

双分子荧光互补技术在动物病毒中的研究进展

周水娟, 郭忠建*

江苏大学生命科学学院, 江苏 镇江 212000

摘要: 病毒侵染宿主的过程存在着一系列相互作用, 了解病毒与宿主之间的蛋白质相互作用对于深入研究病毒具有重要意义。在众多研究蛋白质相互作用的方法中, 双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)因其能在活细胞中可视化相互作用而被广泛应用。介绍了双分子荧光技术的原理、发展和优势, 总结了双分子荧光技术在动物病毒以及抗病毒药物研究中的应用, 并进一步阐述了新型双分子荧光系统的原理, 以期为进一步研究动物病毒致病机制和抗病毒药物研发提供新的思路。

关键词: 双分子荧光互补技术; 蛋白质相互作用; 动物病毒; 抗病毒药物

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2022.0048

中图分类号: Q939.47 文献标志码: A

Progress of Bimolecular Fluorescence Complementation Technology in Animal Viruses Research

ZHOU Shuijuan, GUO Zhongjian*

School of Life Science, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212000, China

Abstract: There are a series of protein-protein interactions in the process of virus infection. Therefore, understanding the interactions between the viruses and the hosts are of great significance for the in-depth studies of virology. Currently, there are many techniques used in protein interactions research, among which the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) is widely used due to its ability to visualize interactions in living cells. This paper introduced the principle, development and advantages of BiFC technology. The application of BiFC technology in animal viruses and antiviral drugs were also summarized, and the principle of some new bimolecular fluorescence systems were further elaborated, so as to provide new ideas for the studies of virus pathogenic mechanism and the development of antiviral drugs.

Key words: BiFC; protein-protein interaction; animal viruses; antiviral drugs

随着生命科学研究的不断深入, 基因组信息已经无法满足人类对现有生命现象背后本质的探索, 蛋白质作为生命活动的执行者, 它们之间复杂的相互作用在细胞生命活动过程中起着重要的作用。在病毒感染宿主的过程中, 其基因组编码的蛋白质发挥重要作用, 因此, 研究病毒蛋白之间或者病毒与宿主蛋白之间的相互作用对于揭示病毒感染宿主的分子机制十分重要。目前研究蛋白质间相互作用的方法有许多, 如酵母双杂交技术

(yeast two-hybrid system)、免疫共沉淀技术(co-immunoprecipitation, Co-IP)、pull-down技术、蛋白质片段互补分析(protein complementation assay, PCA)、荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)试验、生物发光共振能量转移(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)试验等。双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)是近二十年来兴起的检测蛋白质相互作用的技术, 已被广

收稿日期: 2022-04-02; 接受日期: 2022-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31770174; 31370184)。

联系方式: 周水娟 E-mail: 2807948441@qq.com; *通信作者 郭忠建 E-mail: gzh762677@ujs.edu.cn

泛应用于可视化蛋白质互作的研究中。本文概述了BiFC技术的原理、发展、优势以及在动物病毒和抗病毒药物研究中的应用,以期在未来动物病毒致病机制的探索和抗病毒药物的研发提供参考。

1 BiFC技术

1.1 BiFC的原理

荧光蛋白两个 β 片层间的环状结构上有多个特异性位点可插入外源蛋白却不影响其荧光活性,BiFC可利用这一特性,在合适的位点切割荧光蛋白,形成没有荧光的N-端和C-端,分别与待研究的目标蛋白融合表达。若目标蛋白间发生相互作用,两个不完整的荧光片段则相互靠近形成完整的有活性的荧光基团,从而在激发光的激发下发出荧光(图1);反之,则无荧光。荧光信号同时也能够显示目标蛋白在活细胞中相互作用的定位。

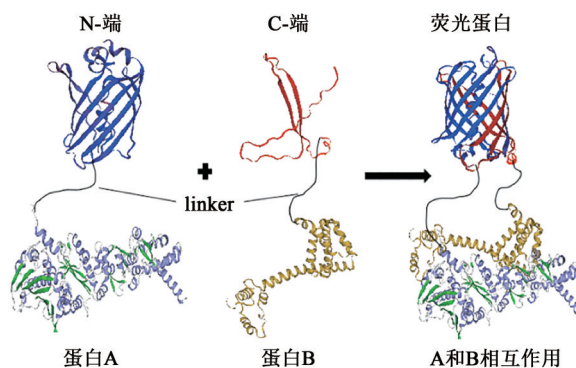
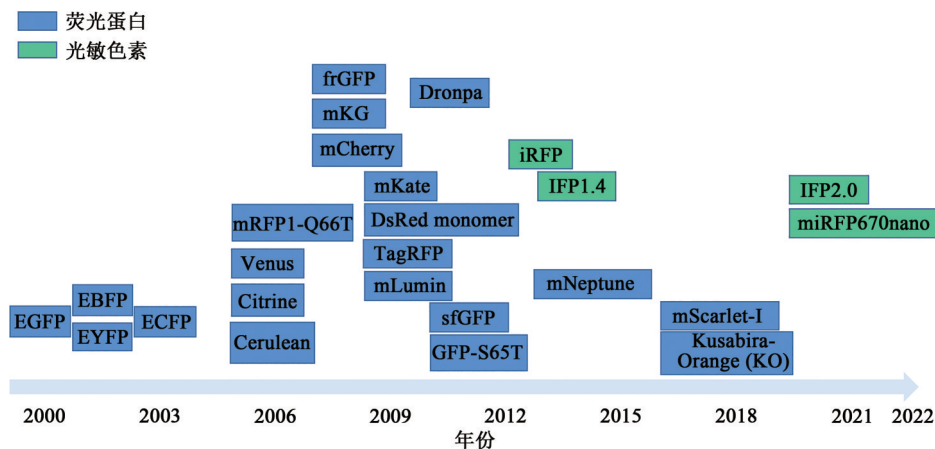


图1 BiFC技术的原理图

Fig. 1 Principle of BiFC technology

1.2 BiFC技术中荧光蛋白的发展

荧光蛋白利用分裂后能够融合且不改变荧光特性的优势在BiFC技术中被广泛应用,后续又开发出以光敏色素作为荧光标记的BiFC技术。根据BiFC系统的发展历程,结合Kodama等^[1]的综述总结用于BiFC的荧光蛋白和光敏色素绘制的发展进程见图2。



注:EGFP—增强型绿色荧光蛋白;EBFP—增强型蓝色荧光蛋白;EYFP—增强型黄色荧光蛋白;ECFP—增强型青色荧光蛋白;mRFP1-Q66T—单体红色荧光蛋白变体(Q66T);Venus—黄色荧光蛋白变体(F46L/F64L/M153T/V163A/S175G);Citrine—黄色荧光蛋白变体(Q69M);Cerulean—青色荧光蛋白变体(S72A/Y145A/H148D);frGFP—折叠报告器GFP;mKG—单体珊瑚荧光报告蛋白;mCherry—樱桃色荧光蛋白;mKate—远红荧光蛋白报告基因;DsRed monomer—红色荧光蛋白单体;TagRFP—橘红色荧光蛋白;mLumin—mKate-S158A变体;Dronpa—单体GFP样荧光蛋白;sfGFP—一种设计精良的折叠版本GFP突变体(S30R/Y39N/N105T/Y145F/I171V/A206V);GFP-S65T—绿色荧光蛋白突变体(S65T);iRFP—近红外荧光蛋白;IRF1.4—近红外荧光蛋白1.4;mNeptune—mKate变体(M41G/S61C/S158C/Y194F);mScarlet-I—单体红色荧光蛋白变体;Kusabira-Orange(KO)—橙色荧光蛋白;IFP2.0—近红外荧光蛋白2.0;miRFP670nano—最小的近红外荧光蛋白。

