

· 基础研究 ·

利用邻近生物素标记技术结合质谱分析鉴定核仁相关蛋白

臧春燕,姚礼萍,邢 鸣,张 军*

南京医科大学生殖医学国家重点实验室,江苏 南京 211166

[摘要] 目的:在小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)中,基于抗坏血酸过氧化物酶(engineered ascorbate peroxidase, APEX2)的邻近标记技术和质谱鉴定核仁相关蛋白。方法:构建稳定过表达 APEX2-FBL 细胞系,通过 APEX2 邻近标记技术获得生物素标记蛋白,用链酶亲和素包裹的磁珠对生物素标记的蛋白进行富集,随后运用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)鉴定,并对数据进行生物信息学分析,筛选差异蛋白。结果:成功构建稳定高表达 APEX2-FBL 细胞系;Western blot 结果显示,通过 APEX2 邻近标记技术获得大量生物素标记蛋白;质谱鉴定出 837 个差异蛋白,且生物学过程多与核仁相关。结论:利用邻近生物素标记技术结合质谱分析是一种可行的鉴定核仁相关蛋白的方法。

[关键词] 邻近生物素标记;核仁蛋白;核仁纤维蛋白

[中图分类号] R529.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)12-1750-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20201202

Identification of nucleolus - related proteins using proximate biotin labeling technique combined with mass spectrometry

ZANG Chunyan, YAO Liping, XIN Ming, ZHANG Jun*

State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** In mouse embryonic stem cells (mESC), proximity labeling technology based on engineered ascorbate peroxidase (APEX2) and mass spectrometry were used to identify nucleolar related proteins. **Methods:** An APEX2-FBL overexpression stable cell line was constructed, biotin-labeled protein was obtained by APEX2 proximity labeling technology, the biotin-labeled protein was enriched with magnetic beads coated with streptavidin, and then liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and bioinformatics analysis was used to screen differential proteins. **Results:** Highly expressed APEX2-FBL stable cell lines were successfully constructed; Western blot results showed that a large number of biotin-labeled proteins were obtained by APEX2 proximity labeling technology; 837 differential proteins were identified by mass spectrometry, and the biological processes were mostly related to nucleoli. **Conclusion:** The use of adjacent biotin labeling technology combined with mass spectrometry is a feasible method to identify nucleolar related proteins.

[Key words] proximate biotin labeling; nucleolar protein; fibrillarin

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(12): 1750-1755]

核仁是细胞核内最大的可见结构。它既是一个动态的区域,又是一个稳定的区域,这取决于组成它的分子性质和数量。该结构的主要功能是核

糖体的生物发生,这一过程涉及 rDNA 的转录、rRNA 的加工和核糖体蛋白的组装^[1-3]。核仁由 3 种成分组成:纤维中心(fiber center, FCS)、致密纤维成分(dense fiber composition, DFC)和颗粒状成分^[4]。在过去的 30 年里,核仁已经被证明是多种新功能的场所,包括信号识别、颗粒组装、小 RNA 修饰、细胞周期控制等^[5-6]。核仁是一个多功能的无膜细胞器,所

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31871445)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhang_jun@njmu.edu.cn

以解析活细胞中核仁的蛋白质组,将有助于了解核仁中各种生物学事件是如何动态且有序进行。在核仁蛋白中核仁纤维蛋白(fibrillarin, FBL)是一种重要的蛋白质,其序列和功能在整个进化过程中一直保守^[7]。通常在细胞间期,可以在FCS和DFC之间的转换区检测到FBL,在那里发生rDNA转录,以及在DFC中检测到rRNA前加工发生在真核细胞中^[4]。因此,FBL通常作为核仁的标记物。

无膜细胞器很难用传统方法进行分离和解析。虽然利用生化分离细胞器的方法可以获得特定细胞器的蛋白质,但在分离过程中可能会使样品受到污染和一些关键成分丢失,从而造成获得的蛋白质组学信息不完整。克服了上述缺点的邻近生物素标记技术结合质谱检测已成为鉴定细胞器蛋白质组成成分及相互作用的理想方法^[8],其完全绕过了生化分离和细胞器纯化。在H₂O₂存在下,抗坏血酸过氧化物酶(engineered ascorbate peroxidase, APEX2)催化生物素苯酚(biotin phenol, BP)转化为生物素-苯氧基自由基,使生物素与短半径内的富电子氨基酸侧链共价连接(图1)。生物素标记的蛋白质使用链霉亲和素磁珠纯化,然后由质谱分析。在这种情况下,生物素标记只需1 min,生物素-苯氧基自由基寿命短(<1 ms),标记半径小(<20 nm)。基于APEX2邻近标记的这种优点,所以有可能提供更高的空间和时间特异性^[9-10]。此外,由于蛋白质间的相互作用距离很短,所以对核仁特定蛋白FBL进行标记,所获得的蛋白质组就包含了核仁和FBL邻近的所有蛋白质。故这种方法可以对核仁蛋白质组进行全面和准确的鉴定。

