PIBB 生物化学与生物物理进展
*Progress in Biochemistry and Biophysics*
XXXX, XX(XX): 1~13
www.pibb.ac.cn

# 基于邻近标记技术建立高尔基蛋白73（GP73）相互作用蛋白谱及初步分析*

刘慕仪[1,2] 张 畅[2] 杨孟欣[1,2] 阎新龙[1)**] 万禄明[2)**] 魏从文[2)**]

([1]) 北京工业大学化学与生命科学学院，环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室，北京 100124；
[2)] 军事科学院军事医学研究院，前沿生物技术国家级重点实验室，北京 100071）

**摘要 目的** 邻近标记是近年来发展起来的一种研究活细胞内蛋白质相互作用的技术手段，能够捕捉细胞内瞬时和微弱的蛋白质相互作用，本研究以高尔基体膜蛋白GP73为研究对象，建立APEX2介导的邻近标记技术，进一步解析GP73蛋白的生理病理功能。**方法** 构建GP73与APEX2融合表达的稳定细胞系，加入Biotin-phenol和$H_2O_2$催化GP73邻近蛋白的生物素化反应，Streptavidin磁珠富集生物素化的蛋白质，联合质谱检测GP73的相互作用蛋白，进一步进行生物信息学分析。**结果** 本研究成功构建了基于APEX2的邻近标记体系，鉴定出95个GP73的高置信度相互作用蛋白。富集分析表明GP73相互作用蛋白与核糖体结合（ribosome binding）功能相关，提示其可能发挥调控细胞翻译的功能，进一步的实验验证了GP73与真核翻译起始因子EIF3的亚基EIF3G和EIF3I存在直接的相互作用，而SUnSET实验则证明了GP73能够促进细胞中的蛋白质翻译过程。**结论** 本研究通过APEX2介导的邻近标记技术系统研究了GP73的相互作用蛋白，揭示了其调控细胞内蛋白质翻译的新功能，加深了对GP73蛋白功能的认知与理解，并为进一步解析复杂的生物大分子相互作用和生物学过程奠定了技术基础。

**关键词** 邻近标记，蛋白质相互作用，GP73，生物信息学分析，翻译
**中图分类号** Q503，Q812 **DOI**：10.3724/j.pibb.2025.0427 **CSTR**：32369.14.pibb.20250427



高尔基蛋白73（Golgi protein 73，GP73）又称高尔基体膜蛋白1（Golgi membrane protein 1，GOLM1）或高尔基体磷酸化蛋白2（Golgi phosphoprotein 2，GOLPH2），是一种定位于高尔基体顺面及中间膜囊的II型跨膜蛋白[1-3]，其分子特征于2000年由Kladney及其团队首次对其进行系统解析[4]。GP73的表达异常与多种疾病的发生发展密切相关[5-7]。例如在肝脏疾病中，GP73的血清水平在乙型肝炎（hepatitis B virus，HBV）[2]、非酒精性脂肪肝病（non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD）[3]及肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）[8]中显著升高，因而被视作肝脏疾病的关键生物标志物[9]；此外，GP73在肺癌[10]、胰腺癌[11]、前列腺癌[8]等多种癌症中也呈现高表达，提示其促癌作用可能具有广谱性。大量研究表明，GP73可能通过TGF-β/Smad、PIK3-AKT等信号通路[12-14]，促进肿瘤细胞增殖、侵袭、迁移及上皮-间质转化，并通过与金属蛋白酶（matrix metallopeptidase 13，MMP13）等相关因子相互作用驱动细胞外基质重塑参与癌症进展[15-16]。

近年来，随着研究的不断深入，领域内逐渐发现GP73在机体多种生理与病理过程中发挥着重要作用，而不局限于肝脏和肿瘤疾病中。在病毒感染的过程中，GP73展现出调控代谢的能力，严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2型（SARS-CoV-2）感染可诱导GP73的分泌，进而激活肝脏糖异生，导致部分患者血糖升高和代谢异常[14]。在天然免疫领域，GP73通过与线粒体抗病毒信号蛋白

* 国家自然科学基金（32270823）资助项目。
** 通讯联系人。
阎新龙 Tel：18813017160，E-mail：yxlong2000@bjut.edu.cn
万禄明 Tel：010-66948854，E-mail：wanluming9@163.com
魏从文 Tel：010-66948869，E-mail：weicongwen@aliyun.com
收稿日期：2025-09-29，接受日期：2026-02-04

（mitochondrial antiviral signaling protein Gene，MAVS）和TNF受体相关因子6（TNF receptor associated factor 6 gene，TRAF6）相互作用并促使其经蛋白酶体降解，从而发挥负向调控抗病毒信号通路的功能[17]。此外，GP73还能直接与自噬关键蛋白LC3相互作用，参与调控受体酪氨酸激酶的选择性自噬过程[18]。以上不断更新的研究结果提示，GP73参与的生物学过程远比其最初被定义的高尔基体跨膜蛋白定位更为广泛和复杂，其分子功能有待进一步研究。

邻近标记技术（proximity labeling，PL）是一种新的研究相互作用的蛋白质组学技术，其原理是先将具有特定催化连接活性的工具酶（过氧化物酶或生物素连接酶）与目的蛋白进行融合[19]，再添对应的小分子底物（如生物素），该小分子底物在工具酶的催化下被活化并与酶邻近的内源蛋白连接，最后将被标记的蛋白质经富集后进行质谱分析。与其他传统的研究蛋白质相互作用的手段相比，邻近标记技术可以精确地捕捉到活细胞内瞬时和微弱的蛋白质相互作用关系[20]，可以更加全面地获取细胞内的蛋白质关系网，更深入地了解相关生物过程。

本研究以GP73为研究对象，建立了以APEX2为催化连接工具酶的邻近标记技术，揭示了GP73蛋白的相互作用蛋白谱并进行了初步的生物信息学分析，研究结果发现GP73可与多种翻译相关蛋白相互作用，并影响细胞翻译效率，由此加深了对GP73蛋白功能的认知与理解，并为进一步解析复杂的生物大分子相互作用和生物学过程奠定了技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究中实验所用的细胞系：购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心的HepG2和Huh7两种细胞系；本课题组自主构建的HepG2-GP73-APEX2-V5稳转细胞系。实验所涉及的质粒：慢病毒载体质粒pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro、慢病毒包装质粒psPAX2、慢病毒包膜质粒pMD2.G，基因扩增所需模板由Mailgene公司提供。

### 1.2 主要试剂与仪器

本研究中实验所用的主要试剂：DMEM高糖培养基、青霉素-链霉素混合液（100×）和胰蛋白酶/EDTA消化液购自北京中生奥邦生物科技有限公司；胎牛血清购自苏州依科赛生物科技股份有限公司；250 bp DNA Ladder和6×DNA Loading Buffer购自北京擎科生物技术有限公司；无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；无内毒素质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司；山梨醇和亚砷酸钠购自德国Sigma-Aldrich公司；丽春红染色液、聚凝胺（polybrene）、NP-40裂解液、嘌呤霉素、Triton×100、DPBS、RIPA裂解缓冲液、PMSF、链霉亲和素磁珠、KCl、尿素和Lamin B1（AF1408）购自北京碧云天生物技术有限公司；水溶性维生素E（Trolox）、抗坏血酸钠和Biotin购自MedChemExpress公司；GP73/GOLPH2 Polyclonal antibody（15126-1-AP）、V5-tag Polyclonal antibody（14440-1-AP）、EIF3G Polyclonal antibody（11165-1-AP）与EIF3I Polyclonal antibody（11287-1-AP）购自武汉三鹰生物技术有限公司；辣根酶标记山羊抗兔（ZB-2301）与辣根酶标记山羊抗小鼠（ZB-2305）购自北京中杉金桥生物技术有限公司；β-tubulin antibody（AC030）购自ABclonal公司；Streptavidin antibody（ab7403）购自Abcam公司；Goat anti-Rabbit Alexa Fluor™ 555（A-21428）与Alexa Fluor™488 Streptavidin（S11223）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；抗嘌呤霉素抗体Anti-Puromycin Antibody（3RH11）购自北京靶点科技有限公司。

