





# 论文题目: DDX21 蛋白的相分离机制研究

- 姓 名:侯明林 学 号: 20307110014
- 院 系: 生命科学学院
- 专 业: 生物科学
- 指导教师:陈玲玲 职 称:研究员
- 单 位:中国科学院分子细胞科学卓越创新中心
- 完成日期: 2024 年 5 月 18 日

# DDX21 蛋白的相分离机制研究

完成人 侯明林

指导小组成员

陈玲玲 研究员

目	录

摘要	ī	I
Abs	tract	ΞΠ
─`,	前	言······1
	1.1	研究背景
	2.1	立项依据与研究内容
<u> </u>	材料	科与方法4
	2.1	实验材料
		2.1.1 载体和感受态菌种 ••••••• 4
		2.1.2 细胞系
	2.2	实验仪器
	2.3	实验所用软件与在线数据库
	2.4	实验试剂与耗材 5
		2.4.1 化学试剂 5
		2.4.1.1 固体试剂 5
		2.4.1.2 液体试剂
		2.4.2 试剂盒
		2.4.3 酶与抗体
		2.4.4 引物
		2.4.5 其他实验用品与耗材 8

	2.4.6 实验相关培养基与缓冲液 9
2.5	实验方法
	2.5.1 载体构建
	2.5.1.1 PCR
	2.5.1.2 载体酶切
	2.5.1.3 琼脂糖凝胶电泳与胶回收
	2.5.1.4 同源重组
	2.5.1.5 感受态转化
	2.5.1.6 复苏与平板涂布
	2.5.1.7 单克隆菌落挑选
	2.5.1.8 质粒抽提
	2.5.2 蛋白纯化
	2.5.2 蛋白纯化
	<ul> <li>2.5.2 蛋白纯化</li></ul>
	<ul> <li>2.5.2 蛋白纯化</li></ul>
	<ul> <li>2.5.2 蛋白纯化</li></ul>
	<ul> <li>2.5.2蛋白纯化</li></ul>
	<ul> <li>2.5.2蛋白纯化</li></ul>
	<ul> <li>2.5.2蛋白纯化</li></ul>
	<ul> <li>2.5.2 蛋白纯化</li></ul>
	<ul> <li>2.5.2蛋白纯化</li></ul>

2.5.2.11 BSA 定量目的蛋白浓度
2.5.3 Western Blot
2.5.4 DNA 酶、RNA 酶、蛋白酶 K 消化后琼脂糖凝胶电泳18
2.5.4.1 DNA 酶与 RNA 酶消化
2.5.4.2 蛋白酶 K 消化
2.5.4.3 琼脂糖凝胶电泳
2.5.5 细胞转染
三、研究结果······20
3.1 DDX21 蛋白特征分析 •••••• 20
3.1.1 DDX21 蛋白结构域分析与三维结构预测
3.1.2 DDX21 蛋白内在无序区域 (IDRs) 预测
3.2 体外纯化的 DDX21 蛋白的两个峰值核酸含量差异显著 ······23
3.2.1 凝胶电泳检验 DDX21 蛋白两个峰值核酸含量
3.2.2 DNA 与 RNA 酶处理探究 DDX21 蛋白结合核酸类型25
3.2.3 核酸含量显著影响 DDX21 相分离形态
3.3 N端与C端不同 IDRs 序列对 DDX21 相分离的影响
3.3.1 DDX21 N 端与 C 端截短体蛋白纯化
3.3.2 DDX21 N 端与 C 端截短体蛋白的相分离形态差异 28
3.4 DDX21 蛋白体内亚细胞定位受 N 端与 C 端 IDRs 影响 31
四、讨论33
参考文献 ····································
致谢 ····································

# 摘要

DDX21 (DExD-box helicase 21) 作为一种 DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) RNA 解旋酶,与rDNA (ribosomal DNA) 的转录,DNA 损伤修复以及 RNA 代谢紧密 联系。前期研究发现 *SLERT* (snoRNA-ended lncRNA enhances pre-ribosomal RNA transcription) 通过调控 DDX21 的构象变化和相分离进而调控 Pol I (RNA polymerase I) 对 rDNA 的转录。但 DDX21 的相分离机制及其形态变化仍然有待 深入探究。