图2 BiFC技术中荧光蛋白和光敏色素发展

Fig. 2 The development of fluorescent proteins and photochromes in BiFC

2000年,Ghosh等^[2]在体外将两个反平行的亮氨酸拉链融合到GFP的两个非荧光片段上,初步证明了GFP具有荧光互补性。随后多种荧光蛋

白被应用于BiFC技术中,如GFP衍生出的增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)、增强型黄绿色荧光蛋白(enhanced yellow-

green fluorescent protein, EYFP)、增强型蓝色荧光蛋白(enhanced blue fluorescent protein, EBFP)和增强型青色荧光蛋白(enhanced cyan fluorescent protein, ECFP)^[2-4]。随着GFP的发展,人们认识到GFP及其衍生变体对环境的敏感性阻碍了生理条件下BiFC的应用,因此,研究人员对荧光蛋白进行了一系列突变,生成可在生理培养条件下产生明亮信号的荧光蛋白Venus、Citrine、Cerulean^[5]。随后,绿色荧光亮度增强的GFP变体frGFP^[6]、GFP-S65T^[7]被应用于BiFC。Zhou等^[8]拆分sfGFP 214和sfGFP 215之间的氨基酸残基并对其进行基因突变,有效减少了荧光蛋白的假阳性现象。2008年,与GFP具有相似光谱特征的珊瑚荧光报告蛋白mKG(单体Kusabira-Green)被开发用于BiFC^[9]。2010年,能够快速响应光的新颖GFP样蛋白Dronpa被应用于BiFC,克服了GFP变体的光漂白和量子产率低的问题^[10]。

除了绿色、青色和黄色荧光蛋白及其变体应用于BiFC外,红色荧光蛋白因其波长范围优势逐渐成为关注的对象。2006年,由单分子DsRED变体mRFP1突变形成的mRFP1-Q66T被应用于BiFC^[11],随后,基于mCherry的BiFC系统被开发^[12],但这两种红色荧光蛋白只能在相对较低的温度下工作,限制了BiFC在活体哺乳动物细胞中的应用。为此,2009年Chu等^[13]首次将mKate应用于更高温度下基于红色荧光蛋白的BiFC系统。同年,为改善红色荧光蛋白的温度敏感性及荧光强度,mKate-S158A变体mLumin^[13]和TagRFP^[14]被应用于BiFC中。2014年,由mKate进一步突变生成的首个激发峰值达到600 nm的明亮荧光蛋白Neptune^[15]被应用于BiFC。2018年,新开发的红色荧光蛋白mScarlet-I^[16]、Kusabira-Orange(KO)^[17]在BiFC上得以应用,进一步优化了荧光蛋白的特性。

与类GFP蛋白不同,光敏色素是细菌或植物中一种可吸收红光和近红外光的光受体^[18]。2013年,基于细菌光敏色素的近红外荧光蛋白iRFP(infra-red fluorescent protein)首次应用于BiFC系统^[19-20]。随后,iRFP1.4也被应用于BiFC^[21],但它和iRFP的荧光强度均不高。2021年,开发了一种改进的单体近红外细菌光敏色素iRFP2.0,增加了BiFC的信号强度^[22]。同年,Chen等^[23]开发了一种基于蓝细菌色素的最小近红外荧光互补系统—miRFP670nano,拓展了BiFC检测的波长范围,为

其广泛应用奠定了基础。

1.3 BiFC技术的优势

BiFC技术具有多个优点,使其在众多研究蛋白质相互作用的方法中脱颖而出。第一,简易性和直观性。报告基因的固有荧光使蛋白质互作直接可视化而不依赖于二次检测,因此只需配备荧光显微镜便可对相互作用的蛋白进行成像分析,且能够直观反映互作在细胞中的定位。同时,荧光强度也可反映BiFC中两个互作蛋白间的相互作用强度^[24-25]。第二,BiFC技术可使蛋白间的相互作用在活细胞中可视化,省去了裂解或者固定细胞等繁琐实验步骤且可以消除其带来的潜在影响。第三,复合物的形成比较稳定,可用于研究蛋白质间微弱或瞬时的相互作用^[24-25]。第四,蛋白质在正常的细胞环境中表达,无需添加具有细胞毒性或扰乱细胞稳态的外源性底物^[26],其效果可与内源性蛋白相媲美,几乎可反映天然蛋白质的性质,包括翻译后修饰的影响。第五,多种蛋白质间相互作用可以使用光谱不同的荧光复合物并行可视化,即多色BiFC分析^[27]。BiFC技术的优势使其成为检测蛋白质相互作用的强大工具。

2 BiFC在动物病毒研究中的应用

BiFC几乎适用于除专性厌氧生物外的各种细胞类型,加之简单、快捷、灵敏且对细胞无侵害的特点,为BiFC的广泛应用提供了基础。动物病毒是一种寄生在人体或动物体内,能引起人和动物疾病的强感染因子,在病毒入侵、增殖和传播过程中,其依靠宿主编码的蛋白质发挥各项功能。利用BiFC技术研究动物病毒侵染宿主过程中蛋白质之间的相互作用关系,对于探索动物病毒与宿主间的相互作用,理解动物病毒的生命周期,进一步阐述其致病机制乃至设计与研发相关药物和抑制剂都至关重要。

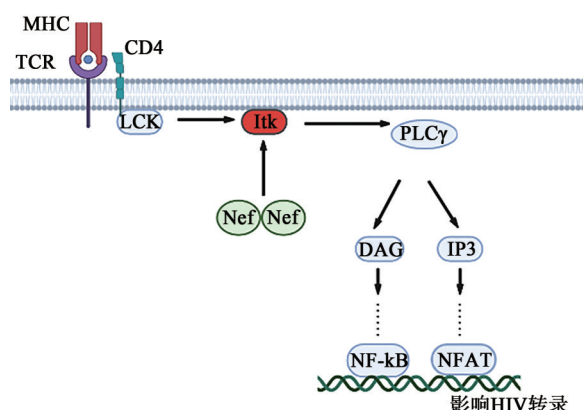
2.1 人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)

HIV是一种攻击T淋巴细胞的逆转录病毒,根据血清学反应和病毒核酸序列测定可分为人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)和2型(HIV-2)两种,其中HIV-1流行范围更广,研究也更加深入。HIV-I整合酶(HIV integrase, IN)是病毒将DNA整合到宿主基因中必不可少的病毒蛋白,这一过程

通常需要将IN转运至细胞核。2009年,Levin等^[28]利用BiFC技术证实IN和importin α 存在相互作用,表明IN的核输入通过importin α 途径发生。随着对IN入核机制的深入研究,Chen等^[29]利用以光敏色素iRFP为荧光标记的BiFC系统,可视化IN和人类晶状体上皮衍生生长因子p75(LEDGF/p75)的相互作用,LEDGF/p75能够辅助IN入核并且将其靶向宿主染色质^[30-31]。随后Nakamura等^[32]利用引入5个突变的Venus-BiFC系统进一步阐明,多聚化的IN仍能与LEDGF/p75相互作用,进而帮助HIV病毒将DNA整合到宿主染色体DNA中^[33]。

