

紫外交联合并串联亲和纯化高效鉴定蛋白复合物组分的 RNA 结合活性*

岳 莎 周淑如 郭学敏**

(中山大学中山医学院人类病毒学研究所, 热带病防治研究教育部重点实验室, 广州 510080)

摘要 RNA 结合蛋白在 RNA 的生成与代谢中发挥着重要作用。我们在近年报道的 PAR-CLIP (photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation) 技术的基础上建立了一套快速、有效鉴定 RNA 结合蛋白的实验方法: 以串联亲和纯化替代一步免疫沉淀获得高纯度蛋白-RNA 复合物; 将 Sypro Ruby 蛋白染色与 RNA 放射自显影相结合判断复合物中哪种或哪些组分为 RNA 结合蛋白, 该方法命名为紫外交联合并的串联亲和纯化(cross-linking and tandem affinity purification, CLiTAP)。运用该方法对布氏锥虫的三种锌指蛋白 ZC3H7、ZC3H34 和 ZC3H5 进行分析, 发现 ZC3H7 作为帽结合蛋白复合物的核心组分具有很强的 RNA 结合能力; ZC3H34 结合 RNA 能力较弱, 但其互作蛋白具有强的 RNA 结合活性; 相比之下, ZC3H5 及其复合物组分皆无 RNA 结合活性。这些结果表明, CLiTAP 与蛋白质鉴定方法相结合, 能够有效鉴定靶蛋白复合物中的 RNA 结合蛋白种类, 也为进一步定位 RNA 结合位点、研究 RNA 结合蛋白的结构及作用机制奠定了基础。

关键词 紫外交联, 串联亲和纯化, RNA 结合蛋白, 布氏锥虫, CCCH 型锌指蛋白

学科分类号 Q5, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00021

RNA 的生成、加工修饰、运输与定位、稳定性调控及翻译控制等依赖于与大量 RNA 结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)相互作用而得以实现, 从而赋予了 RNA 结合蛋白在细胞内一系列重要的生理生化功能^[1-4]。目前, 已有一些具有不同结构和功能的 RNA 结合蛋白得以鉴定, 它们通常含有较为保守的 RNA 结合结构域, 主要包括: RNA recognition motif (RRM)、KH 结构域、RGG box、Pumilio/FBF (PUF) 和锌指结构域等^[5]。虽然已有相当多的 RBPs 报道, 但是受限于研究手段和技术方法, 还有许多 RNA 结合蛋白处于未知状态^[6]。

研究 RNA 与蛋白质间相互作用的常规方法包括: 遗传学检测、RNase 处理合并密度梯度离心或分子筛凝胶色谱层析、凝胶迁移阻滞分析(EMSA)、RNA 免疫共沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)、紫外交联-免疫沉淀、RNA pull-down 分析以及 RNA 原位杂交(FISH)等, 这些方法各有优缺点及适用范围。本文在近来报道的新技术 PAR-CLIP

(photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation)^[7]的基础上建立了紫外交联合并的串联亲和纯化(cross-linking and tandem affinity purification, CLiTAP)方法, 实验步骤见图 1, 概括为: 将目标蛋白融合表达 TAP 标签的基因(图 1a)转染细胞构建稳定表达细胞株; 收集细胞经 UV 254 nm 照射使相互作用的 RNA-蛋白质交联; 将细胞裂解液经低浓度 RNaseT1 消化后与 IgG Sepharose 孵育; 目标蛋白复合物经蛋白酶 TEV 作用后结合到 Calmodulin Sepharose 上; 经高浓度 RNaseT1 消化, 共沉淀的 RNA 只剩下与蛋白质结合的区域; 利用多核苷酸激酶和 γ -³²P-ATP 对 RNA 进行 5'端标记; 将 RBP 复合物用 EGTA 洗脱

* 国家自然科学基金(81171601)和广东省引进创新科研团队计划(2009010058)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 020-87330101, E-mail: xmguo2005@yahoo.com

收稿日期: 2014-01-16, 接受日期: 2014-04-10

下来后经 SDS-PAGE 分离, Sypro Ruby 染色后在 UV 下显示蛋白质复合物的组成和分离情况, 然后放射自显影显示结合 RNA 的蛋白(图 1b)。