我们通过对其结构域、三维结构和 IDRs (intrinsically disordered regions)序 列的分析,将研究聚焦于核酸与 IDRs 序列对 DDX21 相分离的影响。通过构建 多种不同的 DDX21 截短体,并且结合一系列体内外生化实验,我们发现核酸 与 N 端 IDR 序列促使 DDX21 蛋白形成高聚化形态,而其 C 端 IDR 序列促使 DDX21 形成液滴状形态并帮助 DDX21 定位在核仁的 FC (Fibrillar Center) 区域 外。

我们的研究有助于深入理解核酸与不同的 IDRs 对 DDX21 蛋白相分离的影响,为后续深入研究 DDX21 为核仁组织架构的形成与稳定,rDNA 的转录与 pre-rRNA 加工剪切奠定了研究基础。

L

关键词: DDX21,相分离,核酸, IDRs

# Abstract

DDX21 (DExD-box helicase 21), functioning as a DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) RNA helicase, is associated with rDNA (ribosomal DNA) transcription, DNA damage repair and RNA metabolism. The earlier studies revealed that *SLERT* (snoRNA-ended lncRNA enhances pre-ribosomal RNA transcription) modulates Pol I (RNA polymerase I) transcription of rDNA by regulating the conformational changes and phase separation behaviors of DDX21. However, the phase separation mechanism of DDX21 and its morphological changes remain to be further investigated.

Through analysis of its sequence domains, three-dimensional structure, and IDRs (intrinsically disordered regions), our research focuses on the impact of nucleic acids and IDRs sequences on the phase separation behaviors of DDX21. By constructing various DDX21 truncations and combining in vitro biochemical assay and in vivo assay, we uncovered that nucleic acids and the N-terminal IDR promote the formation of DDX21 protein into a highly polymerized state, while the C-terminal IDR facilitates the formation of DDX21 into droplet-like morphology and assists DDX21 in locating outside the FC (Fibrillar Center) region of the nucleolus.

Our research contributed to deeply understanding the influences of nucleic acids and IDRs types on the phase separation behaviors of DDX21. Our research lays the foundation for further investigation of the role of DDX21 in the formation and stabilization of nucleolar architecture, rDNA transcription and pre-rRNA processing.

Key words: DDX21, phase separation, nucleic acids, IDRs

# 一、前言

#### 1.1 研究背景

实验室前期研究使用 non-poly (A) 富集的 RNA 建库测序方法<sup>[1]</sup>发现了一类 具有 snoRNA (small nucleolar RNAs, snoRNA) 末端的 lncRNA (Long non-coding RNA), 即为 sno-lncRNA<sup>[2]</sup>, sno-lncRNA 这类非编码 RNA 往往来源于含有两个 snoRNA 序列的内含子,当该类内含子发生剪切时,易于形成衍生的 snolncRNA<sup>[3]</sup>。也由于其两端 snoRNA 的保护, sno-lncRNA 尽管没有 5' m7G (N7methylated guanosine) cap 与 3'-poly (A) 尾巴结构,也可以在细胞内较为稳定的存 在而不被快速降解。

*SLERT* (snoRNA-ended lncRNA enhances pre-ribosomal RNA transcription), 是一种两端为 box H/ACA snoRNA 的 sno-lncRNA,其通过与 RNA 解旋酶 DDX21 (DExD-box helicase 21) 的结合,使得 DDX21 发生构象变换,进而影响 了 DDX21 与 Pol I (RNA polymerase I) 的结合,从而实现了对 rDNA (ribosomal DNA) 转录效率的调控<sup>[4]</sup>。同时,研究发现 *SLERT* 通过影响 DDX21 的在细胞核 仁内的相分离状态,影响了核仁中 rDNA 所在的 FC (Fibrillar Center) 区域的大 小和流动性,影响了 rDNA 的转录,反应了 DDX21 的不同构象变化与其相分离 状态密切相关,最终调控了 rDNA 的转录过程<sup>[5]</sup>。