作为HIV-1的辅助因子,负调控因子(negative factor, Nef)与HIV的发病机制密切相关。先前的生化及结构研究发现,多数Nef功能的发挥需要其发生二聚化或者寡聚化^[34-35]。直到2009年Poe等^[36]的研究证实了这一发现,他们利用BiFC验证HIV感染宿主后,细胞内Nef呈现二聚体形式。后续有研究利用BiFC证明Nef形成二聚体后可与IL-2诱导T细胞激酶(interleukin-2-inducible T-cell kinase, Itk)和布鲁顿酪氨酸激酶(bruton tyrosine kinase, Btk)两种Tec家族激酶相互作用,将Itk和Btk募集到细胞膜,越过正常免疫受体对Tec家族激酶活性的控制,自磷酸化直接激活组成型激酶^[37],导致病毒转录增强(图3)。2020年,Staudt等^[38]利用BiFC检测到二聚化后Nef的一个单体可能与丝氨酸结合子5(SERINC5)接触,另一个与衔接蛋白-2(adaptin-2, AP-2)接合,形成Nef-SERINC5-AP-2复合物,在网格蛋白介导的内吞作用下下调SERINC5,这与BiFC检测出的CD4下调机制类似^[39]。SERINC5和CD4均可阻止病毒进入宿主细胞,其下调增强了HIV-1的传染性且有助于HIV逃避宿主免疫系统的捕捉。

除了可视化Nef自身发生的二聚化外,BiFC还用于研究Nef与多种宿主蛋白间的相互作用,如Nef和磷酸弗林蛋白酶酸性氨基酸簇选蛋白(phosphofurin acidic cluster sorting protein, PACS)的相互作用破坏了宿主细胞内信号传导和膜运输,引起细胞表面主要组织相容性复合物I类(MHC-I)下调,从而导致病毒逃离免疫监视^[40]。Nef和宿主细胞膜运输调节蛋白SNX18的互作参与调节宿主细胞内囊泡运输,也可使病毒逃避宿主的免疫监测^[41]。最新研究发现,Nef与T细胞免



注:MHC—组织相容性复合物;TCR—T细胞抗原受体;CD4—表面抗原分化簇4受体;LCK—蛋白酪氨酸激酶;PLC γ —磷脂酶C γ 链;DAG—二酰基甘油;IP3—三磷酸肌醇;NF- κ B—核转录因子;NFAT—活化T细胞核因子。

图3 Nef二聚体与Itk相互作用激活模型^[37]

Fig. 3 Models of Nef-dimer mediated Itk activation^[37]

疫球蛋白粘蛋白3(T cell immunoglobulin and mucin-containing molecule 3, Tim-3)形成复合物,促进Tim-3从细胞表面脱落^[42],导致受感染T细胞表面检查点受体水平上调,加速T细胞的衰竭。

此外,BiFC还检测到HIV感染时其他重要蛋白间的相互作用,如Env糖蛋白间相互作用及其与SERINC5的相互作用^[43],HIV-1辅助蛋白Vpu与Tim-3的相互作用^[44],HIV-1主要结构蛋白Gag之间以及Gag和协调RNA干扰的宿主蛋白AGO2之间的相互作用^[45]。这些相互作用的发现和验证,不仅为研究HIV感染宿主细胞的过程和分子机制提供了新见解,也为靶向抗病毒抑制剂的研发奠定了理论基础。

2.2 疱疹病毒

疱疹病毒主要分为 α 、 β 和 γ 三大类。其中单纯疱疹病毒是疱疹病毒的典型代表,属于 α 疱疹病毒,分为1和2两种血清型。单纯疱疹病毒进入细胞需要gB、gD、gH和gL 4种糖蛋白参与。Atanasiu等^[46]利用BiFC对gD和gB以及gD和gH/gL之间的相互作用进行验证,首次检测出gD与其受体的结合可触发gB和gH/gL之间的相互作用,这一结论也被Avitabile等^[47]证实。在单纯疱疹病毒1型(HSV-1)中,Hernandez等^[48-49]发现感染细胞蛋白(infected-cell protein 27, ICP27)能够以头对尾的形式发生分子内相互作用,将ICP27锁定在封闭结构中。基于BiFC的FRET表明在其C端和N

端完好无损的前提下,ICP27能与细胞 mRNA 输出受体蛋白 TAP/NXF1 发生相互作用^[50],有利于对病毒感染机制的理解。Guo 等^[51]利用 BiFC 证实 HSV-1 刺激相关基因 1 蛋白(HSV-1 stimulation related gene 1, HSRG1)与 SV40 转化蛋白大 T 抗原(LT)有相互作用,进而改变 LT 对 SV40 启动子的调节,并影响细胞周期,这一相互作用的发现表明宿主可能存在一种未知的先天抗病毒机制。

人类疱疹病毒 4 型又称 EB 病毒(epstein-Barr virus, EBV),是一种能感染人的疱疹病毒,可潜伏感染 B 淋巴细胞并使其永生。潜伏膜蛋白 1(latent membrane protein 1, LMP1)是 B 细胞转化所必需的,可诱导多种信号通路改变细胞环境,常在与 EB 病毒相关的癌症中检测到,因此被称为 EB 病毒的癌基因^[52]。Talaty 等^[53]利用 BiFC 技术证明 LMP1 能够自组装,且与肿瘤坏死因子受体相关因子 TRAF2、TRAF3 互作产生的荧光定位于细胞的核周和膜区域。Alaty 等^[54]通过 BiFC 技术筛选鉴定了一种新的 LMP1 结合蛋白——跨膜蛋白 134(transmembrane protein 134, Tmem134),其与 LMP1 相互作用会影响 LMP1 诱导的 NF- κ B 活性。2015 年, Holthusen 等^[55]利用 BiFC 鉴定了多种肌动蛋白细胞骨架相关蛋白与 LMP1 互作且定位于脂筏结构域。这些相互作用的发现为寻找有效治疗 EB 病毒相关恶性肿瘤的靶点奠定了基础。

此外, BiFC 技术还被用于测定伪狂犬病毒^[56]和鸭肠炎病毒^[57-58]等疱疹病毒感染时相关蛋白间的相互作用。BiFC 技术在疱疹病毒研究中的应用不仅有助于探究各种疱疹病毒蛋白的功能及其在病毒感染过程中发挥的作用,更有助于进一步了解疱疹病毒感染及其发病机制。

2.3 流感病毒

流感病毒可引起人和禽类、猪、马等多种动物感染和发病,通常分为甲、乙、丙三型,其 RNA 聚合酶复合物是病毒基因组转录和复制所必需的,由 PA、PB1 和 PB2 亚基组成。其中,核心亚基 PB1 通过与 PA 和 PB2 相互作用,将 PA 和 PB2 整合到聚合酶复合物中^[59],但并未发现 PA 和 PB2 亚基之间的相互作用。Hemerka 等^[60]利用 BiFC 技术除验证 PA-PB1 和 PB1-PB2 之间的相互作用外,首次检测出 PA 的 N 端和 PB2 存在相互作用,且定位于细胞质。Suzuki 等^[61]结合 BiFC 与光栅图像相关光谱(raster image correlation spectroscopy, RICS),

