



RNA邻近标记技术研究进展

王凯, 王丽娜, 许晓莞, 何雨薇, 杨庆凯*

大连医科大学肿瘤干细胞研究院, 大连 116044

* 联系人, E-mail: Yangqingkai@dmu.edu.cn

收稿日期: 2021-10-01; 接受日期: 2021-10-25; 网络版发表日期: 2021-12-05

国家自然科学基金(批准号: 81872310)、中国博士后科学基金面上项目(批准号: 2020M680956)、中国博士后科学基金特别资助项目(批准号: 2021T140086)和大连市青年科技之星项目(批准号: 2020RQ070)资助

摘要 RNA的空间分布对多种细胞生物学功能起着决定性作用, 故绘制RNA的亚细胞空间分布图谱具有重要研究意义. 但传统的生化方法很难富集无膜包被的亚细胞空间的RNA, 而邻近标记技术的开发为不同亚细胞空间特别是无膜细胞器内的RNA与蛋白的分离纯化提供了一种有效的方法. 本文主要介绍了基于过氧化物酶、生物素连接酶、miniSOG酶和PafA酶开发的邻近标记技术的特点, 并总结了各种邻近标记酶的优缺点以及在RNA邻近标记方面的应用.

关键词 RNA邻近标记, 亚细胞空间, RNA富集, 无膜细胞器

真核细胞RNA的空间分布在细胞增殖、细胞命运决定、胚胎发育、疾病发生等生理病理过程中发挥重要的作用^[1,2]. 细胞将特定RNA分子富集在不同的亚细胞空间, RNA的亚细胞定位取决于RNA序列、RNA结合蛋白、分子马达和亚细胞结构等, 细胞功能受到RNA和蛋白质亚细胞定位的严格调控^[3]. 近年来各种RNA研究技术得到迅速发展, 如高通量测序RNA检测技术^[4,5]、RNA结构解析技术^[6]、RNA结合蛋白研究技术^[7]、细胞影像解析技术^[8]、RNA化学标记技术^[9]等, 但是有效标记不同亚细胞空间RNA的技术有限.

对于具有封闭膜包被的亚细胞空间, 如细胞核、线粒体、突触小体、外泌体等细胞器可以通过密度梯度离心法进行分离纯化, 进而分离纯化相应亚细胞器内的RNA^[10-13]. 但是利用传统机械离心法很难富集无膜封闭的亚细胞空间的RNA, 如相分离形成的各种无

膜小体^[14]、线粒体外膜、细胞内膜等亚细胞空间的RNA. 所以需要一种适用于活细胞的、具有高时空分辨能力的富集亚细胞空间RNA的方法. 邻近标记技术的出现成为了解蛋白质、RNA相互作用和细胞内定位模式的一种有价值的方法^[15]. 邻近标记技术依赖于酶催化底物来标记细胞分子, 通常将酶与空间定位的诱饵蛋白融合, 在活细胞中进行亚细胞空间定位, 邻近标记酶催化底物分子连接到邻近的蛋白质或RNA上^[16], RNA邻近标记技术可以用于研究不同亚细胞空间RNA的定位与富集.

邻近标记技术使用的标记酶主要有过氧化物酶和生物素连接酶, 过氧化物酶有APEX^[17], APEX2^[18]和HRP^[19], 生物素连接酶有BirA^[20], BioID^[21], BioID2^[22], BSUA^[16], TurboID^[23], miniTurboID^[23]等. 除了过氧化物酶与生物素连接酶外, miniSOG^[24]和PafA^[25]等酶也

引用格式: 王凯, 王丽娜, 许晓莞, 等. RNA邻近标记技术研究进展. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 1657-1667

Wang K, Wang L N, Xu X W, et al. Recent advances in RNA proximity labeling (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 1657-1667, doi: 10.1360/SSV-2021-0390

被用于邻近标记。近些年来,利用这些标记酶发展出各种邻近标记细胞的方法^[26](图1A)。邻近标记反应发生在活细胞内,通常标记范围在几十纳米以内,因此,邻近标记特别适合用于捕获不同空间位置动态与瞬态的RNA和蛋白,为了解细胞不同亚细胞空间的RNA和蛋白的定位及其位置关系提供了有力的工具^[15]。本文详细介绍了不同酶介导的邻近标记方法的特点及其在RNA邻近标记方面的应用与发展。

1 过氧化物酶介导的RNA邻近标记技术

过氧化物酶介导的RNA邻近标记是将亚细胞定位的诱饵蛋白与过氧化物酶在活细胞中融合表达,利用诱饵蛋白的定位将过氧化物酶引导到目标亚细胞空间。用于邻近标记技术的过氧化物酶主要有APEX, APEX2和HRP。在 H_2O_2 的存在下,过氧化物酶能迅速将惰性小分子底物生物素-苯酚转化为具有短暂活性