DDX21 是一种具有 DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) 的 RNA 解旋酶,属于 2 型解旋酶超家族,具有 ATP 酶活性和 RNA 解旋酶活性<sup>[6]</sup>。尽管已有对其解旋酶 核心区域的结构解析<sup>[7]</sup>,但尚未有对于 DDX21 蛋白全长的结构解析。研究发现,DDX21 作为一种与 rRNA 转录密切相关的 RNA 解旋酶<sup>[4,8]</sup>,广泛的参与多种生 物学过程,与基因组稳定性维持<sup>[6,9]</sup>,DNA 损伤修复<sup>[10,11]</sup>,胚胎发育<sup>[12,13]</sup>,含 有 RNA 的无膜细胞器的液液相分离<sup>[14]</sup>,RNA 加工与代谢<sup>[15,16]</sup>均联系紧密。此 外,DDX21 也与许多严重疾病的发生发展密切相关,其与病毒感染相关的先天 免疫联系紧密<sup>[17-19]</sup>,同时其功能紊乱往往导致癌症尤其是结直肠癌的发生<sup>[20,21]</sup>,这也使其可以作为结直肠癌的生物标志物<sup>[22,23]</sup>,乃至多种癌症的生物标志物<sup>[24]</sup>。

DDX21 多样且重要的生物功能使得对其功能的研究尤为重要,而实验室前 期研究深入解析了 DDX21 与 rDNA 转录调控之间的联系,但是对于 DDX21 蛋 白本身如何通过相分离过程参与到这一事件的调控目前仍认识不足<sup>[4,5]</sup>。相分离 作为经典的物理化学概念,其在生物领域内被用于解释许多生物过程现象源于 对秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*)的 P 颗粒 (P granules)的研究<sup>[25]</sup>,而后随着研究的 不断深入,人们逐渐发现相分离现象与转录调控<sup>[26]</sup>、无膜细胞器形成<sup>[27]</sup>以及核 仁的组织形成<sup>[28]</sup>等生物过程紧密相关。细胞借助相分离形成的无膜细胞器作为 不同隔室帮助细胞高效进行多种不同生化反应而不必完全依赖于脂质膜结构的 区分<sup>[29]</sup>,而具有内在无序区域 (intrinsically disordered regions, IDRs) 的蛋白往往 易于发生相分离<sup>[30]</sup>。

#### 1.2 立题依据与研究内容

在前期研究当中,我们发现 DDX21 在体外纯化过程中,进行分子排阻色 谱时,DDX21 将会出现两个出峰位置不同的峰,两个出峰位置不同的紫外吸收 峰均为 DDX21 蛋白,但其相分离形态明显不同。





图 1. 体外纯化 DDX21 时的两个紫外吸收峰及其不同相分离形态 A 体外纯化蛋白 DDX21 进行分子排阻色谱时的两个不同出峰位置的紫外吸收峰。B 负 染电镜下观察图 1 A 中所示 DDX21 的 P1 和 P2 蛋白。C 体外纯化蛋白 EGFP-DDX21 进行分子排阻色谱时的两个不同出峰位置的紫外吸收峰。D 宽场显微镜下观察图 1 C 中所示 EGFP-DDX21 的 P1 和 P2 蛋白。E 不同浓度下 EGFP-DDX21 的 P1 与 P2 的相 分离形态。

因而在后续的研究中,我们将聚焦于研究 DDX21 体外纯化过程中出现两 个紫外吸收峰的原因及其相分离机制,以期阐释 DDX21 的相分离发生的原因 与具体机制。

# 二、材料与方法

#### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 载体和感受态菌种

空载载体: pET-28a、pEGFP-C1。

#### 感受态菌种

Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell;

基因型: F<sup>-</sup> $\varphi$ 80(*lacZ*) $\Delta$ M15 $\Delta$ *lacX*74*hsd*R(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) $\Delta$ recA1398endA1tonA, 公

司: TransGen Biotech; 货号: CD501。

Rosetta(DE3) Chemically Competent Cell;

基因型: FompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm(DE3) pRARE(argU, argW, ilex, glyT,

*leuW*, *proL*)(Cam<sup>R</sup>),公司:唯地生物;货号:EC1010。

#### 2.1.2 细胞系

实验所用 HeLa 细胞系, 购自 ATCC 公司。

#### 2.2 实验仪器

BIO-RAD T100<sup>™</sup> PCR 仪, BIO-RAD T100<sup>™</sup> Thermal Cycler
超速离心机 Thermo Scientific<sup>™</sup> Sorvall<sup>™</sup> LYNX 6000
台式离心机 eppendorf Centrifuge 5810R
小型高速冷冻离心机 eppendorf Centrifuge 5425R
GeneScript eBlot<sup>™</sup> L1 快速湿转仪,产品编号 L00686C
Sinsage MiniChemi 化学发光成像仪
高压细胞破碎仪, Union 永联生物,型号 UH-06
DeltaVision Elite 成像系统 (GE Healthcare)
所用物镜为 60×/1.42 NA Plan Apo oil-immersion objective (Olympus)

