

APEX/APEX2邻近标记方法在膜蛋白研究中的应用

刘云¹ 臧奕^{2*} 李佳^{1,2*}

(¹中国药科大学, 南京 210009; ²中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要 膜蛋白(membrane proteins, MPs)参与人体内各种复杂的生命活动, 了解MPs的结构、功能以及它们的相互作用网络是揭示相关蛋白如何参与复杂的生物学过程的前提。随着蛋白结构预测、结构解析等方面的一系列技术的不断发展, 结构获得破解的MPs的数量一直在稳步增加, 但是, 关于MPs结构和功能的信息仍然非常稀缺。近年来, 基于工程抗坏血酸过氧化物酶(engineered ascorbate peroxidase, APEX/APEX2)的邻近蛋白标记技术被广泛应用于探索MPs的亚细胞定位、解析MPs的拓扑结构, 追踪MPs的动态迁移过程, 以及寻找MPs的相互作用蛋白, 该方法为空间受限的MPs的系统分析提供了一种高通量的方法。该综述归纳总结了APEX/APEX2依赖的邻近标记方法在MPs研究中的应用, 为MPs的深入研究提供了方法和技术参考。

关键词 膜蛋白; APEX/APEX2; 邻近标记; 亚细胞定位; 拓扑结构; 蛋白-蛋白相互作用;

The Application of APEX/APEX2-Based Proximity Labeling in MP Research

LIU Yun¹, ZANG Yi^{2*}, LI Jia^{1,2*}

(¹China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; ²Shanghai Institute of Material Medical, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract MPs (membrane proteins) are involved in various complex life activities in human body. Understanding the structure, function and interaction network of MPs is the premise of revealing how the proteins participate in complex biological processes. With the continuous development of a series of technologies in protein structure prediction and analysis, the number of MPs whose structures have been cracked has been increasing steadily. However, information about the structure and function of MPs is still very scarce. Recently, the proximity labeling technology based on engineering ascorbate peroxidase (APEX/APEX2) has been widely used to explore the subcellular localization and topology of MPs, track the dynamic migration of MPs, and find the interacting proteins of MPs. This method provides a high-throughput method for the system analysis of space constrained MPs. This review summarizes the application of APEX/APEX2-based proximity labeling in MP research and provides some methods and technical references for the in-depth study of MPs.

Keywords membrane protein; APEX/APEX2; proximity labeling; subcellular localization; topology; protein-protein interaction

膜蛋白(membrane proteins, MPs)是指分布于细胞膜、核膜以及细胞器膜等生物膜的蛋白, 包括单次或多次跨脂质双分子层的整合膜蛋白, 与脂质双

分子层或整合膜蛋白以氢键结合分布于生物膜表面的外周膜蛋白, 以及与脂分子共价结合插入脂质双分子层的脂锚定蛋白^[1]。据统计, MPs约占人类所有

收稿日期: 2022-08-05 接受日期: 2022-09-29

上海市科委项目(批准号: 22ZR1415200)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-50800753-124, E-mail: yzang@simmm.ac.cn; jli@simmm.ac.cn

Received: August 5, 2022 Accepted: September 29, 2022

This work was supported by Shanghai Committee of Science and Technology, China (Grant No.22ZR1415200)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-50800753-124, E-mail: yzang@simmm.ac.cn; jli@simmm.ac.cn

基因编码蛋白质的30%^[2],它们通过介导物质运输、发送和接收化学信号、传播电脉冲、调节细胞内囊泡转运、控制膜脂组成等方式,在组织和维持细胞器和细胞本身的形态和功能方面发挥重要作用^[3]。MPs的异常表达或缺失通常与一些严重的疾病,如内质网膜蛋白Snx14与小脑共济失调相关^[4];内质网膜蛋白SIGMAR1的缺陷会损害线粒体清除,从而引起自噬相关的疾病^[5];核膜蛋白LBR和Emerin突变或核膜缺陷分别与雷诺氏综合征(Reynolds syndrome)、肌肉营养不良(X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy, X-EDMD)相关等^[6-7]。

MPs在广泛的生物过程中起着至关重要的作用,它不仅是基础研究的重要方向,而且已经成为药物开发的关键靶点,在现有的药物靶点中,MPs占50%以上^[8]。然而,迄今为止人们对MPs结构与功能的认识只是冰山一角,对MPs的深入探索急不可待。MPs的特殊膜定位,导致膜蛋白的纯化难以实现,且膜蛋白抗体的灵敏度和特异性难以满足实验要求。因此,蛋白研究的一系列经典方法并不适用于对膜蛋白的研究。为了深入研究膜蛋白结构与功能,人们开发了一种新方法——邻近蛋白标记技术^[9],其中基于工程抗坏血酸过氧化物酶(engineered ascorbate peroxidase, APEX/APEX2)邻近蛋白标记方法是当前应用最多的方法。APEX/APEX2依赖的邻近蛋白标记方法非常适用于活细胞中蛋白质的研究,可以在更具生理学相关性的条件下进行研究相关蛋白质在细胞内所处的环境^[10],所以该方法对于难以纯化的膜蛋白是一种优选的研究方法。APEX/APEX2依赖的邻近蛋白标记方法是一种高效的、高灵敏度