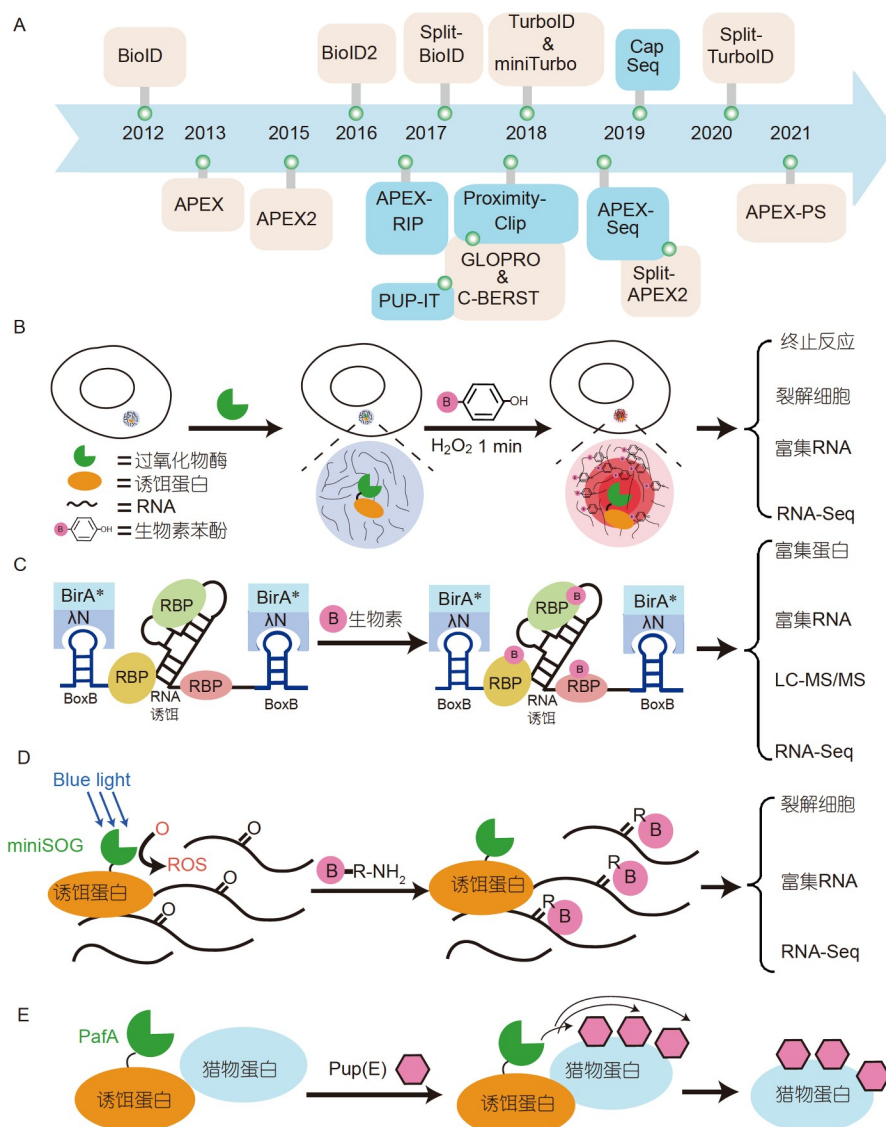


图 1 RNA邻近标记技术。A: 邻近标记技术的研究进展; B: 过氧化物酶介导的RNA邻近标记技术; C: 生物素连接酶介导的RNA邻近标记技术; D: miniSOG CAP-Seq RNA邻近标记技术; E: PUP-IT邻近标记技术

Figure 1 RNA proximity labeling technology. A: Recent advances in RNA proximity labeling technology; B: the RNA proximity labeling methods based on peroxidase; C: the RNA proximity labeling methods based on biotin ligase; D: the CAP-Seq RNA proximity labeling methods based on miniSOG; E: the PUP-IT proximity labeling methods

的标记物自由基(<1 ms), 这些高活性的自由基可以共价连接到邻近的内源蛋白或RNA上. 然后加入还原淬灭剂溶液去除 H_2O_2 后标记反应终止, 最后使用链霉亲和素磁珠富集被生物素标记的RNA分子, 进行高通量测序或其他分析^[27]. 过氧化物酶介导的RNA邻近标记具体技术流程(图1B): 过氧化物酶与诱饵蛋白融合表达后定位在特定亚细胞空间, 向细胞内加入生物素苯酚探针, 加入 H_2O_2 后1 min就能完成RNA邻近标记反应, 终止反应后, 裂解细胞, 提取RNA, 富集被生物素标记的RNA进行高通量测序分析.

1.1 APEX过氧化物酶

APEX是一种来源于植物的工程化抗坏血酸过氧化物酶. APEX可以催化四氧化钼固定的细胞内的DAB显色剂聚合和沉淀, 最初用于细胞结构超分辨电子显微镜成像^[28]. 自从2013年Ting课题组^[17]报道了使用APEX实现线粒体蛋白质组图谱的时空特异性绘制以来, APEX介导的邻近标记技术在蛋白质亚细胞标记方面得到了广泛的应用. APEX在 H_2O_2 的存在下将底物生物素-苯酚催化为具有短暂活性的自由基, 共价连接在邻近的蛋白分子上, 由于生物素-苯氧自由基不具有透膜性, 所以APEX对于膜封闭的亚细胞室(如线粒体和自噬体)的蛋白质组学分析是非常有利的. 2015年, Ting课题组^[18]利用酵母展示技术筛选到具有更高活性的APEX蛋白突变体APEX2, APEX2蛋白有一个氨基酸突变位点A134P, 它与APEX蛋白具有相同的化学催化反应. APEX2对邻近标记反应具有更高的活性和敏感性. Huang等人^[29]进一步将APEX2蛋白进行改造, 通过一个氨基酸突变位点C32S, 进一步提高了APEX2标记蛋白的稳定性. APEX的主要优点是它在还原性细胞环境中(如胞浆)仍然保持其催化活性, APEX的应用并不局限于有膜包被的细胞器, 它已被成功地用于绘制纤毛^[30]、压力颗粒^[31]、线粒体外膜^[18]、内质网-质膜接触点^[32]、线粒体基质^[33]、线粒体膜间隙^[34]等亚细胞空间的研究. 为了实现对亚细胞空间RNA的邻近标记, 基于APEX过氧化物酶的APEX-RIP^[35]技术、Proximity-CLIP^[36]技术、APEX-Seq^[27]技术相继被开发.

1.2 APEX-RIP RNA邻近标记技术

为了研究不同亚细胞空间RNA的转录组, 2017年,

Ting课题组^[35]利用APEX可以邻近标记不同亚细胞空间蛋白的特点发明了一种APEX-RIP方法, 实现了亚细胞空间RNA的邻近标记与富集. 该方法利用APEX2邻近标记目标亚细胞空间的蛋白, 然后通过化学交联的方法将RNA与蛋白质稳定结合在一起后, 使用链霉亲和素磁珠将被生物素标记的蛋白与RNA富集起来, 最后将富集到的RNA进行纯化测序, 从而实现高通量的亚细胞空间转录组测序. APEX-RIP技术可以从多种亚细胞空间分离RNA, 包括线粒体基质、细胞核、胞浆和内质网等, 还进一步富集到位于线粒体内质网连接处的RNA以及核纤层位置处的RNA, 通过测序得知其特异性和灵敏度都比较好. APEX-RIP操作简单, 但是由于RNA与蛋白之间的化学交联, 很难得到完整性良好的RNA, 故而RNA测序数据的质量难以得到充分保障.