本研究利用邻近生物素标记技术结合质谱分析检测了核仁蛋白质组,通过质谱鉴定到了837个差异蛋白且生物学过程多与核仁相关。结果显示了邻近生物素化标记的优点,从而为更深入了解核仁内的分子组成和功能提供基础。

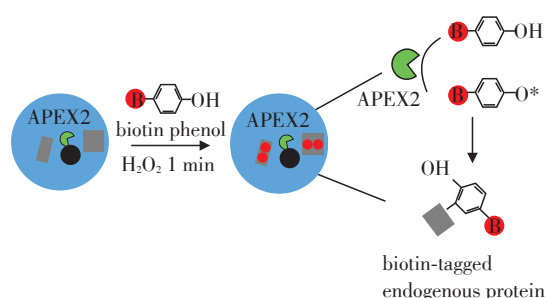


图1 APEX2介导的邻近蛋白生物素化方案

Figure 1 APEX2-mediated biotinylation of adjacent proteins

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠胚胎干细胞细胞株 mESC(南京医科大学沙家豪教授惠赠);DMEM/F-12、Neurobasal 培养基(Gibco公司,美国);N2、B27、丙酮酸钠(sodium pyruvate)、NEAA、Glutamax、Neurobasal、Penicillin/Streptomycin (Gibco 公司,美国);CHIR - 99021、PD0325901 (Selleck 公司,美国);白血病抑制因子(Lif)(Millipore 公司,美国)、胰岛素、多聚-L-鸟氨酸、生物素苯酚、叠氮化钠(sodium azide)、抗坏血酸钠(sodium ascorbate)、Trolox (Sigma 公司,美国);Lipofectamine Stem Transfection 转染试剂、层粘连蛋白(ThermoFisher Scientific 公司,美国);小鼠抗 FBL 抗体、兔抗 Biotin 抗体(ABCAM 公司,英国);鼠抗 HA 抗体(MBL 公司,日本);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(杭州碧云天公司);链霉亲和素磁珠(ThermoFisher Scientific 公司,美国)。

色谱仪(Easy-NLC 1200, ThermoFisher Scientific 公司,美国),质谱仪(LTQ Orbitrap Fusion Lumos, ThermoFisher Scientific 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 N2B27 培养基配置

配置 N2B27 培养基混合液需加入 480 mL DMEM/F-12、470 mL Neurobasal、5 mL N2、10 mL B27、5 mL Glutamax、10 mL NEAA、10 mL 丙酮酸钠、10 mL Penicillin/Streptomycin。

1.2.2 小鼠胚胎干细胞的培养

首先培养皿中先后加入多聚-L-鸟氨酸,10 mg/mL 层粘连蛋白在 37°培养箱各包被 1 h。小鼠胚胎干细胞在含 3 μmol/L CHIR - 9902、1 μmol/L PD0325901、1 000 U/μL Lif、12.5 μg/mL 胰岛素的 N2B27 培养基中,于 37 °C 5% CO₂ 条件下进行培养,每天换液,2~3 d 后传代。

1.2.3 构建 PB-HA-APEX2-FBL 过表达载体

以小鼠 cDNA 为模板,PCR 扩增出目的片段,经 Not I 和 EcoR I 酶切后与同样酶切的 PB 载体连接,经转化,涂板,筛选阳性克隆。提取质粒经酶切鉴定后,送公司测序验证。

1.2.4 构建 FBL 过表达细胞系

将处于对数期生长的 mESC 细胞接种于 6 cm 皿中,当细胞密度达到 70%时,转染 PB-HA-APEX2-FBL 过表达质粒,转染步骤按 Lipofectamine Stem Transfection 操作说明进行,转染后 24 h 内加入 2 μg/mL