的、高时空分辨率的蛋白质研究方法。近年来,该方法已经被广泛应用于鉴定候选蛋白的膜定位,描绘已知膜蛋白的动态迁移过程,以及发现候选膜蛋白的蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interactions, PPIs)^[11]。

1 基于APEX/APEX2的邻近标记方法

邻近标记依赖于将底物转化为活性自由基的酶,活性自由基促进邻近的蛋白质与生物素共价结合。目前,有多种酶被应用于邻近标记,主要包括生物素连接酶和过氧化物酶^[12]。根据所使用的酶,将邻近标记方法进行分类(表1)。其中, APEX/APEX2是邻近标记应用最广泛工具酶。

1.1 APEX邻近标记的原理及特点

APEX是一种来源于植物的工程抗坏血酸过氧化物酶^[13],经H₂O₂活化后, APEX催化其底物生物素-苯酚转化为短效(<1 ms)且高活性的自由基,该自由基可与附近内源性蛋白质中富含电子的氨基酸(如酪氨酸、色氨酸、组氨酸等)共价结合^[14],使得这些蛋白质带上生物素标记(图1)。反应可通过去除H₂O₂或加入淬灭缓冲液而停止^[15],随后可使用链霉亲和素珠分离所得生物素化蛋白质,并通过质谱进一步分析。此外, APEX可催化二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)的聚合和沉淀,使用四氧化锇(OsO₄)固定,可用于电子显微镜观察到表达APEX的结构。

APEX相对于其他邻近标记方法具有很多优势,与BioID相比, APEX反应更加迅速(<1 min),标记半径更小(<20 nm)^[16],且APEX几乎不影响相关蛋

表1 不同酶依赖的邻近标记方法
Table 1 Proximity labeling based on different enzyme

指标 Target	生物素连接酶 BioID	工程抗坏血酸过氧化物酶 APEX/APEX2
Enzyme activity	Biotin ligase	Peroxidase
Relative molecular mass	27-35 kDa	27 kDa
Labeling time	15-18 h	1 min
Incubation time	15-24 h	30-60 min
H ₂ O ₂ activation	Not required	Required
Labeling substrate	Biotin	Biotin-phenol
Half-life of free radicals	mins	< 1 ms
Advantages	Versatility, simple	High activity
Disadvantages	Time-consuming, instability, impairment on protein functions	Possibility of cell oxidative damage, dosage control required

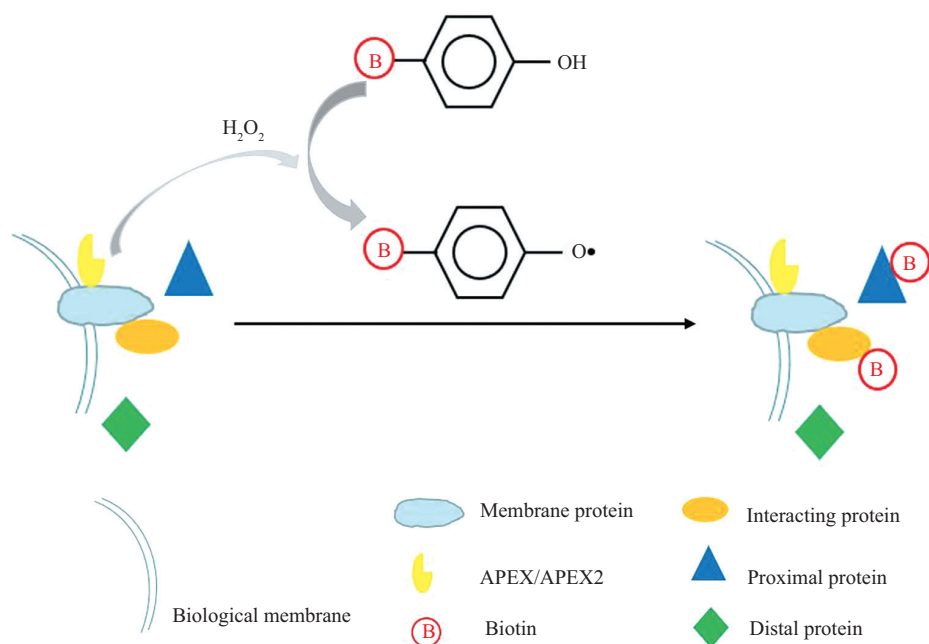


图1 APEX/APEX2邻近蛋白标记示意图

Fig.1 Schematic representation of APEX/APEX2-based proximity labeling

白本身的功能。一方面, APEX可以通过电子显微镜 (electron microscope, EM) 和时空分辨蛋白质图谱用于细胞内特异性蛋白质成像, 另一方面, APEX的快速动力学使得APEX依赖的邻近蛋白标记技术可以更高效、更灵敏地识别目的蛋白的相互作用蛋白^[17]。

