

## 病毒受体鉴定技术最新进展

孔维莎, 江何伟, 郭书娟, 陶生策\*

(上海交通大学系统生物医学研究院, 系统生物医学教育部重点实验室, 上海 200240)

**摘要:** 病毒感染是由病毒附着蛋白和宿主细胞表面结构之间的相互作用启动的。细胞受体是病毒入侵宿主的关键, 开发高通量且准确的病毒受体鉴定方法对病毒性疾病的防控至关重要。近年来, 多种技术推动了病毒受体鉴定, 大体可分为基因组和相互作用组两大类。基因组技术包括CRISPR/Cas9敲除、CRISPR激活、cDNA文库、RNA干扰以及随机插入诱变等; 相互作用组技术包括蛋白质芯片、亲和纯化质谱和交联质谱等。本文试图重点分析基于基因组和相互作用组的相关技术, 对其应用及优缺点进行归纳总结, 以期为病毒受体鉴定技术的进一步发展提供参考。

**关键词:** 病毒-宿主相互作用; 受体鉴定; 基因组技术; 相互作用组技术

## Technological advances in the identification of virus receptors

KONG Weisha, JIANG Hewei, GUO Shujuan, TAO Shengce\*

(Key Laboratory of Systems Biomedicine, Ministry of Education, Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** Virus infection is initiated by the interaction between the viral attachment protein and the surface structure of the host cell. Cell receptors are the key for viruses to invade the hosts, so developing high throughput and accurate viral receptor identification methods is crucial for the prevention and control of viral diseases. In recent years, various technologies have promoted the identification of viral receptors which can be broadly divided into two categories: genomic-based and interactome-based approaches. Genomic-based approaches include CRISPR/Cas9 knockout, CRISPR activation, cDNA libraries, RNA interference, and random insertion mutagenesis. Interactome-based approaches include protein microarray, affinity purification-mass spectrometry, and cross-linking mass spectrometry. This review attempts to focus on analyzing relevant technologies based on genome and interactome, summarizing their applications, advantages and disadvantages, in order to provide a reference for the further development of virus receptor identification technology.

**Key Words:** virus-host interaction; receptor identification; genomic-based approaches; interactome-based approaches

病毒可以导致广泛的疾病(如流感、水痘及唇疱疹等)以及一些严重的疾病(如艾滋病、SARS及狂犬病等)。一些病毒性疾病会引起不可预测的大流行, 对人类的生命健康和全球经济产生较大的

影响, 如近些年爆发的埃博拉病毒(2014—2015年、2018年和2020年)、寨卡病毒(2015—2016年)和近几年的严重急性呼吸综合征冠状病毒2型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,

收稿日期: 2023-02-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFE0202200); 国家自然科学基金项目(31970130, 31900112)

第一作者: E-mail: wei1006@sjtu.edu.cn

\*通信作者: E-mail: taosc@sjtu.edu.cn

SARS-CoV-2)大流行。随着SARS-CoV-2传播与流行时间的增加,病毒不断积累变异,同时在人体以及疫苗免疫的选择压力下,新冠病毒已由最初的原始毒株进化出多谱系的变异毒株([www.gisaid.org/phyldynamics/global/nextstrain/](http://www.gisaid.org/phyldynamics/global/nextstrain/))。截至2023年2月初,已有超过7.53亿例新冠病毒确诊病例和超过680万人死亡(<https://covid19.who.int/>)。同时,如猴痘病毒带来的突发性公共卫生事件,也引起了全球的广泛关注<sup>[1]</sup>。

了解病原-宿主相互作用,是对病毒进行有效预防和治疗的关键。严格意义上讲病毒不是真正的生命体,其只能依赖宿主的细胞机制进行复制。病毒要感染宿主,必须首先进入细胞,突破细胞的主要屏障——细胞膜。病毒进入宿主细胞通常由病毒附着蛋白和宿主细胞表面受体间的相互作用引发。受体大多数是蛋白质,也可能是糖蛋白、蛋白聚糖、脂类或糖脂。受体可以分为两类,一类是用于将病毒定位在细胞表面的附着受体,通常是糖脂或糖蛋白,例如硫酸乙酰肝素<sup>[2]</sup>。病毒与宿主附着受体的相互作用通常是静电和非特异性的,亲和力较低。另一类进入受体是积极参与病毒进入细胞的特定分子<sup>[3]</sup>,也是狭义上的受体。这些受体通过受体介导的内吞作用或信号通路激活,进一步促进病毒内化<sup>[4]</sup>。部分病毒只需要一个受体来进入宿主细胞,而有些病毒利用同一细胞上的共受体或不同类型细胞上的不同受体来引发感染<sup>[5]</sup>。

病毒-受体相互作用是建立感染的关键初始步骤。因此,从细胞生物学的角度来看,了解病毒-受体相互作用有助于加强对病毒生命周期、组织和物种趋向性以及发病机制的理解,从而进一步帮助开发新的诊断方法、疫苗和抗病毒药物,最终对抗各种有害病毒<sup>[5]</sup>。例如,Yan等<sup>[6]</sup>成功鉴定出牛磺胆酸钠共转运蛋白(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)为乙型肝炎病毒受体,为开发乙型和丁型肝炎病毒治疗和预防策略开辟了新的方向。