本研究中实验所用的主要仪器：－20℃冰箱和－80℃超低温冰箱购自中科美菱低温科技股份有限公司；电热恒温水浴锅购自上海一恒科学仪器；$CO_2$细胞培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司；低温高速离心机购自Eppendorf公司；激光共聚焦显微镜购自德国卡尔蔡司股份公司；PCR仪、琼脂糖水平电泳仪、SDS-PAGE凝胶电泳仪和蛋白转印系统转膜仪购自上海伯乐生物医学产品有限公司。

### 1.3 细胞复苏与培养

冻存细胞复苏：从－80℃超低温冰箱中取出HepG2及Huh7细胞冻存管，迅速置于37℃恒温水浴中，待冻存细胞悬液完全溶解后，转移至含预冷PBS的15 ml离心管中，1 500 rpm离心3 min，弃上清后用含10% FBS及1%双抗的DMEM完全培养基轻柔重悬细胞沉淀，接种于100 mm细胞培养皿中，后置入37℃、5% $CO_2$恒温培养箱中培养。

细胞传代处理：每日通过倒置相差显微镜监测

细胞密度与形态学特征。当细胞融合度达80%~90%时进行传代：吸弃培养液，PBS洗涤3次，加入0.25%胰酶-EDTA消化液，37℃消化2~3 min，待镜下观察细胞回缩变圆后立即加入等体积完全培养基终止消化，收集细胞悬液至15 ml离心管中，1 500 rpm离心3 min后去上清，用新鲜培养基重悬细胞并依据实验需求按1：2~1：3比例接种于预处理的培养器皿，补充培养基至标准体积后继续培养。

### 1.4　引物设计

引物由SnapGene软件设计完成：通过PCR扩增的方式在模板两端加入同源臂，以实现目的片段与线性化载体同源重组的目的。扩增引物片段如表1所示。

**Table 1　Primer sequence list**

| Primer name | Primer sequence （5′→3′） | Size/bp |
|---|---|---|
| GP73 forward | TAGAGCTAGCGAATTatgatgggcttgggaaac | 33 |
| GP73 reverse | GCTGCCGCTGCCGCTGCCgagtgtatgattccgc | 34 |
| APEX2-V5 forward | GGCAGCGGCAGCGGCAGCggaaagtcttacccaa | 34 |
| APEX2-V5 reverse | ATTTAAATTCGAATTtcacgtagaatcgagac | 32 |

### 1.5　质粒构建

采用限制性核酸内切酶*Eco*R I对pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro空载质粒进行酶切，通过琼脂糖凝胶电泳对其进行分离并回收线性化载体，同时使用针对目的基因片段的特异性引物对含有GP73、APEX2及V5基因的质粒模板进行PCR扩增，同样对其扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳验证并回收纯化目的片段。通过无缝克隆技术将上述纯化产物与酶切载体进行连接，构建重组质粒pCDH-GP73-APEX2-V5，转化后涂布于氨苄抗性LB固体培养基，37℃孵育12~14 h后挑取单克隆菌落接种至氨苄抗性液体LB培养基中，37℃ 220 rpm震荡培养12~16 h，筛选阳性克隆菌落送北京擎科生物技术有限公司进行测序验证，依据测序结果将构建成功的菌落进行质粒提取。

### 1.6　慢病毒包装

采用三质粒共转染，即二代慢病毒系统进行慢病毒包装。待293FT细胞生长至汇合度为50%~60%时，按照慢病毒载体质粒pCDH-GP73-APEX2-V5：包装载体质粒psPAX2：包膜载体质粒pMD2.G为8 μg：4 μg：3 μg的比例转染293FT细胞，分别于转染后的48 h和72 h用0.45 μm的过滤器过滤并收集上清病毒液，放于－80℃进行保存。

### 1.7　构建稳转细胞系

将HepG2细胞传代至细胞密度为70%~80%，弃去原培养基，皿中加入3 ml新鲜培养基和3 ml上清病毒液，并按照1：1 000的比例加入浓度为10 mg/L的聚凝胺，使其终浓度为10 mg/L，混匀后置于37℃，5% $CO_2$的$CO_2$细胞培养箱中感染24 h，随后更换新鲜培养基，继续培养至感染后48 h，根据细胞状态与密度进行传代并按照1：1 000比例加入10 g/L的嘌呤霉素，使其终浓度为10 mg/L，对感染后的细胞进行筛选，最终获得稳定高表达GP73的HepG2细胞系，命名为HepG2-GP73-APEX2-V5。

### 1.8　邻近标记实验

将六皿HepG2-GP73-APEX2-V5细胞（100 mm培养皿）随机分为标记组与阴性对照组（$n$=3）：标记组培养基更换为含有生物素-苯酚（biotin-phenol，终浓度500 μmol/L）的DMEM完全培养基，于37℃、5% $CO_2$条件下孵育30 min后加入终浓度1 mmol/L的$H_2O_2$于37 ℃孵育1 min以启动邻近标记反应；阴性对照组则继续使用常规DMEM完全培养基至于相同培养条件下培养，以排除非特异性标记背景。反应结束后，迅速弃去培养基，用预冷终止缓冲液（DPBS含5 mmol/L Trolox及10 mmol/L抗坏血酸钠）洗涤细胞3次。细胞刮刮取细胞后，4℃，3 000$g$离心10 min收集细胞沉淀。将细胞沉淀用含蛋白酶抑制剂、1 mmol/L PMSF、5 mmol/L Trolox、10 mmol/L抗坏血酸钠与10 mmol/L叠氮化钠的RIPA裂解缓冲液重悬，冰浴裂解2 min，然后以4℃、15 000$g$离心10 min收集上清裂解液。取预先用RIPA裂解缓冲液平衡3次的链霉亲和素包被磁珠与裂解液于室温孵育1 h或4℃孵育过夜，随后依次用RIPA裂解缓冲液洗涤珠子两次，1 mol/L KCl洗涤珠子1次，0.1 mol/L $Na_2CO_3$洗涤珠子1次，2 mol/L尿素洗涤珠子1次及RIPA裂解缓冲液洗涤珠子2次。最终采用含2 mmol/L biotin和20 mmol/L二硫苏糖醇

（dithiothreitol，DTT）的洗脱液对磁珠进行洗脱并收集洗脱产物，一部分送上海欧易生物医学科技有限公司进行质谱检测，另一部分与蛋白上样缓冲液混合，99.9℃金属浴热变性10~15 min后，取上清进行SDS-PAGE电泳、丽春红染色等后续实验操作[21]。

### 1.9 蛋白质免疫印迹

HepG2-GP73-APEX2-V5细胞经胰酶消化收集后制备全蛋白样品。配制8%分离胶进行SDS-PAGE电泳，按预设顺序加样。初始电压80 V使样品压缩进入分离胶，待示踪染料迁移至分离胶界面后提升电压至120 V持续电泳至溴酚蓝抵达胶底端。采用湿式转印系统（100 V，冰浴条件）将蛋白转移至PVDF膜，转印后膜置于含有5%脱脂奶粉的TBST封闭液中室温封闭1 h，然后用特异性一抗（抗GP73抗体1：1 000，抗V5抗体1：1 000，抗HRP-β-tubulin抗体1：10 000）室温孵育2 h或4℃过夜。TBST漂洗3次（每次5 min）后，与辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔二抗（1：25 000）室温反应40 min，经TBST 3次洗涤后采用增强化学发光（ECL）底物进行化学发光检测。蛋白表达量通过Bio-Rad凝胶成像系统采集图像，以目的蛋白与内参蛋白（β-tubulin）条带积分光密度值的归一化比值进行定量分析。

