

邻近标记在蛋白质组学中的发展及应用

苏田, 韩笑, 刘华东*

(西安交通大学生命学院线粒体生物医学研究所, 西安 710049)

摘要 人体内各种复杂的生命活动离不开蛋白质之间的相互作用。这种相互作用具有瞬时性和结合力弱等特点, 并受到多种动态调节, 特别是蛋白质翻译后修饰 (post-translation modifications, PTM)。传统的亲和质谱检测方法存在蛋白纯化的局限性, 在高效检测到动态变化方面存在不足。邻近标记是一种能够给与靶蛋白质瞬时靠近, 或者互作 (邻近) 的蛋白质加上生物素的技术, 它与质谱检测技术的联合使用能检测细胞过程中弱的、瞬时的蛋白质相互作用, 有效解决上述问题。本文综述了基于生物素的邻近标记方法的发展现状, 从依赖于融合序列的生物素标记开始, 依次介绍有关生物素连接酶、过氧化物酶及其进化后的 2 代标记方法等经典生物素标记的方法和原理, 比较各个方法间的差异和优缺点; 也列举了一些近年来新出现的标记方法, 如将生物素连接酶进行拆分、鉴定蛋白质在不同复合物中功能的方法、抗体靶向的标记方法, 以及其他来源的生物素连接酶突变体, 例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 C 端氨基酸突变的生物素连接酶, 能够应用在苍蝇和蠕虫中的生物素连接酶突变体。本文对这些方法进行归纳总结, 旨在为初步接触该领域的科研工作者提供参考, 同时也希望能够提供一些新的思路, 推动蛋白质相互作用组学的发展。

关键词 蛋白质之间的相互作用; 邻近标记; 蛋白质翻译后修饰; 生物素标记

中图分类号 Q5; Q7

The Proceedings and Applications of Proximity Labeling in Proteomics

SU Tian, HAN Xiao, LIU Hua-Dong*

(Institute of Mitochondrial Biology and Medicine, The School of Life Science and Technology,

Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract The complexity of life activities in humans are inseparable from protein-protein interactions (PPIs). Most PPIs are dynamic, especially by numerous transient post-translational modifications (PTM). Proximity labeling is a recently developed technique, which labels the potential binding proteins of a target protein based on proximity by biotin. It can be used in combination with mass spectrometry to detect weak and transient PPIs in cellular processes. This paper reviews the development of different biotin-based proximity labeling methods. Starting from the biotin labeling method based on the fused substrate sequences, the principle of other labeling probes such as BirA*, an engineered peroxidase (APEX), *Bacillus subtilis* (BASU) and APEX2 are discussed. Methods developed in the past few years such as antibody-targeted proximity labeling and split BioID are also introduced. The application and prospect of these methods in investigating PPIs might inspire new researches in this field.

Key words protein-protein interaction; proximity labeling; protein post-translational modification; biotin labeling

收稿日期: 2019-05-07; 修回日期: 2019-07-08; 接受日期: 2019-07-18

陕西省自然科学面上项目 (No.2017JM3027) 资助

* 通讯作者 Tel: 029-8266-9021; E-mail: huadongliu@xjtu.edu.cn

Received: May 7, 2019; Revised: July 8, 2019; Accepted: July 18, 2019

Supported by Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No.2017JM3027)

* Corresponding author Tel: 029-8266-9021; E-mail: huadongliu@xjtu.edu.cn

蛋白质除了作为细胞骨架、催化酶及信号分子之外,更是复杂蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络中的节点。以 PPI 为研究对象的蛋白质相互作用组学在疾病的发病机制、靶点确定、早期诊断和治疗中均发挥重要作用。然而, PPI 大多以蛋白质翻译后修饰调节, 是一个动态调节的过程, 具有瞬时性、弱相互作用和多因素调节等特点。这些特点使得传统的检测和富集方法, 例如, 亲和纯化质谱 (affinity purification mass spectrometry, AP-MS)^[1]、免疫共沉淀 (coimmunoprecipitation, Co-IP)^[2], 并不能完全反映细胞内的真实情况。