1.3 Proximity-CLIP RNA邻近标记技术

2018年, Benhalevy等人^[36]发明了一种Proximity-CLIP技术, 首先将活细胞内的RNA标记上4-硫尿苷(s^4U), 通过紫外光($\lambda > 310$ nm)将RNA和蛋白质进行交联, 该技术对邻近亚细胞空间RNA富集的原理与上述APEX-RIP相同, 只是将原来的化学交联变成物理交联, 减少了对RNA的干扰. 研究人员利用Proximity-CLIP技术实现了细胞核、细胞质、细胞-细胞结合界面三个亚细胞空间的RNA与蛋白的富集检测, 成功检测到多个RNA与蛋白的结合位点, 并发现位于细胞-细胞结合界面的mRNA在3'非翻译区大多数含有CUG蛋白结合的序列元件. 紫外交联在生物素反应之前进行, 从而大大缩短了蛋白质生物素化和蛋白质-RNA连接之间的时间间隔, 减少了RNA的扩散和RNP重排. s^4U 的掺入增强了RNA与蛋白质之间的交联反应, 从而不需要对细胞进行化学固定和通透, 不会干扰RNA的定位. s^4U 的掺入还会使测序文库中特异性结合位点处发生T到C的转变, 更有利于准确分析蛋白与RNA特异性结合位点, 消除测序中的背景噪音, 提高测序分辨率.

1.4 APEX-Seq RNA邻近标记技术

2019年, Ting课题组^[27]发现, 过氧化物酶APEX2可以直接对RNA进行邻近标记, 并开发了APEX-seq技术. 该技术通过将APEX2与诱饵蛋白融合表达, 将APEX2定位在目标亚细胞空间, 向细胞中加入生物素-

苯酚探针, 在 H_2O_2 催化1 min后就可以将目标区域的RNA进行生物素标记. 研究人员利用APEX-seq技术绘制了包括细胞核、核仁、核纤层、细胞质、线粒体基质、线粒体外膜、内质网、内质网外膜与核孔在内的九个不同亚细胞空间的转录图谱. APEX-seq技术检测到的序列信息可达到单碱基分辨率, 可对亚细胞空间的RNA特征进行精确描述.

Padrón等人^[31]也通过体内和体外实验验证了APEX2标记RNA的效果, 并对内质网膜的胞质面、细胞质、细胞核三个亚细胞空间的RNA进行了邻近标记及测序, 并以细胞质RNA为参照, 鉴定出内质网膜的胞质面有601个显著变化的基因, 细胞核有196个显著变化的基因. 作者又将APEX-seq技术与蛋白质组学联用, 对mRNA翻译起始复合物的成分进行了鉴定, 发现eIF4A1 RNA螺旋酶位于43S复合体前沿, 同时还利用APEX-seq技术鉴定了相分离形成的压力小体内的RNA及蛋白质组成, 这说明APEX-Seq技术可以为研究相分离小体中RNA与蛋白质的相互作用及动态变化提供有利的工具.

1.5 APEX-PS邻近标记技术

最近, Ting课题组^[37]结合APEX邻近标记技术和相分离的RNA集合蛋白富集技术开发了一种APEX-PS技术, 该技术能实现相分离无膜细胞器中RNA结合蛋白的大规模分析, 成功鉴定出791个细胞核内的RNA结合蛋白. APEX-PS技术具有很高的特异性和灵敏度, 可鉴定出局部区域低丰度的RNA结合蛋白, 还具有分析RNA结合强弱的潜力.

1.6 APEX邻近标记探针优化

APEX已经广泛应用于动物细胞蛋白的邻近标记. 由于只有生物素-苯酚作为APEX的底物探针, APEX催化产生的苯氧自由基更倾向于与蛋白进行反应, 限制了APEX在RNA邻近标记与DNA邻近标记中的应用. 邹鹏团队^[38]通过化学筛选发现, 共轭芳胺对核酸具有很好的邻近标记反应, 以及生物素苯胺和生物素萘胺对RNA与DNA的标记效果优于生物素-苯酚(图2). 他们将APEX2定位于线粒体基质, 利用生物素苯胺探针富集到13个线粒体mRNA, 但未富集到细胞质中的RNA, 说明生物素苯胺可以用于标记亚细胞空间RNA.

生物素-苯酚/苯胺底物探针的细胞通透性差, 很

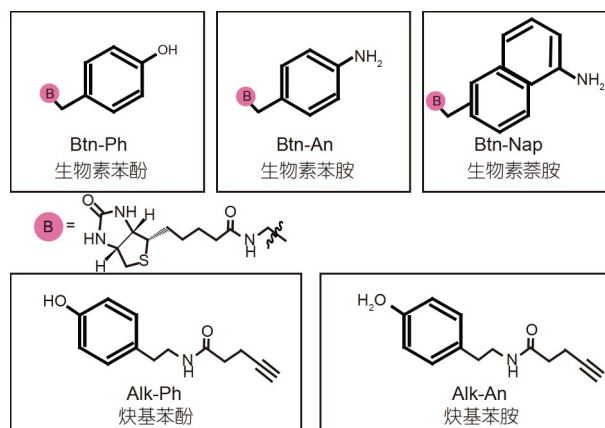


图2 APEX邻近标记底物探针(网络版彩图)

Figure 2 The substrate probes of APEX proximity labeling technology (color online)

难穿透酵母这种具有细胞壁的微生物, 所以APEX邻近标记技术很难用于酵母细胞. 邹鹏团队^[39]通过化学改造将生物素替换成点击化学的手柄-炔基, 增加了探针对酵母的通透性(图2). 将APEX2定位于酵母线粒体基质中, 利用炔基-苯酚探针标记了线粒体基质内的蛋白质和RNA, 裂解细胞后, 通过点击化学反应将炔基-苯酚标记的蛋白和RNA与叠氮生物素结合, 利用链霉亲和素磁珠富集被标记的蛋白质和RNA. 实验结果表明, 炔基苯酚探针对于酵母线粒体基质的RNA和蛋白的富集都是可行的, 并鉴定出165种线粒体特异的蛋白. 除了对反应底物探针的优化, Huang等人^[40]报道, APEX2可催化生物素-苯酚与RNA进行反应, $s^4\text{U}$ 标记的RNA更容易被APEX2催化标记生物素, 这些探针的优化使APEX介导的邻近标记具有更高的标记效率.