### 1.10 免疫荧光实验

将HepG2-GP73-APEX2-V5细胞接种于2个35 mm的共聚焦培养皿，待贴壁密度达60%~70%时，随机分为邻近标记实验组与未处理对照组。加入4%多聚甲醛150 μl室温固定20 min，PBS洗涤3次，然后每孔加入含量3% BSA的PBS溶液150 μl室温封闭2 h，弃去封闭液后与一抗混合液（含抗V5抗体1：500稀释于3% BSA）室温振荡孵育4 h或4℃过夜孵育，并于孵育完成后回收一抗，PBS洗涤3次，每次5 min，然后与二抗混合液（含Alexa Fluor 555标记抗小鼠二抗1：500及链霉亲和素-Alexa Fluor 488 1：500）室温避光振荡孵育3 h，经PBS 3次洗涤后，Hoechst 33342室温染细胞核5~10 min后，PBS洗涤3次，即可进行激光共聚焦显微成像分析。

### 1.11 Surface Sensing of Translation（SUnSET）实验

首先将待测细胞（Huh7-siNC及Huh7-siGP73细胞）按实验设计进行分组处理，施加对应应激刺激。处理完毕后，在培养基中加入工作浓度为10 μmol/L的嘌呤霉素，于37℃孵育30 min，使嘌呤霉素掺入正在进行翻译的新生肽链，随后弃去培养基，用预冷的PBS洗涤细胞3次，加入1 ml含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液，冰上裂解细胞，离心收集上清即为总蛋白提取物。蛋白浓度使用BCA（bicinchoninic acid）法进行定量，并调整为同样的上样量。取等量蛋白质样品进行SDS-PAGE电泳，随后转印至PVDF膜。用含5%脱脂奶粉的TBST室温封闭PVDF膜1 h后，使用特异性抗嘌呤霉素抗体在4℃孵育过夜，之后用TBST洗涤膜3次，每次5 min，洗涤后再与相应的HRP标记二抗室温孵育1 h，洗涤后使用ECL化学发光显影。通过分析特异性条带强度，量化嘌呤霉素掺入水平，从而反映细胞中蛋白质合成的相对速率。另取等量蛋白质样品进行SDS-PAGE电泳并转膜，将PVDF膜置于丽春红染色液中，室温摇床孵育转印膜30 min，之后用去离子水反复冲洗至背景干净，条带清晰，记录染色结果用于后续分析。

## 2 结 果

### 2.1 HepG2−GP73−APEX2−V5稳定细胞系的构建

pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro载体经*Eco*R I限制性内切酶进行线性化处理，琼脂糖凝胶电泳实验进行验证，结果显示，线性化载体片段长度约为7 400 bp（图1a）；基于无缝克隆实验原理，通过Snapgene软件设计引物用于对GP73及APEX2-V5片段进行扩增，获得引入15 bp同源臂的GP73和APEX2-V5目的片段，琼脂糖凝胶电泳实验进行验证，结果显示，片段长度分别约为1 200 bp和800 bp（图1b，c）。

将线性化载体与GP73、APEX2-V5片段连接，构建重组质粒pCDH-CMV-GP73-APEX2-V5-EF1-Puro，测序验证序列正确性，得到pCDH-CMV-GP73-APEX2-V5-EF1-Puro慢病毒质粒（图1d）。通过第二代慢病毒包装系统制备GP73-APEX2-V5慢病毒，感染HepG2细胞24 h后用10 mg/L浓度的嘌呤霉素进行细胞筛选，获得稳定过表达细胞系HepG2-GP73-APEX2-V5。采用Western blot实验对其进行验证，结果显示，GP73-APEX2-V5重组蛋白条带位于100 ku左右，与预期相符，证实细胞系构建成功（图1e）。

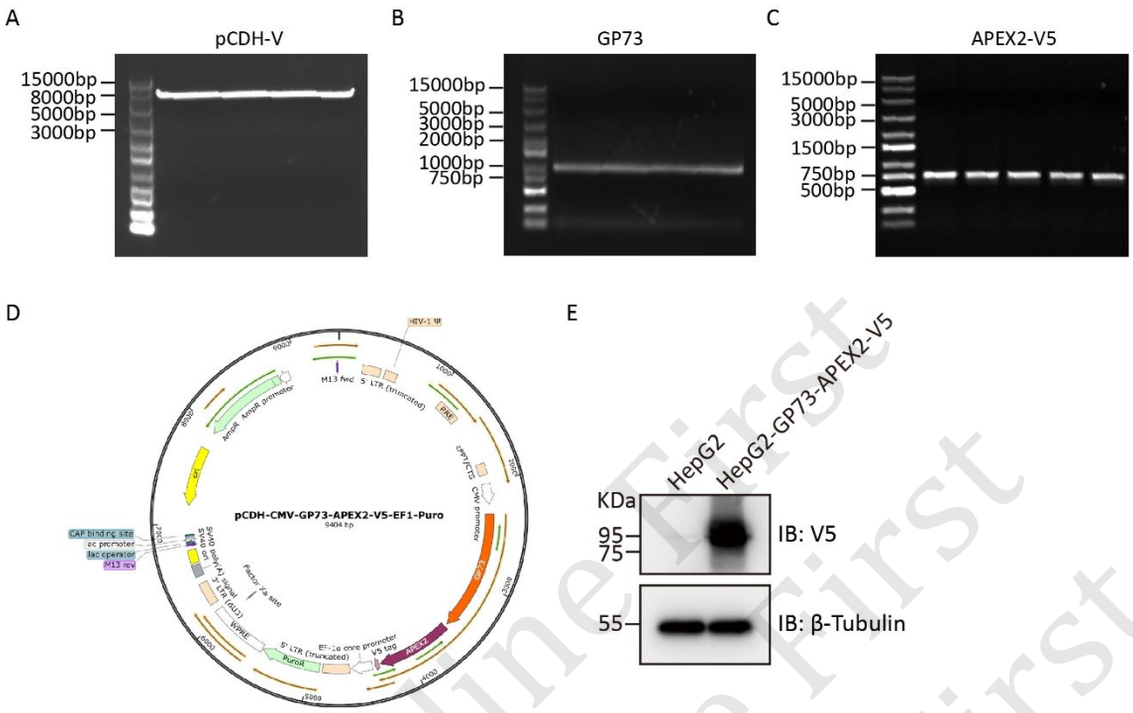



**Fig. 1　Establishment of HepG2−GP73−APEX2−V5 stable cell line**

(a) *Eco*R I digestion of pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro vector; (b) PCR amplification products of GP73; (c) PCR amplification products of APEX2-V5; (d) lentiviral plasmid mapping of pCDH-CMV-GP73-APEX2-V5-EF1-Puro; (e) Western blot was used to detect the overexpression effect of GP73-APEX2-V5 in the HepG2-GP73-APEX2-V5 stable cell line with β-tubulin as an endogenous control.