邻近标记法是新近发展的能够在活细胞中检测瞬时和弱相互作用的有效方法之一。随着近年来的发展, 邻近标记法也在不断地更新进步。例如, 含有特定序列的融合蛋白标记^[3]、大肠杆菌中的生物素连接酶突变体的非序列依赖标记 (biotin identification, BioID)^[4]、过氧化物酶的生物素标记 (an engineered peroxidase, APEX)^[5], 以及现在的 BioID2^[6]、APEX2^[7]、来源于枯草芽孢杆菌中的生物素连接酶的标记 (from *Bacillus subtilis*, BASU)^[8] 和依赖于抗体靶向的邻近标记^[9]。这些不断改进的邻近标记方法推动了蛋白质相互作用组学的发展。本文总结归纳近些年的邻近标记法, 对其原理和方法进行基本的阐述并对比各方法的优缺点, 为初步接触该领域的科研工作者提供参考。

1 经典邻近标记方法

1.1 生物素连接酶 (BirA) 与生物素 (biotin)

2001 年, Parrott 等人利用亲和素 (avidin) 和生物素之间强烈的特异性结合, 提出 BirA 能够催化生物素标记蛋白质^[10]。BirA 是一种生物素连接酶, 存在于大部分微生物体内, 分子量约为 35.5 kD, 能够介导乙酰辅酶 A 羧化酶亚基, 将蛋白质序列中的特定赖氨酸残基生物素化, 并且转录调节生物素合成操纵子^[11-17]。BirA 有 3 个结构域, 分别是: N 端结构域、C 端结构域以及中心催化结构域。其中, 中心催化结构域负责结合三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 及靶蛋白质^[16, 18, 19]。其作用机制如图 1 所示, 在 ATP 的作用下, BirA 能够催化 ATP 和生物素反应形成 5'-AMP-biotin, 并将其保持在催化中心^[18]。之后, 靶蛋白中赖氨酸残基的 ϵ 氨基会和 BirA 的反应中心结合, 将 5'-AMP-biotin 的生物素以酰胺键结合形式转移到靶蛋白质上面^[4, 12]。

在早期的邻近标记方法中, de Boer 设计了红系特异核蛋白转录因子 (GATA-binding factor 1, GATA-1) 和一段含有 23 个氨基酸的多肽的融合蛋白质。该多肽来自于能够被 BirA 介导生物素化的合成肽库, 在多肽上面有特定的赖氨酸残基。将该融合蛋白和 BirA 在小鼠红白血病 (mouse erythroleukemia, MEL) 细胞中共表达时, 在 BirA 的催化下, 该多肽上的赖氨酸残基能被生物素化, 并且给 GATA-1 蛋白加上生物素。再利用辣根过氧化物酶标记链霉亲和素 (streptavidin-Horseradish peroxidase, streptavidin-HRP) 对生物素化的蛋白质进行 Western 印迹检测^[3]。利用此技术, 他们检测到与目标蛋白质 GATA-1 相互作用的分子, 从而找到其潜在的分子靶点, 并且证明 GATA-1 蛋白与多肽序列融合后, 蛋白质的特异性生物素化不会对蛋白质的结合特性产生影响^[3]。这是最早报道的邻近标记方法, 也是 BioID 的前身。

2008 年, Fernandez-Suarez 等^[12, 18]把这种能够被 BirA 标记的序列称为受体序列 (acceptor sequence, AS 序列或是 biotin accept peptide, BAP)。为了研究蛋白质 A 和 B 在细胞内是否相互作用, 正如 Fig.1 所示, 将目标蛋白质 A 与 BirA 构建融合蛋白质, 目标蛋白质 B 和一段 BAP 序列融合, 并在细胞中共表达。如果目标蛋白质 A 和 B 因为相互作用而靠近, 在 ATP 存在的条件下, BirA 会催化添加生物素在 BAP 序列的赖氨酸侧链氨基上^[6, 18]。基于生物素与链霉亲和素 (streptavidin) 的结合, 可以检测目标蛋白质 A 与 B 是否相互作用。该标记方法用途广泛, 适用于 *in-vitro* 或 *in-vivo* 标记; 既可以检测一个细胞中的 PPI, 也可以检测 2 个不同细胞中的 PPI^[10]。此后, Arman Kulyyassov 及合作者通过设计不同序列的 BAP, 使其易于被液相色谱与质谱联用 (liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS/MS), 或是 Western 印迹检测。这种基于 BirA, 与其底物 BAP 的蛋白质-蛋白质相互作用检测方法被称为基于邻近生物素化的质谱检测 (proximity utilizing biotinylation and mass spectrometry, PUB-MS)。

