PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
XXXX，XX（XX）：1~18
www.pibb.ac.cn

邻近生物素标记技术的发展与应用*

方甜园 周钰愉 张楚霞 周晨萱 陈是燏 林志成 雷 斌 陈露艺 应佳芹
陈 慧 蒋 一 黄渝涵 叶志涛 李丽萍**
（宁波大学医学部生理与病理生理学科，宁波 315211）

摘要 蛋白质-蛋白质相互作用形成的复杂网络是生物体内生化反应的核心事件，不仅调控正常生理功能，还与疾病发生发展密切相关。目前研究蛋白质相互作用的技术众多，其中邻近生物素标记技术是一种新兴的活细胞蛋白质组标记技术。利用生物素连接酶对邻近蛋白质或RNA分子进行特异性标记，可捕获瞬时、微弱或稳定的分子相互作用关系，还可系统性构建分子相互作用网络图谱。邻近生物素标记技术通过酶的持续优化与改进，在提升操作便捷性和标记效率的同时，衍生出多种新型标记技术体系。各邻近生物素标记技术各具特色：BioID无细胞毒性但标记效率低（需18~24 h），且生物素化产物低；TurboID虽能在10 min内完成高效标记，但这种高活性和高生物素亲和力会让其具有细胞毒性；AirID在低生物素浓度下即可实现低毒性标记，但标记耗时达数小时；UltraID凭借最小分子质量展现最高标记活性，但易被过度标记；APEX既能简便操作又可解析蛋白质拓扑结构，但存在浓度依赖性缺陷——高浓度产生二聚体伪影，低浓度则灵敏度低；RNA-BioID专用于RNA-蛋白质相互作用研究，但非特异性结合问题突出；TransitID虽能解析亚细胞水平蛋白质转运的动态过程，但其时间分辨率仍需提高。本文系统综述了BioID、TurboID、AirID、UltraID、RNA-BioID、APEX及TransitID等邻近生物素标记技术的发展历程、作用原理和优缺点，并探讨了这些技术在生命体功能调控和疾病研究中的前沿应用。通过全面解析各技术的优缺点与创新潜力，阐明其在分子相互作用研究中的应用优势，以期为生命科学领域的分子机制研究提供方法论指导和理论支撑。

关键词 邻近生物素标记技术，蛋白质相互作用，BioID，TurboID，AirID，UltraID，APEX，RNA-BioID，TransitID
中图分类号 R-33 **DOI**：10.3724/j.pibb.2025.0354 **CSTR**：32369.14.pibb.20250354

在生命系统中，蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interactions，PPIs）、蛋白质-RNA相互作用、蛋白质-DNA相互作用，这些相互作用受蛋白质、核酸及其相互作用的密切调控，分子间形成的复杂网络是大多数生物化学反应事件的基础，生物信息也通过细胞环境中无数分子间的相互作用进行传递，阐明分子间相互作用网络不仅可以用来分析PPIs、蛋白质丰度和定位、蛋白质与DNA/RNA之间的相互作用，还能增强人们对细胞生长、分化和凋亡过程的理解[1-2]。2008年以前，可用于研究细胞内蛋白质的方法大体可以分为两种：一种方法是在活细胞中标记蛋白质，如绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP），通过基因工程将GFP与目标蛋白质融合表达，从而实现对目标蛋白质的实时定位和动态追踪，并通过显微镜等非侵入性方式观察，这种方式会干扰蛋白质之间的相互作用和定位功能；另一种方法是研究死细胞中已经被固定的蛋白质，利用抗体与内源性蛋白质结合后，通过免疫荧光方法观察或应用免疫沉淀法将目标蛋白质与裂解后样本中的分子结合，分离并检查与目标蛋白质结合的分子。由于抗体不能穿

* 浙江省自然科学基金（LY23H090004），浙江省省属高校基本科研业务费专项资金（SJLY2023008），宁波市自然科学基金（2023J068），宁波市教育科学规划课题重点项目（2025YZD004），宁波大学教研项目（JYXM2025027），浙江省大学生科技创新活动计划（新苗人才计划）（2024R405A069，2025R405A076），浙江省级大学生创新创业训练计划（S202511646004）和宁波大学大学生科技创新计划（SRIP）（2025SRIP1931，2025SRIP1909）资助。
** 通讯联系人。
Tel：86-574-87609594，E-mail：liliping@nbu.edu.cn
收稿日期：2025-07-27，接受日期：2025-10-16

过活细胞膜，因而这两种方法的优势在当时无法兼得，导致活细胞中难以研究内源性蛋白质相互作用。后来，研究人员致力于开发一种新型活细胞蛋白质组标记技术，利用生物素等化学处理方法在活细胞中对目标蛋白质组进行原位标记，同时保留完整细胞膜结构、蛋白质复合物及空间关系。该技术的核心在于需要一种基因上可靶向的标记酶，该酶能够特异性共价标记邻近蛋白质，而不标记远距离蛋白质[3]。基于这一需求，两种候选标记酶——混杂生物素连接酶（promiscuous biotin ligases）和辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）被筛选出来。混杂生物素连接酶工作原理：通过将该酶靶向特定的细胞器或蛋白质复合物，可使其在细胞内与底物发生反应，生成一种活性高但半衰期短的中间体，进而与其邻近分子共价结合[4]，然而该酶标记动力学效率较低（需24 h）[5]，且其反应依赖于生物素-腺苷酸酯中间体，但该中间体半衰期较长（数分钟），导致标记半径过大，特异性较差。另一种HRP工作原理是利用该酶催化亚硝基标记的方法[6]，但这种标记产物难以检测，且HRP在哺乳动物细胞质中表达时缺乏活性[7]。由于这两种候选酶在应用中都存在各自局限，因而研究人员在此基础上不断改进酶，使操作步骤简化、实验效率提高，同时酶活性更高、稳定性更好、毒性更低，于是探索出许多新的邻近生物素标记技术。邻近生物素标记技术的研究范围不断扩大，技术水平不断提高。因此，有望通过邻近生物素标记技术更精准地研究不同时空下分子间的相互作用，提高研究效率，并绘制蛋白质组学图谱，为疾病致病机制、防治等研究提供理论基础。

本文汇总了近几年不同种类的邻近生物素标记技术的原理和优缺点，介绍了各新型技术在医疗、生物等领域的最新应用，以期全面地展现邻近生物素标记技术的创新性和发展潜能，为分子间相互作用的精准研究提供理论依据。

1 以生物素连接酶为基础的技术

1.1 BirA-AP及BioID

2008年研究人员为研究活细胞中未标记的内源蛋白质，开发了邻近生物素标记技术，其原理（图1）是将一种感兴趣的蛋白质（目标蛋白质）与大肠杆菌编码的生物素连接酶（*E. coli* enzyme biotin ligase，BirA）融合表达，同时使邻近蛋白质携带BirA的“受体肽（acceptor peptide，AP）”底物，当目标蛋白质与邻近蛋白质之间发生相互作用时，BirA特异性催化AP位点进行生物素化修饰[8]。通过固定细胞的链霉亲和素染色或细胞裂解液的链霉亲和素印迹来检测生物素化的AP，这些邻近生物素化的蛋白质分子被链甲基亲和素珠子捕获后，经过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecylsulfate- polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）预处理，再进行质谱（mass spectrometry，MS）分析，利用数据库搜索比对后确定蛋白质的身份。研究人员应用BirA连接放射状胶质细胞（radial glial cells，RGCs）中的肌球蛋白，追踪这些蛋白质在亚细胞水平的位置及功能，并观察其如何间接影响皮层内中间神经元的数量与排布，进而研究其在大脑皮层发育中的作用，这是邻近生物素标记技术首次用于解析活体小鼠中亚细胞结构与皮层发育之间的关系[9]。

BirA的问题在于其对内源性底物具有高度特异性，从BirA的酶学反应机制上讲，其介导的生物素化是一个两步过程：第一步将生物素和ATP结合形成生物素酰-5β-AMP，这种活化的生物素停留在BirA活性位点内；第二步中活化的生物素与AP的特异性赖氨酸残基反应[5]。生物素像喷漆一样标记了与目标蛋白质邻近的相互作用蛋白质，这种通过类似“分子喷漆”的机制，既能高通量捕获微弱、瞬时的蛋白质相互作用，又可通过强力的裂解洗涤条件有效降低非特异性蛋白质的干扰[10]。在这个过程中，BirA并不会释放这种活化的生物素，所以只能识别携带AP的蛋白质，不能广泛地进行标记，且这个技术需要引入两个融合蛋白质，技术难度较高。

为了解决这一问题，2012年Roux等[5]改进了酶，使用BirA*——一种高度混杂的大肠杆菌BirA生物素蛋白连接酶，BirA*可以通过与“诱饵”蛋白融合，从而靶向特定的亚细胞位置，附近的蛋白质被BirA*生物素化[5]。这种酶对生物素基-5β-AMP具有较弱的亲和力，允许其在细胞质中释放，不需要与蛋白质AP结合，因而将其命名为BioID（图1），其标记半径小于10 nm。之后，研究人员又对其进行改进，开发了一种更小的混杂生物素连接酶BioID2，相较而言，BioID 2标记的选择性更高，需要生物素的量更少，标记的更充分、更快速。BioID2不仅提高了蛋白质的筛选效率，并且能够使用柔性连接体对生物素标记半径进行应用特异性调节[11]。

BirA-AP只能用于验证已知的PPI，且这种标记是高度特异性的，而BioID则可非特异性地标记邻近蛋白质，且无需识别特定的氨基酸序列（即AP），因而BioID相较于BirA有很大优势。但这项技术也存在一些问题，其标记时间相对较长，需持续18~24 h（有时甚至更长时间）的生物素孵育才能产生足够的生物素化产物，且不能很好地捕捉数分钟甚至数小时的蛋白质相互作用过程，也可能会错误标记未相互作用的蛋白纸，导致假阳性或假阴性结果，所以不适用于研究短时程的PPI。此外，BioID在37℃以下的效率较低，对温度的要求较高。此外，低催化活性也使BioID技术难以应用于某些环境，例如蠕虫、苍蝇或培养的哺乳动物细胞的内质网管。