对于病毒受体的鉴定,目前已有多种成熟的技术。早期有病毒铺覆蛋白印迹技术(virus overlay protein binding assays, VOPBA)<sup>[7]</sup>、免疫共沉淀技术<sup>[8]</sup>、亲和纯化技术<sup>[6]</sup>、噬菌体表面展示技术<sup>[9]</sup>以

及抗独特型单克隆抗体筛选技术<sup>[10]</sup>等经典方法。以几种引起广泛关注的冠状病毒为例,SARS-CoV的受体血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)的发现是基于免疫共沉淀和质谱鉴定技术;Li等<sup>[8]</sup>利用SARS-CoV Spike蛋白的S1结构域与易感细胞系Vero E6裂解液孵育,对捕获的相对分子质量为110 000大小的蛋白质进一步质谱分析,序列比对后成功鉴定到ACE2受体。Hoffmann等<sup>[11]</sup>根据SARS-CoV-2与SARS-CoV的氨基酸序列相似性,发现了SARS-CoV-2含有与ACE2结合至关重要的氨基酸残基,进一步确认了SARS-CoV-2同样利用ACE2进入宿主细胞。另一种β冠状病毒MERS-CoV的主要进入受体跨膜二肽基肽酶4是通过亲和纯化和质谱分析鉴定出的<sup>[12]</sup>。

近些年,得益于靶向基因干扰、高通量筛选和高分辨率质谱技术的显著发展<sup>[13]</sup>,以亲和纯化质谱和遗传筛选等为代表的新技术在受体鉴定中得到了广泛的应用,这些新技术的原理如图1。鉴于病毒细胞表面受体的重要性,且目前缺乏对相关鉴定技术的系统性总结,本文将综述目前病毒受体鉴定技术及应用方面的近几年最新进展,重点关注目前最主流的基因组及相互作用组两类技术,以期为进一步开发病毒受体鉴定技术和拓展相关应用提供参考。

## 1 基因组方法

基因组方法可以分为两类:功能缺失和功能获得。功能缺失方法通过全基因组筛选可以鉴定所有促进或抑制感染的宿主因子,而功能获得方法通过引入新受体表达来筛选潜在功能性受体。

用于病毒受体发现的具体技术包括:成簇的间隔短回文重复序列/成簇的间隔短回文重复序列相关蛋白9[clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9]敲除、CRISPR激活(CRISPR activation, CRISPRa)、cDNA文库(complementary DNAs, cDNAs)、RNA干扰(RNA interference, RNAi)以及随机插入诱变等。每种方法都具有其独特优点,如表1所示。

