



蛋白质寡聚化的活体检测技术及其研究进展

罗鹏云, 李岩竣, 左新秀, 钱虹萍, 徐昌文, 林金星, 崔亚宁*

林木育种与生态修复国家工程研究中心, 林木遗传育种全国重点实验室, 树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室, 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

* 联系人, E-mail: cuiyaning@bjfu.edu.cn

2023-11-16 收稿, 2023-12-20 修回, 2023-12-22 接受, 2023-12-25 网络版发表

国家自然科学基金(32370740)和北京市科技新星计划(20230484251)资助

摘要 蛋白质寡聚在许多生理过程中起着非常重要的作用, 分析蛋白寡聚化有利于深层次解析蛋白质-蛋白质/配体相互作用、信号转导以及疾病发生相关机制等生物学过程. 近年来, 随着一些新兴技术的涌现, 实时、动态、活体观测蛋白与蛋白相互作用的研究已成为热点. 通过提高时间分辨率和空间分辨率, 可以更准确地观察和研究蛋白质的动态行为和相互作用. 同时, 新兴技术与算法的结合进一步扩展了对蛋白质在时间和空间尺度上的研究范围, 使我们能更深入地探索蛋白质结构与功能之间的关系. 本文首先简要介绍了寡聚蛋白质的分类和形成机制, 随后从蛋白标记技术和活体检测技术两个方面综述了用于分析蛋白复合体寡聚化的几种主要技术以及其研究进展. 最后, 展望了蛋白质寡聚化研究的发展前景, 希望为研究者在选择适合的分析技术时提供一些理论参考.

关键词 蛋白质寡聚化, 蛋白质-蛋白质相互作用, 蛋白质标记, 活体检测

蛋白质寡聚是一种普遍存在的生理过程, 大约30%的蛋白质以寡聚体的形式存在于活细胞中. 在亚分子水平上, 多肽链由氨基酸残基组成, 并通过扭曲折叠形成特定的空间结构^[1]; 在分子水平上, 多个蛋白质单体聚集形成同源或异源寡聚物复合体^[2,3], 并在酶活性的调节、信号转导、细胞黏附等过程中发挥重要作用. 例如, Hays和Watowich^[4]使用TPR-MET(一种RTKc-MET的功能活性癌蛋白衍生物)探究了寡聚化对受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)活性的影响, 通过比较寡聚体TPR-MET和单体cytoMET的催化活性(k_{cat}), 发现寡聚体TPR-MET比单体cytoMET的 k_{cat} 值增加了3倍, 表明寡聚化可能通过改变受体构象从而导致寡聚受体活性增加. 刘剑峰教授研究团队^[5]对控制G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)信号模式之间平衡的潜在机制进行了研究. 他们选取血小

板激活因子受体(platelet-activating factor receptor, PAFR)作为A类GPCR的代表, 发现通过交联稳定PAFR寡聚体可增加G蛋白活性, 并显著降低 β -arrestin募集和激动剂诱导的内化. 相反, β -arrestin的募集可以减少PAFR的寡聚化, 从而影响下游信号的偏向性. 整合素是一类异跨膜蛋白, 由 α 和 β 两个亚单位组成, 在细胞外基质和细胞内的细胞骨架之间起着桥梁作用. 研究表明, 在细胞黏附的过程中, 这两个亚单位通过寡聚化形成异二聚体, 从而介导细胞与基质的黏附^[6]. 此外, 寡聚化还可以提高蛋白质在局部空间的浓度, 赋予蛋白质更高的稳定性, 并使蛋白质在分子识别过程中具有高特异性^[7].

近些年, 蛋白质寡聚化领域的研究已取得丰硕的成果, 这些成果离不开技术的支持, 如免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)、酵母双杂交、蛋白片段

引用格式: 罗鹏云, 李岩竣, 左新秀, 等. 蛋白质寡聚化的活体检测技术及其研究进展. 科学通报, 2024, 69: 1034–1046

Luo P Y, Li Y J, Zuo X X, et al. Technology and research progress on *in vivo* protein oligomerization detection (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 1034–1046, doi: 10.1360/TB-2023-1177

互补分析技术(protein fragment complementation assay, PCA)等。尽管这些技术是目前研究蛋白质之间相互作用最为常用的方法,但它们仍然存在一定的局限性,例如,Co-IP技术可能检测不到亲和力较低以及瞬间的蛋白质相互作用,也无法确定蛋白质结合过程中是否存在中间物质参与;酵母双杂交可能会出现假阳性或假阴性结果^[8];PCA可能会由于分裂目标蛋白片段而影响蛋白结构和功能^[9]。尽管以上几种技术在研究蛋白相互作用领域发挥了重要作用,但同时也会存在一些限制。近年来,随着科技的进步,对蛋白质寡聚化的研究也出现了革新,研究者逐渐致力于从实时、动态、活体的角度来研究蛋白与蛋白之间的相互作用,为了提高实验数据的质量,从蛋白的标记水平、成像水平以及分析算法水平等都出现了不同程度的更新。本文简要介绍了蛋白质复合体寡聚化的意义,并重点介绍了用于蛋白质复合体寡聚化分析的技术及其研究进展。最后,展望了蛋白复合体寡聚化的研究前景。

1 蛋白质寡聚化的分类及形成机制

1.1 蛋白质寡聚化的分类

蛋白质是具有特定构象的大分子,其形成时亚基的数量和排列方式被称为蛋白质的层级结构。蛋白质的层级结构分为4个级别,分别是一级结构、二级结构、三级结构和四级结构。其中,四级结构是由多个蛋白质亚基相互作用而形成的复合体结构。寡聚蛋白质是指具有四级结构的蛋白质,其中多个亚基通过非共价相互作用(如氢键、离子键、范德华力等)结合在一起,形成一个功能完整的复合体。寡聚蛋白质常常具有特定的结构,并与其功能密切相关,譬如,在细胞内参与信号传导、酶活性调控、基因调控等生物学过程中

均发挥重要作用^[10]。寡聚蛋白质可以被理解为多个蛋白质单体按照一定排列方式形成的同源或异源寡聚体。这种组合可能包含相同多肽链的亚基、具有不同氨基酸序列的多肽链,甚至包含不同的生物聚合物(如核酸等)。且不论是同源还是异源寡聚物,这种自然的寡聚现象均会受到其配体、温度和其他蛋白质的影响^[11]。许多研究表明,大多数受体并不以单体发挥作用,而是在相应的配体介导下组装成二聚体或高阶寡聚体形式^[12]。这种组装机制可以通过促进细胞中的下游信号传导级联反应来传递信号^[13],而细胞表面受体通过二聚化或高阶寡聚化被激活通常被认为是信号传导的第一步^[14](图1)。在蛋白质寡聚物中,同源寡聚物形成的频率可能高于异源寡聚物,最常见的状态是二聚体和四聚体^[15],如促甲状腺素释放激素受体(thyrotropin-releasing hormone receptor, TRHR)、组胺受体(histamine receptor, HR)和生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)等已被证明主要以同二聚体存在^[16]。3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)^[17]、干扰素 λ -2(recombinant interleukin 28A, IL28A)^[18]、水通道蛋白(aquaporin, AQP)等主要以同四聚体存在^[19]。异源寡聚化指的是几种不同的蛋白分子或者相同蛋白的不同亚型间的相互作用,常见于异源二聚体和异源四聚体。如研究表明G蛋白偶联受体能够以异二聚体形式发挥功能^[20],脑组织中的 γ -氨基丁酸B型受体(γ -aminobutyric acid B receptor, GABABR)能够通过异源二聚体形成异源四聚体发挥功能^[21]。