本文采用 CLiTAP 方法对布氏锥虫的三种 CCH 型 锌 指 蛋 白 *TbZC3H7*、*TbZC3H34*、*TbZC3H5* 及其蛋白质复合物组分是否具有 RNA 结合能力进行了检测, 旨在建立一种高效的鉴定目标蛋白或目标蛋白复合物中其他组分是否具有 RNA 结合活性的实验方法。

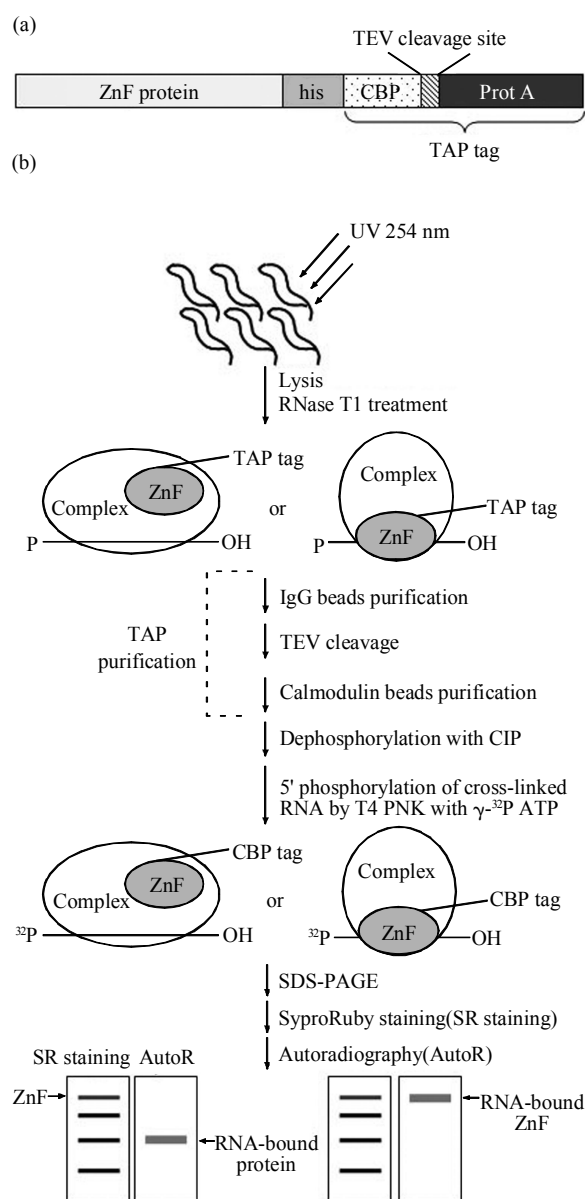


Fig. 1 The CLiTAP strategy

(a) Structure of the target protein with a C-terminal TAP tag. Here, the zinc finger (ZnF) protein was used as the representation of the target protein. (b) Overview of the CLiTAP procedure.

1 材料与方法

1.1 材料

布氏锥虫 *Trypanosoma brucei* PF 427、PF 29-13 和表达质粒 pHD1344-TAP 由 Dr. K. Stuart (Seattle Biomedical Research Institute) 赠予。IgG Sepharose、Calmodulin Sepharose 购自 GE 公司; ATP、小牛肠碱性磷酸酶(CIP)和 T4 多核苷酸激酶 (T4 PNK) 购自 NEB 公司; 蛋白酶抑制剂 cocktail (EDTA free) 和 RNase T1 购自 Thermo 公司; TEV 酶购自 Invitrogen 公司; γ - 32 P-ATP 购自 Perkin Elmer 公司; Sypro Ruby 染色液购自 Bio-Rad 公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司; 鼠源 anti-His MAb 购自 Clontech 公司; 二抗 peroxidase 偶联的 anti-mouse IgG 购自 Sigma 公司。凝胶成像系统为 Tanon 2500; 紫外交联仪为 UVP HL-2000 hybridlinker system; 磷屏成像系统为 GE Typhoon FLA9500。