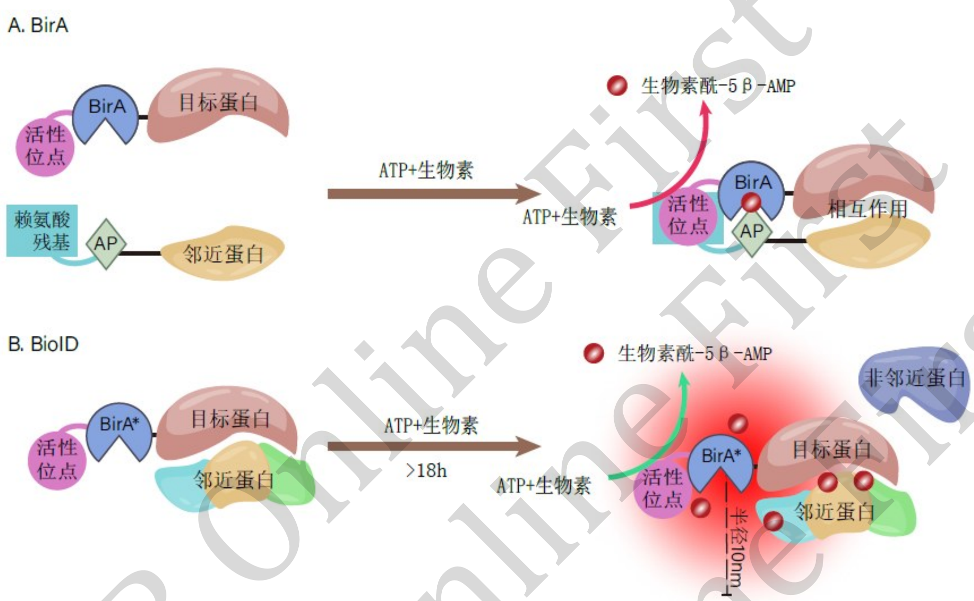


Fig. 1 Protein proximity labeling techniques derived from biotin ligase BirA

图1 基于生物素连接酶BirA开发的蛋白质邻近标记技术

BirA（a）和BioID（b）的作用原理。AP：受体肽（acceptor peptide）；ATP：三磷酸腺苷（adenosine triphosphate）。

1.2 TurboID

由于BioID技术动力学缓慢，无法捕捉瞬时蛋白质相互作用，导致BioID技术不适用于短时程蛋白质相互作用研究[12]。为了综合利用BioID的简单无毒性和工程化抗坏血酸过氧化物酶（engineered ascorbate peroxidase，APEX）2的高催化效率优势，研究人员进行了BirA的定向进化，以产生新的混杂变体。使用PCR对BirA-R118S进行诱变，产生了约10^7个突变体库，每个突变体相对于模板平均约有2个氨基酸突变。直至2018年，研究人员才成功开发出两种高效的BioID混杂突变体：TurboID和miniTurbo。利用酵母展示技术结合荧光激活细胞分选仪（fluorescence-activated cell sorter，FACS）筛选，先富集出高度生物素化的细胞，经过29轮渐进式筛选，逐渐将生物素化时间窗口从18 h缩减至10 min，并逐步提高筛选严格性，最终获得了这两个混杂突变体。相较于野生型BirA，分子质量为35 ku的TurboID含有15个突变；而分子质量28 ku的miniTurbo，相较于野生型BirA，缺失N端结构域且含有13个突变[13]。

与其他邻近生物素连接酶相关的技术相比，TurboID和miniTurbo具有更快的标记动力学和更高的标记产量[14]。在细胞培养中标记时间短至10 min或更少，能够以更高的时间分辨率探测蛋白质动态生物过程。TurboID催化的效率比BioID或BioID2高效。BioID、BioID2和BASU催化后，生物素标记在1 h内无法被检测出，部分转染细胞甚至在6 h后才达到生物素检测阈值。相比之下，TurboID和miniTurbo经过10 min的生物素标记即可在多数转染细胞中清楚检测出生物素化[13]。得益于TurboID技术基于酵母分泌途径的定向进化特性，使其在各类邻近生物素连接酶中展现出高效的催化活性，且在内质网管腔中的活性显著优于BioID[15]。从催化性能来看，miniTurbo的催化活

性仅为TurboID的50%~67%（1.5~2倍差异），且其对生物素的亲和力较低，导致miniTurbo在缺乏高浓度外源生物素时无法有效进行标记。在未添加外源生物素时，miniTurbo标记水平较低，几乎无背景标记。而在外源生物素加入后，标记反应即刻启动，这种精准的时间窗口控制，使其特别适用于动态过程研究[13]。相较而言，TurboID可利用某些细胞类型和生物体中存在的内源性生物素，在无外源生物素添加即可表现出生物素化活性，实现可持续标记[14]。除此之外，TurboID和miniTurbo突破了传统方法对恒温条件的依赖，在低于37℃的环境下仍能保持催化活性，适于在苍蝇、蠕虫、酵母和植物等多种变温生物体系进行邻近生物素标记[16-18]。因此，TurboID和miniTurbo突变体具有快速、高效的标记动力学性能，使其成为体内蛋白质相互作用研究的理想工具酶[19]。

但是TurboID存在一定的局限性。在某些情况下，TurboID的高活性和高生物素亲和力会引起细胞毒性[14]。例如，TurboID普遍存在于果蝇的所有组织中，其组成性表达会导致游离生物素的过度隔离，从而导致在没有补充生物素的情况下果蝇体型变小、存活率下降[13]。补充生物素后诱导TurboID表达，或当TurboID表达仅限于特定组织或器官时，这种毒性得到改善。此外，在培养的哺乳动物细胞中， TurboID标记时间超过24 h（远超推荐的10 min时长）时，会导致内源性蛋白质组的过度生物素化，进而引发细胞生长缺陷[13]，这一现象提示，对于长期实验或生物素补充受限的研究场景，采用活性较低的邻近生物素标记技术（如BioID或AirID）可能更具优势[5, 20]。TurboID的酶活性高于BioID，其标记效率显著提升，仅需10 min即可达到比BioID标记18 h更大的标记半径。尽管该标记半径难以精确测量，但研究人员观察到其似乎可延伸超过35 nm，这可能会错误标记未相互作用的蛋白质。研究人员发现，TurboID在高浓度生物素下具有细胞毒性，如在HEK293T细胞中表达TurboID并补充50 μmol/L生物素，细胞生长几乎完全被抑制[20]。

随着研究的不断深入，研究人员对TurboID进行了许多改进，产生许多新的重组酶。2017年，研究人员开发了Split-TurboID[21]。Split-TurboID是一个通用的工具酶，可以在特定的条件下重新组装，将一个邻近生物素连接酶分割成Turbo-N和Turbo-C两个不活跃的片段，在细胞中共表达，然后通过药物、蛋白质相互作用或细胞器接触使它们重新组装成活性酶TurboID，从而提高了蛋白质定位的特异性和多功能性，用于细胞中特定空间的蛋白质定位[14]（图**2**）。Split-TurboID的活性远远高于Split-BioIDs，甚至比全长BioID更活跃[21-22]。研究人员开发了Split-TurboID的低亲和力（依赖于PPI的重构）和高亲和力（不依赖于PPI的重构）两个版本，任一版本的Split-TurboID都可以在生物素孵育小于1 h的情况下进行标记[23]。目前，应用Split-TurboID已实现内质网线粒体接触部位的蛋白质组学制图[14]。2021年，又开发了另一种版本ProtA-Turbo（图**2**），ProtA-Turbo是融合蛋白A的邻近生物素连接酶TurboID形成的重组酶ProtA-Turbo，应用该酶开发了一种现成的邻近生物素化方法[24]。在细胞渗透和抗体与目标蛋白质结合后，ProtA-Turbo通过蛋白A片段与抗体重链结合，洗涤去除未结合的酶，通过添加外源性生物素和三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP），使附近的蛋白质被生物素化，最终从细胞裂解物中富集生物素化蛋白，并通过液相色谱耦合串联进行MS分析[19]。ProtA-Turbo邻近生物素标记技术的核心优势在于可在72 h内完成任何感兴趣的蛋白质（目标蛋白质）的邻近蛋白质组解析，显著提升研究效率。

ProtA-Turbo可在原代细胞中进行近距离蛋白质生物素化标记，因不需要转染、转导或靶细胞的遗传操作，ProtA-Turbo技术原则上可应用于任何细胞类型，并可获得足量的生物素化产物，用于揭示蛋白质在体内相互作用网络在细胞稳态维持和疾病发生中的分子机制[24]。结合翻译后修饰的特异性抗体，也可应用于研究翻译后修饰相关蛋白质组的空间组织特征[19]。ProtA-Turbo技术兼容固定或非固定的样本，突破HRP[25]或APEX2-ProteinA融合蛋白[26]结合的样本限制。

备注：RNA：核糖核酸（ribonucleic acid）；ATP：三磷酸腺苷（adenosine triphosphate） 。

近年来，TurboID在各个方面得到了广泛应用。在植物细胞体系中，TurboID在室温条件下展现出高效邻近标记性能，其标记效率和特异性均优于传统生物素连接酶（如BioID等）。TurboID在植物中敏感性高，在不同植物物种、组织类型和生长阶段等生物条件下均能实现高效标记，可耐受多种实验条件（包括室温环境），仅需常规生物素处理即可快速完成蛋白质标记[16]。在烟草模式植物系