嘌呤霉素药筛,2 d后观察细胞状态,若存活细胞数量较多,应提高药物浓度,将存活的细胞克隆进行传代,取部分细胞进行 Western blot 和免疫荧光鉴定。

1.2.5 细胞爬片的免疫荧光实验

提前将无菌盖玻片放于细胞培养皿中,待细胞培养到合适形态时,将培养基去除,并用4%PFA常温固定细胞15 min,随后用0.1%PBST通透20 min,5%羊血清封闭2 h,一抗(FBL稀释比1:200,HA稀释比1:500)4℃孵育过夜,二抗室温孵育2 h,0.1%PBST清洗3次后50%甘油封片,共聚焦显微镜拍照并保存图片。

1.2.6 基于APEX2的邻近生物素标记技术

参照 Branon 等^[11]报道的方法进行。将稳定表达APEX2-FBL的mESC细胞培养在2个10 cm皿中,实验分为两组:①实验组,加入500 μmol/L的生物素苯酚,37℃孵育2 h;②对照组,不加生物素苯酚。提前配好淬灭剂溶液,将10 mmol/L叠氮化钠,10 mmol/L抗坏血酸钠,5 mmol/L Trolox溶于PBS。培养基中加入10 μL 100 mmol/L H₂O₂,室温反应1 min。迅速去除培养基,加入500 μL提前配制的淬灭剂洗涤细胞3次,PBS清洗3次。加入细胞裂解液提取蛋白。

1.2.7 Western blot检测蛋白表达水平

将1.2.6中两组细胞进行裂解,用BCA蛋白测量试剂盒测定蛋白浓度,蛋白变性后备用。取20 μg蛋白用于上样,并转印至硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC),5%脱脂奶粉溶液室温封闭1 h,一抗4℃孵育过夜,0.1%TBST洗膜3次后加入相应二抗室温孵育1 h,洗膜后进行曝光。

1.2.8 生物素标记蛋白富集与液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析^[12]

将1.2.7步骤获得的定量蛋白样品进行 Western blot 验证。随后用15 μL链酶亲和素包裹的磁珠对生物素标记蛋白进行富集和胰蛋白酶解,加入1%甲酸(FA)将酶解肽段酸化(pH<3)。将样品放置在真空浓缩器中蒸发至干,并在C18 StageTips上进行脱盐,重悬于0.1%FA中,用LTQ Orbitrap Fusion Lumos质谱仪联用Easy-nLC 1200色谱仪进行分析。采用60 min线性色谱梯度(3%~5% B相5 s,5%~15% B相23.8 min,15%~28% B相21 min,28%~38% B相7.5 min,38%~100%的B相5 s,再100%的B相7.3 min),色谱使用的流动相是0.1%FA的A相和80%ACN,0.1%FA的B相。Orbitrap Fusion Lumos以依赖数据(DDA)的策略进行数据采集,基

于高能碰撞诱导裂解(HCD)的碎裂模式,质荷比(*M/Z*)的扫描范围在350~1 500,分辨率为60 000。

1.2.9 构建NCL-RFP基因敲入细胞系

首先根据NCL基因序列设计sgRNA,之后将sgRNA克隆至载体中,单链DNA由公司合成。随后将质粒cas9、sgRNA、单链DNA以1:1:1比例各转染质粒1 μg至提前准备的细胞中,转染24 h后对细胞进行嘌呤霉素筛选,最后将存活的细胞进行流式分选,最终得到单克隆细胞系。

1.3 生物信息学分析

用MaxQuant(version 1.6.2.10)软件对LC-MS/MS分析得到的原始数据进行分析,检索的参数如下:允许2次胰蛋白酶漏切,最少肽段长度为7,错误发现率(FDR)<0.01,半胱氨酸的脲甲基化为固定修饰,N端乙酰化和甲硫氨酸氧化为可变修饰。运用R包“clusterProfiler”进行在线的GO分析(包括生物学进程、细胞定位和分子功能)和KEGG Pathway分析。GO分析和KEGG Pathway分析的*P*值校准采用Benjamini & Hochberg法,FDR<0.05认为具有统计学意义。