1.2 APEX2是APEX的优化突变体

APEX标记方法的应用存在一个最主要的局限性, 即APEX的酶活性相对较低, 当APEX以低水平表达时, 其与DAB和生物素-酚的反应几乎无法检测。在某些情况下可以通过增加表达量来改善, 但是对于许多构建的融合蛋白来说, 极高水平的过表达对细胞可能是有害的。

酵母相关实验发现了一种APEX的优化突变体——APEX2(A134P)^[18]。与APEX相比, APEX2的过氧化物酶活性高得多。通过显微镜观察到许多细胞以非常低的水平表达APEX2, 这种低表达的APEX2在细胞内仍具有高生物素化活性, 并且不会引起明显的细胞形态或功能异常。此外, APEX2还提高了对内源性蛋白质的标记效率和EM成像的敏感性。因此, APEX2已经完全替代了APEX, APEX2介导的邻近蛋白标记技术是一种更优化的蛋白研究方法。

2 APEX2标记方法在MPs研究中的应用

APEX2是确定体内蛋白质分子环境的重要技

术。APEX2-融合蛋白的多个拷贝可能位于不同的环境中, 并且每个融合蛋白在标记时间内提供信号, 由于标记反应迅速, 该方法非常适合于研究动态生物系统中不断变化的蛋白分子。APEX2标记的高特异性和膜不渗透性表明该方法可以用于活细胞亚细胞区域蛋白质组的标记^[15]。目前人们已经将APEX2与质谱等多种方法联用, 以用于研究难以纯化的MPs。利用APEX2标记不仅可以验证膜蛋白的定位、描绘膜蛋白的动态迁移, 还可以发现膜蛋白的相互作用蛋白(表2)。

2.1 APEX2标记方法鉴定MPs的定位与拓扑结构

蛋白质定位与其在细胞或组织中的特定功能相关, 将蛋白质定位信息映射到其细胞超微结构背景对细胞生物学研究具有重要意义。APEX2既可以作为电子显微镜标记, 也可以作为活细胞亚结构域内蛋白质组分的标记酶。APEX2已经被广泛应用于鉴定蛋白的膜定位, 如内质网膜、线粒体膜以及神经元质膜等, 不仅能很好地保存细胞超微结构, 而且具有显著的EM对比度。

Sigma-1受体(Sigma-1 receptor, S1R)是一种编码223个氨基酸的内质网跨膜蛋白。有研究报道, S1R不仅存在于内质网膜中, 还存在于核膜, 且关于内质网膜内S1R确切拓扑结构的报道相互矛盾, 但是均缺少明确的证据。在一项研究中, 研究者在

表2 APEX2标记在膜蛋白研究中的应用

Table 2 The application of APEX/ APEX2-based proximity labeling in MPs research

膜蛋白 MPs	应用 Applications	参考文献 References
S1R	Subcellular localization, topology, PPIs	[19-20,37]
MGARP	Subcellular localization, topology	[25]
Mff, hFis1	Subcellular localization	[26]
B2AR	Dynamic migration, PPIs	[29]
AT1R	Dynamic migration, PPIs	[32]
JAM-C	Dynamic migration, PPIs	[33]
hTAC	Dynamic migration, PPIs	[34]
B2R	Dynamic migration, PPIs	[35]
BLT2	PPIs	[36]
Snx14	PPIs	[4]
VAPB	PPIs	[39]
Emerin	PPIs	[40]
INC	Dynamic migration, PPIs	[42]

S1R缺失的神经元细胞系中表达 S1R-GFP-APEX2 后, 通过将APEX2技术与金/银染色法相结合来提高 EM分辨率, 并通过应用连续切片策略来解卷积S1R 的三维核分布, 获得了高质量的EM成像。该图像清楚地显示了细胞核中的S1R^[19]。对序列和横截面的进一步分析表明, 虽然S1R出现在核内, 但实际上存在于从核膜向内部凹陷的核质网中。另一项研究中, 研究者构建了S1R不同截短肽段与APEX2融合蛋白, 以经典的含有内质网跨膜结构域的蛋白Sec61B为对照, 根据金/银染色增强电镜的结果, 得到全长S1R 的N-端面对胞质而C-端面对内质网腔的结论^[20]。APEX2标记方法的应用, 一方面为S1R蛋白提供了更全面的定位信息, 另一方面为S1R蛋白的拓扑结构提供了更明确的答案。这些发现为解读S1R在调节细胞核活动中的功能提供了新的方向。