发现 PA 与 PB1 结合后 PA 其 C 端诱导细胞质中三聚体聚合酶复合物的异常形成;相反, PA 的 N 端可抑制这一异常形成,将三聚体聚合酶复合物转运至细胞核中,调控三聚体聚合酶复合体的正确形成。此外, PA、PB1、PB2 还可分别和视黄酸诱导基因 I 蛋白(retinoic acid-inducible gene- I, RIG I)相互作用,其中 PB1-RIG I 和 PA-RIG I 相互作用产生的 BiFC 信号主要分布在细胞质,而 PB2-RIG I 相互作用产生的信号主要在细胞核中^[62],这表明 RIG I 具有抑制病毒 RNA 聚合酶的活性。

总之,在流感病毒蛋白互作的研究中, BiFC 技术主要集中于可视化流感病毒 RNA 聚合酶复合物亚基间的相互作用和入核过程,验证聚合酶复合体的正确形成与病毒基因的转录和复制相关,进而阐述相关的抗病毒机制。

2.4 其他病毒

除了上述三种常见的病毒外, BiFC 还被应用于其他病毒的相关研究中。如人类中丙型肝炎病毒的非结构蛋白 NS4B 与干扰素刺激蛋白 STING^[63]特异性结合的可视化;人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的包膜蛋白(E2)和细胞溴结构域蛋白 4(Brd4)的相互作用验证^[64];视黄酸诱导基因 I 蛋白(RIG- I)与三基序蛋白 25(TRIM25)、线粒体抗病毒信号蛋白 MAVS 之间形成的不同复合物及其空间定位的可视化^[65]。其他动物中,鸡贫血病毒非结构蛋白 VP2 和凋亡相关蛋白 Apoptin 之间的相互作用,使 Apoptin Thr108 去磷酸化,从而减弱由 Apoptin 触发的细胞凋亡,促进病毒繁殖^[66];猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)的跨膜非结构蛋白相互作用网络可视化,可为未来研究转录复合物的形成和功能提供有价值的线索^[67];猪 Mx1 蛋白与猪瘟病毒非结构蛋白 NS5B 的相互作用抑制了猪瘟病毒的复制^[68];可视化家蚕的细胞分裂周期蛋白 37(BmCdc37)与家蚕热休克蛋白(BmHsp90)的相互作用^[69],以及家蚕细胞的紧密连接蛋白(Claudin-2)与家蚕质多角体病毒结构蛋白 VP7 的相互作用^[70],提供了与病毒感染相关机制的新见解。对于新型冠状病毒(简称新冠病毒, SARS-CoV-2), Chen 等^[71]利用 BiFC 可视化了 22 种 SARS-CoV-2 结构蛋白和辅助蛋白的相互作用,揭示了核衣壳

蛋白在病毒样颗粒组装中的关键作用,同时,SARS-CoV-2的核衣壳蛋白还与活细胞中细胞应激颗粒蛋白 CSNK2B、G3BP1 和 G3BP2 相互作用,下调颗粒蛋白 G3BP1 的表达水平^[24],揭示 SARS-CoV-2 可能通过核衣壳蛋白和应激颗粒蛋白之间的相互作用来逃脱宿主的清除。

总而言之,BiFC 技术可对这些相互作用及其作用区域进行可视化,有助于理解病毒感染机制,进而深入研究抗病毒机制。

2.5 BiFC在抗病毒研究方面的应用

蛋白质-蛋白质相互作用在病毒感染宿主的过程中起关键作用,因此通过破坏或阻碍蛋白质-蛋白质相互作用来抑制病毒感染已成为一种前景广阔的抗病毒药物开发策略,而 BiFC 技术的可视化为活细胞抗病毒药物的评估提供了一种新思路。

HIV 感染引起的宿主获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)是一种危害性较大的传染性疾病,治疗难度极大。Emert-Sedlak 等^[72]通过 BiFC 发现一种独特的二苯基吡唑化合物,可直接与 Nef 结合从而阻断 Nef 二聚化,有效地抑制了 HIV-1 活性。HIV-1 整合酶 IN 与细胞辅助因子蛋白 LEDGF/p75 相互作用是一个重要的抗病毒靶点^[73]。Chen 等^[29]通过分裂光敏色素 iRFP 构建 BiFC 系统,发现化合物 6(compound 6)和卡比多巴(Carbidopa)可抑制 IN-LEDGF/p75 间的相互作用且成剂量依赖型,能够有效地阻碍病毒 DNA 整合到宿主基因上。Zhang 等^[43]利用 BiFC 发现 SERINC5 与 HIV-1 Env 蛋白的相互作用选择性地解离 Env 三聚体以限制 HIV-1 复制,为 SERINC5 的抗病毒活性提供了依据。

对流感病毒的研究发现,可通过抑制自噬进而抑制甲型流感病毒的复制^[74]。LC3-II 是自噬体形成所必需的,而 Atg5-Atg12/Atg16 异三聚体能促进 LC3-I 转化形成 LC3-II, Dai 等^[75]利用 BiFC-FRET 技术发现吴茱萸碱可抑制 Atg5-Atg12/Atg16 异三聚体的形成,从而对流感病毒的复制起抑制作用。Beclin 1 作为自噬的调节因子,已被证明是多种病毒操纵的重要靶点^[76]。B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白是一种与 Beclin 1 相互作用的自噬抑制剂,而 Beclin1 作用的发挥必须从 Beclin1/Bcl2 异源二聚体中解离。Dai 等^[77]基于 BiFC 技术鉴定出能够抑制 Beclin1-Bcl2

解离的药物丁香酚,同时,证实原花青素既可以抑制 Atg5-Atg12/Atg16 异源三聚体的形成又能抑制 Beclin1/Bcl2 异源二聚体的解离^[78],为开发新型抗甲型流感病毒药物提供了思路。

近几年 BiFC 技术在抗病毒研究方面有了新的进展。Yu 等^[79]通过 BiFC 揭示了膜相关 RING-CH 型 8(membrane-associated RING-CH 8, MARCH8)具有广泛的抗病毒活性:通过与不同病毒融合蛋白相互作用将其滞留在高尔基体中,进而抑制其从高尔基体向质膜运输以及与病毒粒子的结合。Wei 等^[80]利用 BiFC 鉴定了一种源自噬菌体展示肽库的肽——P1,它能够与日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)的囊膜蛋白相互作用并阻止病毒入侵细胞,具有抗 JEV 感染的潜力。Huang 等^[81]发现化合物 B7 可以阻断 PRRSV 糖蛋白与巨噬细胞特异性表面受体 CD163 的相互作用,从而预防 PRRSV 感染。化合物 II-2-9 也被 BiFC 技术证实能够干扰乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)衣壳蛋白的相互作用,从而抑制 HBV 衣壳的组装,有助于开发新型抗 HBV 药物^[82]。

BiFC 在致病性病毒蛋白互作研究中的应用总结于表 1。一直以来,由病毒引起的各种疾病威胁着全球人类的健康与生活,尽管疫苗的使用有效地预防和控制了疾病的发生和流行,但任何疫苗都需要时间才能发挥作用且无法完全预防病毒,机体依旧面临被感染的风险,因此抗病毒药物的研发尤为重要。BiFC 技术将抗病毒药物的效果在活细胞中以可视化的途径展现,有利于抗病毒药物的筛选与评估,为开发新型药物提供便利。

