

一种细胞内快速标记邻近蛋白复合物的新方法

刘 健 周 珊 戴大鹏 蔡剑平

摘 要 **目的** 构建可诱导、细胞适用性广的细胞内快速标记邻近蛋白复合物新方法。**方法** 体外合成 TurboID 编码基因,并与 Tet-on 系统一并插入改造后的慢病毒载体,病毒包装后侵染 HeLa 细胞以融合表达 TurboID 及目的蛋白 YB1 或对照蛋白 GFP。使用不同浓度的强力霉素处理细胞 24h 以诱导融合蛋白的表达,加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 生物素继续培养 15 ~ 120min 以使 TurboID 将邻近蛋白进行生物素标记,免疫印迹法检测生物素标记的蛋白含量。**结果** 成功构建了可诱导的 TurboID 融合表达慢病毒载体。获得的病毒侵染 HeLa 细胞,应用 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 以上的强力霉素即可诱导细胞产生 TurboID 融合蛋白。生物素处理 15min 以上可得到大量生物素标记的蛋白。**结论** 构建了快速标记邻近蛋白复合物的检测体系——TurboID 系统,该系统具有可诱导、生物素标记迅速及细胞适用性广等优点,可广泛应用于大多数动物及人体细胞内蛋白复合物的筛查研究。

关键词 邻近蛋白标记 TurboID 蛋白复合物 生物素化 载体构建

中图分类号 R331

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.007

Development of One in Vivo and Rapid Protein-Proximity Labeling Method. Liu Jian, Zhou Shan, Dai Dapeng, et al. The MOH Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Beijing 100730, China

Abstract **Objective** To develop an inducible Protein-Proximity Labeling method with rapid and high labeling efficiency in mammalian cells in vivo. **Methods** The coding sequencing of TurboID gene was synthesized in vitro and inserted into modified lentiviral vector, together with the Tet-on system. After packaging, virus was used to infect HeLa cells for expression of TurboID enzyme, fusing with target protein YB1 or with control protein GFP. Cells were then treated with different concentrations of doxycycline for 24h to induce the expression of these fused proteins. 50 $\mu\text{mol/L}$ biotin was added and incubated for 15 - 120min to allow TurboID enzyme to biotinylate proximal proteins in vivo. Then, Western blot was used to detect the biotinylated proteins within treated cells. **Results** We successfully constructed a lentiviral vector which can be used for the inducible expression of TurboID fused protein. After virus infection, HeLa cells could highly expressed the TurboID fused proteins when treated them with only 0.125 $\mu\text{g/ml}$ or more doxycycline. A large amount of biotinylated proteins could also be detected after incubation with biotin for 15min or longer time. **Conclusion** We successfully developed a rapid Protein-Proximity Labeling method-TurboID system. This system is inducible, biotin labeling highly efficient and cell adaptable. Thus, it can be widely applied for the resolution of protein complexes in most animals and human cells.

Key words Protein-proximity labeling; TurboID; Protein complex; Biotinylation; Vector construction

生物体功能的实现需要蛋白质的参与,其中多数生物学功能的行使必须借助于多种蛋白质间相互配合,组成蛋白质复合物来实现。研究蛋白质间的相互作用及定位组成可以更好地理解相关蛋白质的功能和细胞内外复杂的信号转导网络。近年来,邻近蛋白质标记方法(protein-proximity labeling)被越来越广泛地应用于解析细胞内蛋白复合物的组成^[1,2]。该方法通过应用一种可以混杂标记的酶与目的蛋白融合表达,再添加特定底物,比如生物素,进而使得该酶可以在体

内(in vivo)共价催化纳米级别范围内的相关内源性蛋白。已有的邻近标记方法主要分为两大类:一类是以生物素连接酶为基础,如 BioID、BioID2、BASU 等^[3];另一类以过氧化物酶为基础,如 APEX 和 APEX2。BioID 和 APEX2 是目前应用最为广泛的邻近蛋白质标记方法,二者各自有其独特的优势。BioID 标记方法虽然简单且无毒,只需加入生物素来起始标记过程,但其生物素标记反应时间较长,需要 18 ~ 24h,无法捕捉瞬时或作用力较弱的蛋白复合物。与之相反,APEX2 反应速度较 BioID 迅速,适用范围广,但其标记过程需要对样品进行 H_2O_2 处理,导致有些样品因其毒性作用而无法适用,同时氧化处理也可能会改变细胞内微环境,从而破坏某些蛋白与蛋白间的相互作用。