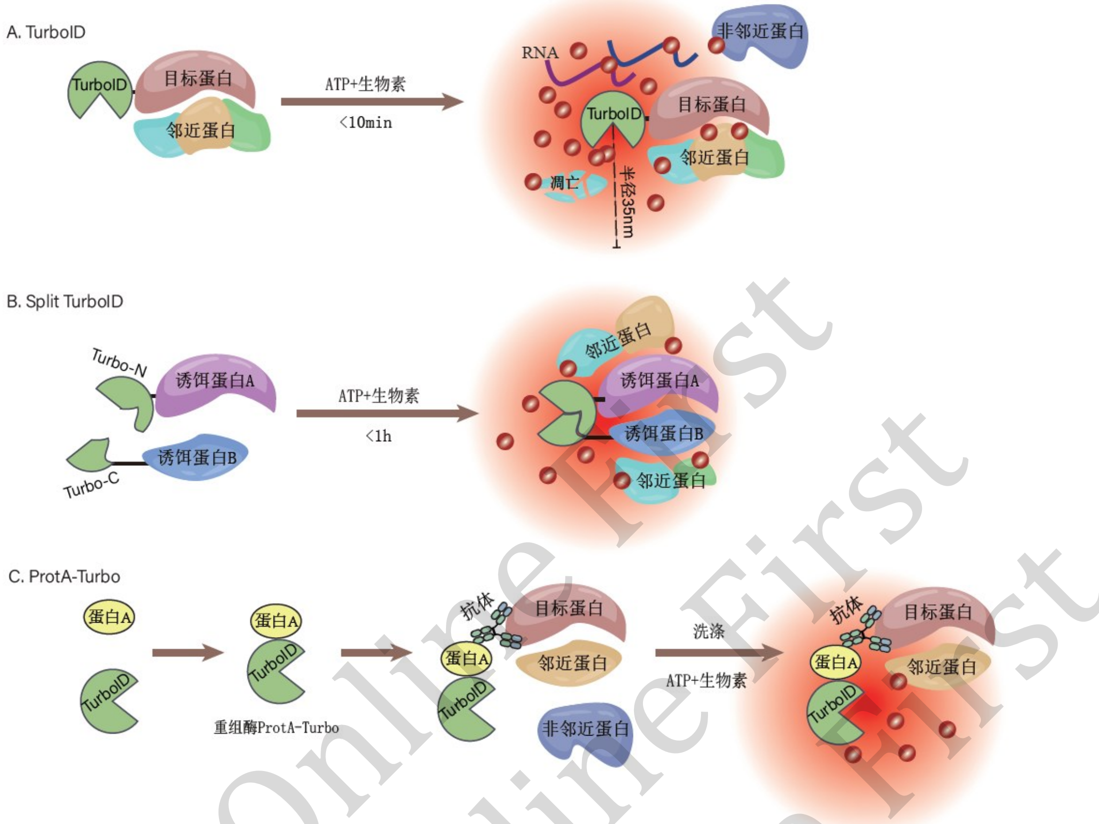


Fig2 The mechanisms of TurboID，Split-TurboID，and ProtA-Turbo

图 2 TurboID、Split-TurboID和ProtA-Turbo的作用原理

统中，TurboID技术成功应用于免疫受体N蛋白——Toll-白介素-1受体-核苷酸结合富亮氨酸重复序列（Toll-interleukin-1-receptor-nucleotide-binding leucine-rich repeat，TIR-NLR）相互作用蛋白的解析。采用TurboID邻近生物素标记技术，结合等压标记定量蛋白质组学（如串联质谱标签/等重同位素标签相对和绝对定量技术（tandem mass tag/isobaric tag for relative and absolute quantitation，TMT/iTRAQ））和MS分析，系统鉴定出多个与免疫受体N蛋白存在潜在相互作用的候选蛋白质[17]。

1.3 AirID

AirID是一种应用邻近生物素化分析PPI的新型酶。由于BioID和TurboID作为工具存在一些局限性，为了解决这些问题，Kido等[20]开发了一种新的邻近生物素连接酶——AirID。通过整合祖先酶重建算法和庞大的基因组数据库分析，成功重构并优化了五种祖先BirA酶变体。结合计算技术和定点诱变技术，获得一种新型高效标记酶AirID。AirID在体外和细胞内起着邻近生物素化的作用，尽管BioID和AirID之间的序列相似性为82%，但是AirID对相互作用蛋白具有更高的生物素化活性，因而其在体外和细胞中高效识别PPI[20]。

AirID与TurboID相比，即使在延长标记的时间情况下，它错误地标记非伴侣或杀死细胞的可能性也很低。在与TurboID相同的催化条件下，AirID没有将GFP和微管蛋白生物素化。通过链亲和素牵拉沉淀实验（streptavidin pull-down experiment）和液相色谱-串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-TMS）分析，发现在瞬态和稳定表达细胞中，AirID融合蛋白能够准确对各种相互作用蛋白进行生物素化标记。在低ATP浓度（1 μmol/L）下，AirID比TurboID更容易形成生物素-5'-AMP，甚至AirID更倾向于较低浓度的生物素化（图3）。应用LC-TMS对生物素化位点的分析表明，AirID生物素化对邻近的赖氨酸残基没有特殊的序列偏好[20]。因此，AirID技术由于具有独特的酶学特

性，使其严格依赖蛋白质相互作用，或缺乏可接近的赖氨酸残基，完全避免自我生物素化现象，使AirID技术提高PPI依赖性生物素化的准确性。同时，与BioID和TurboID不同，AirID具有显著降低的细胞毒性，使其成为长期生物学研究的理想工具。虽然AirID相比TurboID标记速度较慢，但AirID即使在0.5~50 μmol/L的生物素浓度下标记3~24 h，标记结果仍比较稳定，不会出现大量的蛋白质被过度标记[20]。即使在持续补充生物素的条件下，稳定表达AirID-IkBa融合蛋白也不会引起明显的细胞生长抑制，表明表达AirID融合蛋白具有非常低的毒性[20]，使AirID适用于细胞内的邻近生物素化实验。针对蛋白质同源或异源二聚化形式的研究，研究人员又开发了AirID酶的分裂版本splitAirID。在splitAirID中（**图3**），AirID酶的N端片段（AirN）与一个诱饵蛋白融合，C端片段（AirC）与另一诱饵蛋白融合。当两个诱饵蛋白相互作用时，AirN与AirC将重新组装并恢复生物素连接酶活性[27]。该分裂系统将生物素连接酶拆分为两个独立多肽片段——单独存在时均无酶活性，且片段间亲和力极低，可避免自发互补重组。只有当两个互补片段通过相互作用主动靠近时，才能恢复功能，重构的生物素连接酶即可像全长酶一样标记邻近蛋白质。这种设计能特异性研究诱饵蛋白二聚化现象，仅当诱饵蛋白二聚化时才能恢复连接酶活性，从而选择性检测与同源或异源二聚体形式诱饵相互作用的蛋白质[27]。

最新研究表明，AirID技术在各种应用中都十分有效。在嗅觉相关蛋白质标记方面，嗅觉信号转导起始于嗅上皮感觉神经元纤毛膜上的嗅觉受体（olfactory receptors，ORs），其功能性表达大多数依赖于受体转运蛋白（receptor-transporting proteins，RTPs）的辅助。通过AirID邻近生物素标记技术，成功捕获并验证了RTP1S和ORs的相互作用[28]。AirID技术应用于表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）的细胞外蛋白质-蛋白质相互作用（extracellular protein-protein interactions，exPPIs）的解析。将AirID的C端融合至抗EGFR的Fab片段（Fab fragment against EGFR，EGFR- FabID），实现了在多种细胞系中特异性标记EGFR胞外区域。结合LC-MS/MS分析EGFR- FabID，鉴定出已知EGFR相互作用蛋白和未知的候选相互作用蛋白，验证了EGFR在配体非依赖状态下的exPPIs网络[29]。同时，AirID技术也应用于邻近生物素化的PPI鉴定，将AirID技术与一种无细胞蛋白质阵列技术相结合，构建一个由小麦无细胞蛋白质生产系统生产的19 712个重组人蛋白质组成的人蛋白质阵列（20 000人蛋白质微球阵列），邻近生物素连接酶AirID融合的TP53和IκBα蛋白在1 536孔磁性板上分别对特定的相互作用蛋白进行了生物素化，实现了AirID融合蛋白（TP53/IκBα）的阵列式邻近标记[30]。

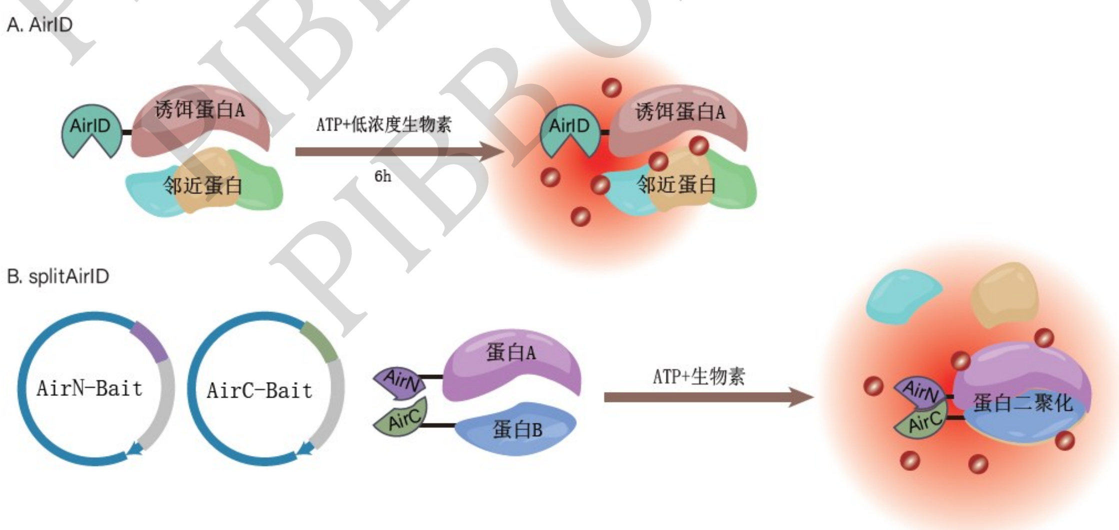


Fig3　The mechanisms of AirID and splitAirID

图3　AirID和splitAirID的作用原理

备注：ATP：三磷酸腺苷（adenosine triphosphate）。

1.4　UltraID

UltraID是一种体积小且高活性的邻近生物素连接酶。原始的邻近生物素连接酶存在着许多问题。最初的BirA是一种体积较大的酶，阻碍相应融合蛋白的正确定位，同时其标记动力学缓慢。由于大肠杆菌的BirA是一种II类邻近生物素连接酶，它具有一个N端DNA结合结构域，该结构域在结构上与连接组蛋白H5具有同源性，并且理论上可能导致伪影性的非特异性结合到宿主DNA或染色质相互作用蛋白。TurboID在向培养基中添加额外的生物素之前会产生高背景标记；miniTurbo的活跃度则不高，且稳定性差；AirID虽然更高效且比TurboID毒性更小，但仍然需要数小时的标记时间[31]。为了提高邻近生物素标记的通用性和速度，研究人员采用不同的方法开发了各种酶，其中一个小尺寸的工程酶——UltraID，兼具了高效与精准（图4）。

研究人员去除I类生物素连接酶BioID2的C端结构域，并在生物素结合结构域的典型R40G取代上添加一个点突变（L41P），经过以上的两个工程步骤，最终得到了产物UltraID。UltraID的工程设计可能提供一个简单的框架来提高基于I类酶的邻近生物素标记酶的活性。同时，专门针对邻近生物素连接酶的生物素结合位点进行随机诱变可产生高活性酶。UltraID与其他的邻近生物素连接酶相比具有更多的优势：10 min的UltraID标记时间与过夜的BioID标记时间效果接近一致；UltraID表现出与TurboID相似的酶动力学，但背景活性较低；UltraID支持在哺乳动物细胞培养物、大肠杆菌和酿酒酵母中进行有效标记。迄今为止，UltraID是可用于邻近生物素标记的最小、最有效的生物素连接酶，并有可能在高时间分辨率下研究相互作用组[31]。