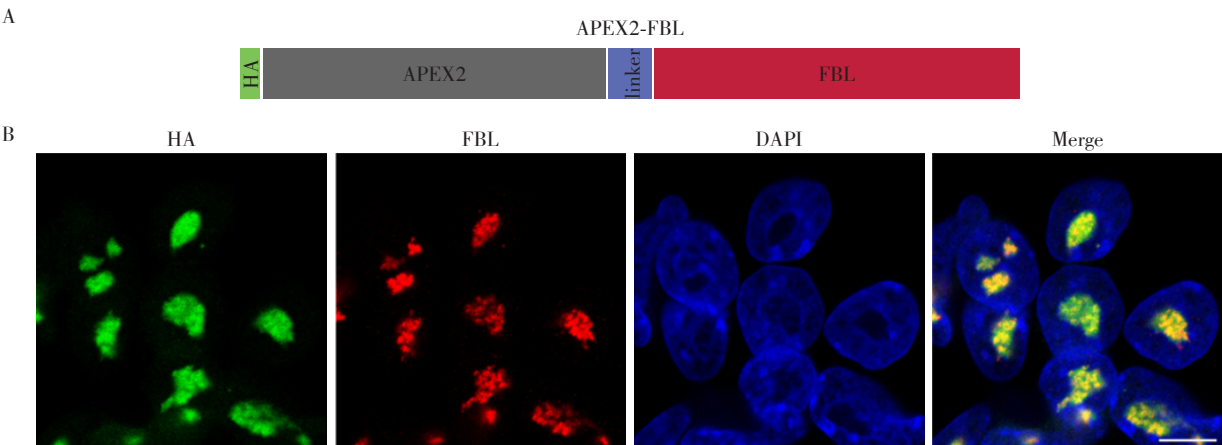
2 结果

2.1 构建APEX2-FBL过表达的mESC稳定细胞系

首先构建了带有HA标签的APEX2-FBL过表达转座子载体(图2A),将过表达载体与转座酶载体共转染至mESC细胞中,通过药筛得到高表达APEX2-FBL的稳定细胞株。将此细胞株进行免疫荧光染色,结果显示其纯度高达95%以上,且HA-FBL融合蛋白定位在核仁中(图2B)。

2.2 对FBL邻近蛋白进行生物素标记

在小鼠胚胎干细胞中,采用邻近生物素化标记结合质谱检测技术鉴定核仁蛋白质组。Western blot检测生物素化蛋白,结果显示加入生物素苯酚处理的实验组检测到大量生物素化蛋白,在没有添加生物素-苯酚的对照组,只有内源性的生物素化蛋白(图3A)。为了保证实验平行性,实验组和对照组应具有相同的总蛋白量,所以我们使用抗HA抗体以及内参Tubulin对细胞裂解液进行免疫印迹,结果显示质谱前两者总蛋白量是一致的(图3B)。随后,对生物素富集后的蛋白行了进行质谱鉴定,并通过MaxQuant(version 1.6.2.10)软件从Universal Protein Resource数据库获得的蛋白质序列对原始数据进行搜索鉴定。对质谱数据的Label free quantification(LFQ)定量值基于Benjamini & Hochberg FDR的stu-



A: APEX2-FBL表达载体模式图;B:免疫荧光检测细胞系纯度(×100)。

图2 APEX2-FBL 稳定细胞系的构建与鉴定

Figure 2 Construction and identification of APEX2-FBL stable cell line

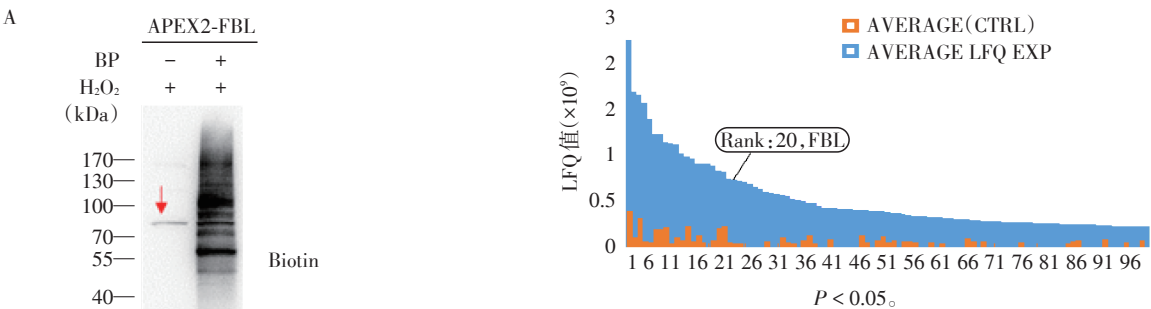


图4 前96个差异蛋白柱形图

Figure 4 Histogram of the first 96 differential proteins

A: Western blot 分析稳定表达 APEX2-FBL 的 mESC 细胞中的生物素化的蛋白,红色箭头指的是内源性的生物素化蛋白;B: Western blot 验证用于质谱分析的总蛋白(BP:生物素苯酚)。