### 2.2　邻近标记联合蛋白质谱检测GP73相互作用蛋白谱

利用前述构建的HepG2-GP73-APEX2-V5稳转细胞系，我们开展了基于APEX2的邻近标记实验。实验中，将细胞随机分为标记组与阴性对照组：标记组依次加入生物素-苯酚与$H_2O_2$以催化邻近标记反应，使GP73邻近的蛋白质发生生物素化；阴性对照组则不添加生物素-苯酚与$H_2O_2$，以排除非特异性标记背景。随后，对两组样品进行链霉亲和素富集，并对富集产物进行蛋白质谱分析，从而系统鉴定GP73的特异性相互作用蛋白（图2a）。为验证标记效率，我们通过免疫荧光检测生物素信号，结果显示标记组的生物素化蛋白可被链霉亲和素（streptavidin）-AF488特异性识别，且该信号与GP73-APEX2-V5的定位高度重合；而阴性对照组则未见明显荧光信号，证实了邻近标记的特异性（图2b）。进一步，利用Western blot检测链霉亲和素磁珠富集的生物素化蛋白，3次独立重复实验均显示明显的生物素化蛋白条带（streptavidin-HRP检测），确认标记结果稳定可靠（图2c）。

在此基础上，将富集样品送交LC-MS/MS质谱鉴定。为筛选高置信度的特异性相互作用蛋白，我们以鉴定蛋白质的匹配谱图数及蛋白质丰度比（实验组/对照组≥2）为主要标准，选取3次重复实验均鉴定到的相互作用蛋白。韦恩图分析共鉴定出95个高置信度的GP73相互作用蛋白质（图2d），我们依据Score Sequest HT值对该蛋白集合进行排序，并将排名前20的蛋白质列表展示（表2）。

### 2.3　GP73的相互作用蛋白与细胞翻译功能相关

利用Enrichr平台对筛选得到的95个高置信度相互作用蛋白进行了富集分析，蛋白质列表和富集结果见https：//maayanlab. cloud/Enrichr/enrich?dataset=9fc2167f06e3a06bd06d31deadd70a93。以$P$＜0.05作为差异具有统计学意义的标准，同时依据－lg（$P$-value）行排序并对富集排名前十的条目进行可视化呈现（图3a~c）。GO细胞组分（cellular component）富集分析结果显示，作为高尔基体膜蛋白，GP73的相互作用蛋白显著富集于内质网腔、

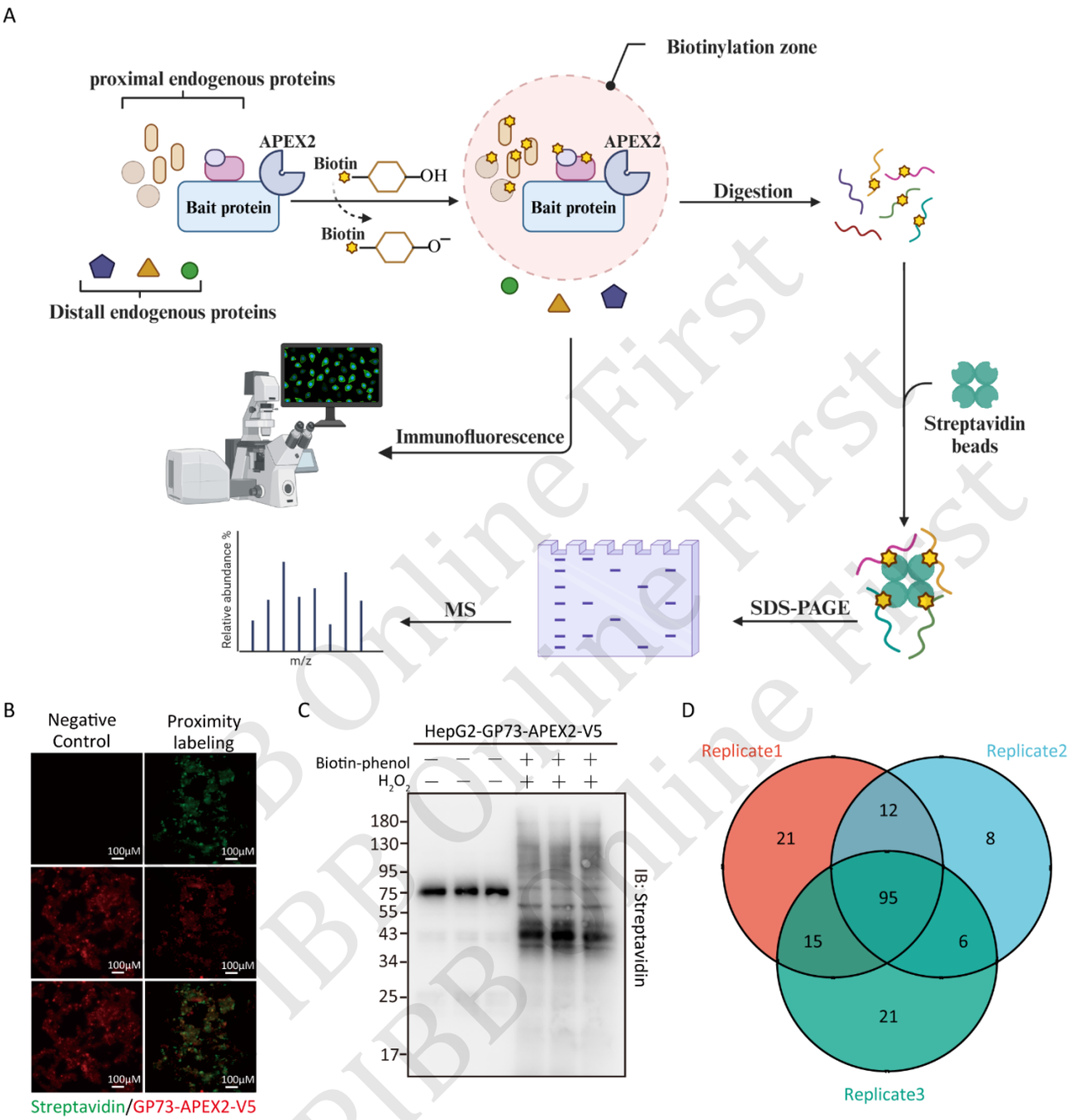



**Fig. 2　Results of proximity labeling experiments**

(a) Principle and flowchart of proximity labeling combined with mass spectrometry detection; (b) cellular immunofluorescence experiments to verify the effect of proximity labeling; (c) Western blot experiments to enrich GP73-interacting proteins; (d) Venn diagram analysis of protein spectra results.

内质网-高尔基体中间腔室膜及高尔基体运输囊泡等经典定位（图 3a）。相应地，GO 生物学过程（biological process）富集分析结果显示，GP73 相互作用蛋白主要参与内质网应激响应、内质网-高尔基体囊泡转运及蛋白质运输等经典生物学过程（图 3b），提示数据质量良好。

**Table 2　GP73 interacting proteins （top20）**

| Protein | Score Sequest HT | Coverage | Unique peptides | PSMs |
|---|---|---|---|---|
| GOLM1 | 78.37； 80.75； 84.6 | 45； 38； 45 | 17； 15； 19 | 43； 41； 50 |
| P4HB | 198.14； 175.37； 178.41 | 57； 54； 60 | 28； 28； 30 | 136； 125； 104 |
| PDIA3 | 157.37； 139.33； 177.81 | 53； 52； 50 | 25； 25； 24 | 64； 57； 71 |
| PDIA4 | 148.63； 120.31； 134.12 | 49； 47； 47 | 31； 27； 27 | 80； 66； 68 |
| PDIA6 | 144.6； 119.86； 132.79 | 45； 48； 39 | 13； 15； 14 | 47； 48； 47 |
| P4HA1 | 141.06； 102.33； 151.7 | 51； 38； 43 | 25； 17； 21 | 51； 36； 62 |
| HSP90B1 | 119.83； 112.07； 110.88 | 43； 35； 40 | 30； 22； 26 | 69； 52； 61 |
| FGG | 110.82； 110.35； 101.04 | 54； 43； 51 | 20； 17； 19 | 55； 46； 45 |
| RPN1 | 96.01； 94.7； 95.93 | 47； 44； 44 | 21； 19； 21 | 39； 34； 47 |
| NICB2 | 95.16； 106.05； 104.08 | 47； 48； 47 | 17； 17； 17 | 43； 48； 46 |
| GAPDH | 93.73； 108.08； 116.28 | 60； 60； 55 | 14； 15； 14 | 33； 42； 46 |
| FN1 | 85.22； 63.69； 61.54 | 18； 12； 12 | 33； 23； 22 | 63； 40； 34 |
| TXNDC5 | 77.58； 61.02； 73.9 | 42； 36； 37 | 18； 16； 15 | 51； 46； 55 |
| LMAN1 | 77.22； 80.7； 97.22 | 32； 30； 32 | 14； 13； 13 | 36； 31； 44 |
| PRDX4 | 66.35； 54.66； 84.93 | 63； 55； 63 | 11； 9； 11 | 30； 32； 32 |
| ERP44 | 46.52； 25.09； 44.47 | 34； 22； 39 | 13； 10； 14 | 22； 19； 24 |
| CCDC47 | 42.46； 36.8； 27.1 | 28； 20； 25 | 11； 7； 10 | 16； 13； 14 |
| ERO1A | 42.21； 47.19； 34.76 | 34； 25； 25 | 11； 9； 9 | 18； 19； 15 |
| TGM2 | 41.88； 33.85； 40.78 | 26； 15； 17 | 14； 8； 10 | 28； 19； 23 |
| TMED10 | 41.41； 25.55； 30.92 | 26； 26； 26 | 5； 5； 6 | 15； 17； 19 |