1.7 辣根过氧化物酶介导的邻近标记

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)也可用于做亚细胞空间的邻近标记, 根据标记探针的不同, HRP邻近标记的方法主要分为两种. 第一种为酶介导的自由基激活, 即利用生物素-芳基叠氮为探针底物, 在HRP和 H_2O_2 催化下产生含氮自由基, 对邻近分子的活性氢位点和亲核基团(酪氨酸、色氨酸等)进行攻击, 从而实现邻近分子的生物素标记, 标记范围为200~300 nm. Kotani等人^[19]利用HRP鉴定了活细胞中细胞表面分子簇的成分. 第二种HRP邻近标记的方法是利用生物素-苯酚作为底物探针, 在HRP和 H_2O_2 的催化下, 惰性小分子底物生物素-苯酚转化为具有短暂半

衰期的高活性自由基, 将生物素-苯酚探针共价连接到邻近蛋白上, 实现邻近蛋白的生物素标记. Li等人^[41]将该方法应用于B淋巴瘤细胞系细胞膜上受体的共组装机分子的检测. HRP不同于APEX, APEX蛋白在所有细胞空间都具有活性, 但HRP只在氧化环境中有活性, 例如, 在内质网或高尔基体的内腔和细胞膜外区域. HRP由四个二硫键和两个Ca²⁺离子结合位点维持, HRP的结构在还原性条件下会被破坏, 因此HRP在还原性环境(如胞浆)中不起作用, 这限制了其在还原性细胞空间中的应用^[42].

2 生物素连接酶介导的RNA邻近标记技术

生物素连接酶催化生物素分子连接到邻近蛋白上实现邻近标记. 常用于邻近标记的生物素连接酶有BioID, BioID2, BSUA, TurboID和miniTurbo等, 这些酶都是通过BirA生物素连接酶进化改造得到的BirA*蛋白. 目前为止, 还没有BirA直接标记RNA的报道, 但是可以按照APEX-RIP和Proximity-CLIP技术路线, 将蛋白与RNA固定后, 通过富集被邻近标记的蛋白, 将与之交联的RNA富集起来并进行高通量测序分析. 有研究者通过用BoxB适体连接RNA诱饵, 招募噬菌体λN肽和生物素连接酶BirA*的融合蛋白, 实现RNA结合蛋白的生物素化, 从而对特定亚空间定位的RNA进行邻近标记^[16]. 生物素连接酶介导的RNA邻近标记具体技术流程(图1C): 将BoxB表达在要研究的RNA上, BirA*与λN标签融合, 利用λN标签能识别BoxB的原理使BirA*结合在目标RNA的邻近空间, BirA*将生物素标记在目标RNA的周围蛋白上, 富集被生物素标记的蛋白与RNA进行质谱检测和高通量测序分析.

2.1 BirA生物素连接酶

BirA是一种高度保守的生物素连接酶, 它能催化生物素和ATP产生一种高活性的生物素酰-5'-AMP (Bio-AMP)中间体, 将生物素连接到特定的蛋白上^[20]. BirA介导的邻近连接策略是将BirA的底物蛋白与诱饵蛋白融合, 从而将目标融合蛋白标记上生物素, 利用链霉亲和素系统富集目标蛋白及与其相互作用的生物分子. BirA的天然底物是生物素羧基载体蛋白(biotin carboxyl carrier protein, BCCP), 由于其分子量大, 至少需要75个氨基酸残基与目标蛋白融合才可以被BirA催化

标记上生物素, 所以通过噬菌体展示技术筛选到的长度仅为15个氨基酸残基的短受体肽-AviTag, 扩大了BirA邻近标记的应用范围^[43]. 由于BirA催化标记反应对蛋白序列具有很强的依赖性, 需要底物蛋白或受体肽-AviTag的参与, 所以进行邻近标记实验时的操作较为复杂.

2.2 BioID/BioID2介导的邻近标记

基于BioID的邻近标记技术采用了生物素连接酶BirA的突变形式BirA*(R118G位点突变), BioID催化生物素产生高活性的Bio-AMP, BioID相比BirA对Bio-AMP的亲和力显著降低, 能提前释放Bio-AMP, 更容易实现对邻近蛋白的生物素标记^[21]. 标记反应发生在邻近蛋白特定的赖氨酸残基上形成稳定的酰胺键, BioID的标记半径为10 nm左右. BioID邻近标记简单无毒, 只需提供生物素即可启动标记. 自引入BioID以来, BioID在培养的哺乳动物细胞^[44]、植物原生质体^[45]、寄生虫^[46,47]、小鼠^[48]和酵母^[49]中的应用已超过100种.

BioID的主要缺点一方面是其催化活性低, 生物素标记能力差, 标记时间需要18~24 h. BioID对一些细胞亚空间难以标记, 例如蠕虫、苍蝇或培养的哺乳动物细胞的內质网腔. 另一方面是BioID含有DNA结合结构域, 产生的非特异性背景高. 2016年, Kim等人^[22]报道了一种改进版本的BioID2, BioID2来源于超噬热菌, 在其蛋白催化位点含有一个R40G突变, BioID2的N末端缺少DNA结合域, 分子量为27 kD, 因此比大肠杆菌BioID小(分子量35 kD), 有利于与诱饵蛋白的融合定位. BioID2的生物素标记背景低, 需要更少的生物素催化标记反应, 适用于标记更加广泛的亚细胞空间.