为弥补现有邻近蛋白标记方法的不足,2018 年

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81971323,31371280)

作者单位:100730 北京医院、国家老年医学中心、卫生部老年医学重点实验室

通讯作者:戴大鹏,电子信箱:daidapeng@163.com;蔡剑平,电子信箱:caijp61@vip.sina.com

Alice YTING 领导的科研小组通过对 BirA * 进行酵母展示技术定向突变,获得了一种生物素标记时间显著降低的生物素连接酶——TurboID, 该酶在相同条件下仅需用生物素处理短短 10min 即可获得与传统 BioID 类似甚至更高的标记效率,彻底解决了限制 BioID 系统应用的最主要技术瓶颈^[4]。本研究率先在国内重建了 TurboID 系统,并将其置于 Tet - on 系统的调控之下,以精确调控目的蛋白的表达量,随后将所有表达单元插入改造后的慢病毒载体,借以大大拓展该系统的细胞适用范围。

材料与amp;方法

1. 材料:HeLa 细胞及 293T 细胞购自美国 ATCC 公司。慢病毒载体 Lenti - Cas9 - Blast、PSPAX2 及 PMD2. G 购自美国 Addgene 公司。转染试剂 Lipofectamine 3000、杀稻瘟菌素、蛋白酶抑制剂(halt protease inhibitor cocktail, EDTA - free)购自美国 Thermo Scientific 公司。强力霉素、Hoechst 33258、生物素、碳

酸氢铵、Triton X - 100 购自美国 Sigma 公司。Streptavidin - HRP 购自英国 Abcam 公司。兔抗人 YB1 单克隆抗体(D2B12)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。兔抗人 GAPDH 单克隆抗体购自上海 Abmart 公司。限制性内切酶、DNA ligation kit Ver 2. 1、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 高保真酶购自日本 TaKaRa 公司。切胶纯化及 PCR 产物纯化试剂盒购自美国 Omega 公司。

2. 基因及引物合成:北京博迈德公司合成载体构建用引物(表 1)及含 TurboID 编码区的插入片段。该插入片段由多克隆位点 MCS(包含 BsrG I、BstB I、Age I、BSu36 I、Sfi I、Xho I、PacI 酶切位点)、TurboID、HA 标签序列、Tet - on 系统(含 Tight 启动子、PGK 启动子、杀稻瘟菌素抗性基因 BSD、P2A 序列及 rtTA)组成,5' 及 3' 末端分别加入 Kpn I 及 EcoR I 酶切位点(图 1)^[4 - 6]。

表 1 载体构建用引物列表

引物	引物序列(5'→3')	用途
GFP - C	正向引物 AAAC ACCGGTATGGTGAGCAAGGGCGAG(含 Age I)	GFP 扩增引物
	反向引物 CCCT CCTTAGGTCTAGATCCGGTGGATCC(含 Bsu36 I)	
YB1 - C	正向引物 AGGG TTCGAAATGAGCAGCGAGGCCGA(含 BstB I)	YB1 扩增引物
	反向引物 AAAA CCTTAGGCTCAGCCCGCCCTGCT(含 Bsu36I)	
Cturbo - se	正向引物 GCTGTGGAAGCTCGCCGTTGG	上游测序引物
	反向引物 CGTCAGATCGCCTGGAGAAGGA	下游测序引物