Notes: Score Sequest HT： sum of the scores of the individual peptides from the Sequest HT search. Coverage： the sequence coverage of identified peptides. Unique peptides： the number of distinctive peptides specific to a protein. PSMs： the number of peptide-spectrum matches.

在GO分子学功能（molecular function）富集分析中，我们发现其相互作用蛋白还显著富集于前胶原-脯氨酸双加氧酶活性、肽-脯氨酸4-双加氧酶活性及低密度脂蛋白颗粒受体结合等未被报道的功能，其中核糖体结合（ribosome binding）条目引起了我们的关注（图3c）。核糖体是细胞内执行蛋白质翻译的关键复合体，其精确调控对于保障细胞蛋白质合成质量与数量至关重要，是细胞生命活动的基石[22]。重要的是，蛋白质谱数据提示GP73与真核翻译起始因子EIF3复合物的两个核心亚基EIF3G和EIF3I存在相互作用，这在我们的邻近标记联合Western blot实验中得到了验证（图3d）。

### 2.4　GP73促进细胞翻译速率

Surface Sensing of Translation（SUnSET）实验是一种评价蛋白质翻译速率的实验方法，该方法基于嘌呤霉素作为氨酰-tRNA类似物被核糖体识别并掺入新生肽链的特性，通过针对嘌呤霉素的特异性抗体检测嘌呤霉素标记的肽段（如Western blot、免疫荧光或流式细胞术），从而实现对翻译活性的非放射性、定量分析（图4a）。该方法具有操作简便、结果准确且无需放射性标记等优点。

我们首先用瞬时转染的方式在Huh7细胞中敲低GP73，在此基础上评价GP73对其翻译速率的影响（图4b）。结果显示，敲低GP73能够显著降低Huh7细胞的翻译速率，而当细胞从高渗压力（sorbitol treatment）和氧化应激压力（sodium arsenite treatment，SA）下恢复时，GP73也能促进细胞翻译的重启（图4c）。以上结果说明，GP73及其相互作用蛋白与细胞翻译具有较大相关性。

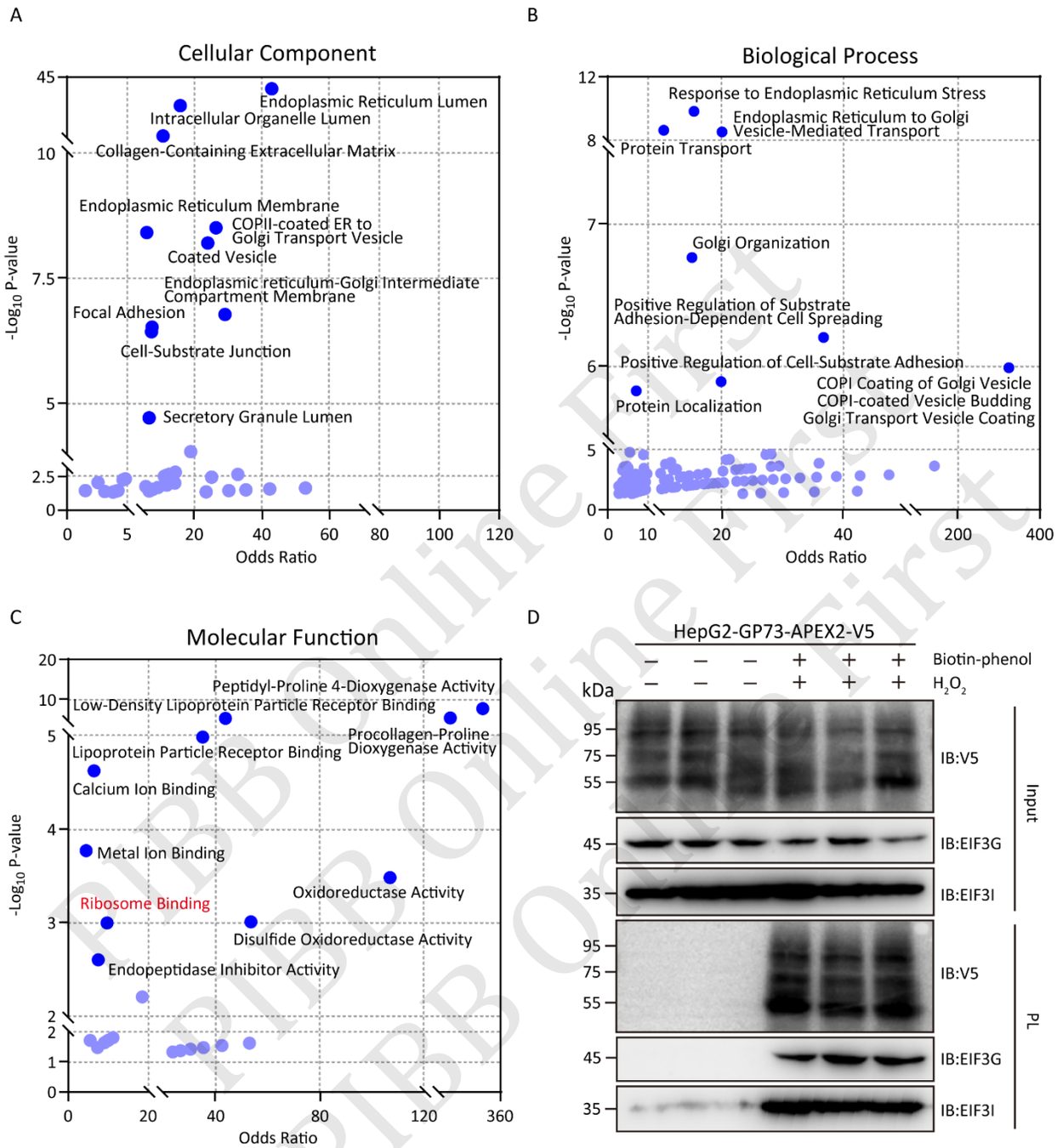



**Fig. 3　Results of GO enrichment analysis of GP73 interacting proteins**

（a） GO biological process enrichment analysis results of GP73 interacting proteins ranked by －lg（*P*-value）；（b） GO cellular compartment enrichment analysis results of GP73 interacting proteins ranked by －lg（*P*-value）；（c） GO molecular function enrichment analysis results of GP73 interacting proteins ranked by －lg（*P*-value）；（d） validation of GP73 interaction with EIF3G and EIF3I by Western blot on samples enriched via proximity labeling.

