

基于抗坏血酸过氧化酶的电镜成像和活细胞邻近标记方法的应用进展*

徐晓君^{1)**} 朱新宇^{1)**} 张蕊^{2)**} 薛艳红²⁾ 李真珍³⁾ 宋婧莉²⁾ 侯俊杰^{2)***}

¹⁾ 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074; ²⁾ 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;

³⁾ 郑州大学第一附属医院肾内科, 郑州 450052)

摘要 Alice Ting 实验室开发的抗坏血酸过氧化物酶(engineered ascorbate peroxidase, APEX), 相对于经典的辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP), 其酶活性不再受细胞内蛋白质定位的影响, 可以在几乎所有的亚细胞区域保持活性, 这使其在研究亚细胞尺度以及活细胞水平生物学问题时极具优势. 目前, 基于 APEX 的二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色标记技术已经成功地实现对全细胞、亚细胞器和蛋白质水平的电镜成像. 同时, 与质谱技术结合, 基于 APEX 的活细胞生物素邻近标记方法也极大地推动了亚细胞器蛋白质组学, 以及目标蛋白在特定时空条件下邻近蛋白质组学的研究发展. 本文将分别从以上两个方面阐述 APEX 技术的基本原理及最新应用进展, 并讨论和展望其在实际应用中存在的局限性和挑战.

关键词 抗坏血酸过氧化物酶, 二氨基联苯胺染色标记, 电镜, 邻近标记, 蛋白质组, 蛋白质相互作用

学科分类号 R6, R7

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0362

蛋白质的亚细胞定位对其发挥特异的生物学功能至关重要, 但由于缺乏有效的研究手段, 在亚细胞器尺度研究蛋白质定位与功能的关系仍然是极具挑战性的科学技术难题. 2012 年, 美国科学家 Alice Ting 实验室通过位点突变的方法改造野生型抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX), 筛选获得了单体性好、催化活性高的 APX (enhanced APX), 即 APEX^[1]. 这种新型的抗坏血酸过氧化物酶, 相对于经典的辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP), 其酶活性不再受细胞内蛋白质定位的影响, 可以在几乎所有的亚细胞区域保持活性. 他们利用基于 APEX 的二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色标记方法对细胞内主要的亚细胞器(如线粒体、内质网等)进行了电镜成像, 获得了衬度好和分辨率高的图像. 2013 年, 他们又将 APEX 应用于以活细胞生物素邻近标记为基础的亚细胞蛋白质组学研究中^[2], 成功鉴定了 495 个人类线粒体基质中的蛋白质, 其中 31 个是之前未报道的定位于线粒体的蛋白质, 证明其

与质谱技术良好的兼容性. Pagliarini 等^[3]在这一成果发表不久就以“Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry”为题回顾了线粒体研究的历史并认为 Ting 实验室的这一研究开创了线粒体研究的新纪元. 2015 年, 该实验室利用酵母表面展示技术进一步对 APEX 进行改良, 得到活性更好的升级版 APEX2^[4]. 同年, *Nature Methods* 的技术编辑 Marx^[5]在“Technology Future”专栏为基于 APEX2 的蛋白标记技术撰写了主题文章“Mapping proteins with spatial proteomics”, 重点展望了该技术在亚细胞器蛋白质组学领域巨大的应用前景. 因此, APEX/APEX2 技术的出现为科学家在亚细胞尺度以及活细胞水平研究生物学问题打开

* 国家自然科学基金资助项目(31770891, 31400703, 31770900).

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-64888524, E-mail: houjunjie@moon.ibp.ac.cn

收稿日期: 2018-01-15, 接受日期: 2018-02-10

了一扇窗户. 下面本文将对 APEX/APEX2 技术在基于 DAB 标记的电镜成像和基于活细胞生物素邻近标记的亚细胞蛋白质组与邻近蛋白质组的应用原理及相关应用研究进行逐一梳理综述.

1 APEX 技术在电镜标记中的应用

1.1 电镜标记方法简述和 APEX/APEX2 介导 DAB 染色原理

电镜成像是生命科学研究中常用的技术, 目前电镜标记方法主要包括免疫胶体金标记技术^[6]、DAB 染色标记技术^[7]、金属离子配体探针技术^[8-9]、光电联合技术^[10]以及染色体电镜断层拍摄 (chromatin dye with electron-microscope tomography, ChromEMT) 技术^[11]等. 免疫胶体金标记是最常用的电镜标记方法, 该方法分为去垢剂透膜后标记或者切片后标记两种. 前者会在不同程度上破坏膜结构; 而后者抗原保存受到损害, 抗体标记效率差, 容易造成假阳性. 金属离子配体探针技术利用的是某些蛋白具有促进金属沉淀产生的特性, 由于金属沉淀具有很高的电子密度, 从而在样品上产生衬度. 目前已有多种蛋白质被证实可以促进金属沉淀的产生, 如金属硫蛋白 (metallothionein, MTH)^[8-9]、细菌铁蛋白 (ferritin)^[12]等. 光电联合技术是将光镜成像与电镜成像结合起来, 通过光镜定位并筛选荧光标记的目标分子, 然后根据光镜信息在电镜下搜索并定位光镜定位的目标位置进行电镜成像. 目前有多种不同的光电联合方式, 如冷冻样品光电联合技术^[13]、超分辨光电联合技术^[14-15]以及 Tsien 实验室开发的 Click-EM 技术^[16]等. ChromEMT 技术是 Shea^[11]实验室在 2017 年报道的一种全新的电镜标记技术, 他们将新型染色质染料与电镜断层成像结合, 通过 ChromEMT 技术首次实现人类活细胞的细胞核中染色质的 3D 成像.