1.2 蛋白质寡聚化的形成机制

寡聚化蛋白形成的机制可以概括为4种类型:结构域交换、配体诱导寡聚、界面点突变以及翻译后修饰^[11]。其中,结构域交换通常是将单体蛋白质的一个

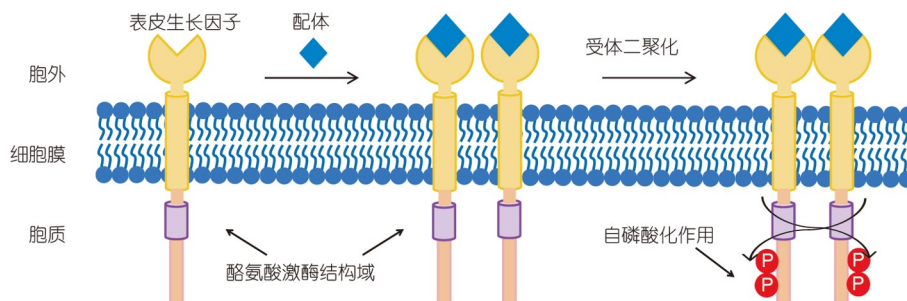


图1 (网络版彩色)配体诱导表皮生长因子受体二聚化过程

Figure 1 (Color online) Ligand-induced epidermal growth factor receptor dimerization process

结构域与相同蛋白质肽链的相似结构域交换从而形成低聚物,低聚蛋白的交换结构域可以很大(第三球状结构域)或很小(α -螺旋或 β -折叠片),结构域交换可以作为寡聚蛋白进化的一种手段,通过单体和寡聚态之间的变换进行功能转换^[22].当然有些交换也可能只是作为一种拯救蛋白稳定性的机制而出现,而不一定是由功能本身驱动,即交换的过程是为了稳定寡聚蛋白的多亚基复合物^[11].寡聚化蛋白形成第二种机制是配体通过诱导蛋白寡聚从而激活其活性.研究表明,许多膜受体蛋白能够被配体结合并激活.例如,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一个典型的在配体诱导下发生二聚化来激活功能的受体.根据细胞类型、表达水平以及配体和受体的组合模式的差异,配体结合除了可以诱导二聚化外,还可以稳定已存在的二聚体,形成高阶寡聚化体,或者调节与其他膜蛋白的异二聚化^[23].寡聚化的第三个过程是界面点突变,它可以理解为蛋白质氨基酸序列的改变或残基的去除.据研究报道,约25%的蛋白质和40%的酶具有辅助或中断寡聚物形成的界面区域.因此,插入或删除位于界面区域的残基可以区分单体、二聚体和寡聚体^[11].例如,半胱氨酸蛋白酶抑制剂hCC(human cystatin C),其生物活性形式是单体状态,然而在细胞运输过程中会通过区域交换发生二聚化并失去其抑制活性,当hCC发生点突变后,除了使其构象更加稳定外,也避免了发生二聚化以及聚集的现象,从而促进其功能的发挥^[24].寡聚化的最后一个过程是翻译后修饰(posttranslational modifications, PTM),翻译后修饰是一种通过大量的化学修饰形成活性折叠蛋白的现象.据报道,二聚体界面上的磷酸化和糖基化以及2个亚基之间的二硫键的形成是少数蛋白质低聚化的

诱导机制^[25].例如,当Tau蛋白被过度进行磷酸化修饰后,会诱导Tau蛋白超磷酸化并形成大量寡聚体,从而导致阿尔茨海默病的发生^[26].综上所述,蛋白质形成寡聚体结构远不是简单的几个蛋白单体的聚合过程,而包含了许多复杂的细节步骤.目前对蛋白质寡聚化机制的研究主要受限于技术和方法的限制,一些更为细致的过程尚未得到深入解析.因此,我们期待技术与方法的革新,以便更深入地研究这种机制.这将有助于我们更好地理解蛋白质寡聚化的原理和功能,并可能为相关领域的疾病治疗和药物开发提供新的思路 and 策略.

2 蛋白质寡聚化的标记技术

实时、动态、活体地研究蛋白与蛋白相互作用一直是研究者普遍关注的问题.在研究蛋白与蛋白之间的相互作用时,首先需要确定相互作用的蛋白组分.除了已知相互作用蛋白之外,对目标蛋白的未知相互作用蛋白,研究者通常会采用计算的方法^[27],如生物信息学预测^[28]和蛋白质相互作用数据库检索^[29]等,以迅速确定这些组分.这些方法既能节约时间成本,提高效率,又适应大规模数据检测的需求.在确定了可能的相互作用组分后,随后可以通过选择合适的标签或标记物进行可视化标记来进行验证.常用的方法包括荧光蛋白标记、Tag标签标记和生物正交标记等.这些标记技术可以将目标蛋白与其他分子或结构连接起来,以实现对其动态活体性的可视化观察.通过这种方式,研究者能够更全面地了解蛋白质的相互作用过程,并进一步深入研究其功能和机制.在这里,我们简要总结了这3种标记技术的原理、应用实例以及优缺点(表1).

表 1 蛋白质寡聚化标记技术的优缺点
Table 1 Advantages and disadvantages of protein oligomerization labeling techniques

标记技术	标记物类型	优势	缺陷
荧光蛋白标记	荧光蛋白	荧光较为稳定、无毒性、产生荧光不需要任何外源底物、便于成像等	蛋白分子本身较大,可能会影响目标蛋白功能;荧光易淬灭,不支持长时程的观察
Tag标签标记	Halo-tag、SNAP-tag、CLIP-tag等	荧光亮度、稳定性以及靶向性上均具有优势,抗淬灭性好,可以长时程观察	Tag标签本质还是连接到目标蛋白上的探针分子,对较小结构的目标分子适用性仍有限
生物正交标记	荧光染料、化学基团等,例如叠氮基团、生物素、生物亲和素等	分子量小,通常是化学基团,可实现目标蛋白的特异性标记,准确性高,不影响生物学功能	设计合适的标记基团较为复杂,使用的催化剂例如铜离子会对活体细胞造成毒性

2.1 荧光蛋白标记

荧光蛋白标记(fluorescent protein labeling)是将不同颜色的荧光质粒通过转化或转导等方式结合到生物体中, 待其稳定表达后可观测到荧光且不影响生物正常生理功能的一种标记方法^[30](图2(a)). 由于荧光蛋白具有荧光稳定、无毒性、产生荧光不需要任何外源底物、便于成像等优点, 该标记方法被广泛应用于生命科学领域的研究. Cevheroglu等人^[31]在酵母的GPCR (Ste2p)中插入EGFP(enhanced green fluorescent protein)片段, 使用双分子荧光互补技术分析监测EGFP荧光的生成来确定蛋白质运输过程中受体二聚化的位置, 结果发现, 这些被标记的受体作为单体运输到膜上, 主要在质膜上进行二聚化或更高阶的寡聚化, 并以二聚体或寡聚体的形式内化. 此外, Cevheroglu等人^[32]还采用EGFP、mCherry作为荧光蛋白标签, 对受体进行标记, 通过荧光共振能量转移技术来测量从EGFP到mCherry的能量转移, 以检测受体的寡聚化, 结合双分子荧光互补实验, 进一步研究了Ste2p的四聚体复合物. 研究表明, 在未被配体激活的静止状态下, Ste2p以四聚体的形式存在于细胞质膜上. 荧光蛋白是研究活细胞分子间相互作用的强有力工具之一, 还可以通过检测荧光寿命来探测目标蛋白之间的相互作用. 荧光寿命(fluorescence lifetime, FLIM)是指荧光分子受激发后到返回基态的时间, 它可以灵敏地反映激发态分子

之间的相互作用与能量转移, 因此通常将荧光寿命和荧光共振能量传递(fluorescence resonance energy transfer, FRET)相结合, 精确测量受体分子与供体分子之间的能量转移过程, 从而确定蛋白互作情况. 例如, Su等人^[33]利用FRET-FLIM分析了BSK1-GFP和FLS2-mCherry之间的相互作用. 结果显示, 在添加flg22配体刺激后, GFP的荧光寿命升高, 表明配体刺激导致BSK1/FLS2复合物解离. 然而, 荧光蛋白在研究中经历复杂的光物理转变和有限的成熟过程, 可能导致非荧光状态的产生, 从而影响寡聚化的测量结果. 近年来, 研究者发现了一种新型红色荧光蛋白mCherry2(一种mCherry的变体), 相比其他红色荧光蛋白, 它具有更稳定的荧光、更高的亮度和更高的荧光表达水平. 已经证明, 在精确定量寡聚化方面, mCherry2表现出优越性能^[34].