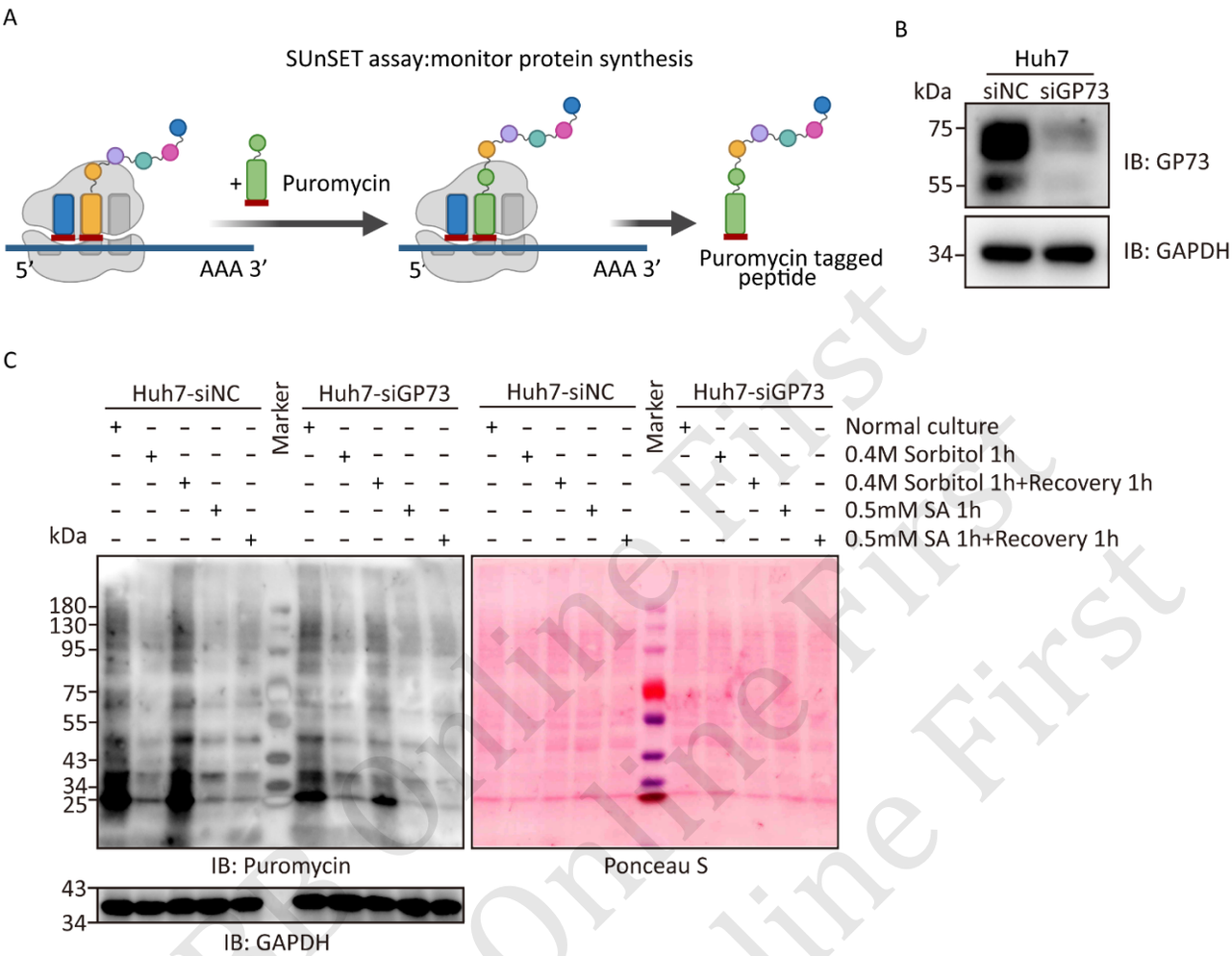



**Fig. 4　GP73 promotes translational rates in hepatocellular carcinoma cells**

（a） Schematic of SUnSET experimental principle；（b） validation of GP73 knockdown efficiency in Huh7 cells，as determined by Western blot analysis；（c） GP73 knockdown impairs translation in Huh7 cells under basal conditions and during recovery from stress （sorbitol treatment；sodium arsenite （SA） treatment）.

## 3　讨 论

邻近标记技术于2012年被开发出来，是一种新的研究蛋白质相互作用的技术方法，在现有的研究蛋白质相互作用的技术方法中，传统方法均有一定的局限性，如酵母双杂交技术具有转化效率低、结果假阳性概率高的缺点[23]；亲和纯化-质谱技术，不适用于低丰度的蛋白或疏水性较强的膜蛋白，应用范围受到限制，且无法有效地捕捉蛋白之间瞬时或较弱的相互作用[24]。因此，传统方法在一定程度上限制了对细胞生命活动精细调控过程的认识。而邻近标记技术则规避了传统方法存在的缺点，该技术可以在活细胞的状态下，捕获瞬时发生的纳米级别的相互作用关系[25]，更好地了解细胞内更加复杂的生命过程。

邻近技术的关键是对标记酶的选择和使用[26]，常用的标记酶有BioID、APEX2和TurboID。这3种标记酶均被广泛应用于动物或植物中蛋白的相互作用研究中，Lu等[27]使用基于BioID的邻近标记技术研究小鼠心脏中心肌细胞相关的蛋白质相互作用，对富集蛋白进行差异分析，发现一种横纹肌蛋白（cardiomyopathy associated 5，CMYA5），为心肌病发病机制提供了见解。Su等[28]使用基于

TurboID的邻近标记技术筛选并验证了与2型糖尿病相关的转录因子FOXO1的相互作用蛋白。El-Mansi等[29]使用基于APEX2的邻近标记技术，捕获与肌动球蛋白环功能相关的蛋白质，提出了血栓性疾病发病原因的新机制。这3种标记酶具有不同的作用特点，BioID和TurboID作为生物素酶，稳定性好，反应简单没有毒性但反应速度缓慢，BioID需要生物素标记18~24 h，才能进行后续的蛋白质组的分析[29]。TurboID相对于BioID极大提高了反应速度，生物素化效率得到了改善，生物素标记时长缩短到了10 min[30]。APEX2是一种过氧化氢酶，它在过氧化物的作用下会迅速产生自由电子，可以在1 min内对近端蛋白进行标记，因此APEX2具有高时间分辨率，通常情况下，许多蛋白质之间的结合和相互作用都是非常短暂的，APEX2更有利于找到相对较新的结合蛋白。此外，APEX2标记酶也可以用于标记DNA和RNA[31]。

本研究选择以APEX2为标记酶的邻近标记技术来研究GP73相互作用蛋白。首先构建了HepG2-GP73-APEX2-V5稳定细胞系，进行邻近标记实验。一般情况下，瞬时转染会造成短时间内APEX2的高表达，这种方法会产生一定的毒性，所以需采用构建慢病毒载体获得稳定表达APEX2的细胞系的方法来控制表达量减弱毒性，同时，该方法也可以保证细胞阳性率和目的基因的持久表达[32]。选用的V5标签蛋白用于检测APEX2的表达和定位情况，可以避免HA等其他标签蛋白被APEX2破坏[18]。通过对APEX2介导的邻近标记技术结合质谱分析，本研究系统鉴定了95个与GP73具有高置信度相互作用的蛋白质。富集分析表明，这些相互作用蛋白除显著参与内质网-高尔基体囊泡运输等过程外，还与核糖体结合功能密切相关。尤其值得注意的是，其中EIF3G和EIF3I两个亚基被识别为关键相互作用对象。EIF3作为真核翻译起始的核心复合物[33-35]，由多个亚基（EIF3A~M）组成[36-37]，在翻译起始过程中扮演关键调控角色，包括促进43S预起始复合物组装[36-38]、阻止核糖体大小亚基过早结合[39]、介导mRNA的募集与扫描[40]、保障起始密码子的准确识别[40]，以及在特定条件下调控翻译的重起始过程[41]。

根据质谱分析结果，GP73与EIF3G和EIF3I存在相互作用，该结果经Western blot进一步验证。为进一步探究GP73对翻译过程的影响，我们采用基于嘌呤霉素标记的SUnSET技术（非放射性蛋白质合成检测法）进行翻译速率测定[42]。结果显示，GP73不仅能显著提升正常条件下细胞的翻译速率，还可促进细胞在高渗/氧化应激后翻译能力的恢复。这一发现提示，GP73可能通过与EIF3复合物关键亚基相互作用，在调控细胞翻译速率中发挥重要功能。