最新研究表明，UltraID已经开始应用，研究人员基于UltraID的特性提出了一种选择方法，通过目标蛋白质上的酶标记物的邻近性富集来自DNA编码文库（DNA-encoded libraries，DELs）的配体，通过使用发光蛋白标签（纳米荧光素酶）对受保护的生物素基团使用UltraID进行酰化，在DNA结构上打开或添加生物素纯化标签。这种选择不需要纯化靶蛋白，从而提高了DNA连接配体的恢复和富集效率，可作为DELs分子发现的一种通用且方便的工具[32]。

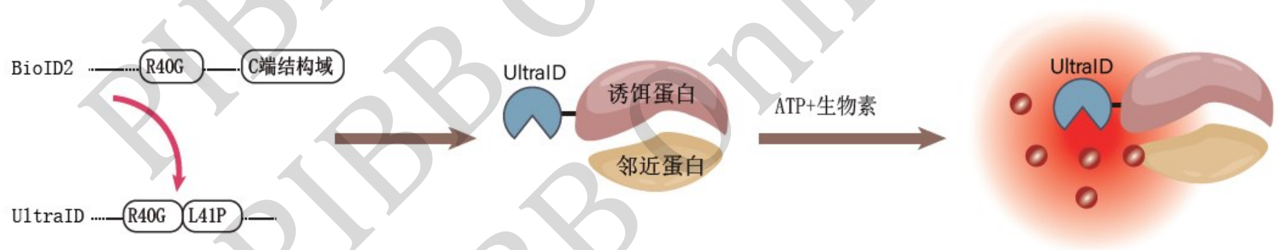


Fig4　Mechanisms of UltraID

图4　UltraID的作用原理

备注：ATP：三磷酸腺苷（adenosine triphosphate）。

1.5　RNA-BioID

RNA邻近生物素化（RNA proximity biotinylation，RNA-BioID）是一种体内能够识别与mRNA定位元件及其主体直接或间接、稳定或瞬时相互作用蛋白质的邻近生物素标记技术。RNA-蛋白质相互作用在生物学中普遍存在，在调节细胞功能中起关键作用[33-34]。大约5%的人类蛋白质组能够结合RNA[35]，RNA-蛋白质相互作用网络调节基因组稳定性、细胞信号转导和基因表达[36-37]。因此，人们期待使用合成RNA作为控制细胞回路的工具。

RNA在细胞环境中具有复杂的结构，这种结构对于蛋白质结合至关重要。以往研究RNA-蛋白质相互作用的方法，如RNA-MaP和RNA-compete，需要专门的设备，且在活细胞中RNA-蛋白质相互作用的环境中无法执行[38]。研究人员选择了RNA结合蛋白进行鉴定，在分子马达蛋白（如motor蛋白）和解旋酶、翻译抑制因子、RNA

稳定性控制蛋白等补充因子的帮助下，RNA结合蛋白识别特定的信号后，介导mRNA运输。为了识别所有参与局部mRNA组装的蛋白质，基于MS2核酸适体RNA标记技术，在小鼠胚胎成纤维细胞在β肌动蛋白（β-actin）mRNA的3'非翻译区（untranslated region，UTR）引入多个MS2 RNA标签，通过MS2外壳蛋白（MS2 coat protein，MCP）与改造后的BirA融合表达，将BirA连接到编码保守的β肌动蛋白mRNA的3' UTR，建立了RNA-BioID技术，该技术可系统鉴定调控mRNA定位的关键功能蛋白质。RNA-BioID技术原理（**图5**）：在细胞中加入生物素，BirA将生物素转化为AMP-生物素活化形式，并将其共价结合到其邻近（半径10~20 nm）的赖氨酸残基上，与MS2标记的β肌动蛋白mRNA邻近的蛋白质都有可能被生物素化。裂解细胞后，生物素化蛋白可以通过链霉亲和纯化分离从细胞裂解物中提取出来，最后用标准质谱技术进行鉴定[39]。通过这种方法，可确定与特定mRNA结合或邻近的蛋白质，帮助揭示mRNA在细胞内的调控机制和空间分布。

相比于传统的免疫共沉淀（co-immunoprecipitation，Co-IP）方法，BioID能够识别出更多潜在的相互作用蛋白质，这可能是由于邻近生物素标记的灵敏度更高，标记范围更广[3, 5, 22]，且更易于捕获瞬时相互作用物[40]。在研究mRNA的不同生命阶段时，BioID可以帮助识别出与信使核糖核蛋白体（messenger ribonucleoprotein，mRNP）相关的所有蛋白质组分，有助于全面了解mRNA的调控机制。但这种方法也有缺点，BioID可能会标记到那些并不是真正稳定的功能性复合物的蛋白质，可能导致数据偏差和非特异性结果。总之，RNA-BioID提供了一种工具，用于识别新的mRNA相互作用蛋白，并在空间和时间上研究内源性mRNA相互作用蛋白质组的动态变化，可以高可信度地鉴定细胞内新的功能性mRNA相互作用蛋白[41]。

目前RNA-BioID的应用不多，最新报道将RNA-BioID与ChIRP-MS技术结合使用，从而鉴定与长链非编码RNA（long non-coding RNAs，lncRNA）HOTAIR相关联的蛋白质，通过两种方法结合，研究者能够获得更全面、更准确的HOTAIR相互作用蛋白质组。研究发现，HOTAIR不仅与已知的转录调控复合物（如多梳阻遏复合物2（polycomb repressive complex 2，PRC2）和赖氨酸特异性去甲基酶1（lysine-specific demethylase 1，LSD1））相互作用，还与线粒体核糖体有关联，表明HOTAIR可能还有一些独立于其转录后调控功能的新作用机制[42]。

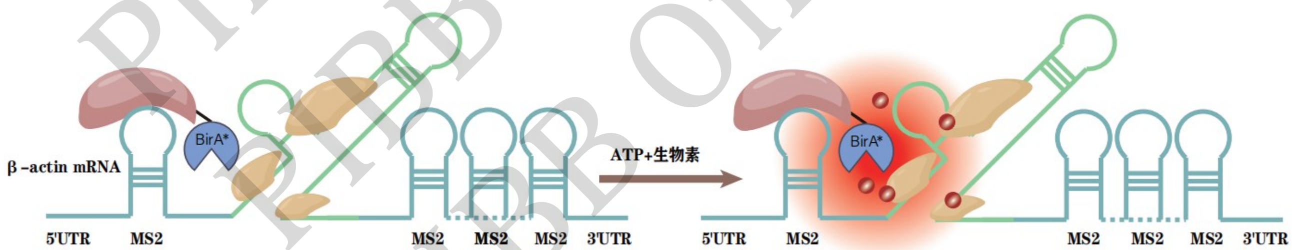


Fig5　Mechanisms of RNA-BioID

图5　RNA-BioID的作用原理

备注：β-actin：β肌动蛋白；MS2：茎环结构；UTR：非翻译区（untranslated region）；ATP：三磷酸腺苷（adenosine triphosphate）。

综上，邻近生物素标记技术通过对邻近蛋白质进行生物素标记，实现了在活细胞中对PPIs的捕获，能够在分子水平观察PPIs，为构建亚细胞蛋白质相互作用网络提供了技术支持。不同的技术各有其优缺点，BioID虽无细胞毒性，但其标记效率（需18~24 h）和生物素化产物低；为了提高其催化效率，研究人员设计了TurboID，发现解决了高活性和高生物素亲和力的问题，但具有细胞毒性，会抑制细胞生长；为了减低毒性，研究人员开发了AirID，能够在低生物素浓度下实现低毒性标记，但标记时间耗时3~24 h；为了提高邻近生物素标记技术的通用性，研究人员设计了分子质量更小的UltraID，其标记活性高但易被过度标记；为了拓

展技术的研究领域，开发了专用于RNA-蛋白质相互作用研究的RNA-BioID，但非特异性结合问题突出。以生物素连接酶为基础的技术作为新型活细胞蛋白质组标记技术，能够在活细胞中进行标记，且不干扰蛋白质之间的相互作用和定位功能，为基础生物学研究提供新的技术。

2 生物素相关的邻近标记技术

2.1 APEX

2012年，研究人员基于HRP的研究证据开发出了APEX。当HRP在哺乳动物细胞质内中表达时会丧失活性，这是由于细胞质的还原性环境及Ca^{2+}缺乏状态，无法满足其活性中心形成所必需的4个二硫键和2个Ca^{2+}结合位点的结构要求[7]。为了解决这一问题，研究人员从血红素过氧化物酶超家族中寻找能在还原环境中保持自然活性的成员，发现抗坏血酸过氧化物酶（ascorbate peroxidase，APX）符合这一要求。APX是一类植物来源的胞质过氧化物酶，具有分子质量小，不含二硫键和Ca^{2+}[43]，因此理论上其可在哺乳动物细胞质内中维持活性。该酶源自二聚体形式的豌豆或大豆抗坏血酸过氧化物酶，既可用于电子显微镜标记，也可作为活细胞蛋白质组学研究的邻近混杂标记酶[44]。但是APX是一个组成型二聚体，其形成的寡聚物标签会扰乱蛋白质的自然定位和功能。研究人员将APX的底物结合位点与HRP的结合位点进行了比较，发现HRP具有更快的动力学，且与芳香过氧化物酶底物结合更广泛[45]。利用蛋白质工程技术将APX单体化，并从HRP的活性部位提取芳香残基纳入APX的活性位点，不断测试后选择mAPX+W41F（K14D/E112K/W41F）突变体，即目前应用的APEX。需要注意的是，尽管APEX是通过生物素的标记实现蛋白质的富集，但其区别于以生物素连接酶为基础的BioID，通常被归为基于过氧化物酶的邻近标记技术。