1.2 BioID 和 BioID2

2004 年, Choi-Rhee 等人对 BirA 进行突变研究, 筛选出 R118G 的 BirA (BirA*)。与 BirA 仅能生物素化一种蛋白质相比, BirA* 不需要特定的底物序列, 能够将生物素与体内的大量细胞蛋白质结合, 同时能和体外的牛血清白蛋白、氯霉素乙酰转移酶、免疫球蛋白重链和轻链以及核糖核酸酶 A (ribonuclease A, RNase A) 相连, 使得在体内和体外

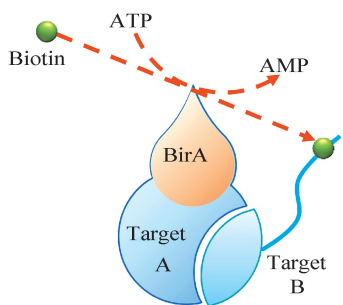


Fig.1 The mechanism of BirA The target protein A was fused with BirA, a biotin-protein ligase from *E. coli*. The target protein B was fused with BirA's substrate BAP. If there is an interaction between target protein A and B in cells, the lysine in BAP will be biotinylated by BirA in the presence of ATP

发生自身生物素化^[4]。同时, BirA* 蛋白与野生型的 BirA 蛋白相比, 活性相对较高, 使蛋白质发生生物素化的程度是相似的^[4]。对 BirA* 的晶体结构进行 X 衍射分析, 发现 R118G 突变能够显著降低酶促反应中心对 5'-AMP-biotin 的结合力^[12, 15]。一旦脱离催化中心, 5'-AMP-biotin 会与邻近蛋白质上的伯胺, 例如赖氨酸侧链, 发生共价交联, 给距离 BirA* 10 nm 周围的蛋白质添加生物素。游离的 5'-AMP-biotin 非常不稳定, 会快速水解, 无法对远距离的蛋白质进行标记^[18, 20, 21]。这种不需要将目标蛋白质与 BAP 序列进行融合, 就能给细胞内蛋白质加上生物素的方法, 称为 BioID (Fig.2)。

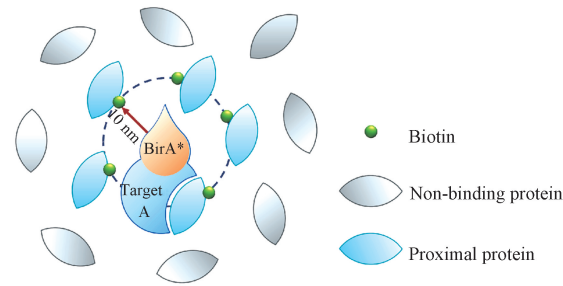


Fig.2 BioID The target protein A is fused with BirA*, a mutant of BirA that has lost sequence specificity of biotinylation. In the presence of ATP and biotin, BirA* adds the biotin label onto proteins within the distance of 10 nm to the target protein A

大量研究表明, BirA* 标记的最佳时间为 15~18 h, 标记后的蛋白质可以被负载 streptavidin 的树脂捕获, 经由质谱分析鉴定。从 2004 年到 2016 年, BioID 更是被成功应用于研究哺乳动物细胞和单细胞真核生物中的多种蛋白质及其作用过程, 并且已

被证明特别适用于研究不溶性或难以接近的细胞结构, 以及检测蛋白质间相对结合力较弱、结合时间较短的相互作用^[22]。

无论是在蛋白质的亚细胞定位还是功能动态调节等研究方面, BioID 都发挥了很大的作用, 人们将 BioID 与高灵敏质谱检测技术结合起来, 用于蛋白质复合物构型鉴定^[20]、细胞器内蛋白质组分析^[23]和蛋白质相互作用组鉴定等^[22]。在 2016 年, Kim 等人提出了第二代的 BioID, 即 BioID2, 一种更小的生物素连接酶。区别于来自 *E. coli* 的一代 BioID, BioID2 来源于 *A. aeolicus* 的 BirA (R40G)。Kim 等人通过对 BirA 的晶体结构进行分析, 发现来自于 2 个不同种属的蛋白质在结构上具有相似性, 但是来自于 *A. aeolicus* 的 BirA 没有 DNA 结合结构域^[4, 6, 15, 21, 24]。BioID2 与第一代相比, 标记效果显著提高, 能够更灵活地靶向融合蛋白质, 可耐受 50 °C 高温, 需要加入的 biotin 更少, 且对邻近蛋白质的标记效果更强^[6, 18]。因此, BioID2 提高了筛选蛋白质-蛋白质结合的效率^[6]。同时, 他们还证明了 BioID2 的生物素化范围可以通过调节衔接部位的柔性进行变化, 从而适应不同研究的标记半径要求^[6]。因为其结构较小, BioID2 可以实现更精准的靶向, 从而实现融合蛋白质的功能。此外, 与 BioID 相比, BioID2 的生物素化范围和效率显著增强, 因此能够检测到第一代连接酶难以生物素化的蛋白质^[6]。