2.2 Tag标签标记

尽管荧光蛋白的应用已取得了重大进展, 但由于亮度和光稳定性相对较低的缺点, 使用荧光蛋白进行寡聚蛋白质检测仍面临挑战. 为了克服荧光蛋白标记的限制, 研究者开发了一系列新的分子标记方法, 如Tag标签标记. 通过将带有基因靶向的Tag序列/标签融合到感兴趣的分子上, 再利用具有与该Tag序列/标签稳定结合的特性的有机染料进行标记. 这种混合标记

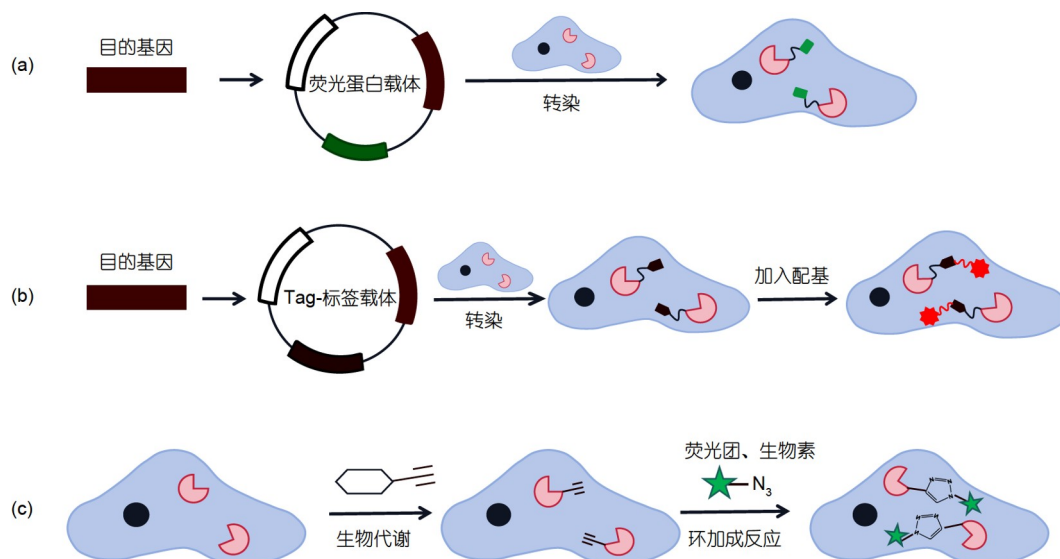


图2 (网络版彩色)蛋白质寡聚化的活体标记技术. (a) 荧光蛋白标记原理; (b) Tag标签标记原理; (c) 生物正交反应标记原理

Figure 2 (Color online) *In vivo* labeling technique of protein oligomerization. (a) Principle of fluorescent protein labeling; (b) Tag label marking principle; (c) biological orthogonal reaction labeling principle

方法在荧光亮度、稳定性和靶向性方面都具有优势,并且可以通过调整荧光染料的浓度实现对目标分子的稀疏标记^[35](图2(b)). 目前使用较多的Tag标签有Halo-tag、SNAP-tag、CLIP-tag等,均已被应用于蛋白质分离和纯化、蛋白质-蛋白质相互作用、体外以及体内活细胞成像等^[36]. 例如,Minner-Meinen等人^[37]在植物中建立了Split-Halo-tag成像实验,用于检测其在蛋白相互作用研究中的应用效果. 他们将Halo-tag分裂为N和C端,然后将它们分别连接在互作蛋白Cnx1和ABD2上. 如果两种蛋白发生相互作用,就会形成完整的Halo-tag标签. 在加入TMR(tetramethylrhodamine)后,可以在细胞内观察到荧光信号. 研究结果发现,与传统的双分子荧光互补(bimolecular fluorescent complementary, BiFC)等显微成像技术相比,Split-Halo-tag标记能够观察到蛋白复合物的局部形成过程以及更多的细节. 这证明了这种标记方法在活细胞内检测蛋白相互作用方面的优势. Maurel等人^[38]选择使用SNAP-tag对细胞表面蛋白进行特异性标记,并成功地应用时间分辨荧光共振能量转移技术(TR-FRET)研究了细胞表面的GPCRs寡聚化. 他们获得了A类和C类GPCRs在细胞表面容易形成二聚体的直接证据. 另外,在检测蛋白相互作用以及追踪前体蛋白中,单一的标签标记常局限于同种蛋白,为了实时追踪蛋白复合物中的不同蛋白质,Me等人^[39]开发了SNAP-CLIP双重标记系统,成功在活细胞中标记蛋白质-蛋白质复合物中的两种蛋白质,并可以在复合物解离后对每种蛋白质进行追踪. 此外,研究者还开发出一种聚集标签(aggregation tag, AggTag)的荧光方法,包括基于Halo-tag配体的AggTag探针P1和基于SNAP-tag配体的AggTag探针P2,使用共聚焦成像以及化学交联实验可以在同一细胞中可视化2种不同的蛋白聚集体,也就是说这种聚集标签能够在活细胞中同时进行荧光检测和双正交检测两种不同目标蛋白质的聚集^[40]. 可以看出,相对于荧光蛋白,采用Tag标签对蛋白质进行标记在一定程度上具有优势. 然而,这种标记方法需要与外源荧光染料结合,并且受到漂洗时长的影响,在活体成像上往往存在一定的限制. 此外,与动物细胞相比,植物细胞由于拥有细胞壁等结构,对荧光染料的渗透性要求更高,因此在一定程度上限制了Tag标记技术在植物领域的研究. 因此,开发新型的荧光探针,并实现对目标蛋白在活体中的免洗荧光成像,将会是Tag标记技术在植物领域应用的新突破.

2.3 生物正交标记

无论是荧光蛋白标记还是Tag标签标记,许多研究表明它们在研究蛋白寡聚化方面是可行的. 然而,从结构上来看,荧光蛋白本身是一个相对较大的分子,在连接到目标蛋白上时可能造成空间位阻,进而影响目标蛋白的结构和功能. 此外,荧光蛋白只能在目标蛋白的两端进行标记,无法实现特异性位点的标记^[41]. 对于Tag标签标记,所使用的探针通常会在目标蛋白翻译后与其融合,但它们相对较大,例如SNAP/CLIP-tag的分子量约为20 kD. 当这些标签插入到对目标蛋白功能至关重要的位置时,可能会导致功能损害.