由核染色体编码的富含谷氨酸的蛋白质MGARP 是一种线粒体定位蛋白, 该蛋白在类固醇组织(卵巢、睾丸和肾上腺)和视觉系统中高度表达^[21-23], 参与类固醇生成, 并通过调节新皮质神经元的线粒体分布和运动来负性介导新皮质发育^[24]。根据生物信息学预测, 并利用细胞和生化方法证实其位于线粒体内, 但没有直接明确的证据表明其确切位置^[25]。研究者构建了MGARP-APEX2融合蛋白, DAB染色后, 结合EM, 精确地显示MGARP位于线粒体内膜/嵴膜中, 同时构建了MGARP截短突变体-APEX2融合蛋白, 以Mito-Tracker染色为对照, 证实了MGARP 在线粒体中的定位取决于其结构完整性, 并且MGARP的跨膜和N-端区域对其定位和功能至关重要。

APEX2标记还被多次应用于鉴定其他线粒体蛋白的膜定位。LIN等^[26]研究人员将APEX2标记和聚焦离子束扫描电子显微镜(cryo-focused ion beam scanning electron microscopy, FIB-SEM)联用, 在3D 细胞超微结构背景下观察到Mff和hFis1分布在线粒体外膜。APEX2标记方法不仅适用于细胞器膜蛋白的研究, 还适用于神经元质膜蛋白的研究。HIRABAYASHI等^[27]研究人员通过将APEX2与相关光连续切片电子显微镜(correlated light-serial scanning electron microscopy, CoLSSEM)联用, 提高了连接多尺度神经元投射的准确性和可行性, 能够在体内特别“突出”从树突棘到轴突的单个神经元的质膜。

即使是膜蛋白被锚定在特定的膜结构域内, APEX2标记技术也同样可以获得相关蛋白的精确定位信息, 这是探索一种全新蛋白的生理功能的最为关键的一步, 为膜蛋白等一些较难研究蛋白相关的工作提供了一种新的方法。同时, 作为一种蛋白定位的鉴定方法, 可以为尚未完全明确定位的蛋白补充更为明确的蛋白定位证据, 且能够更广泛地发现蛋白在细胞内的多区域定位。

2.2 APEX2标记描绘MPs的动态迁移

蛋白质在体内从合成、利用到降解是一个动态的过程, 所以并不是所有的膜蛋白都是一直锚定在膜上的, 膜蛋白在细胞内的动态过程是时间和空间的结合。蛋白结构测定相关的实验方法能够解析生物膜上的静态蛋白质-蛋白质复合物, 但缺乏对无序、柔性结构域以及动态相互作用相关的解析。APEX2标记可以更加详细与精准地描绘蛋白在细胞

内实现一系列功能的动态迁移过程。

人类基因组包含约5 000个整合膜蛋白, 其中G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)超过800个^[1,28]。近年来, GPCR研究取得了重大进展, 尤其是在受体结构、动力学和药理学研究方面。GPCR相关药物在FDA批准的药物中占30%以上。尽管如此, GPCR信号转导的许多主要方面仍不完全确定, 传统的GPCR信号分析方法存在单通路检测、有限的时间分辨率等局限性。LOBINGIER等^[29]研究者以经典的GPCR之一—— β 2肾上腺素能受体(Beta-2 adrenergic receptor, B2AR)验证APEX2邻近蛋白标记方法的高时空分辨率, 相关报道于2017年在*Cell*发表。他们通过分析异丙肾上腺素激活B2AR-APEX2后不同时间点生物素化的蛋白质, 揭示了B2AR在激活后所处环境的动态变化, 充分证实了APEX2邻近蛋白标记方法可以监测MPs的动态迁移过程。作为最大的信号受体家族, GPCR介导对各种刺激的生理反应, 包括激素、神经递质和光^[30]。与激动剂结合后, GPCR经历一系列级联反应^[31]。APEX2标记方法具有较高的时间分辨率, 能够检测GPCR与相关配体结合后发生的位置迁移。同年, *Cell*再次发表了一项APEX2标记方法应用于解析GPCR信号通路的研究, 研究人员以血管紧张素II 1型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1R)为模型, 在细胞水平稳定表达AT1R-APEX2融合蛋白, 分别在激动剂(血管紧张素II)和拮抗剂(氯沙坦)处理后的短时间内的不同时间点快速采样, 发现了AT1R在内吞过程中的信号传递功能^[32]。