### 1.1 功能缺失

功能缺失通常分为基因敲低和基因敲除两

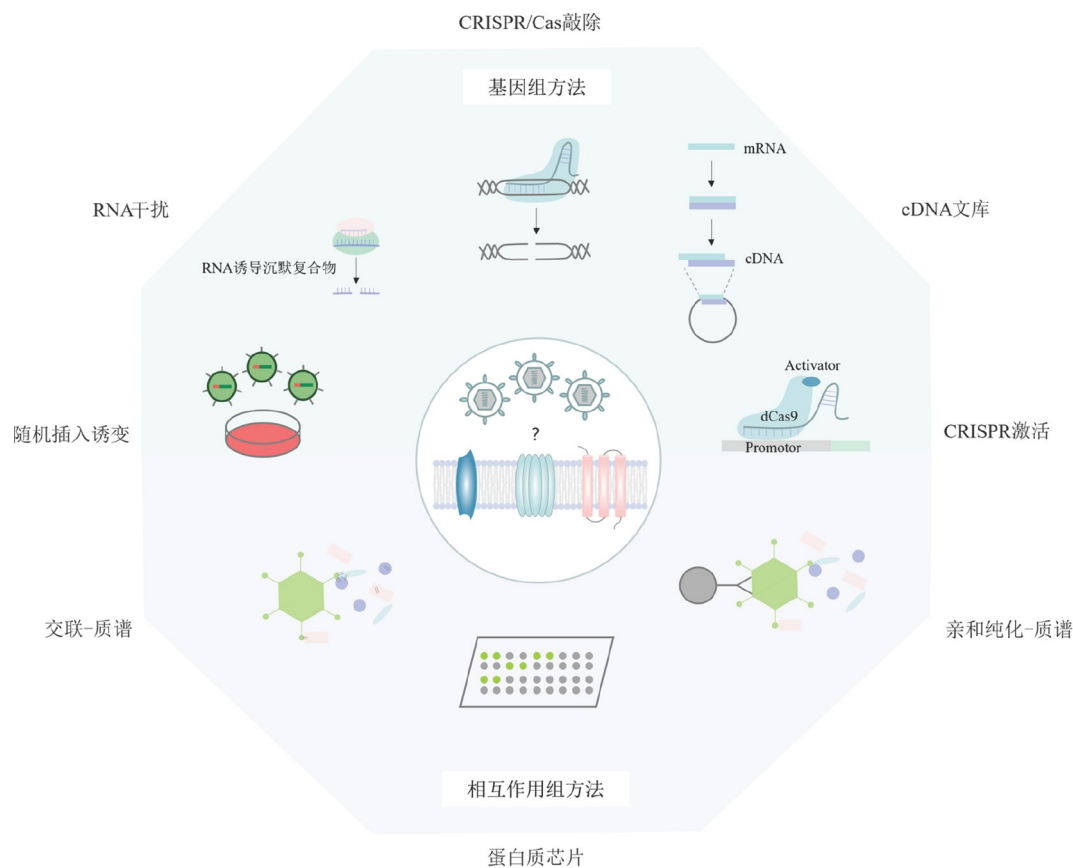


图1 病毒受体鉴定方法

表1 基因组方法优缺点

| 基因组方法        | 优点                                                                                                                       | 缺点                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| RNA干扰        | (1)操作简单、快速(24~48 h); (2)使用试剂稳定; (3)允许研究关键基因                                                                              | (1)在相同研究之间缺乏可重复性; (2)存在一定的假阳性或者假阴性                                    |
| CRISPR/Cas敲除 | (1)无偏向向全部基因; (2)假阳性或假阴性较低; (3)可以用于多种细胞系                                                                                  | (1)可能存在一定的脱靶效应; (2)可能无法研究一些关键基因                                       |
| 随机插入诱变       | (1)较低的脱靶效应; (2)特异性高、假阳性率低; (3)可产生基因的零表型等众多优势                                                                             | (1)应用细胞系较为局限, 通常在单细胞系中使用; (2)不能无偏向向所有基因                               |
| cDNA文库       | (1)操作简单; (2)假阳性概率低                                                                                                       | (1)需要获得合适的非易感细胞系; (2)低表达水平的受体鉴定较困难; (3)文库的突变可能导致假阴性; (4)可能无法考虑功能性基因亚型 |
| CRISPR激活     | (1)设计简单, 具有高特异性; (2)直接在转录水平上控制内源性基因表达, 并且可以作用于编码和非编码序列; (3)与cDNA文库比: 文库构建更容易、更便宜; 大基因递送更容易; 可以上调基因亚型的表达; 可以进行多个sgRNA组合诱导 | (1)靶基因上调水平不足可能造成假阴性; (2)基因在靶细胞中过度表达可能具有潜在的细胞损伤作用; (3)需要设计转录激活剂        |

大类。

1.1.1 基因敲低

RNA干扰是基因敲低中常用的方法, 已广泛应用于病原宿主相互作用领域。RNAi的原理是利用RNA诱导的沉默复合物来暂时去除细胞mRNA, 从而沉默基因<sup>[14]</sup>。沉默复合物的机制是通

用的, 因而RNAi可以用于多种细胞系。

有三种工具可用于实现RNAi: 小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)、短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)和长双链RNA(long double-stranded RNA, dsRNA)。siRNA可以直接瞬转到细胞中, 实现基因的快速筛选。Zhang等<sup>[15]</sup>利用

siRNA筛选, 鉴定出EPA2为爱泼斯坦-巴尔病毒的上皮细胞受体。shRNA以质粒或慢病毒的形式递送到细胞核, 并整合到宿主的DNA中, 因而shRNA表达稳定, 可长期筛选。shRNA和siRNA均可用于哺乳动物系统, 而在昆虫细胞系内常采用dsRNA<sup>[16]</sup>。Rose等<sup>[17]</sup>通过果蝇细胞内的全基因组dsRNAi筛选鉴定出9个Sindbis病毒感染所需的跨膜基因, 证明dsRNAi可在果蝇细胞系中鉴定哺乳动物病毒受体。

RNAi的优点是易于使用, 使用试剂稳定, 可以在24~48 h内实现快速敲低。与功能缺失方法相比, RNAi的敲低效率低于100%, 可以研究必需基因, 且可量化受体对病毒感染的影响。RNAi的缺点是存在一定的脱靶效率和假阳性<sup>[18]</sup>, 类似研究之间重复性不佳<sup>[19-21]</sup>。

### 1.1.2 基因敲除

基因敲除可以通过随机诱变或位点特异性诱变产生。

随机诱变可以通过含有强腺病毒剪接受体位点和标记基因(如绿色荧光蛋白)的基因捕获载体产生<sup>[22]</sup>。基因捕获载体转导后被整合到内含子中, 进一步导致截断mRNA的产生<sup>[23]</sup>。该方法在单倍体细胞系中广泛使用<sup>[24]</sup>, 但在二倍体细胞系中对两条染色体同时引入突变较为困难。此外, 该方法只能产生非通用的分散插入, 不能无偏靶向所有位点<sup>[25]</sup>。近些年, 通过在单倍体细胞系内使用基因陷阱插入诱变方法, 已经筛选到了多种病毒的受体, 如腺相关病毒<sup>[26]</sup>、肠道病毒<sup>[27]</sup>以及卢约病毒<sup>[28]</sup>。