APEX技术通过催化苯酚衍生物氧化生成半衰期短（<1 ms）的苯氧基自由基，可展现3大特性：标记半径小（<20 nm）[46-47]、反应活性高、非膜渗透性。这些自由基能够与富含电子的氨基酸，如酪氨酸（tyrosine，Tyr）、色氨酸（tryptophan，Trp）、组氨酸（histidine，His）和半胱氨酸（L-cysteine，Cys）发生特异性共价结合[48-50]，这种化学反应是酪酰胺信号放大的基础[50]。该方法以1 min的时间分辨率捕获已标记蛋白质，通过MS分析鉴定蛋白质成分，并解析细胞器蛋白质组学的组成。其技术优点在于操作流程简单，缩减实验时间（如可避免亚细胞分离步骤），样本需求量低，且没有明显细胞毒性，相较于传统全细胞蛋白质组学方法具有更高效率。研究人员在人类线粒体基质蛋白质组的初步研究证实，这种技术具有高度特异性，因其在活细胞中完成标记过程，完整保留了膜结构及其他亚细胞结构，另一个关键优势在于能够解析已鉴定蛋白质的拓扑结构[3]，但存在以下局限：高浓度APEX会形成残余二聚体，且当APEX在内质膜细胞质中过表达时，会导致内质网结构紊乱[51]。为了避免二聚化伪影，需将APEX表达量控制在电子显微镜（electron microscopy，EM）检测所需的最低水平。

作为一类具有与HRP相似底物广谱性的通用细胞内过氧化物酶，APEX已成功推动多项重要生物学发现。APEX技术尤其适用于以下两种新型细胞研究应用（图**6**）：EM下细胞内特异性蛋白质定位[7]和空间分辨蛋白质组学分析[3，52]。在EM蛋白质定位应用中，APEX基因在细胞内与目标蛋白质基因融合表达，经二氨基联苯胺（diaminobenzidine，DAB）和H_2O_2溶液处理时，APEX可催化DAB发生聚合和局部沉积，DAB聚合物能高效结合电子致密的锇，从而在目标蛋白质位点形成显著的EM对比信号[7]。在空间分辨蛋白质组学分析中，APEX作为一种基因靶向标记技术，可标记和定位感兴趣的细胞器或蛋白质复合物，经活细胞在生物素-苯酚和H_2O_2存在条件下处理1 min，APEX催化生物素-苯酚发生单电子氧化，生成半衰期短的生物素苯氧基，该自由基能够共价标记APEX邻近的内源性蛋白质，候选通过链霉亲和素珠富集结合质谱法即可实现蛋白质鉴定[3，52]。

APEX技术应用主要限制因素在于其灵敏度低。当APEX表达水平较低时，APEX与DAB反应（用于EM检测）或生物素-酚反应（用于蛋白质组学分析）的活性往往低于检测限。在某些情况下，可通过提高APEX表达水平来解决这个问题，但对于许多融合构建体，过表达APEX是有害的。针对APEX灵敏度低的问题，研究人员采用酵母展示技术结合FACS筛选，在酵母细胞表面表达10^6种不同的APEX变体库，通过FACS筛选获得高效催化生物素化的优势突变体，其中A134P单点突变显著增强细胞中酶活性，使检测灵敏度大幅提高，该

优化版本被命名为APEX2 [44]。APEX2通过A134P突变实现了多重性能提升，如改善了动力学、热稳定性及血红素结合能力，尤其对高浓度H_2O_2的抗性表现出耐受，使得APEX2在细胞应用中比APEX更优越。另外，APEX2无需光学激发即可产生EM对比度，支持大范围视野内染色，避免额外成像设备需求。相较于免疫印迹、亚细胞分离等间接方法，应用APEX2可直接观察到目标蛋白质的亚细胞定位和膜拓扑结构 [7]。

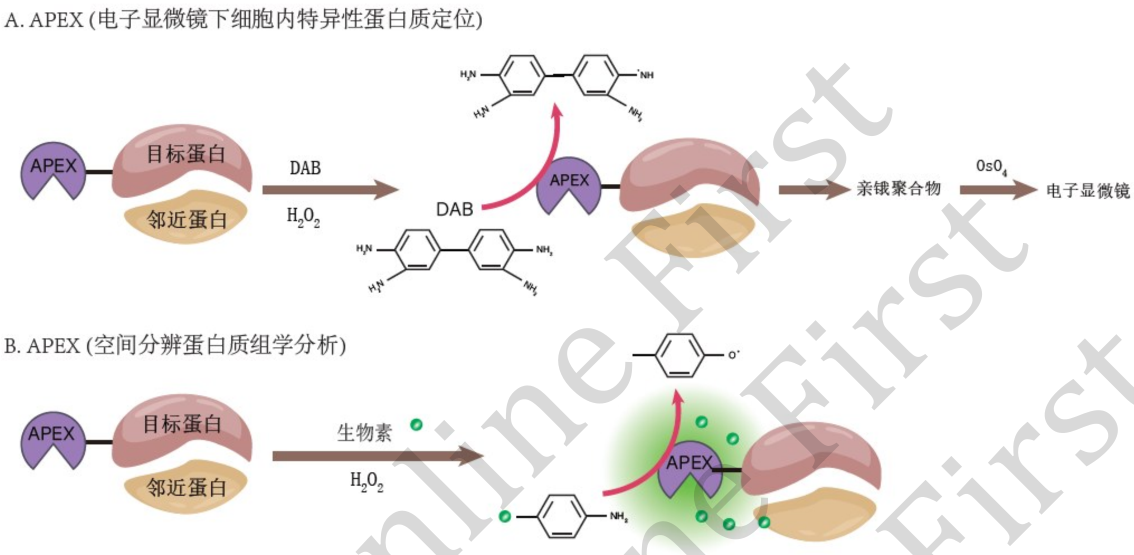


Fig. 6　Mechanism of APEX

图 6　APEX的作用原理

EM下细胞内特异性蛋白质定位和空间分辨蛋白质组学分析。

2.2　TransitID

序列化运输分析识别（trafficking analysis by sequentially incorporated tags for identification，TransitID）是一种在活细胞中以纳米空间分辨率无偏定位内源性蛋白质运输过程的追踪方法。邻近标记为获取空间信息提供了强有力的手段，然而关于蛋白质从一个亚细胞区域到另一个亚细胞区域，或从一个细胞到另一个细胞的动态运动的信息，在很大程度上是质谱分析无法获得的 [53]。某些研究整合TurboID技术与亚细胞区域特异性分析，建立了活体生物分泌蛋白质组的动态追踪方法。将蛋白质最初合成的区域进行TurboID标记（初始标记阶段），标记蛋白质最终被转运到的区域进行链亲和素富集（转运追踪阶段），利用TurboID技术结合链亲和素富集绘制出了苍蝇、小鼠体内分泌的蛋白质组动力学图 [54-55]。这种方法适用于可解剖分离的组织区域之间的长距离蛋白质组通信研究，而不适用于混合细胞之间的短距离蛋白质组运输，或细胞器之间的细胞内运输。此外，这些方法无法让研究人员在受体细胞中明确或选择目标区域或区室（例如细胞质、内体等）[53]。鉴于上述技术局限性，研究人员开发了TransitID，以提供一个通用且灵活的解决方案，用于绘制任何细胞间或细胞内的蛋白质组运输，并能够精确地定位感兴趣的源区室和目的区室。

建立在邻近生物素标记技术的基础上 [56]，TransitID通过用邻近标记技术中APEX2 [44]、BioID [4-5] 和TurboID [13] 等多功能酶，在活样品中生成单时间点的细胞器蛋白质组 [57-59] 和蛋白质相互作用组 [60-61] 的快照。TransitID将TurboID与APEX2两种邻近标记技术有机结合，充分发挥各自的技术优势。TurboID作为大肠杆菌来源的生物素连接酶突变体，具有高催化活性和蛋白质底物的广泛特异性，在10 min内能将蛋白质赖氨酸残基生物素化，而APEX2作为植物抗坏血酸过氧化物酶突变体，在H_2O_2和苯酚化合物的存在条件下，邻近标记速度仅需1 min [44]。在TransitID实验中，为了区分APEX2添加的共价亲和标签与TurboID添加的标签，将之前APEX2标记实验中使用的生物素-酚化合物替换为炔-酚化合物（alkyne-phenol compoud） AP1[53]。一旦用AP1标记，蛋白质可以通过点击化学反应进一步用叠氮荧光素标记，这样的蛋白质可以通过荧光显微镜成像或使用抗荧光素抗体进行免疫沉淀。

为了绘制易位蛋白质，TurboID在“源”区表达，APEX2在“目的”区表达。在“源”区室中的蛋白质用生物素标记一段时间（10~60 min）后，将细胞切换到无生物素的培养基中，静置直至“源”区室中的蛋白质转移到“目的”区室。在“目的”区室中，用炔-酚化合物和H_2O_2启动APEX2标记1 min。然后，立即裂解细胞。释放的蛋白质在点击化学（click chemistry）条件下用叠氮荧光素处理，然后进行抗荧光素免疫沉淀和链亲和素微球富集。从“源”隔室转移到“目的”隔室的蛋白质被双重标记（**图7**）。因此，可富集但恰好在“目的”隔室的内源性生物素化蛋白质也会显现出双重标记。为了过滤掉这些假阳性和其他非特异性结合到亲和纯化珠上的背景蛋白质，实验中还设置了包括不表达TurboID的样本、不处理H_2O_2或生物素的样品进行比较，所有样品均经过基于多重TMS和LC-TMS的定量蛋白质组学分析处理[62]。

TransitID是一种通用且多功能的方法，在活细胞中用于绘制内源性蛋白质组的运输和动态变化，提供了一种基于区室或细胞类型起源区分蛋白质群体的强大标记方法，可以精准地发现在区室和细胞之间运输的蛋白质。但这种方法也有局限性，TransitID是基于TurboID和APEX技术优势整合而出，所以它带有固有技术限制，如TurboID标记需10 min或更长时间，限制了时间分辨率，而APEX标签需要H_2O_2，其生物毒性限制了其在体内的有效应用。在无膜细胞区室中，单独使用邻近标记酶TurboID或APEX的检测灵敏度或覆盖深度较膜封闭区室显著降低。当采用TransitID多重标记策略时，其灵敏度范围仅为35%~80%，而TransitID的优势在于其高特异性（低假阳性率），但其敏感性（假阴性率）仅为中等[53]。

最新应用研究中，TransitID技术被用来鉴定亚砷酸盐诱导的应激颗粒与细胞核或核仁之间的转运蛋白质组。通过改变标记事件之间的时间间隔，能够区分早期到达和晚期到达的蛋白质。TransitID识别出转录因子JUN（一种原癌基因）是一种应激颗粒蛋白，该蛋白质在去除应激后转运到细胞核。JUN从细胞核迁移到应激颗粒，重新定位到应激颗粒中可保护JUN免受降解，有助于在应激恢复期间保持其功能。此外，研究人员还使用TransitID来研究癌细胞和巨噬细胞之间的细胞间蛋白质交换，能区分通过纳米管或外泌体运输的蛋白质[63]。