1.3 APEX 和 APEX2

BioID 的广泛应用给蛋白质互作组的动态调节研究带来了新的活力。但是, 仍然存在着标记时间过长等问题。为了解决这些问题, 人们在研究过程机制的同时, 也在尝试更新关于邻近标记的新方法。在 2013 年, Ting 组首次报道了使用 APEX 代替 BirA 可以实现对邻近蛋白质的快速标记^[18, 23]。正如 Fig.3 所示, 在过氧化氢 (H₂O₂) 的存在下, APEX 能催化生物素-酪胺 (biotin-tyramide) 或生物素-苯酚 (biotin-phenol) 产生短寿命的自由基, 例如酚芳基叠氮衍生物^[25]或酪胺衍生物^[26]。这些自由基可以共价连接到富含电子的氨基酸侧链, 与特定氨基酸共价反应, 包括酪氨酸 (Tyr), 色氨酸 (Trp), 半胱氨酸 (Cys) 和组氨酸 (His)^[5, 23, 27]。

2014 年, 他们将 APEX 技术与稳定同位素标记技术 (stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC) 相结合, 以大幅减少不需要的背景, 并实现纳米空间分辨率, 并将该方法应用于绘制线

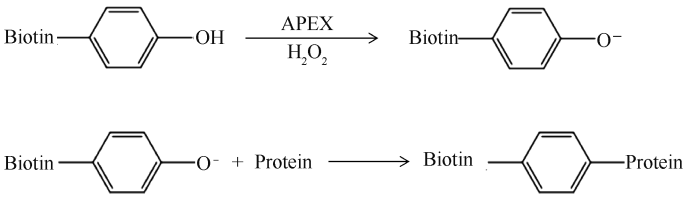


Fig.3 Biotin-phenol (biotin-tyramide) catalytic schematic Biotin-phenol (biotin-tyramide) is catalyzed by APEX in the presence of H₂O₂ to form biotin phenolic groups, which can proximally react with residues of proteins, such as Cys, Tyr and Trp

粒体膜间隙 (intermembrane space, IMS) 的蛋白质组^[5]。在之前的研究中,因为亚细胞结构域不易纯化,它们的蛋白质组大多都处于未知状态^[5]。此次研究鉴定了 127 种线粒体膜间隙蛋白质。其中,包括 9 种新的线粒体蛋白质,其鉴定特异性大于 94%^[5]。将 APEX 融合线粒体基质定位序列,AY Ting 团队先后使用该方法鉴定了人类线粒体基质中的 495 种蛋白质。其中,包括之前认为与线粒体不相关的 31 种蛋白质^[5, 23]。APEX 技术的出现给标记方法注入新的血液,但是也存在着一一定的缺点。APEX 的表达水平需要优化,当它表达水平过低时,标记生物素的活性会降低,使被标记蛋白质较少,导致一些变化无法被检测到。在表达水平过高时,对细胞有害。例如,AY Ting 团队发现,当靶向线粒体外膜和内质网膜的 APEX 融合载体过度表达时,会引起细胞器聚集^[7]。