DAB 染色标记技术是通过细胞融合表达某一标签, 促使 DAB 单体发生聚合, 由于 DAB 聚合物可以被 OsO₄ 着色从而实现标记. 该方法在标记前既不需要透膜也不需要切片, 很好地避免了胶体金标记方法的缺陷. 常用于促发 DAB 聚合的方法有两种, 一种是基于光猝发, 另一种是基于过氧化物酶催化. 光猝发的单价氧离子氧化 DAB 生成聚合物方法包括 MiniSOG 法、4Cys-ReAsH 法和 Halo/SNAP/CLIP tag-TMR 法. MiniSOG 是一类荧光蛋白, 在光激发下发射荧光并且产生单价氧离子^[17-19]. 4Cys-ReAsH 法是在细胞中表达相应的融

合蛋白使其融合表达含有 4 个 Cys 的肽段, 而后孵育底物荧光素衍生物 ReAsH. 结合在肽段上的 ReAsH 在激光的照射下生成单价氧离子^[20-21]. Halo/SNAP/CLIP -TMR 法是在细胞中表达含有 Halo/SNAP/CLIP 标签的融合蛋白, 通过与其荧光小分子底物 TMR 结合, 在激光的照射下生成单价氧离子^[22]. 这三种方法都需要激光照射产生单价氧离子, 由于光的穿透能力有限, 所以不适合分析厚度大的样品. 另外, MiniSOG 反应性能 (产生荧光的能力和产生单价氧离子的能力) 较弱, 而 4Cys-ReAsH 法和 Halo/SNAP/CLIP tag-TMR 法需要孵育相应的小分子配体, 不可避免地带来非特异性结合, 且 ReAsH 对细胞有毒性, 所以这三类标记方法的应用受到了一定的限制^[1, 22].

基于过氧化物酶催化 DAB 染色标记方法是在过氧化氢 (H₂O₂) 存在的条件下, 过氧化物酶可以催化 DAB 形成 DAB 聚合物, 进而被 OsO₄ 染色实现标记 (图 1a). HRP 是最为经典的过氧化物酶^[23-26], 但 HRP 功能结构域中包含 4 个二硫键以及 2 个 Ca²⁺ 结合位点, 导致其在 Ca²⁺ 浓度低和还原性环境中 (如胞浆) 不能正常发挥作用^[25]. 因此, 基于 HRP 的 DAB 染色标记方法在电镜中的应用存在比较大的限制. Alice Ting 实验室为了解决上述缺陷, 曾尝试将 HRP 结构中的二硫键去掉, 使其能够在胞浆和其他亚细胞结构中普遍起作用, 可惜未获得成功^[1]. 此后他们通过调研发现另外一种植物来源的, 且不存在二硫键和 Ca²⁺ 结合位点的过氧化物酶, 即 APX^[27]. 不过, 野生型的 APX 是组成型的同源二聚体, 这可能会影响到相连目的蛋白的定位和功能^[1, 28], 而且其催化活性也弱于 HRP. 因此他们通过对野生型 APX 进行一系列的定点突变, 最终成功地获得了催化活性高、单体性好的 APX 突变体 (K14D、E112K、W41F), 并将其命名为 APEX (enhanced APX). 更重要的是, APEX 可以在几乎所有的细胞结构中保持活性, 所以极大地推动了 DAB 染色标记方法在电镜成像中的应用. 根据所标记的对象我们分别对全细胞的标记、对细胞器的标记和对蛋白质的定位相关的研究进展综述如下.

1.2 APEX 技术介导的电镜成像标记应用进展

1.2.1 全细胞标记

神经元之间连接方式的研究是理解大脑工作原理的基础. 应用电镜三维重构技术可以获得高分辨率和大尺度的样品三维结构^[29], 基于 APEX 技术制备的电镜样品, 在不破坏组织和细胞结构的情况下

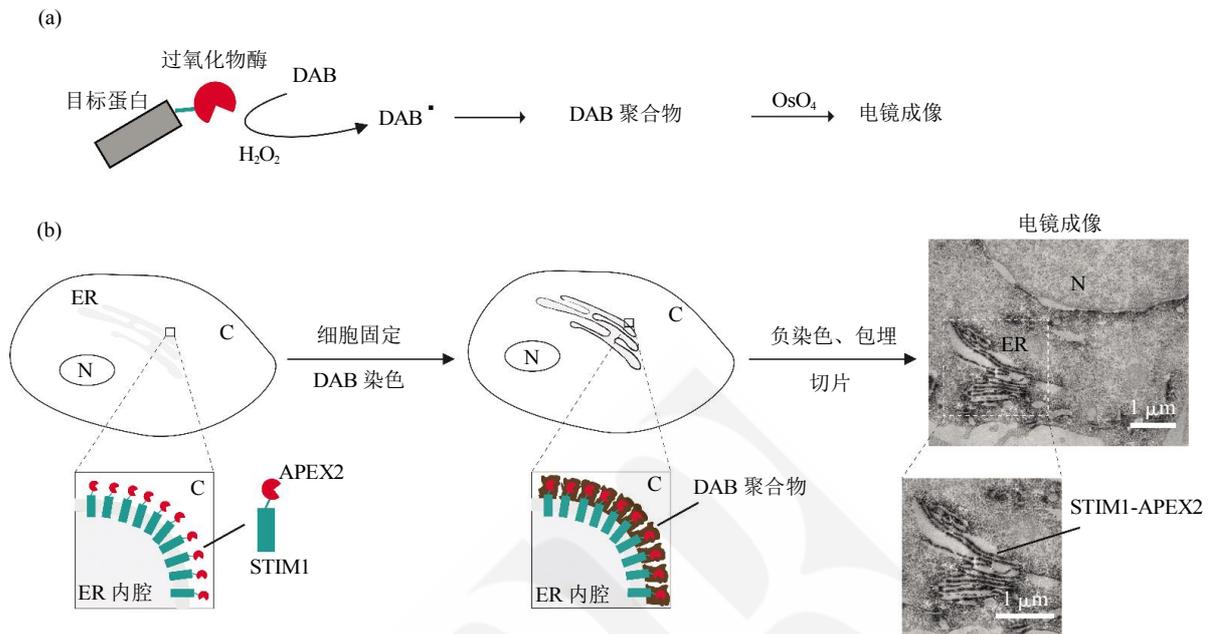


Fig. 1 A schematic diagram and work flow depicting the peroxidase-mediated DAB staining for EM imaging

图 1 过氧化物酶介导的 DAB 染色标记及电镜成像

(a) 基于过氧化物酶的 DAB 染色标记的原理图。(b) APEX2 介导的 DAB 染色标记实现对 STIM1 蛋白的电镜成像(C: 胞浆; N: 细胞核; ER: 内质网; STIM1: CRAC 通道门控蛋白)。