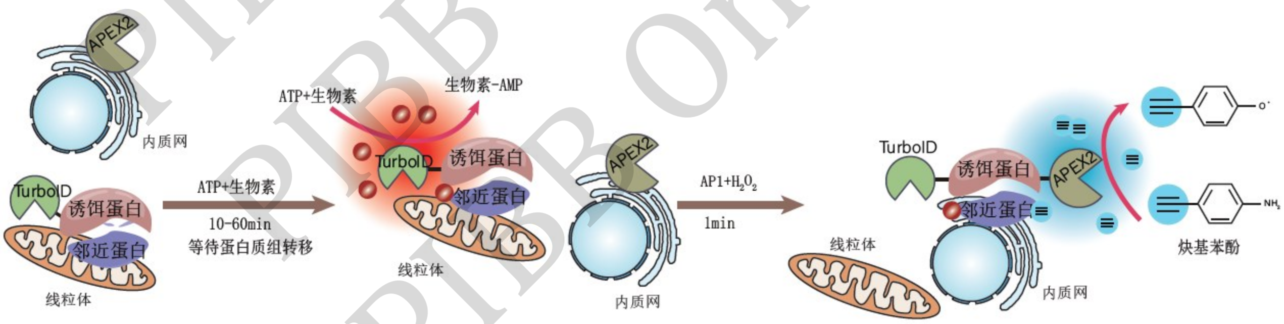


Fig7 Mechanisms of TransitID
图7 TransitID的作用原理

综上，APEX和TransitID等生物素相关的邻近标记技术通过酶促反应实现对目标蛋白质邻近分子的捕获，为亚细胞PPIs及其空间分布的分析提供技术支持。APEX操作流程简单，样本需求量低，其灵敏度也较低；改进后的APEX2在过氧化氢辅助下能在1 min内完成快速标记，且能够捕捉短时程的PPIs；TransitID基于BioID和APEX2两种技术，实现对目标蛋白质的动态标记，为研究区室和细胞之间的运输提供可能，解析亚细胞水平蛋白质转运的动态过程，但其时间分辨率仍需提高。这类技术与MS分析等技术结合，可系统化描绘细胞内PPIs。总体来看，APEX2、TransitID等方法为细胞功能调控及蛋白质相互作用网络的研究提供新的思路。

3 邻近生物素标记技术在疾病领域的应用

邻近生物素标记技术最初研究PPIs，但近年来已有研究将其扩展至蛋白质-RNA、蛋白质-DNA等，特别是在原癌基因和抑癌基因的转录调控、染色体结构改变等方向，BioID、TurboID等邻近生物素标记技术有望阐明其动态调控的机制，为探索肿瘤的发生过程提供新思路（文档S1）。目前邻近生物素标记技术主要应用于基础机制的探索，未来将进一步向临床应用方向发展，用于筛选、验证新的药物靶点，为改善患者的预后提供技术支持。

TurboID、APEX 2、split-TurboID等邻近生物素标记技术为神经系统疾病研究提供了一种更精准、更高效的研究手段，其能够在活体中研究PPIs，构建PPIs网络（文档S1）。随着新型邻近生物素标记不断应用，有望从时间、空间多维度解释神经系统的机制，在神经系统疾病的病理机制与靶点研究方向发挥越来越重要的作用。

TurboID和BioID2邻近生物素标记技术在病原体-宿主相互作用研究中展现出巨大潜力，尤其在解析病毒入侵机制、宿主蛋白质作用等方面发挥了关键作用（文档S1）。邻近生物素标记技术可以在活细胞内捕捉瞬时的PPIs，适用于构建全面的病毒-宿主相互作用网络。未来，邻近生物素标记技术又望在疫苗靶点筛选、抗病毒药物开发等方向发挥重要作用。

免疫系统的激活与调控依赖于精细调控的PPIs，传统技术难以捕捉瞬时且低亲和力的相互作用，邻近生物素标记技术的出现为研究复杂的免疫信号转导提供了新手段（文档S1）。应用TurboID技术可更广泛、更动态的研究免疫信号转导，未来有望用于构建免疫关键酶的相互作用网络，更好地解析免疫疾病的发病机制。应用APEX2技术可筛选出更多调节T细胞活性的靶点，为更精准的免疫抑制疗法提供新思路。邻近生物素标记技术正从基础研究工具向临床研究与药物研发新手段转变，随着新型技术不断发展，其在自身免疫性疾病的治疗等方向会有广阔的应用前景。

应用TurboID技术可动态追踪干细胞的PPIs变化，比较细胞分化前后蛋白质变化，为揭示细胞分化过程的分子机制提供了新的工具（文档S1）。邻近生物素标记技术在干细胞研究中具有重要的应用前景，为再生医学、组织工程、疾病建模等研究方向提供了技术支持。

空间蛋白质组学（spatial protein omics，SPMC）和邻近生物素标记技术在研究蛋白质相互作用方面存在差异（文档S1）。空间蛋白质组学能够对蛋白质在原始空间中的关系进行高通量、多靶标分析，但其结果只能提示蛋白质间可能存在关联，而非直接证明。邻近生物素标记技术虽一次只能验证一个诱饵蛋白的相互作用蛋白质，但其结果证明与诱饵蛋白发生物理接近或相互作用的蛋白质，提供直接相互的物理性证据。此外，邻近生物素标记技术难以直接反映蛋白质在组织中的分布，而空间生物学技术为PPIs提供了宏观组织层面的角度。两种技术在蛋白质研究方面具有互补性，空间生物学技术研究组织层面多蛋白质分布并构建细胞间网络，而邻近生物素标记技术构建细胞内PPIs的微观网络，两者协作可实现组织-细胞-亚细胞多层次PPIs的解析，为深入理解疾病发生机制提供更全面的工具。

综上，邻近生物素标记技术在疾病领域中应用广泛，在肿瘤相关领域主要研究原癌基因和抑癌基因的转录调控、染色体结构改变，在神经系统功能及神经系统疾病相关领域主要研究其机制，在病毒入侵机制相关领域主要研究病毒-宿主相互作用网络，在免疫调控相关领域主要研究免疫信号转导，在干细胞相关领域主要研究细胞分化过程。未来邻近生物素标记技术可能在发病机制广泛应用，并进一步向临床应用方向发展，用于筛选、验证新的药物靶点，为改善患者的预后提供技术支持。同时，邻近生物素标记技术也有望与空间生物学技术相结合，对蛋白质进行更全面又更细致的研究，为深入理解复杂疾病机制与探索新型治疗靶点提供技术支持，成为医学领域更好更全面的工具。

4 展望

本文重点综述了邻近生物素标记技术的研究进展和应用，具体介绍了基于BioID衍生出的许多新技术，包括各种最新技术的研究目的、原理、优缺点（表1）及应用，在不同技术的比较中了解它们的创新点，展现了邻近生物素标记技术在蛋白质与蛋白质、蛋白质与RNA等研究方面的巨大潜能，展示了它们在生命科学研究领域巨大的应用前景。此外，近年来基于APEX技术衍生发展出来的新技术和新方法也是非常值得关注的。对邻近生物素标记技术的发展进程分析可以发现，研究人员改进该技术主要针对于以下四个方面：一是提高生物素连

接酶的催化效率与特异性，二是拓展时间和空间分辨能力，三是降低细胞毒性以适应更广泛的生物体系，四是结合多组学分析，实现更全面的生物学研究。目前，有关PPIs的研究方法仍旧十分有限，基于邻近生物素标记技术的方法，包括未具体介绍的BioID2、APEX2，其中大部分方法都有一定的局限性，这表明未来基于邻近生物素标记技术的方法有待进一步改善。

邻近生物素标记技术就像放大镜，能在研究中发现更多的细节。从细胞层面，由于生物素连接酶可以靶向特定的亚细胞结构，邻近生物素标记技术为研究亚细胞环境中的PPIs提供了强大工具。从个体层面，许多疾病都涉及异常的PPIs网络，邻近生物素标记技术可协助解析疾病相关蛋白的相互作用，揭示疾病进程的关键调控点，从而做到疾病的精准定位，寻找疑难症治愈的可能性。在治疗策略方面，该技术可以针对特定疾病状态下的PPIs网络筛选更有效的方案，评估候选药物对PPIs的

表1　不同邻近生物素标记技术的优缺点

Table 1　The advantages and disadvantages of different proximal biotin labeling techniques

技术	发明年份	改进部分	催化速率	标记半径	生物素浓度	细胞毒性	实验范围	优点	缺点	参考文献
BioID	2012	BirA	18~24 h	<10 nm	50 μmol/L	+/-	细胞、动物	无细胞毒性	标记效率低	[5]
TurboID	2018	BioID	<10 min	>35 nm	50~500 μmol/L	+++	细胞、动物	活性高，低温保存活性	细胞毒性、错误的高背景标记	[13]
miniTurbo	2018	BioID	10 min~2 h	10~35 nm	50~500 μmol/L	++	细胞	低温保存活性	亲和力低，稳定性差	[13]
Split-Turbo	2020	TurboID	4 h	未测	50 μmol/L	++	细胞	高时空可控性	依赖PPIs的稳定性	[23]
ProtA-Turbo	2021	TurboID	10 min	>35 nm	50 μmol/L	+	细胞	适用于不同的靶蛋白	依赖高质量抗体，靶蛋白需要可用蛋白质	[24]
AirID	2020	BitID	3~24 h	未测	0.5~50 μmol/L	+	细胞、具备动物应用潜力	低毒性	标记速度稍慢	[20]
UltraID	2022	BioID	10 min	未测	50 μmol/L	未测	细胞	尺寸（<20 ku）小	可能过度标记	[31]
RNA-BioID	2018	BioID	16~24 h	未测	50 μmol/L	+/-	细胞	识别RNA-蛋白质相互作用	非特异性结果	[64]
APEX	2014	HRP	1 min	<20 nm	500 μmol/L（生物素-苯酚）	+++（超过1min急性损伤）	细胞	操作简单，研究已识别蛋白质的拓扑结构	高浓度产生二聚体伪影，低浓度灵敏度低	[52]
APEX2	2015	APEX	1min	<20 nm	1 mmol/L（H_2O_2）	++	细胞、动物（仅用于活体原位标记）	温度适应性更好	H_2O_2可能引起毒性	[44]
TransitID	2023	TurboID	<10 min	>35 nm	50~500 μmol/L	+++	细胞	识别动态运动信息	时间分辨率受限	[53]
		APEX2	<1 min	<20 nm	1 mmol/L（H_2O_2）	++				