位点特异性诱变可以用CRISPR/Cas9技术实现, 该技术的优点是可以无偏靶向所有位点<sup>[29]</sup>。原核生物中存在多种CRISPR/Cas亚型<sup>[30]</sup>, 其中Cas9是研究最多的CRISPR相关蛋白。CRISPR/Cas9敲除技术首先利用sgRNA靶向双链DNA, 随后Cas9蛋白将特异性切割DNA双链, 双链断裂后, 非同源末端连接导致基因敲除<sup>[31,32]</sup>。CRISPR/Cas9敲除是一种强大的受体鉴定技术, 可以利用sgRNA文库进行全基因组敲除。该方法首先对靶细胞进行病毒感染测定, 通过病毒诱导的细胞死亡或荧光激活细胞分选技术筛选抗病毒细胞, 随后进一步提取细胞DNA, 利用二代测序和生物信

息学分析sgRNA, 从而鉴定出病毒受体, 例如肠道病毒B<sup>[33]</sup>、甲病毒<sup>[34]</sup>、裂谷热病毒<sup>[35]</sup>以及蝙蝠流感病毒<sup>[36]</sup>的鉴定。同时对于利用其他方法鉴定出的候选受体, CRISPR/Cas9技术可以构建特定基因敲除的细胞系, 用以验证候选基因并判断敲除对病毒感染的影响, 如汉坦病毒特异性受体的鉴定<sup>[37]</sup>。

### 1.2 功能获得

功能缺失是筛选与病毒感染相关关键基因的常用方法, 而功能获得对于病毒受体的发现鉴定同样重要。功能缺失筛选揭示了表达基因的依赖性, 然而许多基因可能不在模型细胞系中表达或需要诱导表达, 因此很难被鉴定, 此时可以通过异位表达确定这些基因对病毒感染的影响。如果异位表达显示出与功能缺失相反的表现, 则将进一步验证功能缺失研究的结论<sup>[38]</sup>。

cDNA文库是一种常用的功能获得方法, 该方法利用逆转录酶合成的cDNA文库转染到细胞系中, 通过细胞是否易感病毒来筛选出感兴趣的基因。这种方法一直用于病毒受体的发现和鉴定, 如丙型肝炎病毒<sup>[39,40]</sup>, 此外近些年已经成功鉴定出人巨细胞病毒<sup>[41]</sup>和发热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)<sup>[42]</sup>的受体。cDNA文库筛选较容易获得开放阅读框克隆, 且cDNA文库稳定。然而, 该方法需要考虑非易感细胞系的获得和遗传操纵的难易, 以及低表达水平受体的cDNA文库构建<sup>[43]</sup>。

另一种功能获得方法是CRISPRa, 这种内源性基因扰动方法将催化失活的Cas9(dCas9)连接转录激活因子(如VP64、p65、Rta), 从而在mRNA水平促进基因组特定位点转录, 以使基因上调。CRISPRa打破了外源性过表达的局限性, 可以同时激活多个本底基因表达, 实现高通量过表达筛选<sup>[44]</sup>。

在之前的研究中, CRISPRa已被用于筛选抑制病毒感染的关键宿主因子。Han等<sup>[45]</sup>利用CRISPRa进行全基因组上调, 以筛选抑制甲型流感病毒复制的关键宿主因子。Dukhovny等<sup>[46]</sup>和Luu等<sup>[47]</sup>利用基因组规模的CRISPRa筛选寨卡病毒的宿主因子, 证明CRISPRa是研究病原-宿主相互作用的有效方法。在鉴定病毒受体方面, CRISPRa也得

到了有效应用。Zhu等<sup>[48]</sup>利用全基因组CRISPRa筛选发现了多个介导SARS-CoV-2入侵细胞的潜在新受体。

同cDNA表达筛选相比, CRISPRa的优势是: sgRNA比cDNA小, 更易制备和操作; 更易递送较大基因到靶细胞; 可以组合多个sgRNA诱导基因<sup>[49]</sup>。虽然CRISPRa在受体鉴定方面应用还较少, 但考虑到该技术脱靶效率低等优势, 可以预见未来将会被广泛应用。

## 2 相互作用组方法

相互作用组方法旨在直接识别病毒附着蛋白与其宿主受体之间发生的蛋白质-蛋白质相互作用。

VOPBA是早期较常用的一种方法<sup>[50]</sup>, VOPBA先将所有细胞蛋白进行凝胶电泳并转移到膜上, 然后用病毒进行探测并利用抗体识别, 随后用质谱鉴定蛋白质。采用VOPBA已经成功鉴定出多种病毒的受体, 包括蜚传脑炎病毒<sup>[51]</sup>受体。但VOPBA存在一些局限性, 如电泳会破坏蛋白质三维构象, 可能导致病毒无法识别受体。此外, 可能无法检测低亲和力相互作用的蛋白质<sup>[52]</sup>。