2.3 BASU介导的邻近标记技术

Khavari课题组^[16]在研究RNA与蛋白质相互作用时得到一个新的生物素连接酶突变体BirA*并将其命名为BASU, BASU来源于枯草芽孢杆菌, 同BioID2一样缺失DNA结合域, BASU的C端和5'-AMP结合区进行了一系列突变, 与BioID和BioID2相比生物素催化活性更高. 以BASU为基础, 一系列邻近标记的方法被开发出来, 如ChromID^[50]技术, 通过把BASU与特定染色质读取器融合, 实现对特定区域染色质的邻近标记. RaPID技术^[16]也是利用BASU构建出来的, 被用来检测

与寨卡病毒RNA相互作用的宿主蛋白, 通过用BoxB适体标记感兴趣的RNA, 招募噬菌体 λ N肽和生物素连接酶BASU的融合蛋白, 实现RNA结合蛋白RBP的生物素化(图1C).

2.4 TurboID/miniTurbo介导的邻近标记技术

生物素连接酶BioID, BioID2和BASU的开发为邻近标记技术提供了有力的工具, 但这些酶的标记需要的时间过长(18 h左右). 2018年, Ting课题组^[23]对BirA进行定向计划改造得到TurboID和miniTurbo两种新的生物素连接酶. TurboID分子量35 kD, 有15个氨基酸位点的突变, miniTurbo有13个氨基酸位点突变并有一些N端序列被删除, 分子量为28 kD. TurboID和miniTurbo催化活性大大增加, 催化时间从原来的18 h缩短到10 min, 极大扩展了生物素连接酶在邻近标记方面的应用, 并在果蝇和线虫活体中得到有效的邻近标记反应. 张永亮课题组^[51]将TurboID应用于抗烟草花叶病毒免疫受体蛋白N的互作蛋白研究, 首次在植物中构建了基于TurboID酶的邻近标记系统. Bergmann课题组^[52]在拟南芥稳定转化体系和烟草瞬时转化体系中也验证了TurboID和miniTurbo系统的标记反应.

3 光敏化学反应的空间特异性RNA邻近标记技术

2019年, 邹鹏课题组和王建斌课题组^[24]利用邻近标记酶miniSOG开发了一种基于光敏化学反应的特异亚细胞空间RNA标记技术, 命名为CAP-Seq. 研究人员通过体外实验比较各种光敏蛋白, 筛选出可用于邻近标记的光敏蛋白miniSOG. 光敏蛋白miniSOG在蓝光照射下可产生单线态氧自由基, 迅速进攻鸟嘌呤, 生成氧化中间体, 含有氨基的生物素探针可以捕获氧化中间体形成共价产物, 从而完成邻近标记. 单线氧的扩散距离有限使miniSOG邻近标记发生在附近几十纳米范围内. 通过将miniSOG定位于线粒体, 成功对线粒体内15个RNA进行捕获. miniSOG介导的CAP-Seq技术跳出了原有的过氧化物酶和生物素连接酶介导的邻近标记体系, 可更加精确地对标记区域进行控制, 具有更加精确的时间控制, 可以引领新的邻近标记技术的开发. 光敏化学反应介导的miniSOG CAP-Seq RNA邻近标记技术具体流程(图1D): miniSOG与诱饵蛋白融

合表达, 在蓝光照射下, miniSOG产生的单线态氧迅速进攻鸟嘌呤, 生成的氧化中间体被含有氨基的探针捕获形成共价加成产物, 裂解细胞提取RNA, 富集被标记的RNA进行高通量测序分析.

4 PUP-IT邻近标记技术

2018年, 庄敏和王皞鹏课题组^[25]合作开发了一种新的利用PafA酶的邻近标记系统——PUP-IT(pupylation-based interaction tagging), 与过氧化物酶和生物素连接酶介导的邻近标记不同, PafA催化一种被称为Pup的小蛋白进行邻近的蛋白标记, 这种技术称为PUP-IT技术. PUP-IT技术利用来源于细菌的Pup连接酶PafA, 将Pup小分子标记到邻近蛋白上从而实现对亚细胞空间蛋白的邻近标记. Pup是一个64个氨基酸残基的小蛋白, 其C端为Gly-Gly-Gln, PafA在Pup的C末端脱氨基使Gln变成Glu, 形成Pup(E), 在ATP存在下, PafA催化Pup(E)的C端Glu磷酸化, 并与赖氨酸残基结合. PafA在目标赖氨酸的两侧没有一致的结合基序, 因此可以将Pup连接到附近的任何赖氨酸残基上, 使其成为一种有用的邻近蛋白标记酶. 将PUP-IT技术用于T细胞表面受体CD28的研究, 鉴定出多个与CD28相互作用的蛋白. PUP-IT邻近标记技术具体流程(图1E): PafA与诱饵蛋白融合表达, PafA能催化Pup(E)C端Glu的磷酸化, 而后将该磷酸化的Glu结合到附近猎物蛋白上, 实现对猎物蛋白的邻近标记.

2020年, 刘冀珑、庄敏和吕鹏飞课题组^[53]合作将PUP-IT系统与靶向RNA的CRISPR-dCas13相结合开发出CRUIS(CRISPR-based RNA-United Interacting System)系统, 用于研究特定RNA空间位置周围蛋白质的邻近标记, 通过CRUIS系统, 追踪了ACTB mRNA在应激颗粒中的聚集能力并捕获了与ACTB mRNA结合的蛋白.

5 Split-PL邻近标记技术

为了提高邻近标记技术的特异性, Split-PL邻近标记技术被相继开发. 将邻近标记酶通过基因工程的方法分成两段无活性的蛋白片段, 这两段蛋白在细胞中分别表达均无标记活性, 只有共表达在细胞中的同一亚细胞空间才具有邻近标记活性. Split-PL邻近标记技

术将细胞中两个具有相互作用的诱饵蛋白分别融合到两个无活性的Split-PL片段上, 相互作用的诱饵蛋白在细胞中表达后定位于同一细胞空间, 两个Split-PL片段在同一亚细胞空间相互作用恢复标记活性, 实现对特定空间的标记。