3 新型 BiFC 系统的开发与应用

3.1 BAC-BiFC 系统

BiFC 技术虽被广泛使用,但大量证据表明在目标蛋白不发生相互作用的情况下,两个非荧光片段也可能由于随机碰撞而自组装成完整的荧光蛋白,产生假阳性信号,进而限制了 BiFC 技术对目标蛋白相互作用的定量研究。为了克服这一问题, Mao 等^[45]开发了一种能够检测并消除假阳性信号的方法,并将其命名为 BAC-BiFC(background assessable and correctable-bimolecular fluorescence complementation)。其原理是在 BiFC 中

表1 BiFC在致病性病毒蛋白互作研究中的应用

Table 1 Application of BiFC in the study of proteins interaction of pathogenic viruses

病毒种类	相互作用的蛋白	荧光标签 (荧光蛋白和光敏色素)	相互作用定位	参考文献
人类免疫 缺陷病毒	IN 与 importin α	GFP	细胞核	[28]
	IN 与 LEDGF/p75	iRFP	染色体	[29]
	IN 多聚体	Venus	细胞质	[32]
	Nef 二聚体	YFP	细胞膜和高尔基体网络	[36]
	Nef 与 Itk、Btk	Venus	细胞膜	[37]
	Nef 与 AP-2、SERINC5	Venus	细胞膜	[39]
	Nef 与 PACS	YFP	细胞质	[40]
	Nef 与 SNX18	Venus	细胞质	[41]
	Nef 与 Tim-3	Venus	细胞质	[42]
	Env 与 Env、SERINC5	Venus	细胞膜和细胞质	[43]
疱疹病毒	Vpu 与 Tim-3	Venus	未知	[44]
	Gag 与 Gag、AGO2	Venus	未知	[45]
	gD 与 gB、gH/gL	Venus	细胞质和细胞核	[46]
	gB 与 gH/gL	Venus	细胞质和细胞核	[46-47]
	ICP27 寡聚体	Venus	细胞核	[48-49]
	ICP27 与 TAP/NXF1	Venus	细胞核	[50]
	HSRG1 与 LT	YFP	细胞核	[51]
	LMP1 与 LMP1、TRAF2、TRAF3	YFP	细胞膜及核周	[53]
	LMP1 与 Tmem134	YFP	细胞质	[54]
	LMP1 与 肌动蛋白细胞骨架相关蛋白	YFP	脂筏	[55]
流感病毒	pUL21 与 Roadblock-1	Lumin	细胞质	[56]
	pUL14 与 VP16	Venus	细胞核	[57]
	PA 与 PB1	Venus	细胞核	[60-61]
	PB1 与 PB2	Venus	细胞核	[60-61]
	PA 与 PB2	Venus	细胞核	[60-61]
	RIG I 与 PB2	Venus	细胞核	[62]
其他病毒	RIG I 与 PA、PB1	Venus	细胞质	[62]
	NS4B 与 STING	mKG	细胞质	[63]
	E2 与 Brd4	Venus	细胞核	[64]
	VP2 与 Apoptin	YFP	细胞核	[66]
	RIG-I 与 TRIM25、MAVS	Venus	细胞质	[65]
	PRRSV 跨膜非结构蛋白互作网络	Venus	未知	[67]
	poMx1 与 NS5B	Venus	细胞质	[68]
	BmCdc37 与 BmHsp90	Venus	细胞质	[69]
	Claudin-2 与 VP7	dsRed	未知	[70]
	SARS-CoV-2 结构蛋白和辅助蛋白	Venus	未知	[71]
	SARS-CoV-2 核衣壳蛋白与细胞应激 颗粒蛋白	miRFP670nano	细胞质	[24]

注:pUL21—伪狂犬病毒被膜蛋白;Roadblock-1—宿主胞质动力蛋白轻链;pUL14—鸭肠炎病毒被膜蛋白;VP16—鸭肠炎病毒衣壳蛋白。

一个目标蛋白连接一个参考荧光蛋白,参考荧光蛋白可用来表征目标蛋白在细胞内的表达水平与空间分布,还可通过比率判断不同蛋白表达水平下假阳性信号的强弱,从而获得不受假阳性信号干扰的实验条件(图4)。该系统目前不仅在HIV-1结构蛋白Gag之间的相互作用中应用,还可将BAC-BiFC与其他成像方法(例如荧光共振能量转移)相结合,以研究多种蛋白质之间的相互作用;或与RNA标记系统相结合,研究蛋白质与RNA的相互作用。BAC-BiFC的灵活性,使其成为一种通用且可靠的方法,用于研究各种细胞和病理环境中的生物分子相互作用。

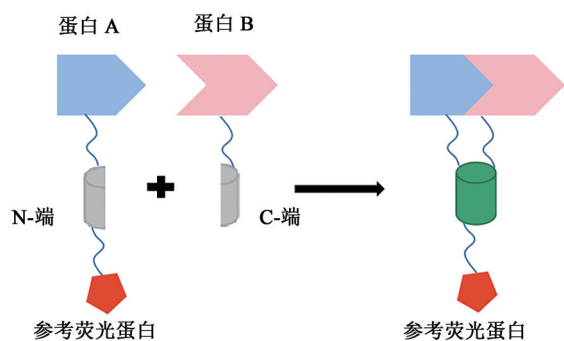


图4 BAC-BiFC用于PPI成像的工作原理^[45]

Fig. 4 Working principle of BAC-BiFC for PPI imaging^[45]

3.2 tBiFC系统

Chen等^[22]以近红外光敏色素蛋白IFP 2.0为材料,通过串联构建的方式,发展了荧光互补效率显著提高的近红外串联荧光互补系统(tandem near-infrared fluorescence complementation system, tBiFC),将目标蛋白串联两个IFP 2.0分裂片段,以达到增强荧光信号的目的(图5)。该系统目前并未在病毒中应用,但其增强荧光信号强度的特点为病毒感染过程中相关蛋白质互作研究提供了一种强有力的工具。此外,串联构建方法也可引入其他标签蛋白,以解决互补荧光强度弱的问题。

3.3 TagBiFC技术

许多研究表明荧光蛋白具有亮度低、光稳定性差、易漂白和多聚化等缺点,近期发展起来的自连接标签蛋白(self-labeling tags)可结合染料,同时能以融合蛋白的形式在活细胞内表达,成为取代荧光蛋白的材料。Shao等^[83]开发了基于自连接标签HaloTag的TagBiFC技术,其可在细胞内单

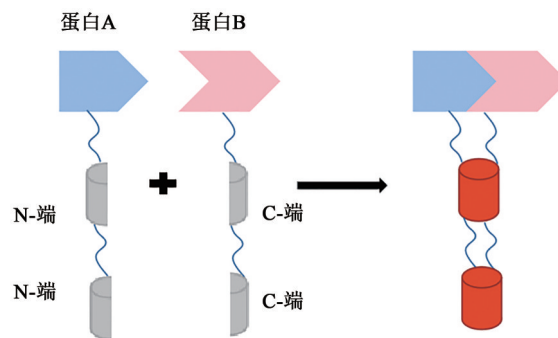


图5 tBiFC用于PPI成像的工作原理^[22]

Fig. 5 Working principle of tBiFC for PPI imaging^[22]

分子层次追踪发生互作的两个转录因子及转录因子与染色质结合的动态过程。TagBiFC能够克服使用荧光蛋白的BiFC缺点,扩展BiFC现有的工具包,并且在单分子和超高分辨水平追踪蛋白相互作用,为有关相互作用提供更多细节信息。