近些年已经有较新的组学方法鉴定病毒受体, 主要技术有蛋白质芯片、亲和纯化质谱(affinity purification-mass spectrometry, AP-MS)和交联质谱(cross-linking mass spectrometry, XL-MS)等, 每种方法都具有独特优点, 如表2所示。

### 2.1 蛋白质芯片

蛋白质芯片是能够高通量并行检测蛋白质相互作用的工具, 在研究病原-宿主相互作用时, 首先将纯化的靶细胞蛋白固定在载玻片上来制备蛋白质芯片, 随后将病毒蛋白与芯片进行孵育, 通

过标记或非标记的方法检测蛋白质相互作用。

蛋白质芯片在蛋白质互作领域应用广泛, 尽管现在已经开发了许多蛋白质芯片, 包括一些商业化芯片<sup>[53]</sup>, 但由于可溶性跨膜蛋白难以制备且较难很好地保持活性, 靶向细胞外受体的蛋白质芯片仍较少<sup>[54]</sup>。同时, 由于重组蛋白可能缺少天然的蛋白质翻译后修饰, 体外的相互作用在体内可能没有生物学相关性。此外, 生成大规模重组蛋白文库需要较高的成本。Martinez-Martin等<sup>[54]</sup>以在细胞外相互作用筛选(avidity-based extracellular interaction screen, Avexis)方法为基础, 在一个自动化的、独立于细胞的平台上建立了一个包含1 297个人类单跨膜受体胞外结构域的库, 用于筛选人巨细胞病毒的潜在受体。另一技术进展是利用核酸可编程蛋白质阵列(nucleic acid programmable protein array, NAPPA), 将表达蛋白质的质粒点制在芯片上, 并使用体外转录和翻译(*in vitro* transcription and translation, IVTT)原位合成蛋白质<sup>[55]</sup>。Glick等<sup>[56]</sup>利用IVTT和微流控系统构建了一个包含约2 100种人膜蛋白质的芯片, 用于表征猿猴病毒的相互作用, 并通过免疫共沉淀技术进行初步验证。

### 2.2 亲和纯化质谱

亲和纯化质谱是鉴定病原-宿主相互作用最常用的蛋白质组学技术之一。Gordon等<sup>[57]</sup>利用AP-MS分析了SARS-CoV-2蛋白相互作用图谱。AP-MS的工作流程如下: 首先, 宿主细胞感染病毒后形成病毒-受体复合物; 裂解细胞后, 通过亲和纯化分离复合物, 亲和纯化通常可以使用高亲和力和高特异性的抗体<sup>[58]</sup>, 也可以使用带有亲和标签的病毒<sup>[59]</sup>; 最后使用质谱鉴定并进行复合物定量分析。

表2 蛋白质组学方法优缺点

| 蛋白质组学方法 优点 |                                                              | 缺点                                                                              |
|------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 蛋白质芯片      | (1)高通量、并行分析; (2)灵敏度高                                         | (1)检测到的相互作用可能不是生理相关的; (2)重组蛋白缺少天然的翻译后修饰; (3)生成重组蛋白文库耗时且昂贵                       |
| 亲和纯化-质谱    | (1)亲和标签使用便捷, 操作简单; (2)蛋白质以天然形式纯化; (3)不基于文库, 可以实现真正的全基因组高通量筛选 | (1)需要遗传易操作的病毒; (2)亲和标记可能干扰病毒蛋白功能和蛋白质折叠; (3)可能无法捕获弱的和瞬时的相互作用; (4)非特异性结合蛋白可能导致假阳性 |
| 交联-质谱      | (1)可以识别弱的和瞬时的相互作用; (2)可以高通量筛选; (3)可以获得有关结合位点的其他结构信息          | (1)需要专门的软件来鉴定交联肽; (2)病毒和受体表面须存在易交联残基; (3)检测的蛋白质可能不是体内的功能性受体                     |

在亲和纯化中,最常使用的是单独标记的重组病毒糖蛋白。如该方法被用于鉴定日本脑炎病毒的细胞受体<sup>[60]</sup>,通过标记病毒的糖蛋白E进行亲和纯化,鉴定出了42种相互作用的蛋白质,并进行了进一步功能验证。AP-MS使用便捷,能够构建大规模相互作用网络。但由于病毒包膜蛋白组装在病毒表面,标记的重组糖蛋白可能无法真实地再现受体结合位点,从而导致假阴性的发生<sup>[61]</sup>。一些较弱和瞬时的相互作用也可能在提取或洗涤步骤中丢失。此外,一些非特异性结合蛋白的共同分离会造成假阳性。

### 2.3 交联质谱

病毒附着蛋白和宿主受体之间的相互作用是在细胞膜上发生的,且往往是瞬时的。交联可以通过在病毒附着蛋白和宿主受体之间引入共价键,克服在天然环境中直接检测的困难。

近些年,交联与高分辨率质谱相结合,在鉴定蛋白质相互作用领域发挥着重要作用。XL-MS利用化学交联剂共价连接相互作用的蛋白质,交联后用酶消化蛋白质,产生复杂的肽混合物,随后使用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析该肽混合物来鉴定交联肽<sup>[62]</sup>。交联剂包括许多类型:同源双官能交联剂、异双官能交联剂、零长度交联剂和三官能交联剂<sup>[63]</sup>。其中,三官能交联剂可以引入其他功能,如生物素标签,可用于后续蛋白质的亲和纯化<sup>[64]</sup>。