2015 年,出现了新一代的 APEX 技术。Lam 等^[7]通过引入 A134P 的单突变建立升级的 APEX 技术,即 APEX2。他们将 APEX 和 APEX2 在人肾上皮 293 细胞 (human embryonic Kidney 293 cell, HEK293) 中表达,在 biotin-phenol 的存在下,用 H₂O₂ 处理 1 min,并将收集的细胞裂解。Western 印迹检测结果表明,APEX2 的活性比 APEX 更强。同时,在显微镜下也观察到,很多转染 APEX2 的细胞虽然表达水平较低,但是仍具有很高的生物素化活性。在细胞成像研究中能清晰的看到,用慢病毒感染细胞,使其维持在一个较低的表达水平时,能够看到 APEX2 具有非常高的生物素化,APEX 则几乎无法观测到这种效果,或是生物素化无法被检测到。新的 APEX2 克服了早先的 APEX 技术表达水平低、催化活性差和灵敏度低等问题,在催化效率和活性等方面有很大的提升。APEX 和 APEX2 方法能够在活细胞中标记蛋白质,用于鉴定候选的 PPIs 和绘制亚细胞区室的蛋白质^[18]。这种新技术更为快速和方便,能够使我们得到以前无法获得的细胞区域

蛋白质组。

2 其他邻近标记法

2.1 拆分-BioID

许多蛋白质可以与不同蛋白质组成复合物,发挥迥异的功能。AP-MS 能够鉴定蛋白质间的相互作用,却难以揭示该互作所参与的通路。AP-MS 能够鉴定蛋白质间的相互作用,但是它却无法鉴定蛋白质在哪一个途径发挥着功能。拆分-BioID (Split-BioID) 是一种条件蛋白质组学方法。BirA^{*} 分成的两个结构域在足够靠近时激活其生物素标记能力,当分别融合在目标蛋白质上时,可以验证两种蛋白质间是否相互作用,进而检测该互作发挥功能的通路^[28]。Isabel Myriam Schopp 等人将 BirA^{*} 从 3 个位点进行拆分,拆分后的 N 端的 BirA^{*}—NBirA^{*} 和 C 端的 BirA^{*}—CBirA^{*},能分别与两个蛋白质融合,当这两个融合蛋白质因为相互作用而靠近时,会形成完整的 BirA^{*},从而具有催化活性。他们就将 NBirA^{*} 和 CBirA^{*} 分别和雷帕霉素受体蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 中的 FRB 结构域 (FKBP-12-rapamycin binding domain, FRB) 与受体蛋白 FKBP (12-kDa FK506-binding protein, FKBP) 融合。当加入雷帕霉素 (rapamycin) 时,FRB 能够和 FKBP 相互作用,形成完整的 BirA^{*}。在生物素的存在下,能够给周围的蛋白质加上生物素。

2017 年,该方法被应用于非编码 RNA (microRNA, miRNA) 介导的沉默通路。Ago2 (argonaute 2, Ago2) 是 miRNA 介导沉默的相关蛋白质,参与 2 个复合物的形成: miRNA 诱导的沉默复合物 (miRNA-induced silencing complex, miRISC) 和 RISC 加载复合物 (RISC-loading complex, RLC)。核糖核酸内切酶 (Dicer) 属于 miRISC,而 TNRC6 (Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein) 属于 RLC。通过 Split-BioID 技术,将 CBirA^{*} 和 Ago2 融

合, NBirA* 分别 Dicer 或 TNRC6 融合, 成功鉴定了 Ago2 作为不同复合物组分时参与的通路^[28]。

2.2 新型的 BirA-BASU

2018 年, Ramanathan 等^[8]在研究 RNA 与蛋白质之间的相互作用时, 发现一种新型的 BirA 类似物 BASU。这是一种来自于 *Bacillus subtilis* 的 BirA 的突变体, 去掉了 N 端 1~65 个氨基酸, 并突变 C 末端, 产生了具有类似于大肠杆菌 BirA* 的 SLR 末端的 BASU, 使其能够将标记反应时间减少到 1 h。而 BioID2 则需要 18 h 以上的标记时间, 所产生的链酶抗生物素信号也不如 BASU 强。经研究证明, APEX2 的标记速度与 BASU 类似, 但是 APEX2 需要给细胞中加入 biotin-tyramide 或者是 biotin-phenol 和 H₂O₂, 会造成细胞毒性。而来自于 *E. coli* 的 BirA* 虽然可以研究一些模式生物中的 PPI, 但是标记动力学较差, BASU 则能够将反应动力学提速至 1 000 倍以上, 并将信噪比增大到 30 倍以上。同时, BASU 的标记动力学和使用的试剂是无毒性的, 这表明它可应用于组织中短时间研究^[8]。

