions and signaling molecule homeostasis in plants by Förster resonance energy transfer analysis. *J Exp Bot*, 2022, **73**(1): 68-77
- [46] Algar W R, Hildebrandt N, Vogel S S, *et al.* FRET as a biomolecular research tool—understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nat Meth*, 2019, **16**(9): 815-829
- [47] Guo S, Zhao T, Yun Y, *et al.* Recent progress in assays for GPCR drug discovery. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, **323**(2): C583-C594
- [48] Bhuckory S, Kays J C, Dennis A M. *In vivo* biosensing using resonance energy transfer. *Biosensors: Basel*, 2019, **9**(2): E76
- [49] Dou L, Pan Y, Ma M, *et al.* Antibody engineering-driven controllable chemiluminescence resonance energy transfer for immunoassay with tunable dynamic range. *Anal Chim Acta*, 2021, **1152**: 338231
- [50] 谢浩, 郭小明. 融合标签技术在膜蛋白结构研究中的应用. *生物技术通讯*, 2009, **20**(1): 138-142
Xie H, Guo X M. *Lett Biotechnol*, 2009, **20**(1): 138-142
- [51] 蒋嘉峰, 肖澜, 谢浩, 等. 重组细菌多药外排泵 AcrAB-TolC 的转运功能和动态组装. *微生物学通报*, 2022, **49**(11): 4617-4628
Jiang J F, Xiao L, Xie H, *et al.* *Microbiol China*, 2022, **49**(11): 4617-4628
- [52] Stroik D R, Yuen S L, Janicek K A, *et al.* Targeting protein-protein interactions for therapeutic discovery via FRET-based high-throughput screening in living cells. *Sci Rep*, 2018, **8**: 12560
- [53] Wan L, Xu F, Liu C, *et al.* Transmembrane peptide 4 and 5 of APJ are essential for its heterodimerization with OX1R. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, **521**(2): 408-413
- [54] Wu Y, Jiang T. Developments in FRET- and BRET-based biosensors. *Micromachines: Basel*, 2022, **13**(10): 1789
- [55] Qin W, Cho K F, Cavanagh P E, *et al.* Deciphering molecular