5.1 Split-APEX2

Xue等人^[54]将APEX2蛋白分为两段, NA201和CA202, 将无催化活性的两个片段分别与FRB及FKBP12进行融合, 雷帕霉素可以诱导FRB和FKBP12蛋白进行二聚化, 无活性的两个片段NA201和CA202二聚化聚合后互补形成具有催化活性的APEX2, 这种Split-APEX2的方法显示出更好的亚细胞标记特异性。Ting课题组^[55]利用酵母展示定向进化技术将200个氨基酸N端的9个氨基酸位点进行了突变, 得到特异性更好的两段, 并将该系统命名为sAPEX, 成功应用于细胞质、线粒体与内质网接触位点等亚细胞空间的RNA与蛋白的研究。

5.2 split-HRP

HRP蛋白有308个氨基酸, Ting课题组^[56]通过筛选得到HRP中的17个剪切位点并进行定向进化, 通过比较发现213位氨基酸剪切位点的split-HRP(sHRP)催化活性最高。将sHRP片段分别融合到Neurexin(NRX)和Neurologin(NLG)蛋白上, NRX与NLG跨越突触间隙相互结合后, sHRP两个片段相互结合, 催化突触间隙的邻近标记反应。sHRP需要血红素和外源性标记试剂, 这些试剂可以直接添加到培养细胞中, 但在体内传递效率低。sHRP不仅在培养的细胞中能敏感地观察特定神经元之间的突触, 也可以检测小鼠大脑中长距离(~1 cm)连接中的小突触。

5.3 Split-BioID

2017年, De Munter等人^[57]开发了一种Split-BioID方法, 将BioID分成两段, 分开表达后均无催化活性, 两段分别融合到蛋白磷酸酶PP1的催化亚基和调节亚基上, 当蛋白磷酸酶PP1在细胞中形成二聚体时, 两段无活性的BioID聚集在一起组合成有催化活性的生物素连接酶, 从而对PP1复合物进行邻近标记。Split-BioID只能标记二聚体邻近的蛋白, 所以标记反应特异性更强。Schopp等人^[58]利用Split-BioID鉴定了RNA诱导沉

默复合体miRISC中相互作用的蛋白, 找到新的基因沉默因子, 说明该技术还可用于挖掘蛋白质复合物中分子间的相互作用。

5.4 Split-TurboID

基于Split-APEX和Split-BioID的邻近标记技术均已被开发, TurboID的标记速度显著优于BioID且不需要细胞毒性的H₂O₂催化, 所以Ting课题组^[59]基于TurboID发明了Split-TurboID技术, 通过SPELL计算算法预测, 筛选了14个不同的TurboID分裂位点, 通过体内体外酶活验证, 最后选定L73/G74作为最佳分裂位点。利用Split-TurboID技术鉴定筛选到70个之前未报道的内质网-线粒体接触位点蛋白。Split-TurboID技术的开发可以实现基于邻近标记技术的相关细胞亚空间群的蛋白质组分析, 同时具有非常大的潜力应用于RNA的邻近标记。

6 邻近标记技术的优势与局限性

传统的亲和纯化与RNA测序相结合的方法也可以用来富集与特定蛋白相互作用的RNA, 如RNA免疫沉淀测序(RNA immunoprecipitation sequencing, RIP-seq)^[60]。然而, 亲和纯化的主要限制是在细胞裂解和随后的洗涤步骤中通常会丢失具有微弱或瞬时相互作用的分子。此外, 亲和纯化对于不溶性靶点或缺乏高亲和力抗体的蛋白质邻近RNA的富集具有挑战性。邻近标记技术突破了传统方法的一些限制, 可以获得大量可溶性蛋白质或者不溶性膜蛋白邻近的RNA并进行高通量测序鉴定。邻近标记技术不仅可以富集到不同亚细胞空间的蛋白质、RNA和DNA等大分子, 还可以捕捉到传统方法无法检测到的微弱或短暂的细胞分子之间的相互作用。

邻近标记技术需要将邻近标记酶(27~44 kD)与诱饵蛋白融合, 融合可能会影响诱饵蛋白的功能、定位甚至相互作用, 还需要将构建的融合载体通过瞬时转染或稳定转染到细胞内进行过表达, 诱饵蛋白与邻近标记酶的过表达可能会产生过度标记而得到假阳性结果。此外, 邻近标记酶的选择在很大程度上取决于具体的应用, 因为每种酶都有自己的优缺点(表1)。例如, 过氧化物酶APEX, PEX2与HRP介导的邻近标记的优点是酶的催化标记效率高、标记时间短, 可以在1 min完

表 1 不同邻近标记酶的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of different proximity labeling enzymes

酶	分子量(kD)	类型	标记时间	优点	缺点
APEX	28	过氧化物酶	1 min	标记时间短; 既可以标记蛋白也可以标记RNA	标记反应需要的H ₂ O ₂ 对细胞具有毒性
APEX2	28	过氧化物酶	1 min	标记时间短; 既可以标记蛋白也可以标记RNA	标记反应需要的H ₂ O ₂ 对细胞具有毒性
HRP	44	过氧化物酶	1 min	标记时间短; 既可以标记蛋白也可以标记RNA	标记反应需要的H ₂ O ₂ 对细胞具有毒性; 在还原性细胞空间中不起作用
BirA	35	生物素连接酶	18 h	无细胞毒性	标记时间长; 标记效率低
BioID	35	生物素连接酶	18 h	无细胞毒性	标记时间长; 标记效率低
BioID2	35	生物素连接酶	18 h	无细胞毒性	标记时间长; 标记效率低
BSUA	29	生物素连接酶	18 h	无细胞毒性	标记时间长; 标记效率低
TurboID	35	生物素连接酶	10 min	无细胞毒性; 标记时间短	如果标记时间未控制好, 标记特异性会下降
miniTurboID	28	生物素连接酶	10 min	无细胞毒性; 标记时间短	如果标记时间未控制好, 标记特异性会下降
miniSOG	12	光敏蛋白	20 min	标记可以用光控制; 标记效率高	标记产生单线态活性氧具有细胞毒性
PafA	53	Pup连接酶	30 min	标记范围小特异性高	PafA分子量太影响在细胞内表达

成标记反应, 其缺点是邻近标记反应需要H₂O₂的催化, H₂O₂对活细胞是有毒性的, 对细胞正常生理状态会有一些影响. 生物素连接酶只需要生物素探针, 对细胞无毒性, 但是BirA, BioID, BioID2与BSUA这些生物素连接酶的催化活性低, 催化时间长达18 h, 还会产生一些标记背景污染.