图3 Western blot 检测 mESC 中生物素化的蛋白

Figure 3 Western blot detection of biotinylated protein in mESCs

dent *t* 检验,且取实验组比对照组 LFQ 定量值>4,选取特异肽段≥1,肽段数 ≥ 2,筛选出 837 个差异蛋白,且根据差异蛋白的实验组 LFQ 定量值排序,图4显示前 96 个差异蛋白,其中 FBL 本身位于第 20 位,故利用邻近生物素标记技术获取的数据是可信的(图4)。

2.3 GO 分析显示差异蛋白与核仁相关

通过对 837 个差异蛋白进行 GO 分析,在生物学

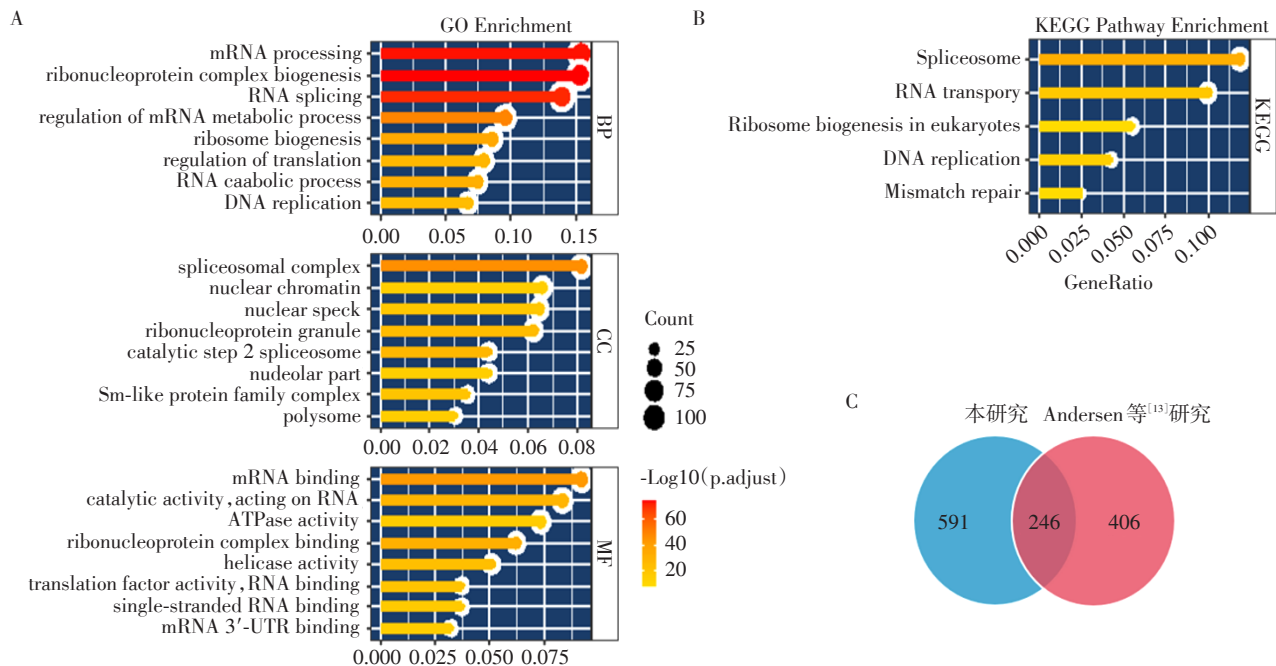
进程(BP)、细胞定位(CC)、分子功能(MF)中发现,差异蛋白主要富集在核糖核蛋白复合体的生物学过程(图5A)。KEGG Pathway 分析显示差异蛋白与 RNA 剪切和核糖体相关(图5B)。这些结果也与已报道的核仁功能一致。综上,通过邻近生物素化技术鉴定核仁蛋白质组是可行的。