下划线所示为括号内的酶切位点

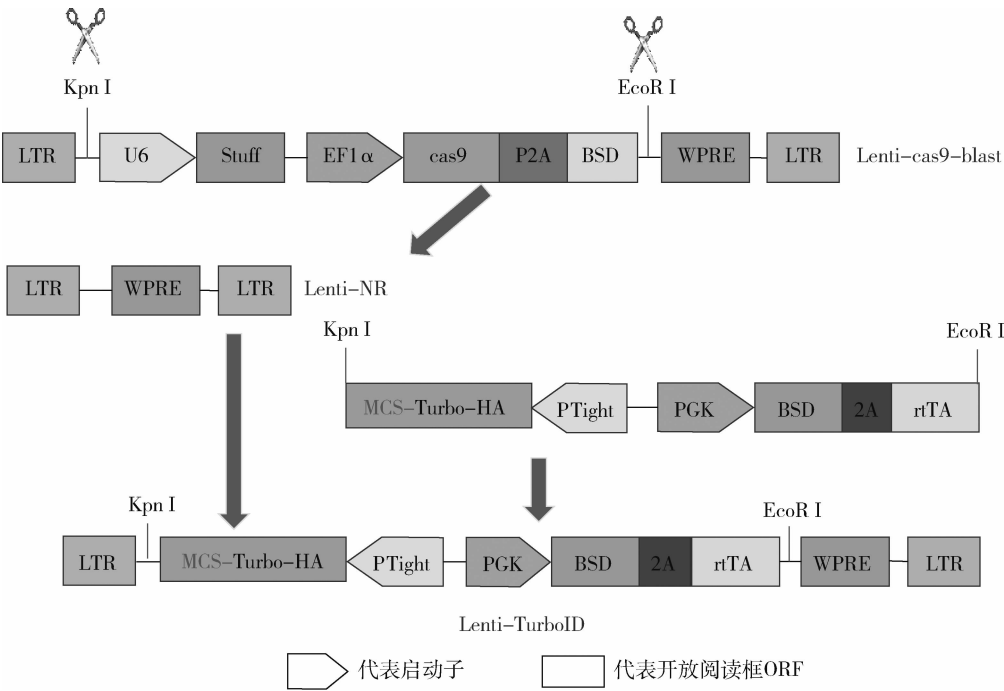


图 1 Lenti - TurboID 载体的构建路径

3. Lenti - TurboID 质粒载体构建:37℃ 下使用 Kpn I 和 EcoR I 双酶切 Lenti - Cas9 - Blast 质粒,2% 琼脂糖凝胶电泳后回收 7.5kb 的片段 lenti - NR。Kpn I 和 EcoR I 双酶切含 TurboID 编码区的合成片段,并与酶切的 lenti - NR 连接,获得慢病毒质粒载体命名为 Lenti - TurboID (图 1)。送北京天一辉远生物技术公司使用表 1 中列出的测序引物进行测序分析,以确保插入的合成基因序列完全正确。

4. TurboID - YB1 及 TurboID - GFP 融合表达载体的构建:以人 YB1 cDNA 全长质粒克隆及 pEGFP - C1 载体(美国 Clontech 公司)为模板,使用表 1 中列出的扩增引物,利用 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 高保真酶分别扩增 YB1 及 GFP 的开放阅读框编码区,同时加入预设酶切位点。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后,紫外灯下切取 YB1 及 GFP 目的条带并使用切胶纯化试剂盒纯化产物,回收产物分别使用 BstB I /Bsu36 I 或 Age I /Bsu36 I 37℃ 下酶切 1.5 ~ 2.0h,产物纯化后与经同样双酶切的 Lenti - TurboID 载体连接,获得融合表达载体 TurboID - YB1 及 TurboID - GFP。

5. 慢病毒包装及侵染:6 孔板内种植 4×10^5 个 293T 细胞,次日参照 Lipofectamine 3000 说明书转染 TurboID - YB1、TurboID - GFP 及辅助质粒 PSPAX2 及 PMD2. G,培养 48h 后收集含病毒培养基并使用 0.45 μ m 滤膜过滤后用于后续侵染。取适量病毒加入到融合度为 50% 的 HeLa 细胞中,培养 24h 后重悬细胞于含 2 μ g/ml 杀稻瘟菌素的 DMEM 高糖培养基中筛选培养 14 天,期间每隔 2 天更换 1 次新鲜培养基。

6. 强力霉素诱导浓度筛选:6 孔板内种植 3×10^5 个第 5 步获得的融合表达 TurboID - YB1 的 HeLa 细胞,次日更换新鲜培养基并加入强力霉素,使其终浓度分别为 0、0.125、0.25、0.5、1.0 和 1.5 μ g/ml。继续培养 24h 后使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解细胞,取 30 μ g 细胞裂解物进行 12% SDS - PAGE 电泳。电泳产物利用湿转仪转至 PVDF 膜,使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 60min,随后加入含兔抗人 YB1 单克隆抗体(1:1000 的稀释比例)或兔抗人 GAPDH 单克隆抗体(1:5000 的稀释比例)的一抗反应液 4℃ 振荡孵育过夜。次日 TBST 洗 5 次后加入含有山羊抗兔 IgG - HRP(1:4000)的二抗反应液室温振荡孵育 1h。TBST 洗 3 次后使用 Millipore Immobilon Western 试剂盒进行曝光显色,以检测融合蛋白