综上所述，本研究通过建立基于APEX2的邻近标记体系，系统性鉴定了GP73的相互作用蛋白，进而揭示其在调控细胞翻译速率方面的新功能。该发现不仅拓展了对GP73蛋白功能的现有认识，也为生物大分子的功能解析提供了可靠的技术基础。

## 4 结 论

本研究成功构建了基于APEX2的邻近标记体系，结合质谱分析技术，共鉴定出95个高置信度的GP73相互作用蛋白。富集分析表明，GP73相互作用蛋白显著富集于核糖体结合功能，后续实验证实，GP73可与真核翻译起始因子EIF3的亚基EIF3G和EIF3I直接相互作用，进一步的功能实验显示，GP73能够促进细胞内的蛋白质翻译过程。这一工作首次从蛋白质相互作用网络和功能层面揭示了GP73在细胞翻译调控中的新作用，拓展了其作为高尔基体膜蛋白的功能内涵，为深入理解GP73在肿瘤发生发展及代谢调控等生物学过程中的作用机制提供了新的理论依据，同时也为邻近标记技术的广泛应用提供了范例和方法学参考。

## 参 考 文 献

[1] Hu L, Li L, Xie H, *et al*. The Golgi localization of GOLPH2 (GP73/GOLM1) is determined by the transmembrane and cytoplamic sequences. PLoS One, 2011, **6**(11): e28207

[2] Puri S, Bachert C, Fimmel C J, *et al*. Cycling of early Golgi proteins *via* the cell surface and endosomes upon lumenal pH disruption. Traffic, 2002, **3**(9): 641-653

[3] Kladney R D, Bulla G A, Guo L, *et al*. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection. Gene, 2000, **249**(1-2): 53-63

[4] Kladney R D, Bulla G A, Guo L, *et al*. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection. Gene, 2000, **249**(1/2): 53-65

[5] Liu M Y, Huang L, Wu J F, *et al*. Possible roles of Golgi protein-73 in liver diseases. Ann Hepatol, 2022, **27**(5): 100720

[6] Gatselis N K, Tornai T, Shums Z, *et al*. Golgi protein-73: a biomarker for assessing cirrhosis and prognosis of liver disease patients. World J Gastroenterol, 2020, **26**(34): 5130-5145

[7] Xia Y, Zhang Y, Shen M, *et al*. Golgi protein 73 and its diagnostic value in liver diseases. Cell Prolif, 2019, **52**(2): e12538

[8] Kristiansen G, Fritzsche F R, Wassermann K, *et al*. GOLPH2

protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics. Br J Cancer, 2008, **99**(6): 939-948

[9] 伊玉娇, 程中乐, 吴正升. 结直肠癌中高尔基体蛋白73的表达及意义. 临床与实验病理学杂志, 2023, **39**(6): 744-747
Yi Y J, Cheng Z L, Wu Z S. Chin J Clin Exp Pathol, 2023, **39**(6): 744-747

[10] Aruna, Li L M. Overexpression of Golgi membrane protein 1 promotes non-small-cell carcinoma aggressiveness by regulating the matrix metallopeptidase 13. Am J Cancer Res, 2018, **8**(3): 551-565

[11] Song Y X, Xu Z C, Li H L, *et al*. Overexpression of GP73 promotes cell invasion, migration and metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. Pancreatology, 2018, **18**(7): 812-821

[12] Chen X, Wang Y, Tao J, *et al*. mTORC1 up-regulates GP73 to promote proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells and growth of xenograft tumors in mice. Gastroenterology, 2015, **149**(3): 741-752.e14

[13] Yang X, Wei C, Liu N, *et al*. GP73 a novel TGF-β target gene, provides selective regulation on Smad and non-Smad signaling pathways. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, **1866**(4): 588-597

[14] Wan L, Gao Q, Deng Y, *et al*. GP73 is a glucogenic hormone contributing to SARS-CoV-2-induced hyperglycemia. Nat Metab, 2022, **4**(1): 29-43

[15] Peng Y, Zeng Q, Wan L, *et al*. GP73 is a TBC-domain Rab GTPase-activating protein contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease without obesity. Nat Commun, 2021, **12**(1): 7004

[16] Wei C, Yang X, Liu N, *et al*. Tumor microenvironment regulation by the endoplasmic reticulum stress transmission mediator Golgi protein 73 in mice. Hepatology, 2019, **70**(3): 851-870

[17] Zhang X, Zhu C, Wang T, *et al*. GP73 represses host innate immune response to promote virus replication by facilitating MAVS and TRAF6 degradation. PLoS Pathog, 2017, **13**(4): e1006321

[18] Shao W Q, Zhu W W, Luo M J, *et al*. Cholesterol suppresses GOLM1-dependent selective autophagy of RTKs in hepatocellular carcinoma. Cell Rep, 2022, **39**(3): 110712

[19] 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**(3): 456-475

[20] Yang X, Wen Z, Zhang D, *et al*. Proximity labeling: an emerging tool for probing *in planta* molecular interactions. Plant Commun, 2021, **2**(2): 100137

[21] 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

[22] Madern M F, Yang S, Witteveen O, *et al*. Long-term imaging of individual ribosomes reveals ribosome cooperativity in mRNA translation. Cell, 2025, **188**(7): 1896-1911.e24

[23] Brückner A, Polge C, Lentze N, *et al*. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. Int J Mol Sci, 2009, **10**(6): 2763-2788

[24] Dunham W H, Mullin M, Gingras A C. Affinity-purification coupled to mass spectrometry: basic principles and strategies. Proteomics, 2012, **12**(10): 1576-1590

[25] Mathew B, Bathla S, Williams K R, *et al*. Deciphering spatial protein-protein interactions in brain using proximity labeling. Mol Cell Proteomics, 2022, **21**(11): 100422

[26] Guo J, Guo S, Lu S, *et al*. The development of proximity labeling technology and its applications in mammals, plants, and microorganisms. Cell Commun Signal, 2023, **21**(1): 269

[27] Lu F, Ma Q, Xie W, *et al*. CMYA5 establishes cardiac dyad architecture and positioning. Nat Commun, 2022, **13**(1): 2185

[28] Su Y, Guo Y, Guo J, *et al*. Study of FOXO1-interacting proteins using TurboID-based proximity labeling technology. BMC Genomics, 2023, **24**(1): 146

[29] El-Mansi S, Robinson C L, Kostelnik K B, *et al*. Proximity proteomics identifies septins and PAK2 as decisive regulators of actomyosin-mediated expulsion of von Willebrand factor. Blood, 2023, **141**(8): 930-944

[30] 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

[31] 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**(34): 11763-11767

[32] 房恩岳, 张丽萍, 马雪征, 等. 慢病毒载体系统及其安全性研究进展. 病毒学报, 2023, **39**(4): 1181-1192
Fang E Y, Zhang L P, Ma X Z, *et al*. Chin J Virol, 2023, **39**(4): 1181-1192

[33] Lee A S, Kranzusch P J, Cate J H. eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. Nature, 2015, **522**(7554): 111-114

[34] Lee A S, Kranzusch P J, Doudna J A, *et al*. eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation. Nature, 2016, **536**(7614): 96-99

[35] Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, **19**(3): 158-174

[36] Hinnebusch A G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. Annu Rev Biochem, 2014, 83: 779-812

[37] des Georges A, Dhote V, Kuhn L, *et al*. Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex. Nature, 2015, **525**(7570): 491-495

[38] Meyer K D, Patil D P, Zhou J, *et al*. 5' UTR m(6)a promotes cap-independent translation. Cell, 2015, **163**(4): 999-1010