影响，从而制定个性化的治疗策略。目前，邻近生物素标记技术主要针对于模式生物、人类，在植物、微生物等其他生物体系中的应用有限，该技术有望解析病原菌与宿主的相互作用机制，另外该技术有拓展至农业、生态学等领域的趋势，这表明未来新型生物技术有待进一步开发应用。

邻近生物素标记技术自开发以来，已成为研究PPIs的重要工具，随着生物素连接酶的优化、时间和空间分辨率的提升、细胞毒性的减低以及多组学整合分析的进展，该技术的应用范围将进一步扩展。如APEX与化学交联质谱（chemical crosslinking coupled with mass spectrometry，CXMS）技术结合，可以在亚细胞水平系统绘制PPIs网络，为揭示细胞信号通路和疾病机制提供新的工具。而在医疗领域，邻近生物素标记技术不仅可发现潜在生物标志物，例如TurboID技术筛选出了一批可能影响口腔癌预后的关键蛋白质，为临床诊断提供新的潜在生物标志物，也可用于寻找新的药物靶点；AXL（希腊语Anexelekto）受体酪氨酸激酶作为潜在共受体，参与新冠病毒入侵过程，这为阻断病毒入侵提供了潜在靶点。在精准医疗的大背景下，医疗健康消费水平和需求在不断提升，邻近生物素标记技术有望在疾病机制研究、药物开发、治疗策略制定等方面发挥重要作用，为生命科学研究提供更加精准、高效的工具，推动医疗卫生领域向更高端迈进。

附件 见本文网络版（http://www.pibb.ac.cn，http://www.cnki.net）：

PIBB_20250354_文档_S1.pdf

参 考 文 献

[1] Golkowski M, Lius A, Sapre T, *et al*. Multiplexed kinase interactome profiling quantifies cellular network activity and plasticity. Mol Cell, 2023, **83**(5): 803-818.e8

[2] Li Z, Zhang Y, Zhou P. Temporal protein complex identification based on dynamic heterogeneous protein information network representation learning. IEEE/ACM Trans Comput Biol And Bioinf, 2024, **21**(5): 1154-1164

[3] Rhee H W, Zou P, Udeshi N D, *et al*. Proteomic mapping of mitochondria in living cells *via* spatially restricted enzymatic tagging. Science, 2013, **339**(6125): 1328-1331

[4] Choi-Rhee E, Schulman H, Cronan J E. Promiscuous protein biotinylation by Escherichia coli biotin protein ligase. Protein Sci, 2004, **13**(11): 3043-3050

[5] Roux K J, Kim D I, Raida M, *et al*. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. J Cell Biol, 2012, **196**(6): 801-810

[6] Kotani N, Gu J, Isaji T, *et al*. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, **105**(21): 7405-7409

[7] Martell J D, Deerinck T J, Sancak Y, *et al*. Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. Nat Biotechnol, 2012, **30**(11): 1143-1148

[8] Fernández-Suárez M, Chen T S, Ting A Y. Protein-protein interaction detection *in vitro* and in cells by proximity biotinylation. J Am Chem Soc, 2008, **130**(29): 9251-9253

[9] D'Arcy B R, Lennox A L, Manso Musso C, *et al*. Non-muscle myosins control radial glial basal endfeet to mediate interneuron organization. PLoS Biol, 2023, **21**(2): e3001926

[10] Roux K J, Kim D I, Burke B, *et al*. BioID: a screen for protein-protein interactions. Curr Protoc Protein Sci, 2018, **91**(1): 19.23.1-19.23.**15**

[11] Kim D I, Jensen S C, Noble K A, *et al*. An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. Mol Biol Cell, 2016, **27**(8): 1188-1196

[12] Uezu A, Kanak D J, Bradshaw T W, *et al*. Identification of an elaborate complex mediating postsynaptic inhibition. Science, 2016, **353**(6304): 1123-1129

[13] Branon T C, Bosch J A, Sanchez A D, *et al*. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. Nat Biotechnol, 2018, **36**(9): 880-887

[14] Cho K F, Branon T C, Udeshi N D, *et al*. Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. Nat Protoc, 2020, **15**(12): 3971-3999

[15] May D G, Scott K L, Campos A R, *et al*. Comparative application of BioID and TurboID for protein-proximity biotinylation. Cells, 2020, **9**(5): E1070

[16] Mair A, Xu S L, Branon T C, *et al*. Proximity labeling of protein complexes and cell-type-specific organellar proteomes in *Arabidopsis* enabled by TurboID. Elife, 2019, **8**: e47864

[17] Zhang Y, Song G, Lal N K, *et al*. TurboID-based proximity labeling reveals that UBR7 is a regulator of N NLR immune receptor-mediated immunity. Nat Commun, 2019, **10**(1): 3252

[18] Larochelle M, Bergeron D, Arcand B, *et al*. Proximity-dependent biotinylation mediated by TurboID to identify protein-protein interaction networks in yeast. J Cell Sci, 2019, **132**(11): jcs232249

[19] Santos-Barriopedro I, van Mierlo G, Vermeulen M. Off-the-shelf proximity biotinylation using ProtA-TurboID. Nat Protoc, 2023, **18**(1): 36-57

[20] Kido K, Yamanaka S, Nakano S, *et al*. AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein-protein interactions. Elife, 2020, **9**: e54983

[21] De Munter S, Görnemann J, Derua R, *et al*. Split-BioID: a proximity biotinylation assay for dimerization-dependent protein interactions. FEBS Lett, 2017, **591**(2): 415-424

[22] Schopp I M, Amaya Ramirez C C, Debeljak J, *et al*. Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. Nat Commun, 2017,

8: 15690

[23] Cho K F, Branon T C, Rajeev S, *et al*. Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, **117**(22): 12143-12154

[24] Santos-Barriopedro I, van Mierlo G, Vermeulen M. Off-the-shelf proximity biotinylation for interaction proteomics. Nat Commun, 2021, **12**(1): 5015

[25] Bar D Z, Atkatsh K, Tavarez U, *et al*. Biotinylation by antibody recognition-a method for proximity labeling. Nat Methods, 2018, **15**(2): 127-133

[26] Li X, Zhou J, Zhao W, *et al*. Defining proximity proteome of histone modifications by antibody-mediated protein A-APEX2 labeling. Genom Proteom Bioinform, 2022, **20**(1): 87-100

[27] Schaack G A, Sullivan O M, Mehle A. Identifying protein-protein interactions by proximity biotinylation with AirID and splitAirID. Curr Protoc, 2023, **3**(3): e702

[28] Inoue R, Fukutani Y, Niwa T, *et al*. Identification and characterization of proteins that are involved in RTP1S-dependent transport of olfactory receptors. Int J Mol Sci, 2023, **24**(9): 7829

[29] Yamada K, Shioya R, Nishino K, *et al*. Proximity extracellular protein-protein interaction analysis of EGFR using AirID-conjugated fragment of antigen binding. Nat Commun, 2023, **14**(1): 8301

[30] Sugiyama S, Yamada K, Denda M, *et al*. CF-PPiD technology based on cell-free protein array and proximity biotinylation enzyme for *in vitro* direct interactome analysis. Sci Rep, 2022, **12**(1): 10592

[31] Kubitz L, Bitsch S, Zhao X, *et al*. Engineering of ultraID, a compact and hyperactive enzyme for proximity-dependent biotinylation in living cells. Commun Biol, 2022, **5**(1): 657

[32] Cai B, Mhetre A B, Krusemark C J. Selection methods for proximity-dependent enrichment of ligands from DNA-encoded libraries using enzymatic fusion proteins. Chem Sci, 2023, **14**(2): 245-250

[33] Moore M J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. Science, 2005, **309**(5740): 1514-1518

[34] Keene J D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. Nat Rev Genet, 2007, **8**(7): 533-543

[35] Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, *et al*. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. Cell, 2012, **149**(6): 1393-1406

[36] Lee J T. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. Science, 2012, **338**(6113): 1435-1439

[37] Wang P, Xue Y, Han Y, *et al*. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. Science, 2014, **344**(6181): 310-313

[38] Buenrostro J D, Araya C L, Chircus L M, *et al*. Quantitative analysis of RNA-protein interactions on a massively parallel array reveals biophysical and evolutionary landscapes. Nat Biotechnol, 2014, **32**(6): 562-568

[39] Mukherjee J, Franz-Wachtel M, Maček B, *et al*. RNA interactome identification *via* RNA-BioID in mouse embryonic fibroblasts. Bio Protoc, 2020, **10**(1): e3476

[40] Varnaitė R, MacNeill S A. Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID. PROTEOMICS, 2016, **16**(19): 2503-2518

[41] Mukherjee J, Hermesh O, Eliscovich C, *et al*. β-Actin mRNA interactome mapping by proximity biotinylation. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, **116**(26): 12863-12872

[42] Delhaye L, De Bruycker E, Volders P J, *et al*. Orthogonal proteomics methods to unravel the HOTAIR interactome. Sci Rep, 2022, **12**(1): 1513

[43] Patterson W R, Poulos T L. Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. Biochemistry, 1995, **34**(13): 4331-4341

[44] Lam S S, Martell J D, Kamer K J, *et al*. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. Nat Methods, 2015, **12**(1): 51-54

[45] Henriksen A, Smith A T, Gajhede M. The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. J Biol Chem, 1999, **274**(49): 35005-35011

[46] Bendayan M. Tech.Sight. worth its weight in gold. Science, 2001, **291**(5507): 1363-1365

[47] Mayer G, Bendayan M. Biotinyl-tyramide: a novel approach for electron microscopic immunocytochemistry. J Histochem Cytochem, 1997, **45**(11): 1449-1454

[48] Minamihata K, Goto M, Kamiya N. Protein heteroconjugation by the peroxidase-catalyzed tyrosine coupling reaction. Bioconjug Chem, 2011, **22**(11): 2332-2338

[49] Rogers M S, Hurtado-Guerrero R, Firbank S J, *et al*. Cross-link formation of the cysteine 228-tyrosine 272 catalytic cofactor of galactose oxidase does not require dioxygen. Biochemistry, 2008, **47**(39): 10428-10439

[50] Schönhuber W, Fuchs B, Juretschko S, *et al*. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**(8): 3268-3273

[51] Costantini L M, Fossati M, Francolini M, *et al*. Assessing the tendency of fluorescent proteins to oligomerize under physiologic conditions. Traffic, 2012, **13**(5): 643-649