- interactions by proximity labeling. *Nat Methods*, 2021, **18**(2): 133-143
- [56] Kido K, Yamanaka S, Nakano S, *et al.* AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein-protein interactions. *eLife*, 2020, **9**: e54983
- [57] Paek J, Kalocsay M, Staus D P, *et al.* Multidimensional tracking of GPCR signaling *via* peroxidase-catalyzed proximity labeling. *Cell*, 2017, **169**(2): 338-349.e11
- [58] 董娜, 张文峰. 邻近标记技术在蛋白质-蛋白质相互作用中的研究进展. *广东药科大学学报*, 2024, **40**(3): 141-151
- Dong N, Zhang W F. *J Guangdong Pharm Univ*, 2024, **40**(3): 141-151
- [59] Cho K F, Branon T C, Rajeev S, *et al.* Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(22): 12143-12154
- [60] Klykov O, Kopylov M, Carragher B, *et al.* Label-free visual proteomics: coupling MS- and EM-based approaches in structural biology. *Mol Cell*, 2022, **82**(2): 285-303
- [61] Wang Z, Raunser S. Structural biochemistry of muscle contraction. *Annu Rev Biochem*, 2023, **92**: 411-433
- [62] Wang Z, Grange M, Pospich S, *et al.* Structures from intact myofibrils reveal mechanism of thin filament regulation through nebulin. *Science*, 2022, **375**(6582): eabn1934
- [63] Guaita M, Watters S C, Loerch S. Recent advances and current trends in cryo-electron microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 2022, **77**: 102484
- [64] Mühleip A, Kock Flygaard R, Ovcjarikova J, *et al.* ATP synthase hexamer assemblies shape cristae of *Toxoplasma* mitochondria. *Nat Commun*, 2021, **12**: 120
- [65] Park D, Lara-Tejero M, Waxham M N, *et al.* Visualization of the type III secretion mediated *Salmonella*-host cell interface using cryo-electron tomography. *Elife*, 2018, **7**: e39514
- [66] Turk M, Baumeister W. The promise and the challenges of cryo-electron tomography. *FEBS Lett*, 2020, **594**(20): 3243-3261
- [67] Hevler J F, Heck A J R. Higher-order structural organization of the mitochondrial proteome charted by *in situ* cross-linking mass spectrometry. *Mol Cell Proteom*, 2023, **22**(11): 100657
- [68] Michael A R M, Amaral B C, Ball K L, *et al.* Cell fixation improves performance of *in situ* crosslinking mass spectrometry while preserving cellular ultrastructure. *Nat Commun*, 2024, **15**: 8537
- [69] Graziadei A, Rappsilber J. Leveraging crosslinking mass spectrometry in structural and cell biology. *Structure*, 2022, **30**(1): 37-54
- [70] Ser Z, Cifani P, Kentsis A. Optimized cross-linking mass spectrometry for *in situ* interaction proteomics. *J Proteome Res*, 2019, **18**(6): 2545-2558
- [71] Hevler J F, Zenezeni Chiozzi R, Cabrera-Orefice A, *et al.* Molecular characterization of a complex of apoptosis-inducing factor 1 with cytochrome c oxidase of the mitochondrial respiratory chain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(39): e2106950118
- [72] Chen Y, Zhou W, Xia Y, *et al.* Targeted cross-linker delivery for the *in situ* mapping of protein conformations and interactions in mitochondria. *Nat Commun*, 2023, **14**: 3882
- [73] Dodo K, Fujita K, Sodeoka M. Raman spectroscopy for chemical biology research. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(43): 19651-19667
- [74] Kuhar N, Sil S, Umapathy S. Potential of Raman spectroscopic techniques to study proteins. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*, 2021, **258**: 119712
- [75] Altangerel N, Neuman B W, Hemmer P R, *et al.* Label-free drug interaction screening *via* Raman microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, **120**(30): e2218826120
- [76] Seo D, Sun H, Choi Y. Simultaneous protein colorful imaging *via* Raman signal classification. *Nano Lett*, 2024, **24**(28): 8595-8601
- [77] Rist D, DePalma T, Stagner E, *et al.* Cancer cell targeting, magnetic sorting, and SERS detection through cell surface receptors. *ACS Sens*, 2023, **8**(12): 4636-4645
- [78] Xu G, Li W, Xie H, *et al.* *In situ* monitoring of membrane protein electron transfer *via* surface-enhanced resonance Raman spectroscopy. *Anal Chem*, 2024, **96**(1): 6-11
- [79] Liao S J, Cao J, Zhu W, *et al.* Recent progress of responsive Raman scattering probes for biosensing and bioimaging. *Trac Trends Anal Chem*, 2023, **169**: 117357
- [80] Guo J, Chen Y, Jiang Y, *et al.* Polyadenine-modulated DNA conformation monitored by surface-enhanced Raman scattering (SERS) on multibranched gold nanoparticles and its sensing application. *Chem*, 2017, **23**(39): 9332-9337
- [81] Guo J, Zhong Z, Li Y, *et al.* "Three-in-one" SERS adhesive tape for rapid sampling, release, and detection of wound infectious pathogens. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(40): 36399-36408
- [82] Guo J, Liu Y, Yang Y, *et al.* A filter supported surface-enhanced Raman scattering "nose" for point-of-care monitoring of gaseous metabolites of bacteria. *Anal Chem*, 2020, **92**(7): 5055-5063
- [83] Guo J, Liu Y, Chen Y, *et al.* A multifunctional SERS sticky note for real-time quorum sensing tracing and inactivation of bacterial biofilms. *Chem Sci*, 2018, **9**(27): 5906-5911
- [84] Wang Y, Fang L, Wang Y, *et al.* Current trends of Raman spectroscopy in clinic settings: opportunities and challenges. *Adv Sci*, 2024, **11**(7): 2300668
- [85] Zhou Q Q, Guo J, Wang Z, *et al.* Rapid visualization of PD-L1 expression level in glioblastoma immune microenvironment *via* machine learning cascade-based Raman histopathology. *J Adv Res*, 2024, **65**: 257-271
- [86] Geue N, Winpenny R E P, Barran P E. Structural characterisation methods for supramolecular chemistry that go beyond crystallography. *Chem Soc Rev*, 2022, **51**(1): 8-27
- [87] Theillet F X. In-cell structural biology by NMR: the benefits of the atomic scale. *Chem Rev*, 2022, **122**(10): 9497-9570
- [88] Kucher S, Elsner C, Safonova M, *et al.* In-cell double electron-electron resonance at nanomolar protein concentrations. *J Phys Chem Lett*, 2021, **12**(14): 3679-3684
- [89] Joseph B. Protein-protein interaction and conformational change in the alpha-helical membrane transporter BtuCD-F in the native