1.2 质粒构建

以 *T. brucei* 427 基因组 DNA 为模板, 以 5' CACCTCGAGCCACCATGCCTCCCAGACGTTCC 3' 和 5' CACGGATCCCTCCTTTTCTTCCACCTG 3' 为引物 PCR 扩增全长 *TbZC3H7* 基因(酶切位点用下划线标出, 以下同), 经 *Xho* I 和 *Bam* H I 酶切克隆到 pHD1344-TAP 载体生成 pHD1344-ZC3H7-TAP。同理, 以 5' CACCTCGAGCCACCATGCAACCATTTGGTCAAAC 3' 和 5' CACGGATCCGGGGATTCGGCAGCCAC 3'、5' CACCTCGAGCCACCATGATGCAACGGGATACC 3' 和 5' CACGGATCCCATGTAACCCAGTTTGTAG 3' 为引物分别扩增全长 *TbZC3H34* 和 *TbZC3H5* 基因, 经相应酶切后克隆至 pHD1344-TAP 载体, 分别生成 pHD1344-ZC3H34-TAP 和 pHD1344-ZC3H5-TAP。pHD1344-TAP 是一个能整合到锥虫 β -tubulin 基因座、稳定表达 TAP 标签融合蛋白的载体^[8]。

1.3 锥虫细胞培养和转染

PF 29-13 用含 10%胎牛血清和相应抗生素的 SDM-79 培养基培养于 27°C CO₂ 培养箱。按照文献[9]进行 pHD1344 系列质粒的转染和筛选, 得到的阳性克隆分别命名为 PF ZC3H7-TAP、PF ZC3H34-TAP 和 PF ZC3H5-TAP。

1.4 UV 交联和细胞裂解

将 50 ml 表达上述锌指蛋白-TAP 的锥虫细胞培养至 2×10^7 /ml, 离心收集, PBSG 清洗 1 次后置

于紫外交联仪中, 用 UV 254 nm 以 0.4 J/cm² 能量照射 2 次; 用含有蛋白酶抑制剂和 1% Triton-X100 的 IPP150 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% NP40)裂解细胞, 经 17 000 r/min 离心 15 min 后取上清加入终浓度为 1 U/ μ l 的 RNase T1, 22℃ 消化 20 min, 离心后取上清用于纯化。

1.5 蛋白质复合物的串联亲和纯化

按照文献[10]介绍的方法进行蛋白质复合物的串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)获得蛋白质复合物, 简述如下: 将 IgG Sepharose 与细胞裂解液上清于 4℃ 孵育 2 h, 加入 TEV 酶在 16℃ 作用 2 h, 将上清转移到新管中, 与适量 Calmodulin Sepharose 于 4℃ 孵育 1 h, 清洗后进行同位素标记 RNA。

1.6 γ -³²P-ATP 标记蛋白结合的 RNA

将结合在 Calmodulin sepharose 上的蛋白质复合物按文献[7]介绍的方法进行 ³²P 标记 RNA, 简述为: 用 RNase T1 反应液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 1 mmol/L EDTA)清洗 2 次后加入高浓度 RNaseT1(终浓度为 100 U/ μ l)于 22℃ 消化 15 min; 依次用高盐缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 0.05% NP40, 0.5 mmol/L DTT)和磷酸化缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT)分别清洗 3 次; 建立 20 μ l 同位素 5'端标记反应体系, 包括 20U T4 PNK, T4 PNK 缓冲液和 1 μ l γ -³²P-ATP(10 μ Ci/ μ l), 37℃ 反应 30 min. 用磷酸化缓冲液洗去游离同位素, 加入 SDS 洗脱缓冲液, 100℃ 变性 10 min, 上清即为待分析的蛋白质复合物, 分别进行 1.7 和 1.8 的检测。

1.7 Sypro Ruby 染色及放射自显影

蛋白质复合物经 SDS-PAGE 分离后按照说明书进行 Sypro Ruby 染色, 用凝胶成像仪在 UV 线下观察蛋白质染色情况并拍照, 随后将胶经磷屏放射自显影, 用磷屏成像系统扫描。

1.8 蛋白质印迹

将 1.3 中筛选到的细胞裂解后经 SDS-PAGE 分离, 转移至 PVDF 膜(Millipore), 以抗 TAP 标签中 protein A 的抗体 PAP(Sigma, 1:2 000 稀释)来检测含 TAP 标签的锌指蛋白 ZC3H7、ZC3H34 和 ZC3H5 的表达情况。将 1.5 中获取的蛋白质复合物经 SDS-PAGE 分离后, 转移至 PVDF 膜, 依次用 anti-His MAb 和过氧化酶标记的 anti-mouse IgG 孵