连接黏附分子C(junctional adhesion molecule-C, JAM-C)是免疫球蛋白超家族的I型整合膜蛋白, 介导多种内皮细胞功能, 如白细胞跨内皮细胞迁移、血管生成和血管通透性。在细胞迁移和血管生成过程中, 动态的JAM-C转运和降解是连接重塑所必需的。然而, 对于JAM-C动态转运的分子机制及其对功能的重要性几乎一无所知。研究者使用APEX2标记来绘制JAM-C在细胞内的运输路线, 并通过比较WT JAM-C-APEX2与Quad-K JAM-C-APEX2标记的生物素化蛋白之间的差异, 发现了JAM-C发生泛素化降解的相关机制^[33]。此外, 研究者们同样通过构建MP-APEX2融合蛋白, 利用APEX2标记发现了白细胞介素-2受体的 α 链(the α chain of the interleukin-2 receptor, IL-2R α , 也称为hTAC)和缓激肽2受体(bra-

dykinin 2 receptor, B2R)的内吞作用以及在质膜上再循环的动态过程^[34-35]。为了深入探索参与hTAC内吞和细胞内转运的分子, 他们采用APEX2邻近标记方法, 原位定位了参与活细胞中hTAC内吞和转运的潜在蛋白质。

APEX2标记的一个最显著的优点即可以在活细胞中对相关蛋白进行标记, 使得APEX2标记方法可以时空分辨地表征相关蛋白的动态迁移过程, 依据蛋白所处细胞内定位或环境的变化, 更加清晰地描绘相关蛋白如何参与生物学进程。对于MPs, 甚至可以追踪其从合成到锚定在膜结构域的动态迁移过程, 以及其完成相关任务后被降解的过程。

2.3 APEX2标记筛选MPs的相互作用蛋白

蛋白质分子往往不能仅仅依靠独立的个体实现其生物学功能, 需要与其他多种分子的相互作用来参与调控细胞生理活动。在对蛋白分子具体功能及其机制的科学探索过程中, 确定蛋白的具体亚细胞定位是认识目的蛋白的首要前提, 发现蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)是探索目的蛋白生物学功能的重要出发点, 对于揭示相关膜蛋白如何参与复杂的生物学过程的研究至关重要。免疫荧光和免疫沉淀等基础实验是考察蛋白定位和相互作用最常用的方法, 但是有效使用这两种方法的前提是必须得到相关蛋白的抗体, 而对于MPs而言, 其抗体的灵敏度和特异性通常难以满足实验要求。经典的蛋白质谱技术中要求先从活细胞或组织中纯化相关的蛋白质, 再用串联质谱进行分析^[36]。虽然方法非常有效, 但质谱数据的可信度从根本上受到纯化蛋白质样品质量的限制, 对于定位相对特别、结构相对复杂的膜蛋白, 经典的蛋白质谱技术通常难以完成对蛋白分子的直接研究。通过对其相互作用蛋白的筛选, 而进一步探索其生物学功能以及具体分子机制, 这种研究思路适合对于MPs的研究。APEX2邻近蛋白标记技术为筛选膜蛋白的相互作用蛋白质提供了一种高效、灵敏的方法。

不仅仅是GPCRs, APEX2标记方法已经被广泛应用于研究MPs的相互作用蛋白。如前所述的S1R参与调节多种效应蛋白的活性, 但其信号功能尚不清楚。最近一项研究中, 使用APEX2邻近蛋白标记技术结合质谱分析, 对S1R相互作用蛋白进行筛选, 进而证明了S1R通过与胆固醇的结合诱导了S1R簇的形成^[37]。白三烯B4受体(leukotriene B4 receptor

2, BLT2)是一种主要表达于上皮细胞的GPCR, 在上皮细胞中可增强屏障功能。为了深入探索BLT2定位于侧膜的分子机制和侧面定位BLT2的生理作用, 研究人员使用APEX2邻近蛋白标记技术寻找BLT2维持横向定位所需的BLT2相互作用蛋白^[38], 确定了LIN7C对于BLT2在质膜上的定位和上皮细胞中BLT2依赖性屏障的形成非常重要。Snx14, 是一种内质网膜蛋白, 参与维持细胞膜脂质饱和平衡。为了探索Snx14促进脂质内稳态的具体分子机制, 研究人员使用油酸处理细胞, 破坏细胞内脂质平衡状态, 诱导Snx14对脂质的调控作用的同时, 借助APEX2邻近蛋白标记技术, 筛选Snx14发挥调控脂质平衡功能时的潜在相互作用蛋白, 包括脂滴表面相关蛋白PLIN2、PLIN3和PNPLA2, 参与脂质/甾醇生物合成的蛋白质LPCAT1、LPCAT3和SOAT1, 进一步表明了Snx14参与调控脂质代谢^[4]。