的表达量。

7. GFP 表达量的检测:24 孔板内使用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基及添加 0.5 μ g/ml 强力霉素的培养基培养第 5 步获得的融合表达 TurboID - GFP 的 HeLa 细胞,培养 24h 后 PBS 洗涤 1 次,替换为 4% 的多聚甲醛溶液固定细胞 5min,加入含 10mg/L Hoechst 33258 的 PBS 溶液,室温染色 10min,倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况。

8. 生物素标记时间筛选:使用含 0.125 μ g/ml 强力霉素的培养基培养细胞 24h 以诱导 TurboID - GFP 融合蛋白的表达,PBS 洗涤细胞 2 次,使用含 50 μ mol/L 生物素的无血清 DMEM 培养基分别处理 TurboID - GFP 和 TurboID - YB1 两种细胞 0、15、30、60 和 120min。PBS 洗涤细胞 2 次,使用新鲜配制的裂解液[50mmol/L Tris - HCl(pH 7.4),8mol/L 尿素,1mmol/L DTT,1 $\times$ Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA - free]裂解细胞。取 20 μ g 细胞裂解物进行 12% SDS - PAGE 凝胶电泳,产物转至 PVDF 膜后使用 BSA 封闭液[PBS 中含 1% 牛血清白蛋白,0.2% (w/v) Triton X - 100]室温封闭 30min。按照 1:40000 稀释 Streptavidin - HRP 于 BSA 封闭液,4℃ 过夜孵育。在室温下 PBS 洗膜 3 次去除未结合的抗体,使用 ABS 封闭液[PBS 中含 10% 牛血清白蛋白,1% (w/v) Triton X - 100]封闭 5min。PBS 洗膜 3 次后,使用 Millipore Immobilon Western 试剂盒检测生物素标记的蛋白。

结 果

1. 慢病毒载体的构建:参照图 1 的构建路线,经测序验证,获得的慢病毒表达载体 TurboID - YB1 及 TurboID - GFP 的序列完全正确。

2. 强力霉素可有效诱导 TurboID 与目的蛋白在细胞内的融合表达:不添加诱导剂强力霉素,细胞内检测不到融合蛋白 TurboID - YB1。随着强力霉素使用浓度的增加,融合蛋白 TurboID - YB1 在细胞中的表达量呈现出明显的递增关系,仅使用 0.125 μ g/ml 便可诱导目的蛋白 YB1 的表达,且其表达量与 HeLa 细胞内源性表达的 YB1 蛋白接近(图 2)。

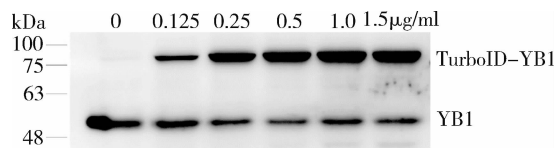


图 2 不同剂量的强力霉素诱导融合蛋白 TurboID - YB1 在 HeLa 细胞内的表达

为进一步验证可诱导性这一特点,对照细胞 (TurboID - GFP 病毒侵染的 HeLa 细胞) 进行了强力霉素诱导处理,结果显示,不添加强力霉素时几乎检测不到 GFP 的表达,添加 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 强力霉素处理可显著提高目的蛋白 GFP 的表达 (图 3)。

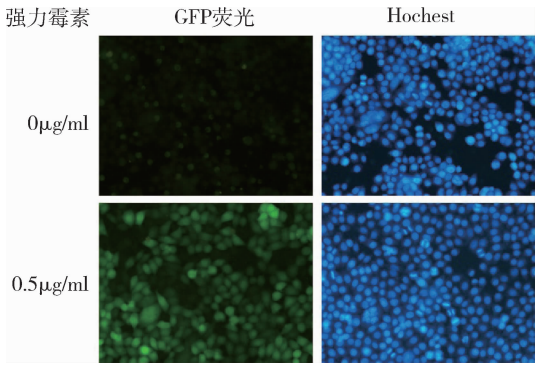


图 3 强力霉素可有效诱导对照细胞中 GFP 的表达
绿色荧光, $\times 200$

3. TurboID 系统可对目的蛋白及其邻近的蛋白质有效标记生物素:使用 50 $\mu\text{mol/L}$ 的生物素处理融合表达 TurboID - YB1 的 HeLa 细胞,并使用 Streptavidin - HRP 进行 Western blot 法检测生物素标记的蛋白。处理 15min 后两类细胞系中均检测到了大量生物素标记的蛋白,同时随着孵育时间的延长,被标记蛋白的数量逐渐增多。将实验组细胞 TurboID - YB1 同对照组细胞 TurboID - GFP 中标记的蛋白进行对比后发现,实验组细胞中可标记更多种类的蛋白,尤其是在相对分子质量 $> 35\text{kDa}$ 范围内的条带种类明显较对照组增多 (图 4)。