浸油为 Cargille 公司所产 Custom Blended Laser Liquids, 折射率 1.516 ÄKTA pure™ 25 L, Cytiva, 产品货号为 29018224

### 2.3 实验所用软件与在线数据库

Uniprot 蛋白质序列与功能信息数据库, <u>https://www.uniprot.org/</u>
Interpro 蛋白质家族结构域和功能位点数据库, <u>https://www.ebi.ac.uk/interpro</u>
Pfam 蛋白质家族数据库, <u>http://pfam-legacy.xfam.org/</u>
AlphaFold Protein Structure Database, <u>https://alphafold.com/</u>
GeneSilico MetaDisorder service, <u>https://iimcb.genesilico.pl/metadisorder/</u>
图像处理软件 Image J
AKTA 系统控制软件 UNICORN™ 7
生物统计绘图软件 GraphPad Prism 8

#### 2.4 实验试剂与耗材

#### 2.4.1 化学试剂

#### 2.4.1.1 固体试剂

实验中所用到的固体试剂如表1所示。

试剂名称	CAS 号	公司	货号
氯化钠 NaCl	7647-14-5	ABCone	S39168
硫酸卡那霉素 Kanamycin Sulfate	25389-94-0	翌圣生物	60206ES60
氨苄青霉素钠 Ampicillin,Sodium	60 50 2	羽又牛枷	602025560
Salt	09-32-3	立主土初	60203ES60
氢氧化钠 NaOH	1310-73-2	国药集团化学试剂 有限公司(沪试)	10019718
硫酸镍 (II) 六水合物 Nickel (II)	10101 07 0	Sigma-Aldrich	227676 1000
sulfate hexahydrate	10101-97-0	(Millipore)	227070-1000
异丙基-β-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷			
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside	367-93-1	ABCONE	I67588
(IPTG)			
考马斯亮蓝 R250 Coomassie Brilliant	6104 50 2	WWP Chamicala	VWRC0472-
Blue R-250	0104-39-2	V WK Chennicais	50G
琼脂糖 Agarose	9012-36-6	Thermo Scientific	75510019
	-		

#### 表1 实验所用固体试剂

		invitrogen	
十二烷基硫酸钠 Sodium dodecyl	151 21 2	Sigma-Aldrich	426142 100C
sulfate (SDS)	131-21-3	(Millipore)	430143-1000
消酚菇 Bromonhanol blue (BDB)	115 30 0	Sigma-Aldrich	11/301 25G
突前面 Bromophenor one (Br B)	115-59-9	(Millipore)	114391-230
牛血清白蛋白组份五 Bovine Serum	9048-46-8	Genview	FA016-100G
Albumin, fraction V (BSA)	7048-40-8	Genview	14010-1000
肺蛋白胨 Transforme	N	Thermo Scientific	
族虽口标 Hyptone	١	Oxoid	LP0042B
m来日担印/如 Vacat Futract	N	Thermo Scientific	I D0021D
时马远巩彻 Ieast Extract	١	Oxoid	LF0021D

实验过程中所用到的固体化学试剂已在表 1 中列出,试剂名称, CAS 号(Chemical Abstracts Service Registry Number),该试剂来源的公司与货号均已列出。

### 2.4.1.2 液体试剂

实验中所用到的液体化学试剂见表 2。

试剂名称	CAS 号	公司	货号
州フ 歌 ヘー・ジュー・・・1	C4 10 7	国药集团化学试剂	10000218
小口的 Acetic acid	64-19-7	有限公司(沪试)	
田 · mē Mathanal	67 56 1	国药集团化学试剂	1001/100
甲醇 Methanol	67-56-1	有限公司(沪试)	10014108
巴	(7, (2, 0))	国药集团化学试剂	10061260
开内时 Isopropanoi	67-63-0	有限公司(沪试)	40064360
0	60-24-2	Sigma-Aldrich	M2140
β-筑基乙醇 β-Mercaptoethanol		(Millipore)	W13140
甘油 Glycerol	56-81-5	ABCone	G46055
主 • 上京水井田市印田河的流	体化学学的		

表 2 实验所用液体试剂

表 2 为实验过程中所用到的液体化学试剂的试剂名称, CAS 号(Chemical Abstracts Service Registry Number),该试剂来源的公司与货号。