为了解决上述问题,研究人员开发了通过化学反应对细胞内蛋白质进行特异性标记的方法——生物正交反应(bioorthogonal reaction)(图2(c)). 该类反应可以在生理条件下发生,且不会干扰其他生化反应或造成损害^[42],其优点是能够准确、可靠地在复杂动态的生物环境中原位识别生物分子^[43]. 因此,这种反应通常应用在复杂生物体系中标记蛋白、脂类、糖类等不易或者不能通过基因方式修饰的生物活性分子. 在蛋白寡聚化(低聚化)的研究中,较高且定量的标记率是十分重要的. Serfling等人^[44]用遗传手段将反式-环辛-2-烯赖氨酸(*trans*-cyclooct-2-ene lysine*, TCO*)标记在A类和B类GPCRs上,并通过在单个TCO*位点进行双色竞争性标记,设计了一种无需生物单体参考即可估算GPCR寡聚化状态的方法,从而拓宽了将荧光方法应用于寡聚化的研究. 胡睿等人^[45]首次将AIE(aggregation-induced emission)探针分子用于蛋白质相互作用的检测. 他们将AIE荧光团EPB通过生物正交反应连接到 β -内酰胺酶(β -lactamase)上,随后对修饰后的 β -lactamase进行光谱和酶活测试,结果显示经EPB标记的 β -lactamase的四级结构以及催化活性均被保留,且在与互作蛋白BLIP的反应中表现较高的荧光信号. 总之,生物正交标记技术具有无损、高效和特异性等特点,因此成为一种理想的体内外生物标记策略. 在蛋白寡聚化研究中,这种标记方法可以克服荧光蛋白标记和Tag标签标记所带来的影响,并在敏感受体蛋白的寡聚状态研究中显示出明显的优势. 然而,该技术的发展仍面临许多挑战,例如设计适用的标记基团较为复杂等. 因此,我们期望随着技术的不断发展,生物正交标记技术能够克服这些限制,并更好地应用于蛋白寡聚化及其功能研究中.

3 蛋白质寡聚化的活体检测技术

蛋白质作为细胞生命活动的主要参与者,介导了几乎所有活细胞中的复杂相互作用。然而,在过去的蛋白质寡聚化检测技术的发展中,存在一些缺陷,如受限与体外检测、高假阳性/阴性率、低灵敏度和无法定量检测等问题。此外,传统的生物化学技术也无法提供足够的时空信息来揭示蛋白分子在活细胞中的相互作用。为了克服这些缺点,研究人员已经开发了一些先进的技术,用于检测活细胞中的蛋白质寡聚化。本文将简要介绍几种用于活体检测蛋白质寡聚化的技术及其研究进展,旨在为研究人员选择适当的蛋白质相互作用技术提供参考(图3)。

3.1 荧光互相关光谱(fluorescence cross-correlation spectroscopy, FCCS)

荧光互相关光谱是一种由涨落光谱技术(fluorescence fluctuation spectroscopy)衍生而来的新兴的单分子检测技术,可以分析2种甚至2种以上不同的荧光信号,并可以直接反映分子间的相互作用^[46]。Tiware等人^[47]利用FCCS技术成功量化了活细胞中p50/p65异源二聚体的聚合解离常数 K_d ,并通过分析发现,p50/p65的 K_d 值在细胞质和细胞核中有所不同,这也体现了FCCS技术在量化和分析分子间相互作用上的优势。此外,FCCS技术还是研究蛋白寡聚化的强有力工具。Hink等人^[48]在2008年利用FCCS技术分析了拟南芥细胞质膜上的受体激酶接受信号刺激后形成二聚体的模型。他们将ECFP和EYFP分别与BRI1(brassinosteroid insensitive 1 receptor)和BAK1(BRI1-associated receptor kinase 1)融合并在植物中表达,分析结果显示,两种蛋白拥有一致的荧光涨落曲线,表明在细胞质膜上BRI1和BAK1可能形成异源二聚体。同样地,本课题组也利用FCCS技术研究了拟南芥BRI1蛋白的寡聚化形式,研究表明,BRI1在配体处理后从没有活性的二聚体变成有活性的二聚体,并进行信号传递^[49]。随着新技术的不断涌现,研究者逐渐致力于开发多种技术联用的方法来拓宽FCCS的应用。例如,Machan等人^[50]使用了一种称为双色成像全内反射荧光互相关光谱(dual-colour imaging total internal reflection fluorescence cross-correlation spectroscopy, DC-ITIR-FCCS)的新型成像方式来研究CHO(Chinese hamster ovary)-K1细胞膜中的EGFR的二聚化,结果显示,用EGFP和mRFP(monomeric red fluor-

escent protein)标记的分子之间相关水平与二聚体形式的EGFR一致,然而单个细胞之间存在相当大的差异;此外,他们还指出这种成像模式不仅可以评估单个细胞之间的差异,还可以评估单个细胞膜内EGFR二聚体的分布,越靠近细胞边界,EGFP的二聚化越多。综上所述,FCCS技术在检测分子间相互作用方面具有显著优势。随着技术的不断改进,我们相信FCCS在活细胞蛋白质寡聚研究中的应用将不断成熟,并在生命科学研究中展现出巨大的发展潜力。

3.2 荧光漂白恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)

荧光漂白恢复技术是一种前沿的活细胞功能成像技术,可以在单个细胞水平上揭示蛋白质的功能和相互作用,因此被广泛应用于研究细胞膜组分的动态变化以及蛋白质寡聚化等领域^[51]。例如,Dorsch等人^[52]运用双色FRAP技术研究了GPCRs(肾上腺素 β 1受体)的寡聚化。他们将 β 1受体分别与CFP(cyan fluorescent protein)和YFP(yellow fluorescent protein)融合,并在细胞膜上等量表达。通过FRAP技术检测 β 1-CFP的荧光恢复情况,结果显示,加入YFP抗体限制了YFP- β 1的移动,并且也限制了15%的 β 1-CFP的运动,表明 β 1受体发生了寡聚化。此外,利用FRAP技术可以推测蛋白质寡聚化的区域和寡聚状态。例如,Sieber等人^[53]运用FRAP技术观察到带有GFP的突触融合蛋白1A(Sx1A)的荧光漂白恢复时间比其他自由扩散的单次跨膜蛋白更长,运动速率更低,进一步研究表明,Sx1A蛋白的运动受到SNARE区域寡聚化的限制。Youn等人^[54]运用多光子荧光漂白恢复技术来测量小热激蛋白sHSP27的扩散速率,并通过扩散速率直方图进行分析发现,sHSP27蛋白至少存在2种扩散速率,表明sHSP27蛋白在活细胞中至少存在2种寡聚化状态,可能与其形成大聚合物和小聚合物有关。总之,FRAP技术现已广泛应用于细胞生物学研究领域,主要通过计算扩散速率来确定蛋白是否发生寡聚。随着新型技术和相应算法的不断涌现,我们期望FRAP技术可以运用更好的荧光探针、更精确的算法以及联合其他显微技术,从而拓宽其在蛋白寡聚化研究中的应用。

3.3 单颗粒追踪技术(single-particle tracking, SPT)