与传统的BiFC相比,新型BiFC系统完善了许多BiFC的不足,展现出优越的相互作用可视化性能,但在动物病毒相关研究中暂未普及。因此,BiFC技术不断的改良与发展,新型BiFC系统的开发与应用,将为日后病毒感染过程中蛋白质相互作用的研究以及抗病毒药物的研发提供新的方法。

4 展望

BiFC已成为可视化活细胞中相互作用的标准实验方法,从蛋白质-蛋白质相互作用到蛋白质的构象^[84-85]、蛋白质和RNA之间的相互作用^[23,86-88]的应用,从多色荧光互补技术^[27]到与其他技术如荧光共振能量转移^[89]、流式细胞术^[90]的联用,都体现了BiFC广泛的应用前景。本文阐述了BiFC的原理、发展、优势以及在典型的动物病毒和抗病毒药物评估中的应用,并对近年来提出的新型BiFC系统原理进行阐述。在病毒感染宿主的过程中,不仅病毒会侵染宿主,宿主也会对病毒做出抵御反应,因此利用BiFC了解病毒以及病毒与宿主之间的相互作用,对于病毒致病机制、宿主的抗病毒机制以及抗病毒药物的研究至关重要。尤其是在新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)全球大流行的当下,通过成熟而便捷的BiFC技术,有望对新冠病毒等严重致病性病毒中

的蛋白质互作网络进行探究,进一步解析病毒感染机制,靶向抗病毒药物的筛选。

然而,在应用BiFC技术时仍然存在一些问题有待解决和改善。比如,分裂荧光片段能够随机碰撞和自我组装产生荧光造成假阳性,特别是在浓度较高的情况下;由于荧光蛋白在重组后并不能够重新分开,这种不可逆性限制了可逆的蛋白质互作研究;观察到的荧光信号滞后于蛋白质的相互作用,不能实时地反映相互作用过程;荧光蛋白的高灵敏性带来的高背景等。因此,除了使用对照和引入突变来规避假阳性和消除高背景外,有必要持续开发出新的荧光标签、新的与其他技术相关联的BiFC系统以及可逆的BiFC系统,继而为病毒和病毒造成的疾病研究提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] KODAMA Y, HU C D. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives[J]. *Biotechniques*, 2012, 53(5): 285-298.
- [2] GHOSH I, HAMILTON A D, REGAN L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122(23): 5658-5659.
- [3] HU C D, CHINENOV Y, KERPPOLA T K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation[J]. *Mol. Cell*, 2002, 9(4): 789-798.
- [4] HU C D, KERPPOLA T K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21(5): 539-545.
- [5] SHYU Y J, LIU H, DENG X, *et al.* Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions[J]. *Biotechniques*, 2006, 40(1): 61-66.
- [6] SARKAR M, MAGLIERY T J. Re-engineering a split-GFP reassembly screen to examine RING-domain interactions between BARD1 and BRCA1 mutants observed in cancer patients[J]. *Mol. Biosyst.*, 2008, 4(6): 599-605.
- [7] YUTAKA K. A bright green-colored bimolecular fluorescence complementation assay in living plant cells[J]. *Plant Biotechnol.*, 2011, 28(1): 95-98.
- [8] ZHOU J, LIN J, ZHOU C, *et al.* An improved bimolecular fluorescence complementation tool based on superfolder green fluorescent protein[J]. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2011, 43(3): 239-244.
- [9] UEYAMA T, KUSAKABE T, KARASAWA S, *et al.* Sequential binding of cytosolic Phox complex to phagosomes through regulated adaptor proteins: evaluation using the novel monomeric Kusabira-Green system and live imaging of phagocytosis[J]. *J. Immunol.*, 2008, 181(1): 629-640.
- [10] LEE Y R, PARK J H, HAHM S H, *et al.* Development of bimolecular fluorescence complementation using Dronpa for visualization of protein-protein interactions in cells[J]. *Mol. Imaging Biol.*, 2010, 12(5): 468-478.
- [11] JACH G, PESCH M, RICHTER K, *et al.* An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation[J]. *Nat. Methods*, 2006, 3(8): 597-600.
- [12] FAN J Y, CUI Z Q, WEI H P, *et al.* Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, 367(1): 47-53.
- [13] CHU J, ZHANG Z, ZHENG Y, *et al.* A novel far-red bimolecular fluorescence complementation system that allows for efficient visualization of protein interactions under physiological conditions[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 25(1): 234-239.
- [14] QIN L, CHU J, YING Z, *et al.* A new red bimolecular fluorescence complementation based on TagRFP[C]. // *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*, 2009, 7191.
- [15] HAN Y, WANG S, ZHANG Z, *et al.* In vivo imaging of protein-protein and RNA-protein interactions using novel far-red fluorescence complementation systems[J/OL]. *Nucl. Acids Res.*, 2014, 42(13): e103[2014-05-09]. <https://doi.org/10.1093/nar/gku408>.
- [16] WANG S, DING M, XUE B, *et al.* Spying on protein interactions in living cells with reconstituted scarlet light[J]. *Analyst*, 2018, 143(21): 5161-5169.
- [17] FUJII Y, YOSHIMURA A, KODAMA Y, *et al.* A novel orange-colored bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay using monomeric Kusabira-Orange protein[J]. *Biotechniques*, 2018, 64(4): 153-161.
- [18] FANKHAUSER C. The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors[J]. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(15): 11453-11456.
- [19] FILONOV G S, VERKHUSHA V V. A near-infrared BiFC reporter for in vivo imaging of protein-protein interactions[J]. *Chem. Biol.*, 2013, 20(8): 1078-1086.
- [20] CHEN M, LI W, ZHANG Z, *et al.* Novel near-infrared BiFC systems from a bacterial phytochrome for imaging protein interactions and drug evaluation under physiological conditions[J]. *Biomaterials*, 2015, 48: 97-107.
- [21] TCHEKANDA E, SIVANESAN D, MICHNICK S W. An infrared reporter to detect spatiotemporal dynamics of protein-protein interactions[J]. *Nat. Methods*, 2014, 11(6): 641-644.
- [22] CHEN M, YAN C, MA Y, *et al.* A tandem near-infrared fluorescence complementation system with enhanced fluorescence for imaging protein-protein interactions in vivo[J/OL]. *Biomaterials*, 2021, 268: 120544[2021-11-23]. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120544>.
- [23] CHEN M, YAN C, ZHENG L, *et al.* The smallest near-infrared fluorescence complementation system for imaging protein-