Frei等<sup>[65]</sup>使用一种新型三官能化学试剂——TRICEPS鉴定出七种潜在的成熟牛痘病毒的细胞受体。Sobatzki等<sup>[66]</sup>在TRICEPS试剂的基础上开发了一种基于水溶性催化剂HATRIC的配体捕获技术(HATRIC-LRC)。这种新方法结合了水溶性催化剂和点击化学技术,进一步筛选了甲型流感病毒的候选受体,确定了24个病毒相互作用候选蛋白。Srivastara等<sup>[67]</sup>设计了一个三功能化学探针,利用一个光反应性基团以时间分辨的方式研究宿主-病原体相互作用组,将神经细胞黏附分子NCAM1确定为潜在的寨卡病毒受体。此外,三官能交联剂还可以结合化学裂解位点,以在纯化后除去生物素部分以及同位素标记的间隔臂,便于进一步的定量分析<sup>[68]</sup>。尽管这些技术在概念验证上取得了成功,但与XL-MS相关的数据分析存在一定的复

杂性,目前已经有几种专门的算法和软件包来识别和鉴定肽<sup>[69]</sup>。

## 3 总结与展望

近些年,已经有多次新发和再发病毒性传染病爆发,对人类生命健康造成严重危害,给社会经济带来极大损失。病毒细胞表面受体的鉴定对于抗病毒药物、疫苗和新诊断技术的开发至关重要。

近年来,靶向基因扰动、高通量筛选和质谱技术等的最新进展促进了病毒细胞受体的发现,已经有多种重要病毒受体被成功鉴定,为进一步了解病毒的致病机制并为病毒性疾病的防控提供了科学依据。但这些方法也存在一定的局限性:基因组方法表现在需要合适的细胞系、组织或动物模型;需要可以遗传操纵的合适的病毒株;可能存在一定的脱靶。相互作用组学方法表现在相互作用可能并不与真实生理相关;低亲和力和瞬时的相互作用可能无法鉴定,并且这些方法通常容易鉴定出多个候选分子,需要进一步缩小范围并验证。除了基因组和相互作用组方法之外,还有其他几种方法可用于验证病毒受体,如竞争测定<sup>[70]</sup>、小分子结合抑制<sup>[71]</sup>、共定位免疫荧光显微镜<sup>[72]</sup>和Förster共振能量转移测定<sup>[73]</sup>等。

与相互作用组方法相比,近些年发展的邻近标记技术可以较好地捕获弱的和瞬时的相互作用。邻近标记技术已经用于病原体蛋白质组之间全局网络的建立<sup>[74]</sup>以及细胞膜相互作用筛选<sup>[75]</sup>,可以预见该方法未来会在病毒受体鉴定发现方面得到广泛应用。总之,受体鉴定通常极为复杂,较难有一种适合所有场景的受体鉴定方法。未来的技术发展更可能使用不同方法的组合来鉴定受体,从而深入探究病毒进入的整体情况,并通过正交实验进行验证。

目前,仍然有非常多的病毒受体未知,如非洲猪瘟病毒参与病毒进入细胞的特异性受体和附着因子。病毒-受体相互作用的鉴定是一个具有重大意义和挑战性的研究方向,特别是在应对不可预计的病毒性大流行病时,受体鉴定可以为病毒诊断、预防及治疗提供科学依据,可以预见未来将开发出更多高通量和通用性的病毒受体鉴定方法。