为了研究蛋白的寡聚化,研究者已经开发出许多不同的技术,如化学交联、免疫共沉淀和荧光互补技

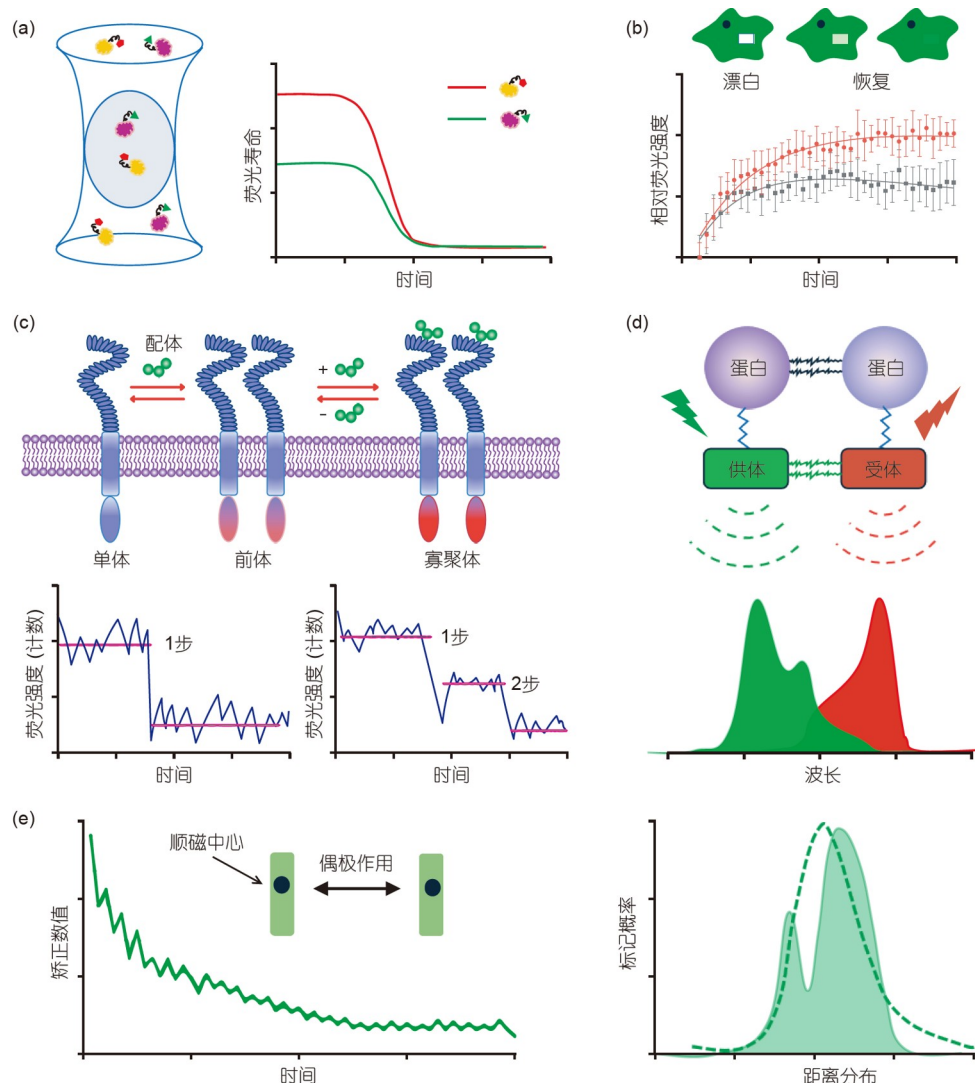


图 3 (网络版彩色)蛋白质寡聚化的活体检测技术。(a) 光互相关光谱(fluorescence cross-correlation spectroscopy, FCCS)的检测区域和荧光涨落曲线; (b) 单个细胞中感兴趣区域受激光漂白以及检测的荧光恢复曲线; (c) 蛋白质单体和寡聚物之间的动态平衡以及SPT技术在蛋白寡聚化研究中的应用, 单个荧光团荧光信号的时间过程, 显示一步漂白和两步漂白; (d) smFRET的工作原理, 当两个蛋白质距离十分接近时, 才会发生供体能量向受体能量的转移; (e) 2个蛋白质中的顺磁中心发生偶极相互作用, 通过DEER可测量两个自旋标记间的精确距离信息

Figure 3 (Color online) *In vivo* detection technique of protein oligomerization. (a) FCCS detection area and fluorescence fluctuation curve; (b) fluorescence recovery curves of regions of interest in a single cell subject to laser bleaching and detection; (c) the dynamic balance between protein monomers and oligomers and the application of SPT technology in the study of protein oligomerization, the time process of the fluorescence signal of a single fluorophore, showing one-step bleaching and two-step bleaching; (d) working principle of smFRET: The transfer of donor energy to recipient energy occurs when two proteins are very close together; (e) dipolar interactions occur in the paramagnetic center of the two proteins, and precise distance information between the two spin markers can be measured with DEER

术等^[55]。然而, 使用传统技术很难在纳米尺度上以毫秒级的时间分辨率直接检测活细胞内分子的寡聚状态^[56]。SPT是一种研究活细胞内部生物分子动力学的强大方法, 通过计算单个荧光颗粒的离散光漂白步骤, 研究人员可以确定膜蛋白中亚基的数量, 即漂白步数与每个蛋白质组合的亚基数量相匹配^[57~59]。值得注意的是, 在实验中使用标准的单体荧光蛋白作为对照,

以排除荧光标记之间固有二聚体甚至寡聚体形成的影响^[60]。当前, SPT技术因其优势已经被广泛使用, 我们团队致力于在植物中应用此技术来探究活体细胞中膜蛋白的动态以及存在形式^[61,62]。例如, Wang等人^[63]利用SPT技术测定了拟南芥中铵转运蛋白1;3(AMT1;3)的寡聚化情况。他们通过漂白步骤发现, 在正常情况下, AMT1;3以三聚体形式存在于质膜上。在高铵胁迫条件

下,质膜上的AMT1;3会聚集成簇并内化到胞质中。同样地,Xue等人^[64]应用SPT技术分析发现,非活性的phot1主要以单体形式存在。当暴露于蓝光时,phot1发生二聚化,而且随着蓝光照射量的增加,二聚化速率显著增加,表明蓝光作为一种物理类配体因子,诱导phot1在质膜上形成二聚体,进而参与信号传递。此外,Zhang等人^[65]利用拟南芥中NRT1.1^{T101D}突变体和NRT1.1^{T101A}非磷酸化突变体研究了NRT1.1的磷酸化状态对侧根发育过程中的作用。通过SPT技术和亚基计数分析,他们发现,NRT1.1^{T101D}和NRT1.1^{T101A}蛋白都显示出单体和二聚体的混合状态,但NRT1.1^{T101A}的二聚体明显多于NRT1.1^{T101D},表明NRT1.1的磷酸化状态对侧根细胞质膜上单体和二聚体的相互转化有显著影响。以上这些研究表明,通过应用SPT技术,我们不仅可以检测膜蛋白的寡聚状态,而且可以实时监测刺激前后特定分子的多聚体状态之间的转变。因此,SPT技术在膜蛋白寡聚化的研究中具有显著的优越性和实用性。

3.4 单分子荧光共振能量转移技术(single-molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET)

smFRET技术是一种强大的工具,可以用于报告荧光探针之间小于10 nm距离的相互作用。其原理是将2个相互作用的分子标记上不同颜色的荧光基团,一个作为供体提供能量,另一个则作为受体接收能量,通过荧光共振能量转移技术可以研究这种相互作用,相较于单个荧光基团标记更具有优势^[66]。smFRET技术由庄小威院士发明,随后迅速发展,目前已被广泛应用于研究生物分子相互作用。这种技术基于两种主要的实验配置,即激光共聚焦显微镜和全内反射荧光显微镜,前者适用于检测荧光分子之间距离的群体分布,而后者则利用冷藏电荷耦合器件(charge-coupled device, CCD)进行成像,其时间分辨率可达毫秒级,这种高时间分辨率对于实时检测生物分子间的快速相互作用至关重要^[67]。此外,smFRET也是一种非侵入性、可视化且易于实现的技术,被广泛应用于检测蛋白质的寡聚化或者蛋白间的互作。例如,Asher等人^[68]利用smFRET技术研究了GPCRs中A类和B类受体的寡聚状态。他们发现,在低受体密度下,MOR(A类)和SecR(B类)是单体形式存在的。然而,在高受体密度下,MOR仍然是单体形式,而SecR则形成相对稳定的复合物,表明GPCRs受体复合物的形成不一定完全依赖于受体密度。尽管

smFRET已经为研究者探索生物学的基本过程提供了前所未有的能力,然而传统双色FRET中单个荧光团间距离的信息不足以完全捕捉许多生物系统的内在复杂性,由此出现了多色smFRET技术。例如,三色smFRET技术^[69]以及更为先进的四色smFRET技术^[70],用以研究复杂生物系统中的瞬时相互作用。Hoi等人^[71]采用三色smFRET技术来研究肿瘤抑制蛋白p53四聚化结构域(tetramerization domain, TD)的寡聚化,发现TD的两个单体在低浓度下形成二聚体,随后两个二聚体在较高浓度下形成四聚体;此外,他们还观察到二聚体中的TD单体构象与四聚体中的不同,且在高TD浓度下,四聚体的形成速度比二聚体的解离速度更快。总之,smFRET技术是学科交叉产生的技术,它与其他技术的联合应用必然可解决更多生物难题。