育, 经 ECL 显色曝光, 用以检测目标蛋白。

2 结 果

2.1 目标蛋白的选择

蛋白质是否具有 RNA 结合活性, 除序列分析外, 还必须进行实验证实。一些数据表明 CCCH 型锌指结构域是一类 RNA 结合结构域^[11-13]。在此, 我们选择布氏锥虫三种 CCCH 型锌指蛋白 *TbZC3H7*、*TbZC3H34* 和 *TbZC3H5* 为靶蛋白, 采用 CLi-TAP 进行复合物各组分 RNA 结合活性的检测分析。蛋白质结构示意图见图 2a, 蛋白质 C 端融合 TAP 标签的表达载体及稳定表达细胞株的构建详见材料与方法。

2.2 *TbZC3H7* 复合物 RNA 结合活性分析

锥虫 RNA 帽结合复合物与 RNA 帽结构(³²P-labeled cap 4 SL RNA)孵育后形成明显的核糖核蛋白复合物, 其核心组分包括 CBP20、CBP30、CBP66 (ZC3H7)、CBP110 和 importin- α ^[14]。以 ZC3H7 为靶蛋白、经 CLi-TAP 分离到的复合物进行 Sypro Ruby 染色、放射自显影以及蛋白质印迹, 结果见图 2b~d。ZC3H7 复合物蛋白组成清晰可见, 蛋白质印迹以及切胶回收经质谱(LC-MS/MS)鉴定为 RNA 帽结合复合物各组分(见图中标记及图注); 放射自显影结果显示: ZC3H7 具有很强的 RNA 结合能力, CBP30 结合 RNA 活性较弱, CBP110 和其他组分基本上无 RNA 结合活性。

2.3 *TbZC3H34* 复合物 RNA 结合活性分析

ZC3H34 是未知蛋白, 分子质量为 22.4 ku, 以其为靶蛋白, 经 CLi-TAP 分离到的复合物 Sypro Ruby 染色、放射自显影及蛋白质印迹结果见图 2b~d。ZC3H34 蛋白的 RNA 结合活性较弱, 分子质量约为 75 ku 的 ZC3H34 互作蛋白表现出很强的 RNA 结合能力, 而约 63 ku 的互作蛋白则无任何 RNA 结合活性。

2.4 *ZC3H5* 蛋白复合物 RNA 结合活性分析

ZC3H5 为未知蛋白, 分子质量为 25.5 ku, 含有一个 CX₇CX₅CX₃H 锌指结构域, GeneDB 数据库依据序列比对注释该基因具有 RNA 结合功能(www.genedb.org)。以 ZC3H5 为靶蛋白经 TAP/MS 鉴定, 该复合物至少含有 5 种蛋白组分(Data not shown)。经 CLi-TAP 分离后的复合物 Sypro Ruby 染色、放射自显影及蛋白质印迹结果(图 2b~d)显示 ZC3H5 复合物任一组分皆无 RNA 结合活性。进一步通过甘油密度梯度离心显示 ZC3H5 的分布不

受 RNase 处理的影响(Data not shown), 与 CLiTAP 结果一致, 揭示了 ZC3H5 及其互作蛋白无 RNA 结合功能; 同时说明具有典型的 RNA 结合结构域的蛋白不一定具有 RNA 结合活性。