可获得神经元的高清电镜图像。如 Joesch 等^[30]通过在特定神经元中表达 APEX2 并介导 DAB 染色, 先采用低分辨率来快速获得整个组织的全部图像信息, 而后只对具有神经元连接的小范围区域进行高分辨率成像, 用自动分割识别算法重构获得了组织内神经元分布及神经元连接的高清图像。

1.2.2 细胞器标记

和 HRP 相比, APEX 可以用于标记各种细胞器及亚细胞区域, 如线粒体基质、内质网、细胞核、线粒体内外膜区域、中间丝分布区域以及细胞间隙连接等^[1]。基于此优势, Ting 实验室借助基于 APEX 的电镜成像揭示了线粒体内膜上 Ca²⁺ 转运蛋白 MCU(mitochondrial calcium uniporter, MCU)的拓扑学结构。而此前, MCU 在线粒体内膜上的拓扑学结构两个研究组一直存在争论, De Stefani 等^[31]认为 MCU 的 N 端和 C 端朝向线粒体基质, 而 Baughman 等^[32]认为 N 端和 C 端朝向线粒体内外膜之间的空间。Ting 实验室通过将 APEX 分别融合到 MCU 的 N 端和 C 端, 通过 DAB 染色标记和电镜成像, 发现无论 APEX 在 MCU 的 N 端还是 C 端, 线粒体基质中都有很强的 DAB 信号, 这强有

力地说明了 MCU 的 N 端和 C 端均朝向线粒体基质^[1]。这一发现为研究线粒体 MCU 摄取 Ca²⁺ 的分子机制迈出了重要一步^[33]。

除了 Alice Ting 的实验室, 基于 APEX 技术对与亚细胞器相关的研究, 在其他实验室也有不断的文献报道。Zhu 等^[34]利用 APEX 技术标记线粒体, 探究线粒体移植在治疗肺缺氧时导致的高血压的机制。Wong 等^[35]同样用 APEX 技术标记线粒体, 研究高尔基体蛋白(golgens)作为连接蛋白介导膜结构在线粒体周围聚集的机制。Salo 等^[36]利用内质网(ER)蛋白 Hsp47 连接 APEX 以标记 ER 结构, 研究 ER 和脂滴(lipid droplet)膜连接的分子机制。Liu 等^[37]用 APEX2 技术标记酵母高尔基体, 研究 Nvj2p 在形成和促进内质网/高尔基体之间膜连接中的作用。

1.2.3 蛋白质定位

APEX 技术介导的电镜成像除了可以对亚细胞结构进行高分辨成像, 同样也能探究某个蛋白质的定位。作者所在实验室通过将 APEX2 连接到 STIM1 的 C 端实现了对 STIM1 蛋白在 ER 上的定位标记和电镜成像(图 1b)。目前, 基于 APEX 技术

研究蛋白质定位的文献报道也有不少。例如：
a. Marceau 等^[38]将 APEX2 连接到调控登革热病毒 (dengue virus) 复制的关键蛋白 STT3B 上，通过 DAB 标记可以发现 STT3B 定位于 ER 膜上，且在登革热病毒感染的细胞中，STT3B 聚集于登革热病毒诱导的囊泡体周围，直观地揭示了 STT3B 在登革热病毒感染中的作用。
b. Zumthor 等^[40]通过将 APEX2 与网格蛋白 (clathrin) 融合表达在肠兰伯式鞭毛虫细胞 (*giardia lamblia*) 中，发现 clathrin 并没有聚集在新形成的网格蛋白有被小窝 (clathrin coated pit, CCP) 上，而是聚集在细胞膜和内吞囊泡 (peripheral vacuoles) 之间的连接点上。而在经典的 clathrin 介导的内吞中 clathrin 是聚集在 CCP 周围协助 CCP 组装^[39]，Zumthor 等^[40]的这一发现拓展了对 clathrin 的功能以及 clathrin 介导内吞的认识。
c. Shvets 等^[41]将 APEX 连接到细胞膜蛋白 CD9 上，发现除了在陷窝 (caveolae) 的位置，沿着细胞膜有一条清晰的 DAB 信号，直观地展示了 caveolae 对内吞的货物具有高度的选择性。
d. Shi 等^[42]将 APEX2 介导的 DAB 染色标记与 FIB-SEM (focus ion beam scanning electron microscopy, FIB-SEM) 结合，成功获得线粒体动态相关蛋白 (Mif49/51、Mif、Fis1 和 Mfn2) 在细胞中的 3D 定位。

2 APEX 技术在活细胞邻近标记中的应用

2.1 活细胞邻近标记技术简述及 APEX/APEX2 介导的邻近标记原理

活细胞邻近标记技术不仅可以研究蛋白质之间的相互作用，还可以结合质谱技术研究亚细胞结构的蛋白质组，为理解蛋白质分子机制和亚细胞结构的生物学功能提供了强有力的研究手段。最早的邻近标记方法可以追溯到 21 世纪初，当时 van Steensel 等^[43]报道用大肠杆菌 DNA 腺嘌呤甲基化转移酶发展的 DamID 方法，用于探究蛋白质与 DNA 之间的相互作用。此后这种研究思路也推动了蛋白质的邻近标记技术的探索和发展。先于 APEX 技术的活细胞邻近标记方法有两种：基于生物学连接酶 BIA 的邻近标记方法 (BioID 方法) 和基于辣根过氧化物酶的邻近标记方法 (HRP 方法)。BioID 方法是利用经基因工程改造的生物素 (biotin) 连接酶 BirA* 将 biotin 连到相邻蛋白的 Tyr 侧链上^[44-46]实现对邻近蛋白质的 biotin 标记。BioID 方法第一次真正实现在活细胞中探测蛋白质相互作用及亚细胞结构蛋白质组，所以在细胞生物学的不同领域得到