2.3 基于二抗 HRP 的邻近标记

最近, Bar 等^[9]提出, 可以利用抗体将生物素富集, 并引导到固定的细胞和原代组织中的相邻蛋白质上。他们使用该方法在多种处理条件下, 分析了细胞和组织类型中的核纤层蛋白 A / C 的动态相互作用组, 发现不同组织的核膜组成有相当大的变化^[9]。无论是 BioID 还是 APEX, 都需要构建 BirA 或者是 APEX 与目的蛋白质的融合基因, 这就使得无法将这些方法应用于原代组织或者是部分现有的动物模型。为了克服这些问题, 他们提出了新的利用抗体引导的, 基于邻近标记的方法。二抗的 HRP 在过氧化氢和苯酚生物素的存在下催化产生自由基, 使得抗体附近的蛋白质生物素化。这种方法被称为抗体识别生物素化 (by antibody recognition, BAR), 以鉴定抗原附近的蛋白质^[9]。他们将该方法应用于鉴定永生细胞系, 原代细胞培养和原代细胞中核纤层蛋白 A / C 的相互作用^[9]。

2.4 TurboID

上述如 BioID 和 APEX 等标记方法, 都存在着标记时间过长, 或者是使用具有细胞毒性的化学药品等问题。而在 2018 年, Branon 等^[29]提出了基于酵母定向进化设计的 2 个突变生物素连接酶, TurboID 和 miniTurbo。这 2 种酶比 BioID 或者是 BioID2 的标记效率更高, 能够在 10 min 内对细胞进行无毒害的快速标记。同时, 该方法能够应用于苍

蝇和蠕虫, 拓展了研究范围。Branon 等^[29]将酶库里的酵母表面和荧光激活的细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 结合在一起进化, 并对之后产生的一系列突变体进行筛选。最终, 他们获得 2 个连接酶: TurboID 和 miniTurbo。其中, TurboID 有 35 kD, 相较于野生型的 BirA, 有 15 个突变; miniTurbo 为 28 kD, 相较于野生型的 BirA, 缺失 N 末端结构域并且有 13 个突变。经过研究证明, 他们发现这 2 种酶催化标记的效率高于 BioID, 在早期检测到的信号是后者的 3~6 倍, 后期则能达到 15~23 倍。TurboID 也同 BASU 进行比较, 结果发现, TurboID 在 10 min 内, 标记的蛋白质几乎和后者 18 h 标记的一样多。而 miniTurbo 虽然活性比 TurboID 要低 1.5~2 倍, 但其标记效率仍高于其他标记方法^[29]。

3 问题与展望

邻近标记法是蛋白质动态相互作用检测的有效方法, 结合高分辨质谱技术, 在揭示细胞内蛋白质功能调节发挥重要作用, 回答了一些以前无法解决的问题。新型邻近标记蛋白 APEX2 和 BioID2 在标记能力和标记速度上均有大幅提升, BASU 更进一步的缩短了标记时间, BAR 则将临近标记的范围拓展到了原代细胞上。在实际工作中, 我们将 APEX2 技术和抗体靶向的标记技术应用于蛋白质互作中, 期望能鉴定到一些与靶蛋白瞬时作用的蛋白质, 目前已经取得了初步的进展。值得注意的是, 在使用这些方法时, 不可避免的会产生一些非特异性吸附, 这给后续的数据分析造成了一定的困扰。如何降低非特异性吸附, 仍需要进一步的探索。目前来说, 邻近标记方法正在飞速发展, 无论是方法上的增强, 还是适用范围的拓广, 相信都会为揭示蛋白质功能调节提供更多方法。

参考文献 (References)

- [1] Liu H, Galka M, Mori E, *et al.* A method for systematic mapping of protein lysine methylation identifies functions for HP1beta in DNA damage response[J]. *Mol Cell*, 2013, **50**(5): 723-735
- [2] Carlson SM, Moore KE, Green EM, *et al.* Proteome-wide enrichment of proteins modified by lysine methylation[J]. *Nat Protoc*, 2014, **9**(1): 37-50
- [3] de Boer E, Rodriguez P, Bonte E, *et al.* Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(13): 7480-7485
- [4] Choi-Rhee E, Schulman H, Cronan JE. Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase[J]. *Protein Sci*, 2004, **13**(11): 3043-3050
- [5] Hung V, Zou P, Rhee HW, *et al.* Proteomic mapping of the