在将APEX2标记方法应用于筛选MPs的相互作用蛋白的研究过程中, 研究人员还将该方法进行了更新优化。囊泡相关膜蛋白-相关蛋白B(vesicle-associated membrane protein-associated protein B, VAPB)是一种尾锚定蛋白, 定位于内质网和内核膜(inner nuclear membrane, INM)。使用优化的APEX2(rapamycin- and APEX2-dependent identification of proteins by SILAC, RAPIDS)邻近蛋白标记方法, 不再将APEX2与VAPB直接融合, 而是分别在APEX2和VAPB分子上带上FKBP或FRB标签, 在雷帕霉素处理后, 两个标签蛋白迅速结合的同时, 将APEX2靶向感兴趣的蛋白质^[39]。结合细胞培养中氨基酸的稳定同位素标记, 最终在内质网水平上确定Emerin、TMEM43和ELYS是VAPB的潜在相互作用蛋白。该方法减小了相对大分子直接融合对目的蛋白本身定位或功能的影响。这种优化的APEX2邻近蛋白标记方法也被应用于经典内核膜蛋白Emerin的研究, Emerin不仅分布在INM, 在内质网中也有分布。利用RAPIDS标记技术来探测Emerin的环境, 检测到了LMNA和LAP1等Emerin的已知相互作用蛋白, 并且发现了Emerin的新的相互作用蛋白——VAPA^[40]。

APEX2标记方法不仅适用于真核生物膜蛋白的研究, 还适用于对原核生物膜蛋白的研究。许多细胞内细菌和其他病原体, 如专性细胞内病原体沙眼衣原体, 生长在含有液泡的膜结合细菌内。由于难以从

受感染宿主细胞中纯化膜组分, 对液泡膜上发生的宿主-病原体相互作用的理解受到限制^[41]。将APEX2与已知的包涵体膜蛋白INC融合, 联合使用APEX2邻近标记方法与质谱技术, 研究发生在衣原体液泡或包涵体膜上的蛋白质-蛋白质相互作用^[42], 不仅发现了CT226和INC之间的相互作用, 而且揭示了细胞被感染的过程中包涵体膜蛋白发生的变化。

蛋白质是细胞维持生理功能的物质基础, 主要是通过PPIs实现其功能, 对于难以直接研究的MPs, 从筛选其相互作用蛋白出发, 由相互作用蛋白的已知功能, 探索其是否通过相互作用影响其他蛋白的功能而发挥作用。另辟蹊径, 由机制入手, 深入研究MPs的生物学功能, APEX2邻近蛋白标记提供了一种高通量的相互作用蛋白筛选方法, 可以发现相关蛋白的相互作用蛋白质组, 构建相互作用蛋白网络, 促进MPs潜在生物学功能的发现, 并扩展已知功能蛋白的更广泛的潜在生物学功能。

3 总结和展望

3.1 APEX2标记技术不断更新与优化

基于APEX2标记技术高效、灵敏、适用于活细胞等独特优势, 该方法越来越多地被用于蛋白质的定位表征、相互作用分子筛选以及亚细胞域蛋白质组分的鉴定。随着APEX2标记在蛋白研究中的应用与发展, 该方法也得到了一系列技术上的优化。在一项磷酸酪氨酸介导的蛋白复合物研究^[43]中, 开发了一种基于高度选择性APEX2邻近蛋白标记方法, 该方法利用生物素-苯酚类似物探针BP5和BN2更高效、更选择性地生成自由基并与蛋白质中的酪氨酸残基结合, 用于绘制具有更高时间分辨率的时空相互作用蛋白质网络。在另一项研究中, 提出了将APEX2标签与高压冷冻(high-pressure freezing, HPF)和冷冻置换(freeze-substitution, FS)结合使用的Cryo-APEX方法^[44], 不仅可以在亚细胞结构域中识别感兴趣的蛋白质, 而且还可以在结构完整的膜中解析关于相关蛋白拓扑结构的附加信息, 适用于任何可进行基因标记的MPs的投射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)分析。

3.2 APEX2标记技术的局限性

尽管APEX2标记方法已经得到了一系列优化, 但是仍然存在一些局限性。首先APEX2标记方法存在所有邻近标记方法都有的两方面共同的缺点。一

方面, APEX2标记方法通常都需要构建融合蛋白, 建立外源过表达体系, 可能产生某些与内源蛋白定位不一致的异常定位。另一方面, APEX2依赖的邻近蛋白标记筛选的部分潜在相互作用蛋白有可能只是与目的蛋白接近而并不存在真实的相互作用, 且不能确定目的蛋白与潜在相互作用蛋白之间是否是直接相互作用。因此, 针对APEX2标记的结果, 必须利用免疫荧光、免疫共沉淀等其他实验方法从多个角度验证结果的真实性。除此之外, APEX2标记方法也存在一些特有的局限性, 如疏水效应和 H_2O_2 处理可能导致某些信号转导途径、细胞器动力学、蛋白质结构和相互作用的氧化损伤, 以及生物素-酚处理对细胞的影响; 过氧化物标记是针对如酪氨酸等富含电子的氨基酸, 这类氨基酸在蛋白质中通常是低丰度的, 如果蛋白中没有可标记的表面暴露的酪氨酸, 标记可能不会发生。因此, 需要控制好实验条件, 同时需要确定合适的筛选条件, 兼顾特异性与灵敏度, 尽量减小实验的假阳性与假阴性。