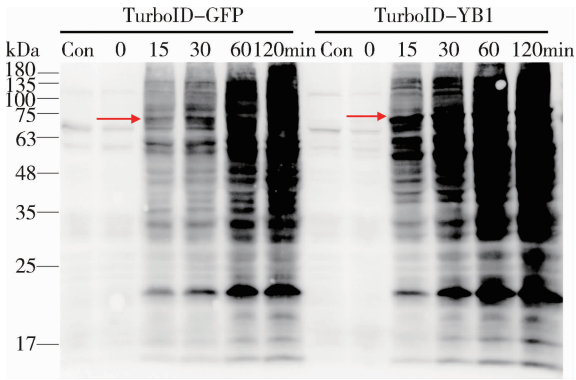


图 4 Western blot 法检测携带生物素标记的蛋白
箭头所指分别为融合表达的 TurboID - GFP 及 TurboID - YB1 蛋白

讨 论

为研究生物体内蛋白质与蛋白质之间的相互作用,人们先后发展出了生化分馏技术、酵母双杂交

(yest two hybrid assay, Y2H) 以及以免疫沉淀 (immunoprecipitation, IP) 为代表的亲和纯化 (affinity purification, AP) 等研究方法,并在国际范围内得到了广泛应用。然而这些技术都存在一些固有缺陷:不容易捕捉瞬时或较弱的蛋白相互作用;需要过表达目的蛋白,因此并不能真实反映相关蛋白复合物在细胞内的真实情况;细胞裂解液往往会破坏目的蛋白在正常细胞内的真实分布等^[2,6]。为弥补这些不足,以 BioID 和 APEX 为代表的邻近蛋白质标记方法应运而生,其中 BioID 技术因其细胞毒性小、标记效率高、适用性广等优点被大量采用。该技术于 2012 年被首次报道,至今已获得超过 100 多篇研究用于解析细胞内的蛋白组成^[6,7]。但该技术仍然存在一些限制因素,主要体现在标记时间过长 (一般要 $> 16\text{h}$),且标记效率不高,因此无法捕捉瞬时或相互之间结合力弱的蛋白质。为解决这些问题,先后衍生出了一系列改良型生物素连接酶,例如 BioID2、BASU,但这些方法仍然无法从根本上解决这些问题^[8,9]。Alice Y Ting 科研团队报道了一种新的 BirA 突变体——TurboID,只需简单用生物素处理 10min,便可获得与传统 BioID 类似甚至更高的生物素标记效率,彻底解决了制约 BioID 技术发展的瓶颈问题^[4]。自首次报道以来短短 1 年时间内,已被多个研究团队成功应用于植物及酵母等多个物种^[10,11]。

本研究中笔者成功构建了可以融合表达 TurboID 及目的蛋白的病毒载体系统。与之前的报道类似,仅对细胞做生物素处理 15min 以上,便可在 HeLa 细胞内检测到大量被生物素标记的蛋白质 (图 4)^[4]。另一方面,相对于最初报道的 TurboID 系统,本系统具有两个突出的特点:(1) 目的蛋白的表达量可以精确控制^[4]:由于 Tet - on 系统的引入,TurboID 及目的基因的融合表达完全受制于外加诱导剂——强力霉素浓度的高低,通过调整诱导剂的加入时间及使用浓度,可以精确控制目的基因的表达时间及表达量,获得更贴近于生物体原本状态的实验数据 (图 2)^[5]。(2) 细胞适用性更广:TurboID 及传统的 BioID 多以质粒为载体,以 293T 细胞为研究对象,这主要是由于 293T 细胞具备质粒转染效率高、外源基因表达量高、细胞生长旺盛等特点。相对于质粒系统,笔者构建的病毒载体系统以 lenti - cas9 载体为基础,具备病毒包装效率高、细胞适用性广的优势,可产生高效价的病毒,并广泛应用于分裂或原代培养的细胞,而不仅仅局限于 293T 这一类细胞^[12,13]。