广泛应用^[47]。但该方法标记时间过长 (6~24 h)，因此不能用来研究短时程生物过程中的分子事件。同时，biotin 修饰的蛋白质在细胞中长时间的滞留可能会影响蛋白质功能以及造成细胞毒性。此外，BirA* 催化形成的反应中间体 Biotin-AMP 不是自由基^[46]，其半衰期长达几分钟，这意味着邻近标记的空间范围可能会很大，造成蛋白标记的假阳性比较高^[2, 48]。HRP 方法则是利用 HRP 标记的抗体或者将 HRP 与目的基因融合表达，外源加入 biotin 偶联的芳香叠氮类化合物或者 biotin 偶联的酰胺化合物，在 H₂O₂ 存在的条件下，HRP 催化底物生成的自由基可以与邻近蛋白共价相连从而使这些蛋白带上 biotin 标签^[49-52]。但这个方法也有其局限性：
a. 如前文所述，HRP 结构中含有二硫键，在胞浆和其他还原性环境的亚细胞区域中会失去催化活性，所以它的应用只局限于研究细胞膜外蛋白^[47-48]。
b. HRP 标记的空间范围达到 200~300 nm，最终得到的假阳性结果仍然比较多^[53]。
c. 该技术中使用的酰胺衍生物或者芳香族叠氮化合物生成的自由基可以穿过膜结构，从而造成非特异性标记^[52, 54]。

由于 APEX 可以在所有亚细胞结构和胞浆中保持酶活性，基于 APEX 的邻近标记技术的应用性更为广泛。同时，Ting 实验室还对 biotin 偶联化合物进行了筛选，最终确定生物素酚 (biotin-phenol, BP) 在 APEX 介导的邻近标记中具有很好的效果^[55-56]。如图 2 所示，在 H₂O₂ 存在情况下，APEX/APEX2 催化 BP 生成 biotin 偶联的苯氧自由基，这些自由基可以与相邻蛋白质上电子密度较高的氨基酸如 Tyr、Trp、His 和 Cys 相连 (实验发现 BP 自由基与 Tyr 相连为主) 从而使邻近蛋白带上 biotin 标签。Biotin 修饰的蛋白质通过偶联链霉亲和素 (streptavidin) 的珠子进行亲和富集，富集得到的蛋白质经过 SDS-PAGE 分离，进一步胶内酶解，最后利用质谱技术对 biotin 修饰的蛋白质进行鉴定，得到目标蛋白质的邻近蛋白质组。基于 APEX 技术的邻近标记主要有以下 3 个优点：
a. 苯氧自由基的寿命很短，在 1 ms 以内，所以理论上只能标记空间范围在 20 nm 以内的蛋白，和 HRP 方法相比，极大地降低了假阳性的结果。
b. 自由基的活性很高，反应速度极快，标记反应只需要 1 min，所以无论对于瞬时的生物过程还是长时程的生物过程，APEX 技术都能很好地实现邻近标记^[2, 57]。
c. 由于苯氧自由基不能透膜，所以对于研究具有膜封闭结构的细胞器蛋白质组，APEX

技术具有独特的优势。

目前, 基于 APEX 技术的邻近标记方法不仅成功地应用于离体培养的细胞, 也成功地应用于微生物衣原体^[58]、单细胞生物酵母^[59], 以及多细胞动

物秀丽线虫(*C. elegans*)和果蝇^[59-60]等。下文将主要从两个部分来阐述: a. 亚细胞结构蛋白质组; b. 目的蛋白在特定时空下的相互作用(和邻近)蛋白质组。

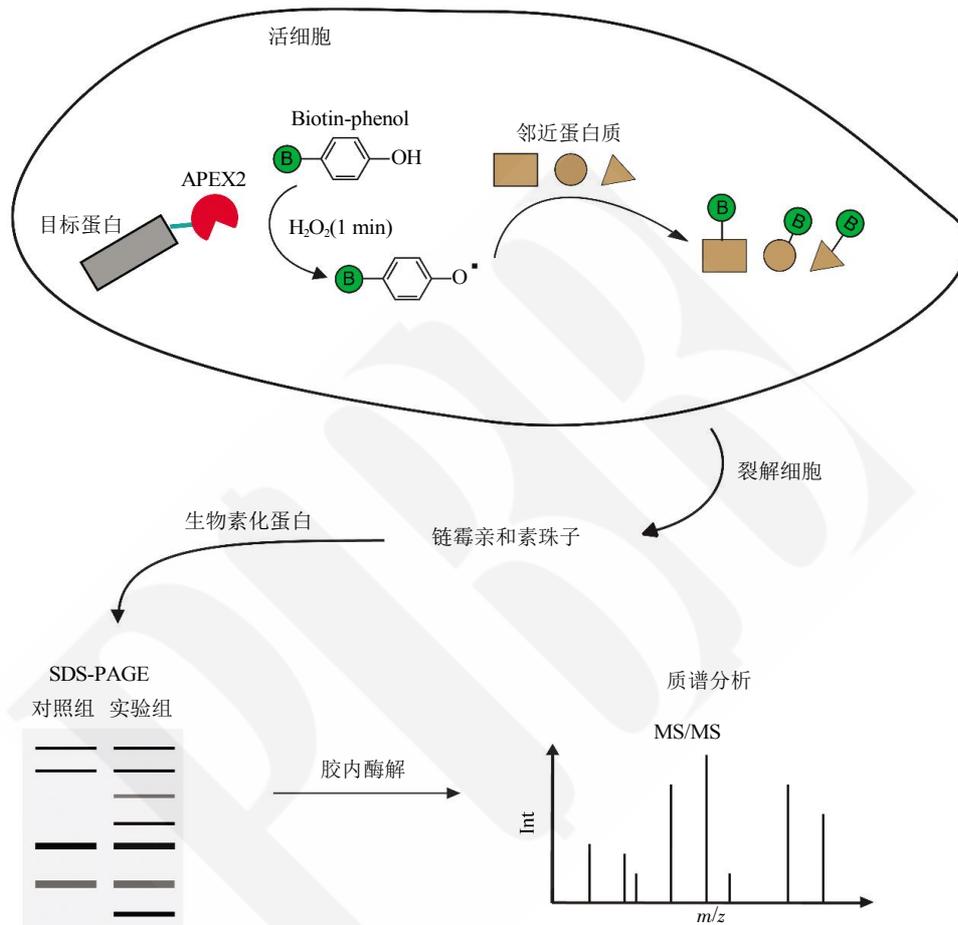


Fig. 2 A schematic diagram depicting the proximity labeling in living cells induced by APEX/APEX2