7 总结

邻近标记技术的出现为蛋白质、RNA与DNA的亚细胞空间定位与相互作用的研究提供了很大帮助, 邻近标记不需要破坏细胞进行复杂的分离, 打破了传统方法的限制. 各种邻近标记酶的发现与优化推动了RNA邻近标记技术的飞速发展. 过氧化物酶APEX2、光敏化学反应酶miniSOG已经被报道可以直接将底物

探针连接到邻近的RNA分子上, 用来富集各种亚细胞空间的RNA. 生物素连接酶与PafA酶同过氧化物酶一样可以直接催化底物探针连接到邻近蛋白上, 但还未发现其与过氧化物酶APEX2一样直接标记邻近RNA的能力. 这些邻近标记酶都可以通过增加一步RNA与蛋白质交联的步骤, 通过对邻近蛋白的富集得到与邻近蛋白交联的RNA.

越来越多的酶被开发应用于邻近标记, 随着各种技术的开发, RNA邻近标记技术将得到更好的发展, 更多RNA的空间位置与动态信息将会被捕捉. 邻近标记技术的发展将推动一些重要生命科学问题的解决. 利用邻近标记技术可以绘制分子间相互作用图谱, 使以前难以获得的生物学信息, 如分子间瞬时相互作用信息、不溶性诱饵蛋白邻近分子、分子间相互作用的接触点的研究成为可能.

参考文献

1 Xia C, Fan J, Emanuel G, et al. Spatial transcriptome profiling by MERFISH reveals subcellular RNA compartmentalization and cell cycle-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 19490–19499

2 Wang Z, Liu W, Fan C, et al. Visualizing mRNA in live mammalian cells. *Methods*, 2019, 161: 16–23

3 Fawcner-Corbett D, Antanaviciute A, Parikh K, et al. Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution. *Cell*, 2021, 184: 810–826.e23

4 Huang J H, Huang Q J, Li B, et al. Bioinformatic methods for analyzing noncoding RNAs from high-throughput sequencing data (in Chinese).

- Chin Bull Life Sci, 2021, 33: 267–280 [黄钧鸿, 黄巧娟, 李斌, 等. 基于高通量测序的RNA信息解析技术. 生命科学, 2021, 33: 267–280]
- 5 Zhu W Y, Li C T, Yang W Q, et al. The detection methods of RNA modifications based on high-throughput sequencing (in Chinese). Chin Bull Life Sci, 2021, 33: 292–302 [朱文煜, 李蔡涛, 杨文清, 等. 基于高通量测序的RNA修饰检测技术. 生命科学, 2021, 33: 292–302]
- 6 Cai Z K, Xue Y C. Research progresses of RNA structure probing technologies (in Chinese). Chin Bull Life Sci, 2021, 33: 281–291 [蔡兆奎, 薛愿超. RNA结构解析技术研究进展. 生命科学, 2021, 33: 281–291]
- 7 Chen G L, Wang Y M, Fan J, et al. Technologies of studying RNA binding proteins (in Chinese). Chin Bull Life Sci, 2021, 33: 303–311 [陈冠霖, 王怡旻, 范静, 等. RNA结合蛋白研究技术. 生命科学, 2021, 33: 303–311]
- 8 Chen X J, Zuo F T, Xie X, et al. The advances in cellular RNA imaging technology (in Chinese). Chin Bull Life Sci, 2021, 33: 312–325 [陈显军, 左方婷, 谢鑫, 等. 细胞RNA影像解析技术的研究进展. 生命科学, 2021, 33: 312–325]
- 9 Fang Z T, Lu Z A, Fang X, et al. RNA chemical labeling technology (in Chinese). Chin Bull Life Sci, 2021, 33: 326–336 [方振天, 卢子昂, 方鑫, 等. RNA化学标记技术. 生命科学, 2021, 33: 326–336]
- 10 Caudron-Herger M, Rusin S F, Adamo M E, et al. R-Deep: proteome-wide and quantitative identification of RNA-dependent proteins by density gradient ultracentrifugation. *Mol Cell*, 2019, 75: 184–199.e10
- 11 Lapolla R J, Lambowitz A M. Mitochondrial ribosome assembly in *Neurospora*. Structural analysis of mature and partially assembled ribosomal subunits by equilibrium centrifugation in CsCl gradients. *J Cell Biol*, 1982, 95: 267–277
- 12 Goudriaan A, Camargo N, Carney K E, et al. Novel cell separation method for molecular analysis of neuron-astrocyte co-cultures. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 12
- 13 Wunsch B H, Smith J T, Gifford S M, et al. Nanoscale lateral displacement arrays for the separation of exosomes and colloids down to 20 nm. *Nat Nanotech*, 2016, 11: 936–940
- 14 Roden C, Gladfelter A S. RNA contributions to the form and function of biomolecular condensates. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 183–195
- 15 Qin W, Cho K F, Cavanagh P E, et al. Deciphering molecular interactions by proximity labeling. *Nat Methods*, 2021, 18: 133–143
- 16 Ramanathan M, Majzoub K, Rao D S, et al. RNA-protein interaction detection in living cells. *Nat Methods*, 2018, 15: 207–212
- 17 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: 1328–1331
- 18 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: 51–54
- 19 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: 7405–7409
- 20 Choi-Rhee E, Schulman H, Cronan J E. Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Sci*, 2004, 13: 3043–3050
- 21 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: 801–810
- 22 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: 1188–1196
- 23 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: 880–887
- 24 Wang P, Tang W, Li Z, et al. Mapping spatial transcriptome with light-activated proximity-dependent RNA labeling. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 1110–1119
- 25 Liu Q, Zheng J, Sun W, et al. A proximity-tagging system to identify membrane protein-protein interactions. *Nat Methods*, 2018, 15: 715–722
- 26 Zhou Y, Zou P. The evolving capabilities of enzyme-mediated proximity labeling. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, 60: 30–38
- 27 Fazal F M, Han S, Parker K R, et al. Atlas of subcellular RNA localization revealed by APEX-seq. *Cell*, 2019, 178: 473–490.e26
- 28 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: 1143–1148
- 29 Huang M S, Lin W C, Chang J H, et al. The cysteine-free single mutant C32S of APEX2 is a highly expressed and active fusion tag for proximity labeling applications. *Protein Sci*, 2019, 28: 1703–1712
- 30 Mick D U, Rodrigues R B, Leib R D, et al. Proteomics of primary cilia by proximity labeling. *Dev Cell*, 2015, 35: 497–512
- 31 Padrón A, Iwasaki S, Ingolia N T. Proximity RNA labeling by APEX-seq reveals the organization of translation initiation complexes and