3.5 双电子-电子共振技术(double electron electron resonance, DEER)

DEER也被称为脉冲电子双共振(pulsed electron double resonance, PELDOR),是一种广泛应用的生物物理技术,通常用于测量蛋白质上2个自旋标签之间的距离,范围为18~60 Å^[72]。其中基于氮氧化物自旋标记的DEER光谱在研究蛋白质结构以及寡聚状态等方面较为广泛。例如,Bleicken等人^[73]利用此技术对膜上活性低聚Bax蛋白的结构进行研究,在模拟线粒体外膜的脂质双分子层中通过12个不同自旋标记位置之间的距离,共计42个距离,获得了全长Bax膜中的结构信息,并利用这些距离计算出全长活性Bax在膜中的三维结构模型。同时,他们发现,活性Bax以二聚体的形式存在于膜上,每个单体都包含一个更灵活的结构域,参与二聚体间的相互作用和孔隙形成。Carrington等人^[74]应用DEER研究了人类肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)三聚体的天然构象,并成功识别出此前未报道过的三聚体预聚寡聚化(predeoligomerization)构象。在这个三聚体构象中,其中一个单体会向外旋转倾斜,导致三聚体解离,从而阻止了与TNF α 受体的结合,且小分子可以改变TNF α 活性的可能性。尽管定点自旋标记(site-directed spin labeling, SDSL)结合DEER可用于探索生物分子结构,但目前可用的自旋标记在细胞内的应用仍存在多种缺陷,如低自由基稳定性或较长的生物偶联物等。因此研究者致力于开发更为实用的自旋标记标签,例如苏循成课题组与魏兹曼研究所Goldfarb教授合作将他们发展的高性能顺磁探针标记BIR1结构

域同源二聚体用以研究其在细胞内的结构性质, 他们对比了顺磁标记的BIR1二聚体在体内外环境下的DEER数据, 结果发现BIR1二聚体在细胞内比在体外更易解离, 表明DEER是研究细胞内蛋白质结构性质以及相互作用的一种强有力技术^[75].

4 展望

蛋白质是细胞活动的体现者, 也是细胞功能的最终执行者, 蛋白质的功能发挥通常依赖于与其他蛋白质或配体结合形成临时或稳定的复合体来执行特定的生物功能. 在活细胞中, 蛋白质的寡聚化和相互作用对于细胞的生命活动和功能发挥至关重要. 因此, 在研究某个蛋白质的结构或功能时, 研究者通常非常关注这两个方面, 并开发了许多技术, 如Co-IP、PCA、BiFC、酵母双杂交等. 这些技术为研究蛋白质的寡聚

化和相互作用做出了巨大贡献. 然而, 随着科学技术的不断发展, 研究者发现传统的研究方法存在弊端, 如假阳性率高、灵敏度低、不能应用于活细胞等问题. 因此, 更加精确、实时、动态、适用于活体观测的方法成为研究者关注的焦点. 活体标记技术和显微成像技术的进步逐渐解决了这些问题. 然而, 无论是哪种技术, 都存在一定的局限性. 活体标记技术受到光稳定性差、标签空间位阻大和构建时间长等因素的影响; 成像技术受到空间和时间分辨率不足、存在非荧光物质以及统计算法不够准确等限制. 因此, 开发新的算法和更稳定的标签等对于更深入地探索蛋白质的寡聚化和相互作用具有重要意义. 我们期待通过改进现有的研究方法和技术, 结合多种技术的联合使用, 以及开发新的技术和算法, 来不断完善蛋白质在生命活动中的时空相互作用网络.

参考文献

- 1 Tong X, Liu S, Gu J, et al. Amino acid environment affinity model based on graph attention network. *J Bioinform Comput Biol*, 2022, 20: 2150032
- 2 Uguzzoni G, John Lovis S, Oteri F, et al. Large-scale identification of coevolution signals across homo-oligomeric protein interfaces by direct coupling analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E2662–E2671
- 3 Goodsell D S, Olson A J. Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29: 105–153
- 4 Hays J L, Watowich S J. Oligomerization-induced modulation of TPR-MET tyrosine kinase activity. *J Biol Chem*, 2003, 278: 27456–27463
- 5 Liu J, Tang H, Xu C, et al. Biased signaling due to oligomerization of the G protein-coupled platelet-activating factor receptor. *Nat Commun*, 2022, 13: 6365
- 6 Parra-Acero H, Harcet M, Sánchez-Pons N, et al. Integrin-mediated adhesion in the unicellular holozoan *Capsaspora owczarzaki*. *Curr Biol*, 2020, 30: 4270–4275.e4
- 7 Nussinov R, Jang H, Tsai C. Oligomerization and nanocluster organization render specificity. *Biol Rev*, 2015, 90: 587–598
- 8 Shivhare D, Musialak-Lange M, Julca I, et al. Removing auto-activators from yeast-two-hybrid assays by conditional negative selection. *Sci Rep*, 2021, 11: 5477
- 9 Li P, Wang L, Di L. Applications of protein fragment complementation assays for analyzing biomolecular interactions and biochemical networks in living cells. *J Proteome Res*, 2019, 18: 2987–2998
- 10 Huang C C, Chang C C, Chen C W, et al. PClass: Protein quaternary structure classification by using bootstrapping strategy as model selection. *Genes*, 2018, 9: 91
- 11 Kumari N, Yadav S. Modulation of protein oligomerization: An overview. *Prog Biophys Mol Biol*, 2019, 149: 99–113
- 12 Farooq Z, Howell L A, McCormick P J. Probing GPCR dimerization using peptides. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 843770
- 13 Noriega-Guerra H, Freitas V. Extracellular matrix influencing HGF/c-MET signaling pathway: Impact on cancer progression. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 3300
- 14 Zhang X, Yin J, Pan W, et al. Imaging strategies for receptor tyrosine kinase dimers in living cells. *Anal Bioanal Chem*, 2023, 415: 67–82
- 15 Hashimoto K, Panchenko A R. Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 20352–20357
- 16 Guo J M, Liu Y, An Y S, et al. Effects of G protein-coupled receptor oligomerization on receptor functions (in Chinese). *Chin Cell Biol*, 2016, 38: 1427–1432 [郭景明, 刘莹, 安瑜, 等. G蛋白偶联受体寡聚化对受体功能影响的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38: 1427–1432]
- 17 Simkin A J, Alqurashi M, Lopez-Calcano P E, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunits A and B are essential to maintain photosynthetic efficiency. *Plant Physiol*, 2023, 192: 2989–3000
- 18 Ma Y, Li J, Peng Z, et al. IL28A protein homotetramer structure is required for autolysosomal degradation of HCV-NS5A *in vitro*. *Cell Death Dis*,