图2 APEX/APEX2介导活细胞邻近标记的工作模式图

2.2 亚细胞结构蛋白质组鉴定

亚细胞器蛋白质组的常规分析是通过对细胞内的亚细胞器进行预分离, 再进行后续的蛋白质组分析来完成的。常规是亚细胞器分离方法往往需要大量的细胞样品, 而且不同亚细胞器之间组分的交叉污染很难避免, 所以往往无法满足科研需求^[5, 61]。APEX介导的活细胞邻近标记方法的出现, 为亚细胞器蛋白质组学提供了新的研究策略, 克服了常规提纯法的缺点, 极大地推动了该领域的研究发展。自APEX技术报道以来的短短几年中, 已有多篇

基于APEX技术的蛋白质组方面的研究报道, 具体可以分为膜封闭亚细胞结构蛋白质组和非膜封闭亚细胞结构的蛋白质组两大类。

2.2.1 膜封闭亚细胞结构蛋白质组鉴定

对于用APEX技术鉴定膜封闭体系中蛋白质组最早的报道当属Ting实验室对线粒体蛋白质组的研究^[61]。由于前文中对此有描述, 这里不再赘述。而Chen等^[60]将APEX表达于果蝇肌肉细胞的线粒体基质中, 鉴定了果蝇线粒体基质的蛋白成分, 发现69个以前不曾鉴定到的线粒体基质蛋白,

这也是 APEX 技术第一次在多细胞活体动物上的应用. 2017 年, Reinke 等^[62]报道称将 APEX2 分别表达在秀丽线虫(*C. elegans*)的肠细胞、表皮细胞、体壁肌肉细胞和咽部肌肉细胞这 4 种组织的细胞核和胞浆中, 首次在活体动物中系统性鉴定到了具有组织特异性和亚细胞结构特异性的蛋白质组, 为系统研究不同组织蛋白质组提供了非常有价值的数据库.

2.2.2 非膜封闭亚细胞结构蛋白质组鉴定

对于非膜封闭的亚细胞结构蛋白质组的鉴定, 主要的研究思路为, APEX/APEX2 通过融合蛋白的方式特异地表达在相应的亚细胞结构中, 同时要设计合理的对照, 来排除敞开体系中由于 biotin 偶联的苯氧自由基的自由扩散, 或者蛋白质的自由流动而被随机标记的蛋白, 降低假阳性结果.

Ting 实验室用 APEX 邻近标记方法结合定量蛋白质组技术, 鉴定了完全敞开体系 ER 外膜和线粒体外膜蛋白^[63], 他们鉴定到 137 个线粒体外膜蛋白, 其中 86% 是以前已知线粒体外膜蛋白, 而剩下的 16% 是新发现的线粒体外膜蛋白. 以及鉴定到 634 个 ER 外膜蛋白, 其中 89% 是以前已知的, 11% 是新发现的内质网外膜蛋白, 通过比较分析 ER 外膜的蛋白质组和线粒体外膜的蛋白质组, 找到了 94 个在两者中均有分布的蛋白质, 即这些蛋白质可能是分布于 ER 和线粒体接触点上. 他们选取其中的 SYNJ2BP 做了进一步验证, 发现 SYNJ2BP 过表达时会增加线粒体和 ER 的接触, 说明 SYNJ2BP 确实在 ER 和线粒体接触位点的形成中发挥作用. 这项研究工作很好地展示了 APEX 技术鉴定完全敞开体系亚细胞结构蛋白质组的能力.

Mick 等^[64-65]将 APEX 与纤毛区聚集蛋白 NPHP3(1-203)融合表达来鉴定纤毛相关蛋白. 由于纤毛是一个非膜封闭的体系, 作者在对照组细胞中表达一种丧失了鞭毛区定位功能的 NPHP3(1-203)突变体, 并使其融合表达 APEX. 最终他们鉴定到 622 个鞭毛相关蛋白, 其中包括很多已知的鞭毛蛋白, 也包括很多以前未知的鞭毛蛋白如 SKA 复合物、四次穿膜蛋白(tetraspanins)等, 并免疫荧光实验确认了这些蛋白质确实分布于鞭毛区. 此外, 他们用基于 APEX 的邻近标记技术发现跟野生型相比, 在一种导致 BBSome 在纤毛中异常聚集的突变体 *Irf27*^{-/-} 中有 57 个蛋白质的含量产生了明显的变化, 并通过后续验证发现这 57 个蛋白质中的 CAR 和 b-arrestin2 是 BBSome 的潜在受体, 这为研究 BBSome 和 BBSome 异常导致的诸多疾病提

供了基础信息.

2.3 时空相互作用(和邻近)蛋白质组鉴定

基于苯氧自由基作用半径小、半衰期短的特点, 使得利用 APEX 技术探究某一目的蛋白时空相互作用(和邻近)蛋白质组成为可能, 2017 年相继报道的几篇研究工作也成功地验证了这一点.

Chung 等^[66]在 2017 年 2 月报道用 APEX 技术鉴定与 α 突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)相互作用(和邻近)的蛋白质. α -synuclein (α -syn)是神经细胞富含的蛋白, 参与突出囊泡的形成和转运, 但它在神经元中的异常聚集是引起共核蛋白病如帕金森病的关键因子^[67-68]. 他们通过 APEX 技术鉴定到与 α -syn 相关的 225 个蛋白, 其中不仅包括内吞及囊泡转运相关蛋白, 也包括很多 mRNA 结合蛋白以及蛋白质合成的相关蛋白, 在全细胞水平上系统地揭示了 α -syn 在神经细胞中异常聚集可能是由多种因素造成的^[66].