综上所述,本研究建立的 TurboID 体系提供了一种新型的探测蛋白质相互作用和空间关系的方法,该方法可以应用到多种细胞及多个物种,操作简便快速,可精确控制目的蛋白的相对表达量,具有广阔的应用前景。

参考文献

- 1 May DG, Roux KJ. BioID: a method to generate a history of protein associations [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2008: 83 – 95
- 2 Gingras AC, Abe KT, Raught B. Getting to know the neighborhood: using proximity – dependent biotinylation to characterize protein complexes and map organelles [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 48: 44 – 54
- 3 Roux KJ, Kim DI, Burke B, *et al.* BioID: a screen for protein – Protein interactions [J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2018, 91(1): 19.23. 11 – 19.23.15
- 4 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
- 5 Samavarchi – Tehrani P, Abdouni H, Samson R, *et al.* A versatile lentiviral delivery toolkit for proximity – dependent biotinylation in diverse cell types [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17(11): 2256 – 2269
- 6 Trinkle – Mulcahy L. Recent advances in proximity – based labeling methods for interactome mapping [J]. *F1000Res*, 2019, 8 (F1000 Faculty Rev): 135
- 7 Roux KJ, Kim DI, 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 – 810
- 8 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
- 9 Ramanathan M, Majzoub K, Rao DS, *et al.* RNA – protein interaction detection in living cells [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(3): 207 – 212
- 10 Zhang Y, Song G, Lal NK, *et al.* TurboID – based proximity labeling reveals that UBR7 is a regulator of N NLR immune receptor – mediated immunity [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3252
- 11 Larochelle M, Bergeron D, Arcand B, *et al.* Proximity – dependent biotinylation mediated by TurboID to identify protein – protein interaction networks in yeast [J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(11): jcs232249
- 12 Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome – wide libraries for CRISPR screening [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(8): 783 – 784
- 13 Ran FA, Hsu PD, Wright J, *et al.* Genome engineering using the CRISPR – Cas9 system [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281 – 2308
(收稿日期:2019 – 11 – 08)
(修回日期:2019 – 11 – 12)
- 14 Wurmbach E, Chen YB, Khitrov G, *et al.* Genome – wide molecular profiles of HCV – induced dysplasia and hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2007, 45(4): 938 – 947
- 15 Hughes SK, Oudin MJ, Tadros J, *et al.* PTP1B – dependent regulation of receptor tyrosine kinase signaling by the actin – binding protein Mena [J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(21): 3867 – 3878
- 16 Chen D, Xu L, Li X, *et al.* Enah overexpression is correlated with poor survival and aggressive phenotype in gastric cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 998
- 17 Hu K, Wang J, Yao Z, *et al.* Expression of cytoskeleton regulatory protein Mena in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(5): 939
- 18 Gurzu S, Jung I, Prantner I, *et al.* The immunohistochemical aspects of protein Mena in cervical lesions [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2009, 50(2): 213 – 216
- 19 Oudin MJ, Gertler FB. Signatures of breast cancer metastasis: aME-Nable to interpretation? [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(1): 7 – 9
- 20 Ochal – Chojińska AJ, Osuch – Wójcikiewicz E. Particular aspects in the cytogenetics and molecular biology of salivary gland tumours – current review of reports [J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2016, 20(4): 281 – 286
- 21 McConkey DJ, Gertler FB, Melucci E, *et al.* Human Mena + 11a isoform serves as a marker of epithelial phenotype and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human pancreatic cancer cell lines [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(15): 4943 – 4950
- 22 Wang L, Huang J, Jiang M, *et al.* CAMK1 phosphoinositide signal – mediated protein sorting and transport network in human hepatocellular carcinoma (HCC) by biocomputation [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(2): 1011 – 1016
- 23 Gurzu S, Ciortea D, Ember I, *et al.* The possible role of mena protein and its splicing – derived variants in embryogenesis, carcinogenesis and tumor invasion: a systematic review of the literature [J]. *BioMed Res Int*, 2013, 2013: 1 – 6
- 24 Pollutri D, Gramantieri L, Bolondi L, *et al.* TP53/MicroRNA Interplay in Hepatocellular Carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 2029
- 25 Xia TF, Chen J, Wu K, *et al.* Long noncoding RNA NEAT1 promotes the growth of gastric cancer cells by regulating miR – 497 – 5p/PIK3R1 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(16): 6914 – 6926
(收稿日期:2019 – 09 – 10)
(修回日期:2019 – 11 – 14)

(上接第 25 页)