2.4 差异蛋白与已发表数据有交叉

为了比较该技术鉴定的核仁蛋白与已报道数据的重叠情况,将本文数据与 Andersen 等^[13]发表的核仁蛋白质组学进行比较,结果表明有 246 个核仁相关蛋白在两组数据中重叠。此外,本研究鉴定到 837 个有统计学意义的蛋白,而 Andersen 等^[13]鉴定到 652 个蛋白(图5C)。故通过生物素标记这种方法,我们鉴定到的核仁蛋白数量多于 Andersen 等^[13]通过蔗糖梯度离心分离鉴定到的核仁蛋白。

2.5 验证本研究鉴定的相关核仁蛋白

为了进一步验证利用邻近生物素标记技术结合质谱分析鉴定核仁相关蛋白方法的准确性,选取了差异蛋白表中第 6 位核仁标记物 nucleolin(NCL)进行免疫荧光验证。首先构建了 NCL-RFP 敲入细



A、B: 差异蛋白的GO分析和KEGG Pathway分析, 纵轴表示富集功能, 颜色由深至浅表示P值逐渐变大; C: Venn图显示本研究鉴定的差异蛋白与已发表数据的重叠情况。

图5 生物素标记的核仁相关蛋白的组学分析

Figure 5 The proteomics analysis of biotin-labeled nucleolar related proteins

胞系, FBL和NCL免疫荧光显示NCL与FBL呈现核仁共定位(图6)。

3 讨论

有研究表明FBL可以通过改变rRNA的2,-O-甲基化修饰从而影响细胞过程, 这反过来又导致翻译的变化^[14]。核糖体本身可以影响各种mRNA的相对翻译效率, 说明这些影响可以受到核糖体异质性的调节^[15]。FBL的表达水平与rRNA的合成速率相关^[16], 因此与核仁的大小有关。在过去几年里, 陆续有研究指出FBL是核糖体形成的关键成分之一, 除了影响细胞的各种过程, 也可以影响病理过程的发展, 甚至衰老的动力学^[17], 由于ESC细胞具

有无限增殖、自我更新和多向分化的特性, 在ESC细胞中分析核仁蛋白质组以及FBL的功能是具有重要生物学意义的。本文分析了在mESC中FBL的邻近蛋白, 从而鉴定mESC中的核仁蛋白质组。

基于APEX2的细胞内生物素标记是筛选邻近和潜在相互作用蛋白的新方法, 已成功地应用于研究哺乳动物细胞和单细胞真核生物中, 并且已被证明特别适用于研究不溶或不可接近的细胞结构以及检测微弱或短暂的蛋白质相互作用^[18], 例如核孔复合体^[19]、中心体^[20]等。本研究通过这种方法鉴定到837个差异蛋白, 其中有NPM1核仁蛋白、mRNA剪接蛋白SF3A1等与核仁功能相关的蛋白。此外, GO分析中核仁蛋白的富集以及NCL核仁标记

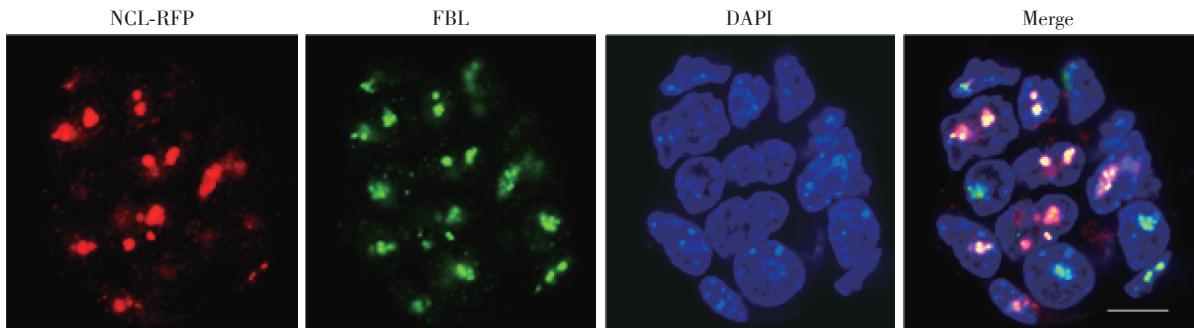


图6 免疫荧光检测NCL定位(×80)