[39] Valásek L, Mathew A A, Shin B S, *et al*. The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome *in vivo*. Genes Dev, 2003, **17**(6): 786-799

[40] Pisareva V P, Pisarev A V, Komar A A, *et al*. Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. Cell, 2008, **135**(7): 1237-1250

[41] Jackson R J, Hellen C U, Pestova T V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, **11**(2): 113-127

[42] Schmidt E K, Clavarino G, Ceppi M, *et al*. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. Nat Methods, 2009, **6**(4): 275-277

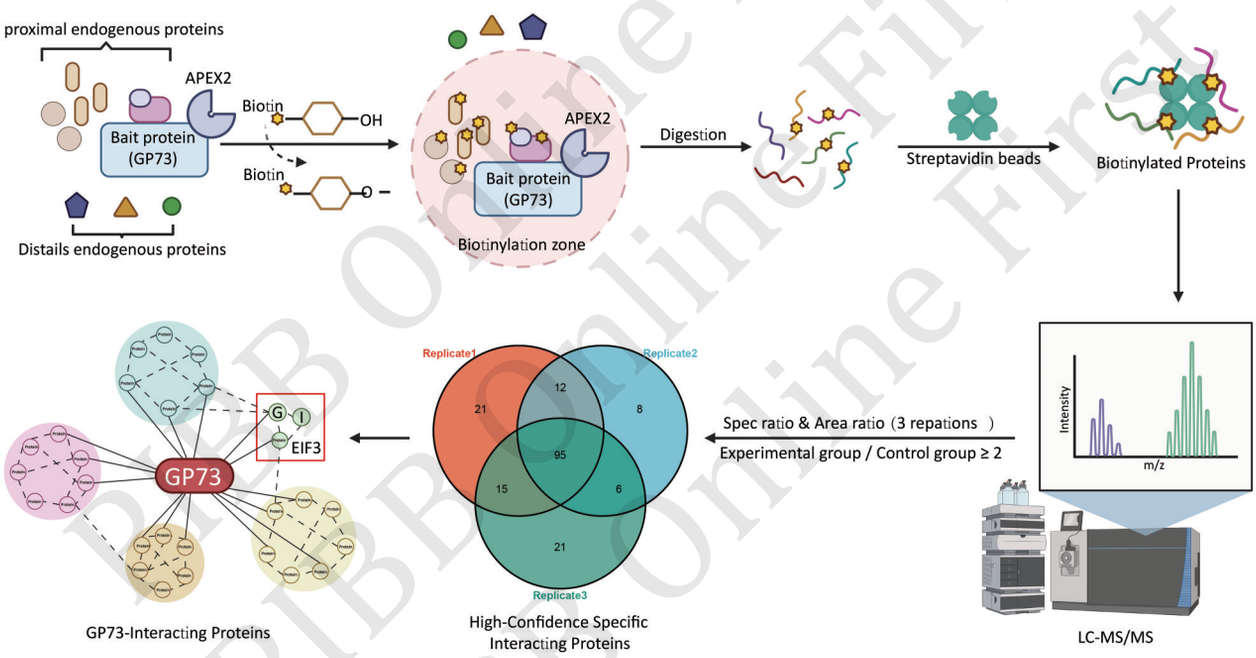
# Establishment and Preliminary Analysis of GP73 Interactome Using Proximity-dependent Labeling Technology*

LIU Mu-Yi[1,2], ZHANG Chang[2], YANG Meng-Xing[1,2], YAN Xin-Long[1)**],
WAN Lu-Ming[2)**], WEI Cong-Wen[2)**]

([1)]*Beijing Key Laboratory of Environmental and Viral Oncology, College of Chemistry and Life Sciences, Beijing University of Technology, Beijing* 100124, China;

[2)]*National Key Laboratory of Advanced Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing* 100071, China)

## Graphical abstract




**Abstract**　**Objective**　Protein-protein interactions (PPIs) are fundamental to the execution of biological functions within living cells. However, traditional biochemical methods, such as co-immunoprecipitation (Co-IP), often fail to capture transient, weak, or membrane-associated interactions due to the stringent detergent requirements for cell lysis. Proximity labeling (PL) has emerged in recent years as a transformative technology for mapping the proteomes of specific subcellular compartments and identifying dynamic interactomes in situ. Golgi protein 73 (GP73, also known as GOLPH2), a resident type II Golgi transmembrane protein, is a well-recognized clinical biomarker for liver diseases, including hepatocellular carcinoma (HCC). Despite its clinical significance, the comprehensive physiological and pathological functions of GP73 remain partially understood. This study aims to establish an APEX2-mediated proximity labeling system specifically targeting GP73 to map its interactome in a living cellular environment, thereby providing new insights into its molecular roles and regulatory mechanisms. **Methods**　To achieve spatial specificity, we first constructed a stable cell line expressing a fusion protein consisting of GP73 and the engineered soybean peroxidase APEX2. The localization of the GP73-APEX2 fusion protein was validated to ensure it correctly targeted the Golgi apparatus. The proximity labeling reaction was

initiated by incubating the cells with biotin-phenol (BP) for 30 min, followed by a brief (1 min) treatment with 1 mmol/L hydrogen peroxide ($H_2O_2$). This catalytic reaction converts BP into highly reactive, short-lived biotin-phenoxyl radicals that covalently attach to endogenous proteins within a small labeling radius of the GP73-APEX2 enzyme. Subsequently, the cells were quenched, and biotinylated proteins were enriched using high-affinity Streptavidin-coated magnetic beads. The captured "neighbor" proteins were subjected to on-bead digestion and analyzed *via* liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for high-throughput identification. Rigorous bioinformatics analysis, including Gene Ontology (GO) enrichment, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis, and protein-protein interaction network mapping, was performed to interpret the biological significance of the identified candidates. **Results**　Our results demonstrate the successful establishment of a robust and sensitive APEX2-based proximity labeling system for GP73. We identified a total of 95 high-confidence interacting proteins that were significantly enriched in the GP73 proximity proteome compared to control groups. Bioinformatics analysis revealed that these interactors were predominantly associated with biological processes such as vesicular transport, protein localization, and, most notably, molecular functions related to "ribosome binding" and "translation regulation". This suggested an unexpected role for the Golgi-resident GP73 in the cellular translation machinery. To validate these findings, we performed targeted biochemical assays which confirmed a direct interaction between GP73 and the subunits of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) complex, specifically EIF3G and EIF3I. Furthermore, functional validation using the surface sensing of translation (SUnSET) assay—a non-radioactive method to monitor protein synthesis—revealed that the overexpression of GP73 significantly promoted global protein translation levels in the cell, whereas its depletion or inhibition resulted in reduced translation efficiency. **Conclusion**　This study successfully utilized APEX2-mediated proximity labeling to provide the first systematic map of GP73 interactome in living cells. Our findings uncover a novel, unconventional function of GP73 as a regulator of cellular protein translation, likely mediated through its interaction with the eIF3 complex. This discovery significantly broadens our understanding of the biological roles of GP73 beyond its traditional function in the Golgi apparatus and suggests that it may act as a bridge between Golgi-related trafficking and the protein synthesis machinery. Furthermore, the technical framework established in this study provides a valuable template for investigating other complex organelle-associated protein networks and resolving transient macromolecular interactions in various physiological and pathological contexts.

**Key words**　proximity labeling, protein-protein interaction, Golgi protein 73, bioinformatics analysis, translation
**DOI**：10.3724/j.pibb.2025.0427　　**CSTR**：32369.14.pibb.20250427



* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32270823).
** Corresponding author.
YAN Xin-Long. Tel：86-18813017160，E-mail：yxlong2000@bjut.edu.cn
WAN Lu-Ming. Tel：86-10-66948854，E-mail：wanluming9@163.com
WEI Cong-Wen. Tel：86-10-66948869，E-mail：weicongwen@aliyun.com
Received：September 29，2025　Accepted：February 4，2026