2017 年 4 月《细胞》(*Cell*)同期刊登两篇文章, 报道了基于 APEX 邻近标记技术在时间和空间尺度上开展的 GPCR 信号传导分子机制的研究工作^[69-70], 这无疑成为目前为止 APEX 邻近标记技术最耀眼的应用研究成果. GPCR 是人类最大膜蛋白家族, 在人类很多生理过程中都起到重要作用, 也是最广泛使用的药物靶点. 但 GPCR 信号通路的分子机制研究是生命科学领域的最具挑战性的难题之一, 主要因为其信号传递是时间依赖的, 且高度复杂的动态过程, 即在配体刺激下 GPCR 在亚秒时间内激活 G 蛋白, 进而触发下游的磷酸化事件, 募集 β 拘留蛋白(β -arrestins), 而后其在网格蛋白(clathrin)等蛋白协助下被内吞进入核内体(endosome)进而向下游转运等^[71-72]. 由于之前缺乏系统性的研究手段, 限制了对这一高度复杂过程分子机制的认识, 而基于 APEX 的邻近标记技术为打破这种限制提供了可能. Lobingier 等^[69]利用 APEX 邻近标记技术结合定量质谱方法鉴定了在配体刺激的不同时间点, GPCR 信号传导和内吞各阶段的标志蛋白 arrestin3、CLTC、VPS35、VTI1B/EEA1、RDX/OCLN 含量的变化, 揭示了 GPCR 随配体刺激空间变化的信息. 他们还通过将经典的 GPCR 蛋白 B2AR 与 APEX2 融合表达, 同时设计严密的对照实验——在胞浆、细胞膜胞浆侧和 endosome 膜上表达 APEX2, 制定了一套定量鉴定 GPCR 时空特异性相互作用蛋白的方法. 他们以一种人们不太熟知的 GPCR 蛋白 DOR 为研究对象,

研究在配体刺激的不同时间点(1、3、10、30 min)与其相互作用的蛋白质组, 通过一系列的数据筛选, 最终鉴定到 29 个高度可信的参与 DOR 信号传递的蛋白, 其中包括 2 个泛素化相关蛋白 WWP2 和 TOM1, 并通过功能实验验证了 WWP2 和 TOM1 确实参与 DOR 的降解. Paek 等^[70]则利用类似的研究策略在更高的时间分辨率(10 s)下, 定量分析了不同配体刺激时与 GPCR 蛋白 AT1R 和 B2AR 相互作用(和邻近)的蛋白质, 以及它们随配体刺激时间长短发生的定量变化, 揭示了其信号传递和 GPCR 内吞的时空过程及分子机制, 也揭示了这两种 GPCR 蛋白在配体刺激时信号传递和内吞机制的差异. 这两篇文章虽然方法各异侧重点不同, 但共同展示了 APEX 技术在探索动态生物过程时空特异性的分子机制方面的强大能力^[73].

3 讨论与展望

本文重点综述了 APEX 技术的发展历程, 及其在基于 DAB 染色标记的电镜成像和活细胞邻近标记的研究应用, 展示了它在生命科学研究领域巨大的应用前景. 此外, 近年来基于 APEX 技术衍生发展出来的新技术和新方法也是非常值得关注的. Xue 等^[73]基于完整 APEX2 发展出一种蛋白质片段互补(protein-fragment complementation)技术, 用来在活细胞中研究蛋白质相互作用及鉴定相互作用位点; Ariotti 等^[74]将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)结合肽(GBP)与 APEX2 融合表达(APEX2-GBP), 成功实现了对 GFP 标记的蛋白质的光电联合成像, 并展示了此方法适用于现代的三维成像技术.

自 APEX 技术被报道以来, 作者所在实验室就一直关注该技术的应用和发展. 这里, 结合文献报道以及本实验室在 APEX 技术实际应用中得到的经验和教训, 总结如下: a. 基于 APEX/APEX2 的 DAB 染色标记, 都依赖于 DAB 的氧化, 这影响了这一标记方法的定位精度, 同时也只能用于常规固定的样品. b. 与融合表达荧光蛋白类似, 融合表达 APEX/APEX2 也存在目的蛋白定位不正确的情况, 造成假阳性结果, 因此, 设置合适的阳性或阴性对照是至关重要的. c. APEX/APEX2 催化反应依赖于血红素(heme), 所以在血红素缺乏的环境中 APEX/APEX2 无法发挥催化功能. d. 邻近标记反应中, 如果蛋白质缺少暴露在表面的可以被生物素标记的氨基酸, 或者某些蛋白被包裹在大的分

子复合体中, 会导致邻近标记实验失败, 间接产生假阴性结果. e. 尽管 APEX/APEX2 介导的邻近标记范围只有 20 nm, 仍存在引入假阳性相互作用蛋白的可能性. 因此, 需要设计合理的对照组, 来排除那些与目的蛋白空间距离上邻近但非相互作用的蛋白质. 同时, 如果目的蛋白定位信息不明确, 直接使用基于 APEX 技术的邻近标记方法是非常冒险的^[2, 22, 75-76]. 随着今后对现有 APEX 技术局限性不断地改进和发展, 该技术的应用前景将更加巨大.

综上所述, APEX 技术的开发不仅拓展了 DAB 染色标记方法在电镜成像领域的应用, 同时也为在活细胞体系中探索亚细胞器的生物学功能以及研究时空蛋白质组学提供了强有力的新工具.

参 考 文 献

- [1] Martell J D, Deerinck T J, Sancak Y, *et al.* Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nature Biotechnology*, 2012, **30**(11): 1143-1148
- [2] 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**(6125): 1328-1331
- [3] Pagliarini D J, Rutter J. Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes & Development*, 2013, **27**(24): 2615-2627
- [4] Lam S S, Martell J D, Kamer K J, *et al.* Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature Methods*, 2015, **12**(1): 51-54
- [5] Marx V. Mapping proteins with spatial proteomics. *Nat Methods*, 2015, **12**(9): 815-819
- [6] Faulk W P, Taylor G M. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*, 1971, **8**(11): 1081-1083
- [7] Graham R C, Jr., Karnovsky M J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*, 1966, **14**(4): 291-302
- [8] Mercogliano C P, Derosier D J. Gold nanocluster formation using metallothionein: mass spectrometry and electron microscopy. *J Mol Biol*, 2006, **355**(2): 211-223
- [9] Mercogliano C P, Derosier D J. Concatenated metallothionein as a clonable gold label for electron microscopy. *J Struct Biol*, 2007, **160**(1): 70-82
- [10] Osborn M, Webster R E, Weber K. Individual microtubules viewed by immunofluorescence and electron-microscopy in same Ptk2 cell. *J Cell Biol*, 1978, **77**(3): R27-R34
- [11] Ou H D, Phan S, Deerinck T J, *et al.* ChromEMT: visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science*, 2017, **357**(6349): eaag0025
- [12] Wang Q, Mercogliano C P, Lowe J. A ferritin-based label for cellular electron cryotomography. *Structure*, 2011, **19**(2): 147-154
- [13] Sartori A, Gatz R, Beck F, *et al.* Correlative microscopy: bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron

- tomography. *J Struct Biol*, 2007, **160**(2): 135–145
- [14] Chang Y W, Chen S, Tocheva E I, *et al.* Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography. *Nat Methods*, 2014, **11**(7): 737–739
- [15] Liu B, Xue Y, Zhao W, *et al.* Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context. *Sci Rep*, 2015, **5**: 13017
- [16] Ngo J T, Adams S R, Deerinck T J, *et al.* Click-EM for imaging metabolically tagged nonprotein biomolecules. *Nat Chem Biol*, 2016, **12**(6): 459–465
- [17] Ruiz-Gonzalez R, Cortajarena A L, Mejias S H, *et al.* Singlet oxygen generation by the genetically encoded tag miniSOG. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**(26): 9564–9567
- [18] Pimenta F M, Jensen R L, Breitenbach T, *et al.* Oxygen-dependent photochemistry and photophysics of "MiniSOG," a protein-encased flavin. *Photochem Photobiol*, 2013, **89**(5): 1116–1126
- [19] Shu X K, Lev-Ram V, Deerinck T J, *et al.* A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *Plos Biology*, 2011, **9**(4): e1001041
- [20] Gaietta G, Deerinck T J, Adams S R, *et al.* Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science*, 2002, **296**(5567): 503–507
- [21] Gaietta G M, Giepmans B N G, Deerinck T J, *et al.* Golgi twins in late mitosis revealed by genetically encoded tags for live cell imaging and correlated electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci UAS*, 2006, **103**(47): 17777–17782
- [22] Liss V, Barlag B, Nietschke M, *et al.* Self-labelling enzymes as universal tags for fluorescence microscopy, super-resolution microscopy and electron microscopy. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 11740
- [23] Porstmann B, Porstmann T, Nügel E, *et al.* Which of the commonly used marker enzymes gives the best results in colorimetric and fluorimetric enzyme immunoassays - horseradish-peroxidase, alkaline-phosphatase or beta-galactosidase. *J Immunol Methods*, 1985, **79**(1): 27–37
- [24] Connolly C N, Futter C E, Gibson A, *et al.* Transport into and out of the Golgi-complex studied by transfecting cells with cdnas encoding horseradish-peroxidase. *Journal of Cell Biology*, 1994, **127**(3): 641–652
- [25] Hopkins C, Gibson A, Stinchcombe J, *et al.* Chimeric molecules employing horseradish peroxidase as reporter enzyme for protein localization in the electron microscope. *Method Enzymol*, 2000, **327**: 35–45
- [26] Graham R C, Karnovsk.Mj. Early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in proximal tubules of mouse kidney - ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*, 1966, **14**(4): 291–302
- [27] Patterson W R, Poulos T L. Crystal-structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry*, 1995, **34**(13): 4331–4341
- [28] Mandelman D, Schwarz F P, Li H Y, *et al.* The role of quaternary interactions on the stability and activity of ascorbate peroxidase. *Protein Sci*, 1998, **7**(10): 2089–2098
- [29] Morgan J L, Berger D R, Wetzel A W, *et al.* The fuzzy logic of network connectivity in mouse visual thalamus. *Cell*, 2016, **165**(1): 192–206
- [30] Joesch M, Mankus D, Yamagata M, *et al.* Reconstruction of genetically identified neurons imaged by serial-section electron microscopy. *Elife*, 2016, **5**: e15015
- [31] De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, *et al.* A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 2011, **476**(7360): 336–U104
- [32] Baughman J M, Perocchi F, Girgis H S, *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 2011, **476**(7360): 341–U111
- [33] Mammucari C, Gherardi G, Rizzuto R. Structure, activity regulation, and role of the mitochondrial calcium uniporter in health and disease. *Frontiers in Oncology*, 2017, **7**: 139
- [34] Zhu L P, Zhang J W, Zhou J, *et al.* Mitochondrial transplantation attenuates hypoxic pulmonary hypertension. *Oncotarget*, 2016, **7**(31): 48925–48940
- [35] Wong M, Munro S. The specificity of vesicle traffic to the Golgi is encoded in the golgin coiled-coil proteins. *Science*, 2014, **346**(6209): 1256898
- [36] Salo V T, Belevich I, Li S Q, *et al.* Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery. *Embo Journal*, 2016, **35** (24): 2699–2716
- [37] Liu L K, Choudhary V, Toulmay A, *et al.* An inducible ER-Golgi tether facilitates ceramide transport to alleviate lipotoxicity. *The Journal of Cell Biology*, 2017, **216**(1): 131–147
- [38] Marceau C D, Puschnik A S, Majzoub K, *et al.* Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens. *Nature*, 2016, **535**(7610): 159–163
- [39] McMahon H T, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, **12**(8): 517–533
- [40] Zumthor J P, Cernikova L, Rout S, *et al.* Static clathrin assemblies at the peripheral vacuole-plasma membrane interface of the parasitic protozoan giardia lamblia. *Plos Pathog*, 2016, **12** (7): e1005756
- [41] Shvets E, Bitsikas V, Howard G, *et al.* Dynamic caveolae exclude bulk membrane proteins and are required for sorting of excess glycosphingolipids. *Nature Communications*, 2015, **6**: 6867
- [42] Shi Y, Wang L, Zhang J, *et al.* Determining the target protein localization in 3D using the combination of FIB-SEM and APEX2. *Biophys Rep*, 2017, **3**(4): 92–99
- [43] Van Steensel B, Delrow J, Henikoff S. Chromatin profiling using targeted DNA adenine methyltransferase. *Nat Genet*, 2001, **27**(3): 304–308
- [44] Roux K J, Kim D I, Raida M, *et al.* A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 2012, **196**(6): 801–810
- [45] Kim D I, Birendra K C, Zhu W H, *et al.* Probing nuclear pore

- complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(24): E2453–E2461
- [46] Choi-Rhee E, Schulman H, Cronan J E. Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Sci*, 2004, **13**(11): 3043–3050
- [47] Kim D I, Roux K J. Filling the void: proximity-based labeling of proteins in living cells. *Trends in Cell Biology*, 2016, **26** (11): 804–817
- [48] Rees J S, Li X W, Perrett S, *et al.* Protein neighbors and proximity proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2015, **14**(11): 2848–2856
- [49] Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N, Honke K. Expressed glycosylphosphatidylinositol-anchored horseradish peroxidase identifies co-clustering molecules in individual lipid raft domains. *Plos One*, 2014, **9**(3): e93054
- [50] Jiang S, Kotani N, Ohnishi T, *et al.* A proteomics approach to the cell-surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction. *Proteomics*, 2012, **12**(1): 54–62
- [51] Rees J S, Li X W, Perrett S, *et al.* Selective proteomic proximity labeling assay using tyramide (SPPLAT): a quantitative method for the proteomic analysis of localized membrane-bound protein clusters. *Current Protocols in Protein Science*, 2015, **80** (19.27): 11–18
- [52] 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(21): 14434–14447
- [53] 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**(21): 7405–7409
- [54] Honke K, Kotani N. The enzyme-mediated activation of radical source reaction: a new approach to identify partners of a given molecule in membrane microdomains. *Journal of Neurochemistry*, 2011, **116**(5): 690–695
- [55] Mayer G, Bendayan M. Biotinyl-tyramide: A novel approach for electron microscopic immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*, 1997, **45**(11): 1449–1454.
- [56] Tyurin V A, Carta G, Tyurina Y Y, *et al.* Peroxidase-catalyzed oxidation of beta-carotene in HL-60 cells and in model systems: involvement of phenoxy radicals. *Lipids*, 1997, **32**(2): 131–142
- [57] Hung V, Udeshi N D, Lam S S, *et al.* Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nature Protocols*, 2016, **11**(3): 456–475.
- [58] Rucks E A, Olson M G, Jorgenson L M, *et al.* Development of a proximity labeling system to map the chlamydia trachomatis inclusion membrane. *Front Cell Infect Mi*, 2017, **7**: 40
- [59] Hwang J, Espenshade P J. Proximity-dependent biotin labelling in yeast using the engineered ascorbate peroxidase APEX2. *Biochem J*, 2016, **473**(16): 2463–2469
- [60] Chen C L, Hu Y H, Udeshi N D, *et al.* Proteomic mapping in live *Drosophila* tissues using an engineered ascorbate peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(39): 12093–12098
- [61] Hung V, Zou P, Rhee H W, *et al.* Proteomic mapping of the human mitochondrial intermembrane space in live cells *via* ratiometric APEX tagging. *Molecular Cell*, 2014, **55**(2): 332–341
- [62] Reinke A W, Mak R, Troemel E R, *et al.* *In vivo* mapping of tissue- and subcellular-specific proteomes in *Caenorhabditis elegans*. *Science Advances*, 2017, **3**(5): e1602426
- [63] 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. *Elife*, 2017, **6**: e24463
- [64] Mick D U, Rodrigues R B, Leib R D, *et al.* Proteomics of primary cilia by proximity labeling. *Developmental Cell*, 2015, **35** (4): 497–512
- [65] Forsythe E, Beales P L. Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2013, **21**(1): 8–13
- [66] Chung C Y, Khurana V, Yi S, *et al.* *In situ* peroxidase labeling and mass-spectrometry connects alpha-synuclein directly to endocytic trafficking and mRNA metabolism in neurons. *Cell Systems*, 2017, **4**(2): 242–250
- [67] Goedert M, Spillantini M G, Del Tredici K, *et al.* 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol*, 2013, **9**(1): 13–24
- [68] Auluck P K, Caraveo G, Lindquist S. Alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in parkinson's disease. *Annu Rev Cell Dev Bi*, 2010, **26**: 211–233
- [69] Lobingier B T, Huttenhain R, Eichel K, *et al.* An approach to spatiotemporally resolve protein interaction networks in living cells. *Cell*, 2017, **169**(2): 350–360
- [70] Paek J, Kalocsay M, Staus D P, *et al.* Multidimensional tracking of GPCR signaling *via* peroxidase-catalyzed proximity labeling. *Cell*, 2017, **169**(2): 338–349
- [71] Lefkowitz R J. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Edit*, 2013, **52**(25): 6366–6378
- [72] Lohse M J, Hein P, Hoffmann C, *et al.* Kinetics of G-protein-coupled receptor signals in intact cells. *Brit J Pharmacol*, 2008, **153**(S1): S125–S132
- [73] 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**(1): 12039
- [74] Ariotti N, Hall T E, Parton R G. Correlative light and electron microscopic detection of GFP-labeled proteins using modular APEX. *Methods in Cell Biology*, 2017, **140**: 105–121
- [75] Hadley K C, Rakhit R, Guo H B, *et al.* Determining composition of micron-scale protein deposits in neurodegenerative disease by spatially targeted optical microproteomics. *Elife*, 2015, **4**: e09579
- [76] Zhu. X, Li. M, Xu. X, *et al.* hTAC internalizes *via* both clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis in mammalian cells. *Protein & Cell*, 2018[Epub ahead of print](DOI: 10.1007/S 13238-018-0508-9)

Advances in Applications of Ascorbate Peroxidase in Electron Microscope Imaging and Proximity Labeling in Live Cells*

XU Xiao-Jun^{1)**}, ZHU Xin-Yu^{1)**}, ZHANG Rui^{2)**}, XUE Yan-Hong²⁾,
LI Zhen-Zhen³⁾, SONG E-Li²⁾, HOU Jun-Jie^{2)***}

¹⁾ College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

²⁾ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

³⁾ Nephrology Department, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract The engineered ascorbate peroxidase (APEX) developed by Alice Ting laboratory, compared with classical horse radish peroxidase (HRP), can keep active within all cellular compartments, so it has great potential as a tool for studying the fusion proteins in both subcellular organelles and live cells. Up to now, diaminobenzidine staining based on APEX tag has been successfully developed for electron microscopy (EM) in whole cells, subcellular organelles and proteins. Moreover, combined with mass spectrometry technique, APEX-mediated proximity biotin labeling in living cells greatly promoted the study of subcellular organelle proteomics and temporal-spatial proteomics. This review focused on the principle of APEX methodology, summarized its latest applications including EM imaging and spatial proteomics, and discussed its limitations and challenges as well.

Key words APEX, diaminobenzidine (DAB) staining, electron microscope, proximity labeling, proteome, protein interaction

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0362

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31770891, 31400703, 31770900).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-10-64888524, E-mail: houjunjie@moon.ibp.ac.cn

Received: January 15, 2018 Accepted: February 10, 2018