## 参考文献

- [1] Lum FM, Torres-Ruesta A, Tay MZ, et al. Monkeypox: disease epidemiology, host immunity and clinical interventions. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(10): 597-613
- [2] Neu U, Bauer J, Stehle T. Viruses and sialic acids: rules of engagement. *Curr Opin Struct Biol*, 2011, 21(5): 610-618
- [3] Helenius A. Virus entry: looking back and moving forward. *J Mol Biol*, 2018, 430(13): 1853-1862
- [4] Yamauchi Y, Helenius A. Virus entry at a glance. *J Cell Sci*, 2013, 126(6): 1289-1295
- [5] Maginnis MS. Virus-receptor interactions: the key to cellular invasion. *J Mol Biol*, 2018, 430(17): 2590-2611
- [6] Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*, 2012, 1: e00049
- [7] Li X, Bangari DS, Sharma A, et al. Bovine adenovirus serotype 3 utilizes sialic acid as a cellular receptor for virus entry. *Virology*, 2009, 392(2): 162-168
- [8] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, 426(6965): 450-454
- [9] Jolly CL, Huang JA, Holmes IH. Selection of rotavirus VP4 cell receptor binding domains for MA104 cells using a phage display library. *J Virological Methods*, 2001, 98(1): 41-51
- [10] Shimojima M, Miyazawa T, Ikeda Y, et al. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science*, 2004, 303(5661): 1192-1195
- [11] 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
- [12] Raj VS, Mou H, Smits SL, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 2013, 495(7440): 251-254
- [13] Michalski A, Damoc E, Lange O, et al. Ultra high resolution linear ion trap orbitrap mass spectrometer (orbitrap elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(3): O111.013698
- [14] Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*, 2013, 42(1): 217-239
- [15] Zhang H, Li Y, Wang HB, et al. Ephrin receptor A2 is an epithelial cell receptor for Epstein-Barr virus entry. *Nat Microbiol*, 2018, 3(2): 164-171
- [16] Cherry S. Genomic RNAi screening in *Drosophila* S2 cells: what have we learned about host-pathogen interactions? *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(3): 262-270
- [17] Rose PP, Hanna SL, Spiridigliozzi A, et al. Natural resistance-associated macrophage protein is a cellular receptor for Sindbis virus in both insect and mammalian hosts. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(2): 97-104
- [18] Schmich F, Szczurek E, Kreibich S, et al. gespeR: a statistical model for deconvoluting off-target-confounded RNA interference screens. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 220
- [19] Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*, 2008, 319(5865): 921-926
- [20] König R, Zhou Y, Elleder D, et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell*, 2008, 135(1): 49-60
- [21] Zhou H, Xu M, Huang Q, et al. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe*, 2008, 4(5): 495-504
- [22] Lee T, Shah C, Xu EY. Gene trap mutagenesis: a functional genomics approach towards reproductive research. *MHR Basic Sci Reproduc Med*, 2007, 13(11): 771-779
- [23] Carette JE, Guimaraes CP, Varadarajan M, et al. Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science*, 2009, 326(5957): 1231-1235
- [24] Pillay S, Carette JE. Hunting viral receptors using haploid cells. *Annu Rev Virol*, 2015, 2(1): 219-239
- [25] Bellen HJ, Levis RW, He Y, et al. The *Drosophila* gene disruption project: progress using transposons with distinctive site specificities. *Genetics*, 2011, 188(3): 731-743
- [26] Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, et al. An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature*, 2016, 530(7588): 108-112
- [27] Staring J, van den Hengel LG, Raaben M, et al. KREMEN1 is a host entry receptor for a major group of enteroviruses. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(5): 636-643
- [28] Raaben M, Jae LT, Herbert AS, et al. NRP2 and CD63 are host factors for lujo virus cell entry. *Cell Host Microbe*, 2017, 22(5): 688-696
- [29] Essletzbichler P, Konopka T, Santoro F, et al. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res*, 2014, 24(12): 2059-2065
- [30] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1(6): e60
- [31] Hsu PD, Zhang F. Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies. *ACS Chem Neurosci*, 2012, 3(8): 603-610