- 2020, 11: 200
- 19 Ozu M, Galizia L, Acuña C, et al. Aquaporins: More than functional monomers in a tetrameric arrangement. *Cells*, 2018, 7: 209–233
 - 20 Maggio R, Fasciani I, Carli M, et al. Integration and spatial organization of signaling by G protein-coupled receptor homo- and heterodimers. *Biomolecules*, 2021, 11: 1828–1844
 - 21 Comps-Agrar L, Kniazeff J, Nørskov-Lauritsen L, et al. The oligomeric state sets GABAB receptor signalling efficacy. *EMBO J*, 2011, 30: 2336–2349
 - 22 Bustamante A, Rivera R, Floor M, et al. Single-molecule optical tweezers reveals folding steps of the domain swapping mechanism of a protein. *Biophys J*, 2021, 120: 4809–4818
 - 23 Zhao C, DeGroot A C M, Hayden C C, et al. Receptor heterodimerization modulates endocytosis through collaborative and competitive mechanisms. *Biophys J*, 2019, 117: 646–658
 - 24 Szymańska A, Jankowska E, Orlikowska M, et al. Influence of point mutations on the stability, dimerization, and oligomerization of human cystatin C and its L68Q variant. *Front Mol Neurosci*, 2012, 5: 82
 - 25 Duan G, Walther D. The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS Comput Biol*, 2015, 11: e1004049
 - 26 Ercan-Herbst E, Ehrig J, Schöndorf D C, et al. A post-translational modification signature defines changes in soluble Tau correlating with oligomerization in early stage Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7: 192
 - 27 Qian B, Ma B S, Liu Y. A survey of models for protein-protein interactions prediction (in Chinese). *J Guangzhou Univ (Nat Sci Ed)*, 2023, 22: 25–32 [钱冰, 马宝山, 刘玉. 蛋白质与蛋白质相互作用预测模型综述. 广州大学学报(自然科学版), 2023, 22: 25–32]
 - 28 Huang H, Chen L X. Application of bioinformatics methods in predicting protein interactions (in Chinese). *Med Innov China*, 2010, 7: 179–181 [黄浩, 陈临溪. 生物信息学方法在预测蛋白质相互作用中的应用. 中国医学创新, 2010, 7: 179–181]
 - 29 Chen Y C, Chen Y H, Wright J D, et al. PPI-hotspot^{DB}: Database of protein-protein interaction hot spots. *J Chem Inf Model*, 2022, 62: 1052–1060
 - 30 Kermani A A. Applications of fluorescent protein tagging in structural studies of membrane proteins. *FEBS J*, 2023, doi: 10.1111/febs.16910
 - 31 Cevheroğlu O, Kumaş G, Hauser M, et al. The yeast Ste2p G protein-coupled receptor dimerizes on the cell plasma membrane. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2017, 1859: 698–711
 - 32 Cevheroğlu O, Murat M, Mingu-Akmete S, et al. Ste2p under the microscope: The investigation of oligomeric states of a yeast G protein-coupled receptor. *J Phys Chem B*, 2021, 125: 9526–9536
 - 33 Su B, Zhang X, Li L, et al. Dynamic spatial reorganization of BSK1 complexes in the plasma membrane underpins signal-specific activation for growth and immunity. *Mol Plant*, 2021, 14: 588–603
 - 34 Dunsing V, Luckner M, Zühlke B, et al. Optimal fluorescent protein tags for quantifying protein oligomerization in living cells. *Sci Rep*, 2018, 8: 10634
 - 35 Qian H P, Luo P Y, Liu S, et al. Halo-tag labeling technology and its application in plant living cell imaging (in Chinese). *Chin Bull Bot*, 2023, 58: 475–485 [钱虹萍, 罗鹏云, 刘帅, 等. Halo-tag标记技术及其在植物细胞成像中的应用. 植物学报, 2023, 58: 475–485]
 - 36 Wilhelm J, Kühn S, Tarnawski M, et al. Kinetic and structural characterization of the self-labeling protein Tags HaloTag7, SNAP-tag, and CLIP-tag. *Biochemistry*, 2021, 60: 2560–2575
 - 37 Minner-Meinen R, Weber J N, Albrecht A, et al. Split-Halo tag imaging assay for sophisticated microscopy of protein-protein interactions in planta. *Plant Commun*, 2021, 2: 100212
 - 38 Maurel D, Comps-Agrar L, Brock C, et al. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: Application to GPCR oligomerization. *Nat Methods*, 2008, 5: 561–567
 - 39 Mie M, Naoki T, Kobatake E. Development of a split SNAP-CLIP double labeling system for tracking proteins following dissociation from protein-protein complexes in living cells. *Anal Chem*, 2016, 88: 8166–8171
 - 40 Jung K H, Kim S F, Liu Y, et al. A fluorogenic *AggTag* method based on Halo- and Snap-tags to simultaneously detect aggregation of two proteins in live cells. *ChemBioChem*, 2019, 20: 1078–1087
 - 41 Yang M Y, Chen P. Advances in biological orthogonal labeling reactions (in Chinese). *Acta Chim Sin*, 2015, 73: 783–792 [杨麦云, 陈鹏. 生物正交标记反应研究进展. 化学学报, 2015, 73: 783–792]
 - 42 Siegl S J, Galeta J, Dzajak R, et al. An extended approach for the development of fluorogenic *trans*-cyclooctene-tetrazine cycloadditions. *Chembiochem*, 2019, 20: 886–890
 - 43 Pan H, Li W, Yao X, et al. *In situ* bioorthogonal metabolic labeling for fluorescence imaging of virus infection *in vivo*. *Small*, 2017, 13: 1604036–1604044