- repressive RNA granules. *Mol Cell*, 2019, 75: 875–887.e5
- 32 Jing J, He L, Sun A, et al. Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca^{2+} influx. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 1339–1347
- 33 Hung V, Udeshi N D, Lam S S, et al. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nat Protoc*, 2016, 11: 456–475
- 34 Rathore A, Chu Q, Tan D, et al. MIEF1 microprotein regulates mitochondrial translation. *Biochemistry*, 2018, 57: 5564–5575
- 35 Kaewsapsak P, Shechner D M, Mallard W, et al. Live-cell mapping of organelle-associated RNAs via proximity biotinylation combined with protein-RNA crosslinking. *eLife*, 2017, 6: e29224
- 36 Benhalevy D, Anastasakis D G, Hafner M. Proximity-CLIP provides a snapshot of protein-occupied RNA elements in subcellular compartments. *Nat Methods*, 2018, 15: 1074–1082
- 37 Qin W, Myers S A, Carey D K, et al. Spatiotemporally-resolved mapping of RNA binding proteins via functional proximity labeling reveals a mitochondrial mRNA anchor promoting stress recovery. *Nat Commun*, 2021, 12: 4980
- 38 Zhou Y, Wang G, Wang P, et al. Expanding APEX2 substrates for proximity-dependent labeling of nucleic acids and proteins in living cells. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 11763–11767
- 39 Li Y, Tian C, Liu K, et al. A clickable APEX probe for proximity-dependent proteomic profiling in yeast. *Cell Chem Biol*, 2020, 27: 858–865.e8
- 40 Huang J, Zhao R, Qin S, et al. 4-Thiouridine-enhanced peroxidase-generated biotinylation of RNA. *Chembiochem*, 2021, 22: 212–216
- 41 Li X W, Rees J S, Xue P, et al. New insights into the DT40 B cell receptor cluster using a proteomic proximity labeling assay. *J Biol Chem*, 2014, 289: 14434–14447
- 42 Loh K H, Stawski P S, Draycott A S, et al. Proteomic analysis of unbounded cellular compartments: synaptic clefts. *Cell*, 2016, 166: 1295–1307.e21
- 43 Zhang X, Wang X X, Shusta E V. Creation and evaluation of a single-chain antibody tetramer that targets brain endothelial cells. *AIChE J*, 2014, 60: 1245–1252
- 44 Gu B, Lambert J P, Cockburn K, et al. AIRE is a critical spindle-associated protein in embryonic stem cells. *eLife*, 2017, 6: e28131
- 45 Lin Q, Zhou Z, Luo W, et al. Screening of proximal and interacting proteins in rice protoplasts by proximity-dependent biotinylation. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 749
- 46 Morriswood B, Havlicek K, Demmel L, et al. Novel bilobe components in *Trypanosoma brucei* identified using proximity-dependent biotinylation. *Eukaryotic Cell*, 2013, 12: 356–367
- 47 Batsios P, Meyer I, Gräf R. Proximity-dependent biotin identification (BioID) in *Dictyostelium* amoebae. In: *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 2016. 23–42
- 48 Dingar D, Kalkat M, Chan P K, et al. BioID identifies novel c-MYC interacting partners in cultured cells and xenograft tumors. *J Proteomics*, 2015, 118: 95–111
- 49 Opitz N, Schmitt K, Hofer-Pretz V, et al. Capturing the Asc1p/receptor for activated C kinase 1 (RACK1) microenvironment at the head region of the 40S ribosome with quantitative BioID in yeast. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16: 2199–2218
- 50 Villaseñor R, Pfaendler R, Ambrosi C, et al. ChromID identifies the protein interactome at chromatin marks. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 728–736
- 51 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: 3252
- 52 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
- 53 Zhang Z, Sun W, Shi T, et al. Capturing RNA-protein interaction via CRUIS. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: e52
- 54 Xue M, Hou J, Wang L, et al. Optimizing the fragment complementation of APEX2 for detection of specific protein-protein interactions in live cells. *Sci Rep*, 2017, 7: 12039
- 55 Han Y, Branon T C, Martell J D, et al. Directed evolution of split APEX2 peroxidase. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 619–635
- 56 Martell J D, Yamagata M, Deerinck T J, et al. A split horseradish peroxidase for the detection of intercellular protein-protein interactions and sensitive visualization of synapses. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 774–780
- 57 De Munter S, Görnemann J, Derua R, et al. Split-BioID: a proximity biotinylation assay for dimerization-dependent protein interactions. *FEBS Lett*, 2017, 591: 415–424

- 58 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
- 59 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: 12143–12154
- 60 Zhang Z, Xing Y. CLIP-seq analysis of multi-mapped reads discovers novel functional RNA regulatory sites in the human transcriptome. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 9260–9271

Recent advances in RNA proximity labeling

WANG Kai, WANG LiNa, XU XiaoWan, HE YuWei & YANG QingKai

Institute of Cancer Stem Cell, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

The spatial distribution of RNA is crucial for diverse cellular functions. However, isolating RNA from a membraneless organelle remains a challenge. Fortunately, significant advances have been made in proximity labeling (PL) to isolate RNA and/or protein from membraneless organelles. In this review, we summarize the PL methods using peroxidase, biotin ligase, miniSOG, and PafA. Following this, we abridge their applications, advantages, and disadvantages in RNA PL.

RNA proximity labeling, subcellular space, RNA enrichment, membraneless organelle

doi: [10.1360/SSV-2021-0390](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0390)