- human mitochondrial intermembrane space in live cells via ratiometric APEX tagging[J]. *Mol Cell*, 2014, **55**(2): 332-341
- [6] Kim DI, Jensen SC, Noble KA, *et al.* An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling[J]. *Mol Biol Cell*, 2016, **27**(8): 1188-1196
- [7] Lam SS, Martell JD, Kamer KJ, *et al.* Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling[J]. *Nat Methods*, 2015, **12**(1): 51-54
- [8] Ramanathan M, Majzoub K, Rao DS, *et al.* RNA-protein interaction detection in living cells[J]. *Nat Methods*, 2018, **15**(3): 207-212
- [9] Bar DZ, Atkash K, Tavaréz U, *et al.* Biotinylation by antibody recognition-a method for proximity labeling[J]. *Nat Methods*, 2018, **15**(2): 127-133
- [10] Parrott MB, Barry MA. Metabolic biotinylation of secreted and cell surface proteins from mammalian cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **281**(4): 993-1000
- [11] Brennan RG, Vasu S, Matthews BW, *et al.* Crystallization of the bifunctional biotin operon repressor[J]. *J Biol Chem*, 1989, **264**(1): 5
- [12] Kim DI, Roux KJ. Filling the Void; Proximity-Based Labeling of Proteins in Living Cells[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, **26**(11): 804-817
- [13] Eginton C, Cressman WJ, Bachas S, *et al.* Allosteric coupling via distant disorder-to-order transitions[J]. *J Mol Biol*, 2015, **427**(8): 1695-1704
- [14] Weaver LH, Kwon K, Beckett D, *et al.* Corepressor-induced organization and assembly of the biotin repressor: a model for allosteric activation of a transcriptional regulator[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**(11): 6045-6050
- [15] Wilson KP, Shewchuk LM, Brennan RG, *et al.* Escherichia coli biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, **89**(19): 9257-9261
- [16] Wood ZA, Weaver LH, Brown PH, *et al.* Co-repressor induced order and biotin repressor dimerization: a case for divergent followed by convergent evolution[J]. *J Mol Biol*, 2006, **357**(2): 509-523
- [17] Chakravarty V, Cronan JE. Altered regulation of Escherichia coli biotin biosynthesis in BirA superrepressor mutant strains[J]. *J Bacteriol*, 2012, **194**(5): 1113-1126
- [18] Li P, Li J, Wang L, *et al.* Proximity Labeling of Interacting Proteins: Application of BioID as a Discovery Tool [J]. *Proteomics*, 2017, **17**(20). doi: 10.1002/pmic.201700002
- [19] Chapman-Smith A, Mulhern TD, Whelan F, *et al.* The C-terminal domain of biotin protein ligase from E. coli is required for catalytic activity[J]. *Protein Sci*, 2001, **10**(12): 2608-2617
- [20] Kim DI, Birendra KC, Zhu W, *et al.* Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**(24): E2453-2461
- [21] Cronan JE. Targeted and proximity-dependent promiscuous protein biotinylation by a mutant Escherichia coli biotin protein ligase[J]. *J Nutr Biochem*, 2005, **16**(7): 416-418
- [22] Varnaite R, Macneill SA. Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID[J]. *Proteomics*, 2016, **16**(19): 2503-2518
- [23] Rhee HW, Zou P, Udeshi ND, *et al.* Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging[J]. *Science*, 2013, **339**(6125): 1328-1331
- [24] Tron CM, Menae IW, Nutley M, *et al.* Structural and Functional Studies of the Biotin Protein Ligase from Aquifex aeolicus Reveal a Critical Role for a Conserved Residue in Target Specificity[J]. *J Mol Biol*, 2009, **387**(1): 129-146
- [25] Honke K, Kotani N. The enzyme-mediated activation of radical source reaction: a new approach to identify partners of a given molecule in membrane microdomains[J]. *J Neurochem*, 2011, **116**(5): 690-695
- [26] Gross AJ, Sizer IW. Oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxidase[J]. *J Biol Chem*, 1959, **234**(6): 1611-1614
- [27] Chen CL, Hu Y, Udeshi ND, *et al.* Proteomic mapping in live Drosophila tissues using an engineered ascorbate peroxidase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, **112**(39): 12093-12098
- [28] Schopp IM, Amaya Ramirez CC, Debeljak J, *et al.* Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes[J]. *Nat Commun*, 2017, **8**: 15690
- [29] Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, *et al.* Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**(9): 880-887