3.3 APEX2标记技术的前景与展望

虽然APEX2标记技术尚存在一些无法避免的局限性, 但是总的来说, APEX2标记技术为膜蛋白研究提供了一种更精确的高通量研究方法, 为促进膜蛋白的研究提供了更优化的策略, 为膜蛋白定位、结构解析以及相互作用蛋白网络的描绘提供了技术支持, 为膜蛋白的生物学功能探索以及分子信号通路研究提供了信息基础, 为寻找更多可以成为药物治疗靶点的膜蛋白提供了理论依据。MPs是一类参与维持生理功能的重要蛋白, APEX2标记方法作为发现与研究MPs的相对先进的方法, 在对MPs的科研实践中或许已经成为不可或缺的实验方法。期待今后我们在利用APEX2标记方法研究MPs的过程中, 不仅可以不断拓展更新相关MPs的数据, 也可以不断优化更新APEX2标记方法, 以及不断寻找发现适于MPs研究的新方法。MPs的潜在重要信息仍然有待我们进一步深入挖掘, MPs的相关研究方法也有待我们继续开发更新, 希望在各位科研工作者的后续研究工作中这两个方面的发展可以齐头并进。任重而道远, 与君共勉。

参考文献 (References)

- [1] JAWHARI A. Editorial-membrane protein tools for drug discovery [J]. *Methods*, 2020, 180: 1-2.

- [2] LYONS J A, SHAHSAVAR A, PAULSEN P A, et al. Expression strategies for structural studies of eukaryotic membrane proteins [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2016, 38: 137-44.
- [3] ANSON L. Membrane protein biophysics [J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 343.
- [4] DATTA S, BOWERMAN J, HARIRI H, et al. Snx14 proximity labeling reveals a role in saturated fatty acid metabolism and ER homeostasis defective in SCAR20 disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(52): 33282-94.
- [5] YANG H, SHEN H, LI J, et al. SIGMAR1/Sigma-1 receptor ablation impairs autophagosome clearance [J]. *Autophagy*, 2019, 15(9): 1539-57.
- [6] GAUDY-MARQUESTE C, ROLL P, ESTEVES-VIEIRA V, et al. LBR mutation and nuclear envelope defects in a patient affected with Reynolds syndrome [J]. *J Med Genet*, 2010, 47(6): 361-70.
- [7] ESSAWY N, SAMSON C, PETITALOT A, et al. An Emerin LED-domain mutation impairs cell response to mechanical stress [J]. *Cells*, 2019, 8(6): 570.
- [8] 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]. *J Cell Biol*, 2012, 196(6): 801-10.
- [9] 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 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(8): 3268-73.
- [10] ROSÁRIO-FERREIRA N, MARQUES-PEREIRA C, GOUVEIA R P, et al. Guardians of the cell: state-of-the-art of membrane proteins from a computational point-of-view [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2315: 3-28.
- [11] KIM D I, ROUX K J. Filling the void: proximity-based labeling of proteins in living cells [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(11): 804-17.
- [12] CHEN C L, PERRIMON N. Proximity-dependent labeling methods for proteomic profiling in living cells [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2017, 6(4): e272.
- [13] UDESHI N D, PEDRAM K, SVINKINA T, et al. Antibodies to biotin enable large-scale detection of biotinylation sites on proteins [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(12): 1167-70.
- [14] RHEE H W, ZOU P, UDESHI N D, et al. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging [J]. *Science*, 2013, 339(6125): 1328-31.
- [15] BOSCH J A, CHEN C L, PERRIMON N. Proximity-dependent labeling methods for proteomic profiling in living cells: An update [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2021, 10(1): e392.
- [16] RHEE H W, ZOU P, UDESHI N D, et al. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging [J]. *Science*, 2013, 339(6125): 1328-31.
- [17] HUNG V, LAM S S, UDESHI N D, et al. Proteomic mapping of cytosol-facing outer mitochondrial and ER membranes in living human cells by proximity biotinylation [J]. *eLife*, 2017, 6: e24463.
- [18] LAM S S, MARTELL J D, KAMER K J, et al. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(1): 51-4.
- [19] MAVLYUTOV T A, YANG H, EPSTEIN M L, et al. APEX2-enhanced electron microscopy distinguishes sigma-1 receptor