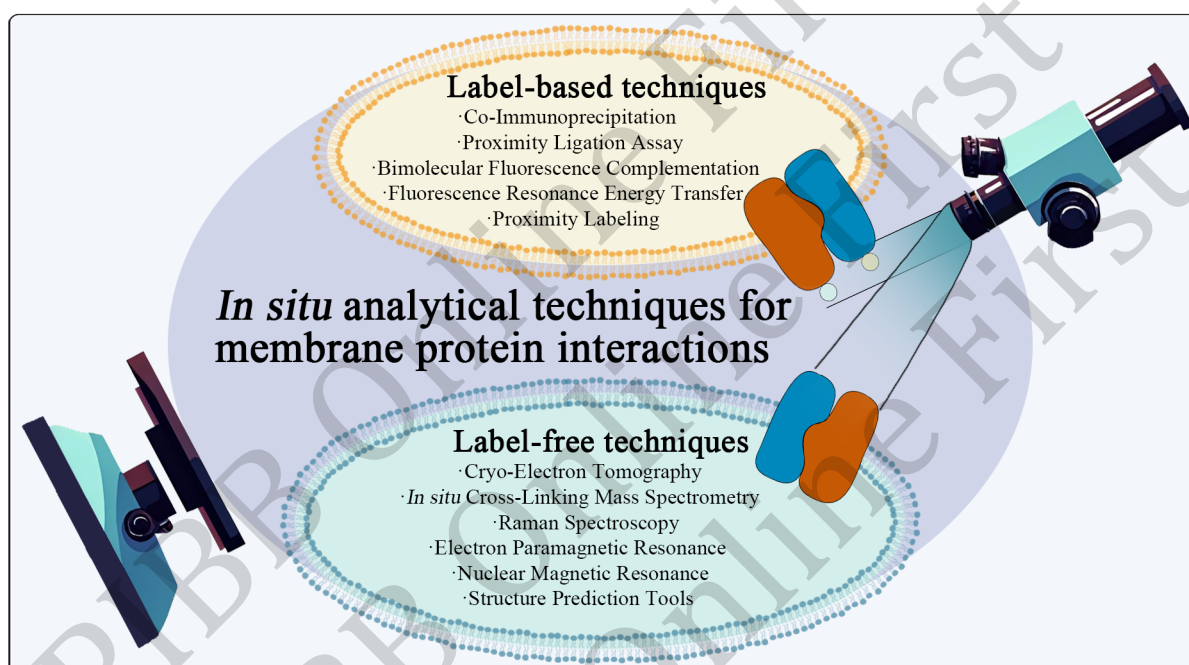
- cellular envelope. *ChemBioChem*, 2025, **26**(1): e202400858
- [90] Hofmann L, Ruthstein S. EPR spectroscopy provides new insights into complex biological reaction mechanisms. *J Phys Chem B*, 2022, **126**(39): 7486-7494
- [91] Theillet F X, Luchinat E. In-cell NMR: why and how? *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2022, **132/133**: 1-112
- [92] Kadavath H, Prymaczok N C, Eichmann C, *et al.* Multi-dimensional structure and dynamics landscape of proteins in mammalian cells revealed by in-cell NMR. *Angew Chem Int Ed*, 2023, **62**(4): e202213976
- [93] Ward M E, Wang S, Munro R, *et al.* *In situ* structural studies of anabaena sensory rhodopsin in the *E. coli* membrane. *Biophys J*, 2015, **108**(7): 1683-1696
- [94] Kulminkaya N V, Pedersen M Ø, Bjerring M, *et al.* In Situ solid-state NMR spectroscopy of protein in heterogeneous membranes: the baseplate antenna complex of chlorobaculum tepidum. *Angew Chem Int Ed*, 2012, **51**(28): 6891-6895
- [95] Hu Y, Cheng K, He L, *et al.* NMR-based methods for protein analysis. *Anal Chem*, 2021, **93**(4): 1866-1879
- [96] Hu R, Li T, Yang Y, *et al.* NMR-based metabolomics in cancer research. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1280: 201-218
- [97] Abramson J, Adler J, Dunger J, *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 2024, **630**(8016): 493-500
- [98] Nussinov R, Zhang M, Liu Y, *et al.* AlphaFold, artificial intelligence (AI), and allostery. *J Phys Chem B*, 2022, **126**(34): 6372-6383
- [99] Slusky J S. Outer membrane protein design. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 45: 45-52
- [100] Sun M, Yuan F, Tang Y, *et al.* Subcellular interactomes revealed by merging APEX with cross-linking mass spectrometry. *Anal Chem*, 2022, **94**(43): 14878-14888
- [101] Heng J, Hu Y, Pérez-Hernández G, *et al.* Function and dynamics of the intrinsically disordered carboxyl terminus of β_2 adrenergic receptor. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 2005