- [32] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230-232
- [33] Zhao X, Zhang G, Liu S, et al. Human neonatal fc receptor is the cellular uncoating receptor for enterovirus B. *Cell*, 2019, 177(6): 1553-1565.e16
- [34] Clark LE, Clark SA, Lin CY, et al. VLDLR and ApoER2 are receptors for multiple alphaviruses. *Nature*, 2022, 602(7897): 475-480
- [35] Ganaie SS, Schwarz MM, McMillen CM, et al. Lrp1 is a host entry factor for Rift Valley fever virus. *Cell*, 2021, 184(20): 5163-5178
- [36] Karakus U, Thamamongood T, Ciminski K, et al. MHC class II proteins mediate cross-species entry of bat influenza viruses. *Nature*, 2019, 567(7746): 109-112
- [37] Jangra RK, Herbert AS, Li R, et al. Protocadherin-1 is essential for cell entry by New World hantaviruses. *Nature*, 2018, 563(7732): 559-563
- [38] Ramage H, Cherry S. Virus-host interactions: from unbiased genetic screens to function. *Annu Rev Virol*, 2015, 2(1): 497-524
- [39] Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, 2009, 457(7231): 882-886
- [40] Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 2007, 446(7137): 801-805
- [41] Vanarsdall AL, Pritchard SR, Wisner TW, et al. CD147 promotes entry of pentamer-expressing human cytomegalovirus into epithelial and endothelial cells. *mBio*, 2018, 9(3): e00781-18
- [42] Shimojima M, Sugimoto S, Taniguchi S, et al. Efficient functional screening of a cellular cDNA library to identify severe fever with thrombocytopenia syndrome virus entry factors. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5996
- [43] Barrass SV, Butcher SJ. Advances in high-throughput methods for the identification of virus receptors. *Med Microbiol Immunol*, 2020, 209(3): 309-323
- [44] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588
- [45] Han J, Perez JT, Chen C, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors essential for influenza virus replication. *Cell Rep*, 2018, 23(2): 596-607
- [46] Dukhovny A, Lamkiewicz K, Chen Q, et al. A CRISPR activation screen identifies genes that protect against zika virus infection. *J Virol*, 2019, 93(16): e00211-219
- [47] Luu AP, Yao Z, Ramachandran S, et al. A CRISPR activation screen identifies an atypical rho gtpase that enhances zika viral entry. *Viruses*, 2021, 13(11): 2113
- [48] Zhu S, Liu Y, Zhou Z, et al. Genome-wide CRISPR activation screen identifies candidate receptors for SARS-CoV-2 entry. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(4): 701-717
- [49] Gebre M, Nomburg J, Gewurz B. CRISPR-Cas9 genetic analysis of virus-host interactions. *Viruses*, 2018, 10(2): 55
- [50] Lasswitz L, Chandra N, Arnberg N, et al. Glycomics and proteomics approaches to investigate early adenovirus-host cell interactions. *J Mol Biol*, 2018, 430(13): 1863-1882
- [51] Zhang XW, Liang CQ, Wang HZ, et al. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a functional entry factor for tick-borne encephalitis virus. *mBio*, 2022, 13(1): e0286021
- [52] Tuve S, Wang HJ, Jacobs JD, et al. Role of cellular heparan sulfate proteoglycans in infection of human adenovirus serotype 3 and 35. *PLoS Pathog*, 2008, 4(10): e1000189
- [53] Gupta S, Manubhai KP, Kulkarni V, et al. An overview of innovations and industrial solutions in protein microarray technology. *Proteomics*, 2016, 16(8): 1297-1308
- [54] Martinez-Martin N, Marcandalli J, Huang CS, et al. An unbiased screen for human cytomegalovirus identifies neuropilin-2 as a central viral receptor. *Cell*, 2018, 174(5): 1158-1171
- [55] Ramachandran N, Raphael JV, Hainsworth E, et al. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nat Methods*, 2008, 5(6): 535-538
- [56] Glick Y, Ben-Ari Y, Drayman N, et al. Pathogen receptor discovery with a microfluidic human membrane protein array. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(16): 4344-4349
- [57] Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 2020, 583(7816): 459-468
- [58] Lum KK, Cristea IM. Proteomic approaches to uncovering virus-host protein interactions during the progression of viral infection. *Expert Rev Proteomics*, 2016, 13(3): 325-340
- [59] Reitsma JM, Savaryn JP, Faust K, et al. Antiviral inhibition targeting the HCMV kinase pUL97 requires pUL27-dependent degradation of Tip60 acetyltransferase and cell-cycle arrest. *Cell Host Microbe*, 2011, 9(2): 103-114
- [60] Mukherjee S, Sengupta N, Chaudhuri A, et al. PLVAP and GKN3 are two critical host cell receptors which facilitate japanese encephalitis virus entry into neurons. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11784
- [61] Pankow S, Bamberger C, Calzolari D, et al. Deep

- interactome profiling of membrane proteins by co-interacting protein identification technology. *Nat Protoc*, 2016, 11(12): 2515-2528
- [62] Yu C, Huang L. Cross-linking mass spectrometry: an emerging technology for interactomics and structural biology. *Anal Chem*, 2018, 90(1): 144-165
- [63] Sinz A. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom Rev*, 2006, 25(4): 663-682
- [64] Tremblay TL, Hill JJ. Biotin-transfer from a trifunctional crosslinker for identification of cell surface receptors of soluble protein ligands. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 46574
- [65] Frei AP, Jeon OY, Kilcher S, et al. Direct identification of ligand-receptor interactions on living cells and tissues. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(10): 997-1001
- [66] Sobotzki N, Schafroth MA, Rudnicka A, et al. HATRIC-based identification of receptors for orphan ligands. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1519
- [67] Srivastava M, Zhang Y, Chen J, et al. Chemical proteomics tracks virus entry and uncovers NCAM1 as Zika virus receptor. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3896
- [68] Tan D, Li Q, Zhang MJ, et al. Trifunctional cross-linker for mapping protein-protein interaction networks and comparing protein conformational states. *Elife*, 2016, 5: e12509
- [69] Ylmaz , Shiferaw GA, Rayo J, et al. Cross-linked peptide identification: a computational forest of algorithms. *Mass Spec Rev*, 2018, 37(6): 738-749
- [70] Jonsson N, Gullberg M, Israelsson S, et al. A rapid and efficient method for studies of virus interaction at the host cell surface using enteroviruses and real-time PCR. *Virology*, 2009, 6(1): 217
- [71] Kwon YJ, Heo J, Wong HEE, et al. Kinome siRNA screen identifies novel cell-type specific dengue host target genes. *Antiviral Res*, 2014, 110: 20-30
- [72] Carette JE, Raaben M, Wong AC, et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature*, 2011, 477(7364): 340-343
- [73] Helbig KJ, Eyre NS, Yip E, et al. The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1506-1517
- [74] Richards AL, Eckhardt M, Krogan NJ. Mass spectrometry-based protein-protein interaction networks for the study of human diseases. *Mol Syst Biol*, 2021, 17(1): e8792
- [75] Liu Q, Zheng J, Sun W, et al. A proximity-tagging system to identify membrane protein-protein interactions. *Nat Methods*, 2018, 15(9): 715-722