## 2.4.2 试剂盒

实验中所使用的商业化成品试剂盒详见表 3。

试剂盒名称	试剂盒用途	公司	货号
GenStar StarPrep DNA Gel	市肥粧胶同版	ConStor	D205_01
Extraction Kit	场加利在加入巴收	Genstar	D203-01

### 表 3 实验所用试剂盒

Lipofectamine <sup>™</sup> 3000 细胞转染		Scientific	L3000015
		Thermo Fisher	I 2000015
Chemiluminescence Kit		4年日今 CPIZyme	5Q201
Omni-ECL <sup>™</sup> Femto Light	WB 显影	雅酶 enizume	\$0201
Transfer Kit	YY D +7 几天	Genescript	L00729C
eBlot L1 PVDF Membrane	WB柱間	GeneScript	1 007290
(DNase Included) R1014	KINA 50 PL		L00729C
RNA Clean & Concentrator-5	DNA 结化	7VMO Pasaarah	1.00720C
transfection-grade plasmid DNA	风花油灰	Wideheitey-Wagel	740410.30
NucleoBond Xtra Midi kit for	质粒抽担	Macharay Nagal	740410 50

实验用到的商业化的成品试剂盒在表 3 中列出,该试剂盒的名称与用途,来源的公司 与货号均已列出。

# 2.4.3 酶与抗体

实验过程中所使用的酶与抗体均为购买的商业化的酶与抗体,详见表4。

名称	用途	公司名称	货号
$2 \times$ Phanta Flash Master Mix	PCR	诺唯赞 Vazyme	P510-01
EcoR I	载体酶切	New England Biolabs	R0101M
Not I	载体酶切	New England Biolabs	R0189M
Sac I	载体酶切	New England Biolabs	R3156M
BamH I	载体酶切	New England Biolabs	R0136M
2×Hieff Clone® Enzyme Premix	同源重组	翌圣生物	10922ES20
		Thermofisher	
TURBO <sup>™</sup> DNase	消化 DNA	Scientific	AM2238
		Invitrogen <sup>TM</sup>	
		Thermofisher	
RNase A	消化 RNA	Scientific	R1253
		Invitrogen™	
Pavo7anasoTM契据核酸酶		Beyotime	D7121 100VU
Beyozollase <sup></sup> 但级权敌时	伯化 DNA –J KNA	Biotechnology	D/121-100KU
蛋白酶 K, Proteinase K	消化蛋白	TIANGEN	RT403
DDV21 培休 (E 5)	Wastern Plat	Santa Cruz	aa 276759
ллуугар (г- <i>э</i> )	western Diol	Biotechnology	80-370738

表 4 实验所用酶与抗体

表4为实验过程中所使用的酶与抗体的名称、用途,来源的公司与货号。

### 2.4.4 引物

实验中为构建载体所订购的引物如下表。

表5载体构建所用引物

引物名称	引物序列
pET-28a-EGFP-F	5'- atgggtcgcggatccgaattcatggtgagcaagggcgagg -3'
pET-28a-EGFP-R	5'- agetegagatetgagteeggaettgtacagetegteeatge -3'
DDX21-1-F	5'- tccggactcagatctcgagctccgggaaaactccgtagtga -3'
DDX21-163-F	5'- tccggactcagatctcgagctcccagtgaagctgccagtga -3'
pET-28a-DDX21-710-R	5'- tggtgctcgagtgcggccgcttactctgtggccacagaga -3'
pET-28a-DDX21-783-R	5'- tggtgctcgagtgcggccgcttattgaccaaatgctttac -3'
pEGFP-DDX21-710-R	5'- tatctagatccggtggatccttactctgtggccacagaga -3'
pEGFP-DDX21-783-R	5'- tatctagatccggtggatccttattgaccaaatgctttac -3'

表 5 为实验过程中所订购的引物序列,订购引物由北京擎科生物科技股份有限公司上 海合成部合成。

### 2.4.5 其他实验用品与耗材

除去上述所用化学试剂、试剂盒、酶与抗体、引物,实验过程中所使用的 其他物品或耗材见下表。

名称	公司名称	货号
Ni Sepharose 6 Fast Flow	Cytiva	17531801
HiTrap Heparin HP $1 \times 5$ ml	Cytiva	17040701
Superdex 200 Increase 10/300 GL	Cytiva	28990944
rCutSmart <sup>™</sup> Buffer	New England Biolabs	B6004S
96孔深孔板	南通市海之星实验器 材有限公司 Maisinuo	HZX047-2
Amicon® Ultra 过滤器 100 kDa MWCO (15ml 管)	Millipore	UFC8100
Amicon® Ultra 过滤器,100 kDa MWCO (50ml 管)	Millipore	UFC9100
Immobilon-PSQ 卷膜, PVDF, 0.2 µm, 26.5 cm x 3.75 m	Millipore	ISEQ00010
	Thermofisher	
UltraPure <sup>™</sup> 1 M Tris-HCI 缓冲液 pH 7.5	Scientific	15567027
	Invitrogen <sup>TM</sup>	