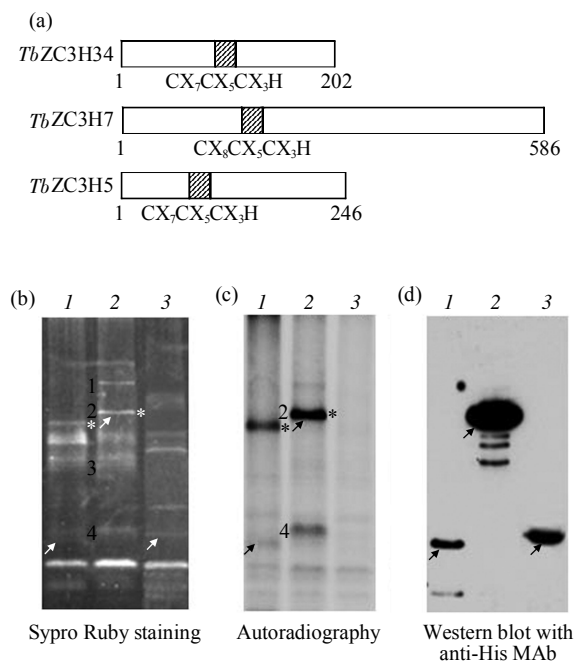


Fig. 2 RNA binding assay of the trypanosome ZnF proteins by CLiTAP

(a) Schematic showing number and pattern of the CCCH-type ZnF motif in *TbZC3H34*, *TbZC3H7* and *TbZC3H5*. The TAP-tagged ZnF protein complexes were prepared through CLiTAP procedures and detected by Sypro Ruby staining (b), autoradiography (c), and Western blot with anti-His MAb (d), respectively. The white arrows in (b) pointed to the tagged ZnF proteins, corresponding to the black arrows in (d). The white star (*) pointed to the proteins showing a strong RNA-binding activity, corresponding to the black star in (c). The components of ZC3H7 complex were determined by MS and marked with number on the left of the lane (b, c), 1~4 representing for CBP110, ZC3H7, importin- α and CBP30, respectively. 1: ZC3H34-TAP; 2: ZC3H7-TAP; 3: ZC3H5-TAP.

3 讨 论

本文在新技术 PAR-CLIP 基础上, 建立了一种高效的可以同时鉴定靶蛋白及其复合物中互作蛋白是否具有 RNA 结合活性的新方法——CLiTAP. 改进之处主要包括: a. 目标蛋白末端融合表达 TAP 标签, 不但避免了目标蛋白特异性抗体的需求, 而且用串联亲和纯化替代一步免疫纯化, 改善了蛋白

质复合物的纯化效果; b. RNA-蛋白复合物经 SDS-PAGE 分离后增加了 Sypro Ruby 染色步骤, 染色结果与放射自显影结果在同一块胶上进行比较, 便于直接观察复合物中具有 RNA 结合活性的组分. 该方法不但与蛋白质谱鉴定兼容、有助于发现新型 RNA 结合蛋白, 而且可以为鉴定靶 RNA 序列组成提供 RNA 样品. 尤其需要指出的是, 该方法不受物种和蛋白质种类的限制, 可以广泛用来对蛋白质及其复合物进行 RNA 结合功能鉴定。

运用 CLiTAP 对布氏锥虫的三种锌指蛋白复合物的 RNA 结合活性进行分析, 发现有的锌指蛋白并无 RNA 结合功能, 说明基于序列分析的含有保守 RNA 结合域的蛋白并非都具有 RNA 结合活性, 进一步强调了实验验证的重要性和必要性; 同时具有 RNA 结合活性的互作蛋白的鉴定对于发现新型 RNA 结合蛋白或 RNA 结合结构域具有重要意义. 布氏锥虫是重要的寄生性原虫, 也是研究转录后调控的模式生物, 其基因表达调控主要发生在转录后水平, 依赖于多种 RBPs 参与^[4, 15]. 序列分析表明布氏锥虫基因组编码约 50 个 CCCH 型锌指蛋白, 大部分为功能未知蛋白^[16]. 对未知锌指蛋白进行 RNA 结合活性分析, 对于揭示蛋白质的功能特性和作用机制是必需的, 对于理解锌指蛋白在锥虫基因表达调控的作用、发现药物新靶位具有重要意义。

对于多数 RNA 结合蛋白而言, 每种 RNA 结合蛋白可识别结合多种靶标 RNAs, 高通量分析鉴定靶标 RNAs 的种类、结构及功能特点对于全面了解 RNA 结合蛋白的功能及作用机制至关重要. CLiTAP 方法是在 PAR-CLIP 基础上发展而来, 获得的 RNA-蛋白胶条经洗脱、蛋白酶 K 消化、酚/氯仿抽提, 很易获得高纯度、稳定的小 RNA 片段(依据蛋白质种类不同, RNA 长度峰值有所不同); 经 RNA-seq 和生物信息学分析可在转录组范围内获得 RBP 识别结合的靶 RNA 序列特征和基因种类。

总之, 实验结果表明, 本文所建立的 CLiTAP 是一种高效 RNA 结合蛋白鉴定方法, 适用范围广、可行性强、重现性好, 还可为下一步的 RNA 靶序列鉴定奠定良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Magro M G, Solimena M. Regulation of beta-cell function by RNA-binding proteins. *Molecular Metabolism*, 2013, 2(4): 348-355