- protein and RNA-protein interactions[J]. *Chem. Sci.*, 2021, 13(4): 1119-1129.
- [24] MAGLIERI T J, WILSON C G, PAN W, *et al.*. Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127(1): 146-157.
- [25] MORELL M, ESPARGARÓ A, AVILÉS F X, *et al.*. Detection of transient protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation: the Abl-SH3 case[J]. *Proteomics*, 2007, 7(7): 1023-1036.
- [26] KERPPOLA T K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells[J]. *Annu. Rev. Biophys.*, 2008, 37: 465-487.
- [27] HU C D, KERPPOLA T K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21(5): 539-545.
- [28] LEVIN A, ARMON-OMER A, ROSENBLUH J, *et al.*. Inhibition of HIV-1 integrase nuclear import and replication by a peptide bearing integrase putative nuclear localization signal[J]. *Retrovirology*, 2009, 6(1):1-16.
- [29] CHEN M, LI W, ZHANG Z, *et al.*. Novel near-infrared BiFC systems from a bacterial phytochrome for imaging protein interactions and drug evaluation under physiological conditions[J]. *Biomaterials*, 2015, 48: 97-107.
- [30] MAERTENS G, CHEREPANOV P, PLUYMERS W, *et al.*. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells[J]. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(35): 33528-33539.
- [31] SHUN M C, RAGHAVENDRA N K, VANDEGRAAFF N, *et al.*. LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration[J]. *Genes Dev.*, 2007, 21(14): 1767-1778.
- [32] NAKAMURA T, CAMPBELL J R, MOORE A R, *et al.*. Development and validation of a cell-based assay system to assess human immunodeficiency virus type 1 integrase multimerization[J]. *J. Virol. Methods*, 2016, 236: 196-206.
- [33] GUIOT E, CARAYON K, DELELIS O, *et al.*. Relationship between the oligomeric status of HIV-1 integrase on DNA and enzymatic activity[J]. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(32): 22707-22719.
- [34] AROLD S, HOH F, DOMERGUE S, *et al.*. Characterization and molecular basis of the oligomeric structure of HIV-1 Nef protein[J]. *Protein Sci.*, 2000, 9(6): 1137-1148.
- [35] LEE C H, SAKSELA K, MIRZA U A, *et al.*. Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain[J]. *Cell*, 1996, 85(6): 931-942.
- [36] POE J A, SMITHGALL T E. HIV-1 Nef dimerization is required for Nef-mediated receptor downregulation and viral replication[J]. *J. Mol. Biol.*, 2009, 394(2): 329-342.
- [37] LI W F, ARYAL M, SHU S T, *et al.*. HIV-1 Nef dimers short-circuit immune receptor signaling by activating Tec-family kinases at the host cell membrane[J]. *J. Biol. Chem.*, 2020, 295(15): 5163-5174.
- [38] STAUDT R P, SMITHGALL T E. Nef homodimers down-regulate SERINC5 by AP-2-mediated endocytosis to promote HIV-1 infectivity[J]. *J. Biol. Chem.*, 2020, 295(46): 15540-15552.
- [39] SHU S T, EMERT-SEDLAK L A, SMITHGALL T E. Cell-based fluorescence complementation reveals a role for HIV-1 Nef protein dimerization in AP-2 adaptor recruitment and CD4 co-receptor down-regulation[J]. *J. Biol. Chem.*, 2017, 292(7): 2670-2678.
- [40] DIKEAKOS J D, THOMAS L, KWON G, *et al.*. An interdomain binding site on HIV-1 Nef interacts with PACS-1 and PACS-2 on endosomes to down-regulate MHC-I[J]. *Mol. Biol. Cell*, 2012, 23(11): 2184-2197.
- [41] DIRK B S, JACOB R A, JOHNSON A L, *et al.*. Viral bimolecular fluorescence complementation: a novel tool to study intracellular vesicular trafficking pathways[J/OL]. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0125619[2015-04-27]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0125619>.
- [42] JACOB R A, EDGAR C R, PRÉVOST J, *et al.*. The HIV-1 accessory protein Nef increases surface expression of the checkpoint receptor Tim-3 in infected CD4⁺ T cells[J/OL]. *J. Biol. Chem.*, 2021, 297(3): 101042[2021-08-04]. <http://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101042>.
- [43] ZHANG X, SHI J, QIU X, *et al.*. CD4 expression and Env conformation are critical for HIV-1 restriction by SERINC5[J/OL]. *J. Virol.*, 2019, 93(14): e00544-19[2019-06-28]. <https://doi.org/10.1128/JVI.00544-19>.
- [44] PRÉVOST J, EDGAR C R, RICHARD J, *et al.*. HIV-1 Vpu downregulates Tim-3 from the surface of infected CD4⁺ T cells[J/OL]. *J. Virol.*, 2020, 94(7): e01999-19[2020-03-17]. <https://doi.org/10.1128/JVI.01999-19>.
- [45] MAO S, YING Y, MA Z, *et al.*. A background assessable and correctable bimolecular fluorescence complementation system for nanoscopic single-molecule imaging of intracellular protein-protein interactions[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(9): 14338-14346.
- [46] ATANASIU D, WHITBECK J C, CAIRNS T M, *et al.*. Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104(47): 18718-18723.
- [47] AVITABILE E, FORGHIERI C, CAMPADELLI-FIUME G. Complexes between herpes simplex virus glycoproteins gD, gB, and gH detected in cells by complementation of split enhanced green fluorescent protein[J]. *J. Virol.*, 2007, 81(20): 11532-11537.
- [48] HERNANDEZ F P, SANDRI-GOLDIN R M. Herpes simplex virus 1 regulatory protein ICP27 undergoes a head-to-tail intramolecular interaction[J]. *J. Virol.*, 2010, 84(9): 4124-4135.
- [49] HERNANDEZ F P, SANDRI-GOLDIN R M. Bimolecular fluorescence complementation analysis to reveal protein interactions in herpes virus infected cells[J]. *Methods*, 2011, 55(2): 182-187.
- [50] HERNANDEZ F P, SANDRI-GOLDIN R M. Head-to-tail intramolecular interaction of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is important for its interaction with cellular