In situ Analytical Techniques for Membrane Protein Interactions*

KANG Zi-Yuan **, YU Tong **, LI Chao, ZHANG Xue-Hua, GUO Jun-Hui, LI Qi-Chang,
GUO Jing-Xing ***, XIE Hao ***

(School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Graphical abstract



Abstract Membrane proteins are integral components of cellular membranes, accounting for approximately 30% of the mammalian proteome and serving as targets for 60% of FDA-approved drugs. They are critical to both physiological functions and disease mechanisms. Their functional protein-protein interactions form the basis for many physiological processes, such as signal transduction, material transport, and cell communication. Membrane protein interactions are characterized by membrane environment dependence, spatial asymmetry, weak interaction strength, high dynamics, and a variety of interaction sites. Therefore, *in situ* analysis is essential for revealing the structural basis and kinetics of these proteins. This paper introduces currently available *in situ* analytical techniques for studying membrane protein interactions and evaluates the characteristics of each. These techniques are divided into two categories: label-based techniques (*e.g.*, Co-Immunoprecipitation, Proximity Ligation Assay, Bimolecular Fluorescence Complementation, Resonance Energy Transfer, and Proximity Labeling) and label-free techniques (*e.g.*, Cryo-Electron Tomography, *In situ* Cross-Linking Mass Spectrometry, Raman Spectroscopy, Electron Paramagnetic Resonance, Nuclear Magnetic Resonance, and Structure Prediction Tools). Each technique is critically assessed in terms of its historical development, strengths, and limitations. Based on the authors' relevant research, the paper further discusses the key issues and trends in the application of these techniques, providing valuable references for the field of membrane protein research. Label-based techniques rely on molecular tags or antibodies to detect proximity or interactions, offering high specificity and adaptability for

dynamic studies. For instance, Proximity Ligation Assay combines the specificity of antibodies with the sensitivity of PCR amplification, while Proximity Labeling enables spatial mapping of interactomes. Conversely, label-free techniques, such as Cryo-Electron Tomography, provide near-native structural insights, and Raman Spectroscopy directly probes molecular interactions without perturbing the membrane environment. Despite advancements, these methods face several universal challenges: (1) indirect detection, relying on proximity or tagged proxies rather than direct interaction measurement; (2) limited capacity for continuous dynamic monitoring in live cells; and (3) potential artificial influences introduced by labeling or sample preparation, which may alter native conformations. Emerging trends emphasize the multimodal integration of complementary techniques to overcome individual limitations. For example, combining *In situ* Cross-Linking Mass Spectrometry with Proximity Labeling enhances both spatial resolution and interaction coverage, enabling high-throughput subcellular interactome mapping. Similarly, coupling Fluorescence Resonance Energy Transfer with Nuclear Magnetic Resonance and AI simulations integrates dynamic structural data, atomic-level details, and predictive modeling for holistic insights. Advances in artificial intelligence, exemplified by AlphaFold's ability to predict interaction interfaces, further augment experimental data, accelerating structure-function analyses. Future developments in Cryo-Electron Microscopy, Super-Resolution Imaging, and Machine Learning are poised to refine spatiotemporal resolution and scalability. In conclusion, *in situ* analysis of membrane protein interactions remains indispensable for deciphering their roles in health and disease. While current technologies have significantly advanced our understanding, persistent gaps highlight the need for innovative, integrative approaches. By synergizing experimental and computational tools, researchers can achieve multiscale, real-time, and perturbation-free analyses, ultimately unraveling the dynamic complexity of membrane protein networks and driving therapeutic discovery.

Key words membrane protein, protein-protein interaction, *in situ* analysis

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0412

CSTR: 32369.14.pibb.20240412

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (22372127, 82127806), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (WUT: 233120002, WUT: 223120009).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

GUO Jing-Xing. Tel: 86-18362931882, E-mail: jxguo@whut.edu.cn

XIE Hao. Tel: 86-18971099976, E-mail: h.xie@whut.edu.cn

Received: September 19, 2024 Accepted: February 19, 2025