- 44 Serfling R, Seidel L, Bock A, et al. Quantitative single-residue bioorthogonal labeling of G protein-coupled receptors in live cells. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 1141–1149
- 45 Hu R, Huang G X, Yang G Q. Biological orthogonal fluorescent labeling of proteins based on AIE compounds and its application in the detection of protein-protein interaction (in Chinese). Abstracts of the 30th Annual Meeting of the Chinese Chemical Society—Chapter 27: Photochemistry. Dalian, Liaoning, China, 2016. 1 [胡睿, 黄国贤, 杨国强. 基于AIE化合物的蛋白质生物正交荧光标记及在蛋白-蛋白相互作用检测过程中的应用. 中国化学会第30届学术年会摘要集——第二十七分会: 光化学. 中国辽宁大连, 2016. 1]
- 46 Qu S F, Lin J X, Li X J. FCS/FCCS and their application in plant cell biology (in Chinese). *J Chin Electron Microsc Soc*, 2014, 33: 461–468 [曲绍峰, 林金星, 李晓娟. FCS/FCCS技术及其在植物细胞生物学中的应用. 电子显微学报, 2014, 33: 461–468]
- 47 Tiwari M, Mikuni S, Muto H, et al. Determination of dissociation constant of the NFκB p50/p65 heterodimer using fluorescence cross-correlation spectroscopy in the living cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436: 430–435
- 48 Hink M A, Shah K, Russinova E, et al. Fluorescence fluctuation analysis of *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinase and brassinosteroid insensitive 1 receptor oligomerization. *Biophys J*, 2008, 94: 1052–1062
- 49 Wang L, Li H, Lv X, et al. Spatiotemporal dynamics of the BRI1 receptor and its regulation by membrane microdomains in living *Arabidopsis* cells. *Mol Plant*, 2015, 8: 1334–1349
- 50 Machan R, Yavas S, Wohland T. Mapping epidermal growth factor receptor (EGFR) dimerization by imaging fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophys J*, 2016, 110: 428a
- 51 Giakoumakis N N, Rapsomaniki M A, Lygerou Z. Analysis of protein kinetics using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Methods Mol Biol*, 2017, 1563: 243–267
- 52 Dorsch S, Klotz K N, Engelhardt S, et al. Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Methods*, 2009, 6: 225–230
- 53 Sieber J J, Willig K I, Kutzner C, et al. Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science*, 2007, 317: 1072–1076
- 54 Youn B S, Lepock J R, Borrelli M J, et al. *In vivo* resolution of oligomers with fluorescence photobleaching recovery histograms. *Cell Stress Chaper*, 2006, 11: 170–179
- 55 Wang J P, Liu B, Sun Y, et al. Enzyme-enzyme interactions in monolignol biosynthesis. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1942
- 56 García-Sáez A J, Schwill P. Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions. *Methods*, 2008, 46: 116–122
- 57 Godoy B I, Vickers N A, Andersson S B. An estimation algorithm for general linear single particle tracking models with time-varying parameters. *Molecules*, 2021, 26: 886–907
- 58 Wang X, Li X, Deng X, et al. Single-molecule fluorescence imaging to quantify membrane protein dynamics and oligomerization in living plant cells. *Nat Protoc*, 2015, 10: 2054–2063
- 59 Reiner A, Arant R J, Isacoff E Y. Assembly stoichiometry of the GluK2/GluK5 kainate receptor complex. *Cell Rep*, 2012, 1: 234–240
- 60 Song K, Xue Y, Wang X, et al. A modified GFP facilitates counting membrane protein subunits by step-wise photobleaching in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*, 2017, 213: 129–133
- 61 Cui Y, Yu M, Yao X, et al. Single-particle tracking for the quantification of membrane protein dynamics in living plant cells. *Mol Plant*, 2018, 11: 1315–1327
- 62 Xu C, Abbas S, Qian H, et al. Environmental cues contribute to dynamic plasma membrane organization of nanodomains containing flotillin-1 and hypersensitive induced reaction-1 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 897594
- 63 Wang Q, Zhao Y, Luo W, et al. Single-particle analysis reveals shutoff control of the *Arabidopsis* ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 13204–13209
- 64 Xue Y, Xing J, Wan Y, et al. *Arabidopsis* blue light receptor phototropin 1 undergoes blue light-induced activation in membrane microdomains. *Mol Plant*, 2018, 11: 846–859
- 65 Zhang X, Cui Y, Yu M, et al. Phosphorylation-mediated dynamics of nitrate transporter NRT1.1 regulate auxin flux and nitrate signaling in lateral root growth. *Plant Physiol*, 2019, 181: 480–498
- 66 Sun L L, Su Y Y, Gao Y J, et al. Progresses of single molecular fluorescence resonance energy transfer in studying biomacromolecule dynamic process (in Chinese). *Chin J Anal Chem*, 2018, 46: 803–813 [孙乐乐, 苏莹莹, 高延静, 等. 单分子荧光共振能量转移用于生物大分子构象动态变化过程研究进展. 分析化学, 2018, 46: 803–813]
- 67 Zhao Y F. Single molecule fluorescence resonance energy transfer technique (in Chinese). *Chin Bull Life Sci*, 2011, 23: 1140–1144 [赵永芳. 单分子荧光共振能量转移技术. 生命科学, 2011, 23: 1140–1144]
- 68 Asher W B, Geggier P, Holsey M D, et al. Single-molecule FRET imaging of GPCR dimers in living cells. *Nat Methods*, 2021, 18: 397–405

-
- 69 Yoo J, Kim J Y, Louis J M, et al. Fast three-color single-molecule FRET using statistical inference. [Nat Commun](#), 2020, 11: 3336
- 70 Jinwoo L, Sanghwa L, Kaushik R, et al. First realization of single-molecule four-color FRET. [Biophys J](#), 2010, 100: 349a
- 71 Hoi S, Meng F, Kim J, Louis J M. Multi-color single molecule FRET study of intrinsically disordered protein binding. [Biophys J](#), 2016, 110: 555a–556a
- 72 Nguyen D, Abdullin D, Heubach C A, et al. Unraveling a ligand-induced twist of a homodimeric enzyme by pulsed electron-electron double resonance. [Angew Chem Int Ed](#), 2021, 60: 23419–23426
- 73 Bleicken S, Jeschke G, Stegmüller C, et al. Structural model of active Bax at the membrane. [Mol Cell](#), 2014, 56: 496–505
- 74 Carrington B, Myers W K, Horanyi P, et al. Natural conformational sampling of human TNF α visualized by double electron-electron resonance. [Biophys J](#), 2017, 113: 371–380
- 75 Yang Y, Chen S N, Yang F, et al. In-cell destabilization of a homodimeric protein complex detected by DEER spectroscopy. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2020, 117: 20566–20575

Summary for “蛋白质寡聚化的活体检测技术及其研究进展”

Technology and research progress on *in vivo* protein oligomerization detection

Pengyun Luo, Yanjun Li, Xinxiu Zuo, Hongping Qian, Changwen Xu, Jinxing Lin & Yaning Cui*

Forest Tree Breeding and Ecological Restoration, National Engineering Research Center, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Bioengineering of Tree and Flower Breeding, National Forestry and Grassland Administration, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

* Corresponding author, E-mail: cuiyaning@bjfu.edu.cn

Proteins are large molecules of specific conformations, and their functions vary depending on their structure. As the key components involved in life processes, proteins often assemble into large complexes called oligomers to execute important activities. Oligomers are of two types: Homologous and heterologous. The homologous oligomers contain subunits of the same polypeptide chain, whereas the heterologous ones consist of two or more polypeptide chains with different amino acids or different biopolymers, such as nucleic acids. These oligomer complexes play significant roles in regulating enzyme activity, signal transduction, and cell adhesion. Oligomerization can increase protein concentration in local space to provide higher stability and enhance the specificity in a molecular recognition process. Oligomerization is influenced by factors such as the types of ligands, proteins, and temperature. For example, receptor proteins are often assembled into dimeric or higher-order oligomers mediated by their corresponding ligands, which promote downstream signaling cascades to transmit signals. The formation mechanisms of oligomeric proteins can be categorized into the following four types: Domain exchange, ligand-induced oligomerization, interfacial point mutation, and post-translational modification. Domain exchange allows functional conversion between protein monomers and oligomers. Ligands can induce oligomerization to activate protein activity, as is typically observed in receptor proteins. Interfacial point mutation involves changes in the amino acid sequence, insertion, or deletion of residues in an interfacial region, which distinguishes different oligomerization states. Post-translational modifications are essential for functional protein formation, although errors in modifications can result in the formation and accumulation of abnormal oligomers, which potentially contribute to disease development. Therefore, analyzing protein oligomerization is crucial for understanding biological processes such as protein-protein/ligand interactions, signal transduction, and disease-related mechanisms. Researchers have optimized the study of protein oligomerization from different perspectives, including predicting and identifying interacting proteins, labeling target proteins, and observing them through imaging. The conventional techniques such as co-immunoprecipitation (Co-IP) and yeast two-hybrid precipitation have some limitations, such as the inability to investigate directly in living cells as well as the possibility of giving false-positive or false-negative results. In recent years, however, the emergence of new technologies has enabled real-time, dynamic, and *in vivo* observation of protein-protein interactions, which has significantly contributed to the advancements in this field. For instance, the use of more stable and photobleaching-resistant fluorescent probes, combined with high-speed imaging techniques, has improved the temporal and spatial resolution in observing the dynamic behavior and interactions of proteins. In addition, the combination of emerging technologies and algorithms has expanded the scope of protein explored at both temporal and spatial scales, which has deepened our understanding of the relation between protein structure and function. This review summarizes the classification and formation mechanisms of oligomeric proteins, as well as highlights several major technologies for analyzing protein complex oligomerization, and provides an overview of the recent research progress in protein labeling and *in vivo* detection technologies. Finally, it offers a prospective outlook on the development of research in protein oligomerization, intending to provide theoretical references for researchers in selecting appropriate analytical techniques.

protein oligomerization, protein-protein interaction, protein labeling, *in vivo* determination

doi: [10.1360/TB-2023-1177](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1177)