- [2] Jean-Philippe J, Paz S, Caputi M. hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *Int J Mol Sci*, 2013, **14**(9): 18999–19024
- [3] Herbert C J, Golik P, Bonnefoy N. Yeast PPR proteins, watchdogs of mitochondrial gene expression. *RNA Biology*, 2013, **10** (9): 1477–1494
- [4] Clayton C. The regulation of trypanosome gene expression by RNA-binding proteins. *PLoS Pathogens*, 2013, **9**(11): e1003680
- [5] Chen Y, Varani G. Protein families and RNA recognition. *The FEBS J*, 2005, **272**(9): 2088–2097
- [6] Zhao H, Yang Y, Zhou Y. Prediction of RNA binding proteins comes of age from low resolution to high resolution. *Molecular bioSystems*, 2013, **9**(10): 2417–2425
- [7] Hafner M, Landthaler M, Burger L, *et al.* PAR-CLIP—a method to identify transcriptome-wide the binding sites of RNA binding proteins. *J Vis Exp*, 2010, (41): 2034–2037
- [8] Guo X, Carnes J, Ernst N L, *et al.* KREPB6, KREPB7, and KREPB8 are important for editing endonuclease function in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, 2012, **18**(2): 308–320
- [9] Schnaufer A, Panigrahi A K, Panicucci B, *et al.* An RNA ligase essential for RNA editing and survival of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Science*, 2001, **291**(5511): 2159–2162
- [10] Puig O, Caspary F, Rigaut G, *et al.* The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, 2001, **24**(3): 218–229
- [11] Lai W S, Perera L, Hicks S N, *et al.* Mutational and structural analysis of the tandem zinc finger domain of tristetraprolin. *J Biol Chem*, 2014, **289**(1): 565–580
- [12] Kaymak E, Ryder S P. RNA recognition by the *Caenorhabditis elegans* oocyte maturation determinant OMA-1. *J Biol Chem*, 2013, **288**(42): 30463–30472
- [13] Guo X, Carroll J W, Macdonald M R, *et al.* The zinc finger antiviral protein directly binds to specific viral mRNAs through the CCCH zinc finger motifs. *Journal of Virology*, 2004, **78**(23): 12781–12787
- [14] Li H, Tschudi C. Novel and essential subunits in the 300-kilodalton nuclear cap binding complex of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(6): 2216–2226
- [15] Fernandez-Moya S M, Estevez A M. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2010, **1**(1): 34–46
- [16] Kramer S, Kimblin N C, Carrington M. Genome-wide in silico screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. *BMC Genomics*, 2010, **11**: 283–295

Efficient Assay of The RNA-binding Activities in a Protein Complex by UV Cross-linking and Tandem Affinity Purification*

YUE Sha, ZHOU Shu-Ru, GUO Xue-Min**

(Institute of Human Virology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University; Key laboratory of tropical Diseases Control (Sun Yat-Sen University), Ministry of Education, Guangzhou 510080, China)

Abstract RNA-binding proteins (RBPs) function importantly in RNA synthesis and metabolism by interacting with specific RNAs. The identification of RNA-protein interactions is required for understanding the cellular function mechanisms. A new technique, PAR-CLIP (photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation), has been used to determine the target transcripts of a few RBPs and map the RNA binding sites in a genome-wide fashion. In this study, a rapid and effective method was developed on the basis of PAR-CLIP to detect the RNA binding activity of putative RBPs and their complexes, termed UV cross-linking and tandem affinity purification (CLiTAP). The improvements include: (1) Tandem affinity purification was performed to purify RNA-protein complexes efficiently; (2) Sypro Ruby staining and autoradiography were used sequentially to determine which protein(s) possessing RNA-binding activities. CLiTAP was used to analyze the RNA binding activity of three kinds of CCCH-type zinc finger proteins, *TbZC3H7*, *TbZC3H34* and *TbZC3H5*, in *Trypanosoma brucei*. *TbZC3H7*, a core component of RNA cap-binding complex, showed a strong RNA-binding ability. *TbZC3H34*, a hypothetical protein, displayed a weak RNA-binding activity, while one of its interacting proteins showed a strong activity. In contrast, *TbZC3H5* and all its interacting proteins did not show any RNA binding activity. These results indicated that CLiTAP is an efficient method and can be used to experimentally identify the RBPs in a protein complex, which provide a basis for further mapping the RNA binding sites and investigating the structure and mechanism of RBPs.

Key words UV cross-linking, tandem affinity purification, RNA binding protein, *Trypanosoma brucei*, CCCH-type zinc-finger protein

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00021

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81171601) and The Introduction of Innovative R&D Team Program of Guangdong Province (2009010058).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-87330101, E-mail: xmguo2005@yahoo.com

Received: January 16, 2014 Accepted: April 10, 2014