- mRNA export receptor TAP/NXF1[J/OL]. MBio, 2010, 1(5): e00268-10 [2010-11-09]. <https://doi.org/10.1128/mBio.00268-10>.
- [51] GUO H X, CUN W, LIU L D, *et al.* Protein encoded by HSV-1 stimulation-related gene 1 (HSRG1) interacts with and inhibits SV40 large T antigen[J]. Cell Prolif., 2006, 39(6): 507-518.
- [52] YOUNG L S, RICKINSON A B. Epstein-Barr virus: 40 years on[J]. Nat. Rev. Cancer, 2004, 4(10): 757-768.
- [53] TALATY P, EMERY A, EVERLY D N. Characterization of the latent membrane protein 1 signaling complex of Epstein-Barr virus in the membrane of mammalian cells with bimolecular fluorescence complementation[J/OL]. Virol. J., 2011, 8: 414 [2011-08-24]. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-414>.
- [54] ALATY P, EMERY A, HOLTHUSEN K, *et al.* Identification of transmembrane protein 134 as a novel LMP1-binding protein by using bimolecular fluorescence complementation and an enhanced retroviral mutagen[J]. J. Virol., 2012, 86(20): 11345-11355.
- [55] HOLTHUSEN K, TALATY P, EVERLY D N. Regulation of latent membrane protein 1 signaling through interaction with cytoskeletal proteins[J]. J. Virol., 2015, 89(14): 7277-7290.
- [56] YAN K, LIU J, GUAN X, *et al.* The carboxyl terminus of tegument protein pUL21 contributes to pseudorabies virus neuroinvasion[J/OL]. J. Virol., 2019, 93(7): e02052-18 [2019-03-21]. <https://doi.org/10.1128/JVI.02052-18>.
- [57] LI F, ZHANG Y, CHEN S, *et al.* Identification of the nuclear localization signal region of duck enteritis virus UL14 and its interaction with VP16[J]. Intervirology, 2016, 59(4): 187-196.
- [58] CHEN L, NI Z, HUA J, *et al.* Proteomic analysis of host cellular proteins co-immunoprecipitated with duck enteritis virus gC[J/OL]. J. Proteomics, 2021, 245: 104281 [2021-08-15]. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104281>.
- [59] DENG T, SHARPS J, FODOR E, *et al.* In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex[J]. J. Virol., 2005, 79(13): 8669-8674.
- [60] HEMERKA J N, WANG D, WENG Y, *et al.* Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay[J]. J. Virol., 2009, 83(8): 3944-3955.
- [61] SUZUKI T, AINAI A, NAGATA N, *et al.* A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase[J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2011, 414(4): 719-726.
- [62] LI W, CHEN H, SUTTON T, *et al.* Interactions between the influenza A virus RNA polymerase components and retinoic acid-inducible gene I[J]. J. Virol., 2014, 88(18): 10432-10447.
- [63] NITTA S, SAKAMOTO N, NAKAGAWA M, *et al.* Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity[J]. Hepatology, 2013, 57(1): 46-58.
- [64] HELFER C M, WANG R, YOU J. Analysis of the papillomavirus E2 and bromodomain protein Brd4 interaction using bimolecular fluorescence complementation[J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(10): e77994 [2013-10-25]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077994>.
- [65] SÁNCHEZ-APARICIO M T, AYLLÓN J, LEO-MACIAS A, *et al.* Subcellular localizations of RIG-I, TRIM25, and MAVS complexes[J/OL]. J. Virol., 2017, 91(2): e01155-16 [2017-01-03]. <https://doi.org/10.1128/JVI.01155-16>.
- [66] LAI G H, LIEN Y Y, LIN M K, *et al.* VP2 of chicken anaemia virus interacts with apoptin for down-regulation of apoptosis through de-phosphorylated threonine 108 on apoptin[J/OL]. Sci. Rep., 2017, 7(1): 14799 [2017-11-01]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14558-8>.
- [67] NAN H, LAN J, TIAN M, *et al.* The network of interactions among porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural proteins[J/OL]. Front. Microbiol., 2018, 9: 970 [2018-05-14]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00970>.
- [68] ZHOU J, CHEN J, ZHANG X M, *et al.* Porcine Mx1 protein inhibits classical swine fever virus replication by targeting non-structural protein NS5B[J/OL]. J. Virol., 2018, 92(7): e02147-17 [2022-06-30]. <https://doi.org/10.1128/JVI.02147-17>.
- [69] ZHANG Q, WU Y F, CHEN P, *et al.* *Bombyx mori* cell division cycle protein 37 promotes the proliferation of BmNPV[J/OL]. Pestic. Biochem. Physiol., 2021, 178: 104923 [2021-07-17]. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104923>.
- [70] ZHU M, ZHANG X, PAN J, *et al.* Tight junction protein claudin-2 promotes cell entry of *Bombyx mori* cypovirus[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2021, 105(14-15): 6019-6031.
- [71] CHEN M, YAN C, QIN F, *et al.* The intraviral protein-protein interaction of SARS-CoV-2 reveals the key role of N protein in virus-like particle assembly[J]. Int. J. Biol. Sci., 2021, 17(14): 3889-3897.
- [72] EMERT-SEDLAK L A, NARUTE P, SHU S T, *et al.* Effector kinase coupling enables high-throughput screens for direct HIV-1 Nef antagonists with antiretroviral activity[J]. Chem. Biol., 2013, 20(1): 82-91.
- [73] SHUN M C, RAGHAVENDRA N K, VANDEGRAAFF N, *et al.* LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration[J]. Genes Dev., 2007, 21(14): 1767-1778.
- [74] ZHOU Z, JIANG X, LIU D, *et al.* Autophagy is involved in influenza A virus replication[J]. Autophagy, 2009, 5(3): 321-328.
- [75] DAI J P, LI W Z, ZHAO X F, *et al.* A drug screening method based on the autophagy pathway and studies of the mechanism of evodiamine against influenza A virus[J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e42706 [2012-08-10]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042706>.
- [76] MÜNZ C. Beclin-1 targeting for viral immune escape[J]. Viruses, 2011, 3(7): 1166-1178.
- [77] DAI J P, ZHAO X F, ZENG J, *et al.* Drug screening for autophagy inhibitors based on the dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BiFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza A virus activity[J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(4): e61026 [2013-04-16]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061026>.

- [78] DAI J, WANG G, LI W, *et al.* High-throughput screening for anti-influenza A virus drugs and study of the mechanism of procyanidin on influenza A virus-induced autophagy[J]. *J. Biomol. Screen.*, 2012, 17(5): 605-617.
- [79] YU C, LI S, ZHANG X, *et al.* MARCH8 inhibits Ebola virus glycoprotein, human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, and avian influenza virus H5N1 hemagglutinin maturation[J/OL]. *mBio*, 2020, 11(5): e01882-20[2022-06-30]. <https://doi.org/10.1128/mBio.01882-20>.
- [80] WEI J, HAMEED M, WANG X, *et al.* Antiviral activity of phage display-selected peptides against Japanese encephalitis virus infection in vitro and in vivo[J/OL]. *Antiviral Res.*, 2020, 174: 104673 [2020-12-05]. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104673>.
- [81] HUANG C, BERNARD D, ZHU J, *et al.* Small molecules block the interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus and CD163 receptor and the infection of pig cells [J/OL]. *Virol. J.*, 2020, 17(1): 116[2020-07-30]. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01361-7>.
- [82] WANG Y, WANG Z, LIU J, *et al.* Discovery of novel HBV capsid assembly modulators by structure-based virtual screening and bioassays[J/OL]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2021, 36(11): 116096 [2021-04-15]. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116096>.
- [83] SHAO S, ZHANG H, ZENG Y, *et al.* TagBiFC technique allows long-term single-molecule tracking of protein-protein interactions in living cells[J/OL]. *Commun. Biol.*, 2021, 4(1): 378[2021-03-19]. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01896-7>.
- [84] ZAMYATNIN A A, SOLOVYEV A G, BOZHKO V P V, *et al.* Assessment of the integral membrane protein topology in living cells[J]. *Plant J.*, 2006, 46(1): 145-154.
- [85] LEASTRO M O, FREITAS-ASTÚA J, KITAJIMA E W, *et al.* Dichorhavirus movement protein and nucleoprotein form a protein complex that may be required for virus spread and interacts in vivo with viral movement-related cilevirus proteins[J/OL]. *Front. Microbiol.*, 2020, 11: 571807[2020-11-04]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.571807>.
- [86] HAN Y, WANG S, ZHANG Z, *et al.* In vivo imaging of protein-protein and RNA-protein interactions using novel far-red fluorescence complementation systems[J/OL]. *Nucl. Acids Res.*, 2014, 42(13): e103[2014-05-09]. <https://doi.org/10.1093/nar/gku408>.
- [87] PARK S Y, MOON H C, PARK H Y. Live-cell imaging of single mRNA dynamics using split superfolder green fluorescent proteins with minimal background[J]. *RNA*, 2020, 26(1): 101-109.
- [88] 熊冰钰,叶珂璐,崔凌云,等. 蛋白质-RNA相互作用鉴定技术研究进展[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(3): 217-225.
- [89] MORELL M, ESPARGARO A, AVILES F X, *et al.* Study and selection of in vivo protein interactions by coupling bimolecular fluorescence complementation and flow cytometry[J]. *Nat. Protoc.*, 2008, 3(1): 22-33.
- [90] SHYU Y J, SUAREZ C D, HU C D. Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay[J]. *Nat. Protoc.*, 2008, 3(11): 1693-1702.