[52] Hung V, Zou P, Rhee H W, *et al*. Proteomic mapping of the human mitochondrial intermembrane space in live cells *via* ratiometric APEX tagging. Mol Cell, 2014, **55**(2): 332-341

[53] Qin W, Cheah J S, Xu C, *et al*. Dynamic mapping of proteome trafficking within and between living cells by TransitID. Cell, 2023, **186**(15): 3307-3324.e30

[54] Wei W, Riley N M, Yang A C, *et al*. Cell type-selective secretome profiling *in vivo*. Nat Chem Biol, 2021, **17**(3): 326-334

[55] Kim K E, Park I, Kim J, *et al*. Dynamic tracking and identification of tissue-specific secretory proteins in the circulation of live mice. Nat Commun, 2021, **12**(1): 5204

[56] Qin W, Cho K F, Cavanagh P E, *et al*. Deciphering molecular interactions by proximity labeling. Nat Methods, 2021, **18**(2):

133-143

[57] Go C D, Knight J D R, Rajasekharan A, *et al*. A proximity-dependent biotinylation map of a human cell. Nature, 2021, **595**(7865): 120-124

[58] Youn J Y, Dunham W H, Hong S J, *et al*. High-density proximity mapping reveals the subcellular organization of mRNA-associated granules and bodies. Mol Cell, 2018, **69**(3): 517-532.e11

[59] Markmiller S, Soltanieh S, Server K L, *et al*. Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules. Cell, 2018, **172**(3): 590-604.e13

[60] Lobingier B T, Hüttenhain R, Eichel K, *et al*. An approach to spatiotemporally resolve protein interaction networks in living cells. Cell, 2017, **169**(2): 350-360.e12

[61] Paek J, Kalocsay M, Staus D P, *et al*. Multidimensional tracking of GPCR signaling *via* peroxidase-catalyzed proximity labeling. Cell, 2017, **169**(2): 338-349.e11

[62] Cao Y, Dong M Q. TransitID maps translocated proteins en masse through tandem proximity labeling and enrichment. Sci Bull: Beijing, 2023, **68**(19): 2139-2141

[63] Cheah J S. Unbiased mapping of protein trafficking with TransitID. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, **24**(12): 853

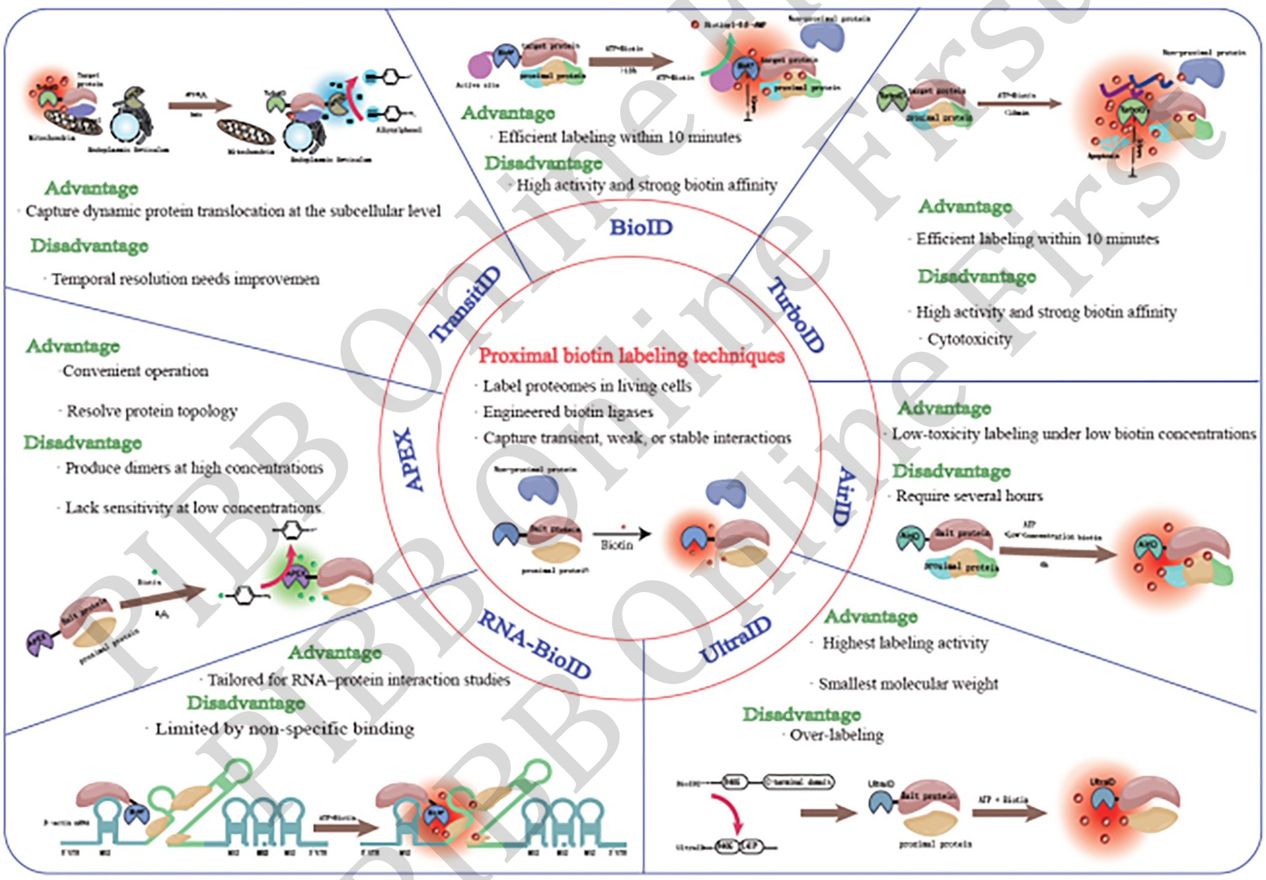
[64] Ramanathan M, Majzoub K, Rao D S, *et al*. RNA-protein interaction detection in living cells. Nat Methods, 2018, **15**(3): 207-212

Development and Application of Proximal Biotin Labeling Techniques*

FANG Tian-Yuan, ZHOU Yu-Yu, ZHANG Chu-Xia, ZHOU Chen-Xuan, CHEN Shi-Yu, LIN Zhi-Cheng, LEI Bin, CHEN Lu-Yi, YING Jia-Qin, CHEN Hui, JIANG Yi, HUANG Yu-Han, LIU Zhi-Tao, LI Li-Ping**

(*Department of Physiology and Pharmacology, Health Science Centre, Ningbo University, Ningbo* 315211, China)

Graphical abstract



Abstract The formation of protein-protein interaction (PPI) networks is a central event in biochemical reactions within organisms. These interactions not only regulate normal physiological functions but are also closely associated with the onset and progression of diseases. PPIs are intricately regulated by proteins, nucleic acids, and their interactions. The complex molecular networks formed between these molecules serve as the foundation for most biochemical reaction events. Moreover, biological information is transmitted through countless molecular interactions within the cellular environment. A wide range of technologies has been developed to study PPIs, among which proximity-dependent biotinylation is a novel technique for labeling proteomes in living cells. This method utilizes engineered biotin ligases to specifically label nearby proteins or RNA molecules, enabling the capture of transient, weak, or stable interactions and facilitating the systematic construction of molecular interaction maps. Through continuous enzyme optimization and refinement, proximity-dependent biotinylation techniques have evolved into diverse systems with improved operational convenience and labeling efficiency. Each proximity-dependent biotinylation technique offers unique advantages: BioID is non-toxic to cells but suffers from low labeling efficiency, requires 18–24 h for labeling, and yields limited biotinylated products. TurboID achieves efficient labeling within 10 min, but its high activity and strong biotin affinity may lead to cytotoxicity. AirID enables low-toxicity labeling under low biotin concentrations but requires several hours to complete. UltraID offers the highest labeling activity with the smallest molecular weight but is prone to over-labeling. APEX provides convenient operation and can resolve protein topology, yet it has concentration-dependent limitations—forming dimers at high concentrations and lacking sensitivity at low concentrations. RNA-BioID is tailored for studying RNA–protein interactions but is limited by non-specific binding. TransitID can capture dynamic protein translocation at the subcellular level, though its temporal resolution still requires improvement. This review systematically summarizes the development, mechanisms, advantages, and disadvantages of proximity-dependent biotinylation techniques such as BioID, TurboID, AirID, UltraID, RNA-BioID, APEX, and TransitID. It also explores their cutting-edge applications in functional regulation and disease research. Proximity-dependent biotinylation techniques are widely used in disease-related studies. In tumor research, they are primarily applied to investigate the transcriptional regulation and chromosomal structural changes of proto-oncogenes and tumor suppressor genes. In the field of neuroscience, they are used to study mechanisms underlying nervous system function and neurological diseases. In viral infection mechanisms, they help elucidate virus–host interaction networks. In immune regulation, they contribute to the study of immune signaling pathways. In stem cell research, they aid in understanding cell differentiation processes. Furthermore, proximity-dependent biotinylation techniques hold promise for integration with spatial biology technologies, enabling more comprehensive and detailed protein studies. These techniques are expected to provide more accurate and efficient tools for life science research and to advance the medical and health fields to a higher level. By comprehensively analyzing the strengths, limitations, and innovative potential of each method, this review also highlights their advantageous applications in molecular interaction studies, aiming to provide methodological guidance and theoretical support for molecular mechanism research in the life sciences.

Key words　proximal biotin labeling techniques, protein-protein interactions, BioID, TurboID, AirID, UltraID, APEX, RNA-BioID, TransitID
DOI：10.3724/j.pibb.2025.0354　　**CSTR**：32369.14.pibb.20250354

---

* This work was supported by grants from Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY23H090004), the Fundamental Research Funds for the Provincial Universities of Zhejiang (SJLY2023008), the Natural Science Foundation of Ningbo (2023J068), Ningbo Education Science Planning Project (2025YZD004), Ningbo University Teaching and Research Project (JYXM2025027), College Students' Scientific and Technological Innovation Project (Xin Miao Talent Plan) of Zhejiang Province (2024R405A069, 2025R405A076), Zhejiang Provincial College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program Project (S202511646004), and the Student Research, Innovation Program (SRIP) of Ningbo University (2025SRIP1931, 2025SRIP1909).

** Corresponding author.
Tel：86-574-87609594，E-mail：liliping@nbu.edu.cn

Received：July 27，2025　Accepted：October 16，2025