- localization in the nucleoplasmic reticulum [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 51317-30.
- [20] MAVYLUTOV T, CHEN X, GUO L, et al. APEX2- tagging of Sigma 1-receptor indicates subcellular protein topology with cytosolic N-terminus and ER luminal C-terminus [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(8): 733-7.
- [21] MATSUMOTO T, MINEGISHI K, ISHIMOTO H, et al. Expression of ovary-specific acidic protein in steroidogenic tissues: a possible role in steroidogenesis [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(7): 3353-9.
- [22] QI S, WANG Y, ZHOU M, et al. A mitochondria-localized glutamic acid-rich protein (MGARP/OSAP) is highly expressed in retina that exhibits a large area of intrinsic disorder [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(5): 2869-77.
- [23] ZHOU M, WANG Y, QI S, et al. The expression of a mitochondria-localized glutamic acid-rich protein (MGARP/OSAP) is under the regulation of the HPG axis [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(6): 2311-20.
- [24] JIA L, LIANG T, YU X, et al. MGARP regulates mouse neocortical development via mitochondrial positioning [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(3): 1293-308.
- [25] ZHANG S. MGARP is ultrastructurally located in the inner faces of mitochondrial membranes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(1): 138-43.
- [26] LIN D L, CHEREPANOVA N A, BOZZACCO L, et al. Dengue virus hijacks a noncanonical oxidoreductase function of a cellular oligosaccharyltransferase complex [J]. *mBio*, 2017, 8(4): e00939-17-17.
- [27] HIRABAYASHI Y, TAPIA J C, POLLEUX F. Correlated light serial scanning electron microscopylight (CoLSSEM) for ultrastructural visualization of single neurons *in vivo* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14491.
- [28] HEGDE R S, KEENAN R J. The mechanisms of integral membrane protein biogenesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(2): 107-24.
- [29] LOBINGIER B T, HUTTENHAIN R, EICHEL K, et al. An approach to spatiotemporally resolve protein interaction networks in living cells [J]. *Cell*, 2017, 169(2): 350-60, e12.
- [30] ROSENBAUM D M, RASMUSSEN S G F, KOBILKA B K. The structure and function of G-protein-coupled receptors [J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 356-63.
- [31] RITTER S L, HALL R A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(12): 819-30.
- [32] PAEK J, KALOCSAY M, STAUS D P, et al. Multidimensional tracking of GPCR signaling via peroxidase catalyzed proximity labeling [J]. *Cell*, 2017, 169(2): 338-49, e11.
- [33] KOSTELNIK K B, BARKER A, SCHULTZ C, et al. Dynamic trafficking and turnover of JAM-C is essential for endothelial cell migration [J]. *PLoS Biol*, 2019, 17(12): e3000554.
- [34] ZHU X, LI M, XU X, et al. hTAC internalizes via both clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis in mammalian cells [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(10): 896-901.
- [35] CHAREST-MORIN X, LODGE R, MARCEAU F. Bifunctional fusion proteins containing the sequence of the bradykinin homologue maximakinin: activities at the rat bradykinin B receptor [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(5): 459-70.
- [36] HUNG V, UDESHI N D, LAM S S, et al. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2 [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(3): 456-75.
- [37] ZHEMKOV V, GEVA M, HAYDEN M R, et al. Sigma-1 receptor (S1R) interaction with cholesterol: mechanisms of S1R activation and its role in neurodegenerative disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4082.
- [38] HARA T, SAEKI K, JINNOUCHI H, et al. The c-terminal region of BLT2 restricts its localization to the lateral membrane in a LIN7C-dependent manner [J]. *FASEB J*, 2021, 35(2): e21364.
- [39] JAMES C, MULLER M, GOLDBERG M W, et al. Proteomic mapping by rapamycin-dependent targeting of APEX2 identifies binding partners of VAPB at the inner nuclear membrane [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(44): 16241-54.
- [40] MULLER M, JAMES C, LENZ C, et al. Probing the environment of Emerin by enhanced ascorbate peroxidase 2 (APEX2) mediated proximity labeling [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 605.
- [41] DICKINSON M S, ANDERSON L N, WEBB-ROBERTSON B M, et al. Proximity-dependent proteomics of the Chlamydia trachomatis inclusion membrane reveals functional interactions with endoplasmic reticulum exit sites [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(4): e1007698.
- [42] OLSON M G, WIDNER R E, JORGENSEN L M, et al. Proximity labeling to map Host-Pathogen interactions at the membrane of a bacterium containing vacuole in chlamydia trachomatis infected human cell [J]. *Infect Immun*, 2019, 87(11): e00537-19.
- [43] KE M, YUAN X, HE A, et al. Spatiotemporal profiling of cytosolic signaling complexes in living cells by selective proximity proteomics [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 71.
- [44] MIHELIC E M, ANGEL S, STAHELIN R V, et al. The Cryo-APEX method for electron microscopy analysis of membrane protein localization within ultrastructurally preserved cells [J]. *J Vis Exp*, 2020, doi: 10.3791/60677.