Figure 6 Immunofluorescence detection of NCL location(×80)

物的验证也进一步说明了这种方法的准确性。

关于本研究鉴定出的核仁蛋白多于已报道的数据,一方面是用传统的密度梯度离心分离方法可能造成一些关键成分损失,另一方面基于APEX2的原位生物素标记方法使得在FBL蛋白20 nm范围内的蛋白质能被生物素标记并且同时保留了蛋白质之间的空间关系,从而高效富集核仁相关蛋白。但是由于体内有部分蛋白能够发生内源性的生物素化以及APEX2-FBL蛋白刚合成后未进入核仁前也能够活化生物素苯酚,从而造成此方法鉴定的蛋白有可能是非核仁相关的蛋白,所以仍需要在以下几个方面对该方法进行改进:①将此方法与定量蛋白质组学技术(例如SILAC,iTRAQ或SWATH)结合使用,以消除非特异性生物素化蛋白质,并设计多个对照;②对数据进行严格的统计学分析如提高差异蛋白之间的倍数以减去背景蛋白。

本研究利用基于APEX2的生物素标记技术结合质谱分析鉴定了837个潜在的核仁相关蛋白,该技术可以扩展到大规模研究无膜细胞器的蛋白质组及蛋白质与蛋白质的相互作用。

[参考文献]

- [1] RODRIGUEZ-CORONA U, SOBOL M. Fibrillarin from Archaea to human[J]. *Biol Cell*, 2015, 107(6): 159-174
- [2] CERQUEIRA A V, LEMOS B. Ribosomal DNA and the nucleolus as keystones of nuclear architecture, organization, and function[J]. *Trends Genet*, 2019, 35(10): 710-723
- [3] TSEKREKOU M, STRATIGI K, CHATZINIKOLAOU G. The nucleolus: in genome maintenance and repair[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1411
- [4] YAO R W, XU G, WANG Y, et al. Nascent pre-rRNA sorting via phase separation drives the assembly of dense fibrillar components in the human nucleolus[J]. *Mol Cell*, 2019, 76(5): 767-783
- [5] PEDERSON T, POWELL K. Thoru pederson: spotting novel roles for the nucleolus[J]. *J Cell Biol*, 2015, 208(4): 384-385
- [6] TSAI R Y, PEDERSON T. Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease[J]. *FASEB J*, 2014, 28(8): 3290-3296
- [7] SHUBINA M, MUSINOVA Y R, SHEVAL E V. Nucleolar methyltransferase fibrillarin: evolution of structure and functions[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2016, 81(9): 941-950
- [8] ROUX K J, KIM D I, RAID A M, et al. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells[J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(6): 801-810
- [9] 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): 51-54
- [10] 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
- [11] BRANON T C, BOSCH J A, SANCHEZ A D, et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9): 880-887
- [12] 杨妍婷,赵苏瑛,张亚楠,等.基于气相色谱质谱联用仪的糖尿病胃轻瘫大鼠血清代谢组学研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(6): 793-797
- [13] ANDERSEN J S, LAM Y W, LEUNG A K, et al. Nucleolar proteome dynamics[J]. *Nature*, 2005, 433(7021): 77-83
- [14] QIN W, LV P, FAN X, et al. Quantitative time-resolved chemoproteomics reveals that stable O-GlcNAc regulates box C/D snoRNP biogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(33): 6749-6758
- [15] MAURO V P, Matsuda D. Translation regulation by ribosomes: increased complexity and expanded scope[J]. *RNA Biol*, 2016, 13(9): 748-755
- [16] SHUBINA M Y, MUSINOVA Y R, SHEVAL E V. Proliferation, cancer, and aging-novel functions of the nucleolar methyltransferase fibrillarin[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(11): 1463-1466
- [17] ERALES J, MARCHAND V, PANTHU B, et al. Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(49): 12934-12939
- [18] VARNAITE R, MACNEILL S A. Meet the neighbors: mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID[J]. *Proteomics*, 2016, 16(19): 2503-2518
- [19] KIM D I, BIRENDRA K C, ZHU W, et al. Probing nucleolar pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(24): 2453-2461
- [20] FIRAT-KARALAR E N, STEARNS T. Probing mammalian centrosome structure using BioID proximity-dependent biotinylation[J]. *Methods Cell Biol*, 2015, 129: 153-170

[收稿日期] 2020-05-19