表 6 其他实验用品与耗材

Biofuraw <sup>™</sup> Fast Protein Stain 快速蛋白染液	Tanon	180-7001
Trans2K <sup>®</sup> Plus II DNA Marker	TransGen Biotech	BM121
	Thermofisher	
TRIzol <sup>TM</sup> 试剂	Scientific	15596018CN
	Invitrogen™	
TAE (50Y)	Beyotime	ST716
IAE (JUX)	Biotechnology	51/10

表 6 为实验过程中所使用到的其他物品或耗材。

### 2.4.6 实验相关培养基与缓冲液

琼脂糖凝胶电泳缓冲液 TAE (Tris Acetate-EDTA buffer)配方见表 7.

#### 表7 Tris Acetate-EDTA buffer

试剂	终浓度
Tris Acetate	40 mM
EDTA	1 mM
调节 p	H至于 8.0

表 7 为进行琼脂糖凝胶电泳时所使用的 TAE buffer 配方,将 50X TAE buffer 稀释 50 倍 后其组分及其浓度如表 7 所示。

实验中所使用的液体 LB 培养基配方见下表。

#### 表 8 LB 液体培养基

试剂	用量
Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
ddH2O	定容至 1000 ml

表 8 为实验过程中培养菌液时所使用的液体 LB 培养基,使用前加入对应菌种抗性的 抗生素以避免杂菌污染。

考马斯亮蓝 R-250 染色液配制方法如下。

#### 表9 考马斯亮蓝 R-250 染色液

试剂	终浓度
考马斯亮蓝 R-250	0.1% (W/V)

异丙醇 Isopropanol	25% (V/V)
冰醋酸 Acetic acid	10% (V/V)

表 9 为考马斯亮蓝 R-250 染色液各组分浓度。详细配制方法如下: 首先称取考马斯亮 蓝 R-250 1 g, 放入 1 L 容量的烧杯中, 而后依次加入 250 ml 异丙醇、100 ml 冰醋酸、650 ml 双蒸水, 搅拌均匀使其充分溶解, 待其充分溶解后使用滤纸过滤, 过滤后室温保存。

表 10 考马斯亮蓝脱色液

终浓度	
45% (V/V)	
45% (V/V)	
10% (V/V)	

表 10 为近些考马斯亮蓝染色后的脱色液配方,进行脱色时需多次更换脱色液并最好脱 色过夜。

	5	
试剂	终浓度	
250mM Tris-HCL pH 6.8	250 mM	
SDS	10% (W/V)	
溴酚蓝 Bromophenol blue	0.5% (W/V)	
甘油 Glycerol	50% (W/V)	
β-巯基乙醇 β-mercaptoethanol	5% (W/V)	

表 11 5× SDS loading Buffer

表 11 为 5× SDS loading buffer 配方,进行 SDS-PAGE 点样前需先向样品中加入样品 1/4 体积的 5× SDS loading buffer。

使用镍柱对蛋白进行亲和层析纯化时所用到的 Lysis Buffer, Wash Buffer1,

Wash Buffer2 和 Elution Buffer 详见下表 12~15。

Lysis Buffer	母液浓度	50 ml
20 mM Tris-HCl pH7.5	1 M	1 ml
500 mM NaCl	5 M	5 ml
10 mM Imidazole	5 M	0.1 ml
10% glycerol	50 %	10 ml
DEPC-H2O	/	up to 50 ml

表 12 镍柱亲和层析 Lysis Buffer

Wash Buffer 1	母液浓度	50 ml
20 mM Tris-HCl pH7.5	1 M	1 ml
500 mM NaCl	5 M	5 ml
50 mM Imidazole	5 M	500 ul
10% glycerol	50 %	10 ml
DEPC-H2O	/	up to 50 ml

表 13 镍柱亲和层析 Wash Buffer 1

表 14 镍柱亲和层析 Wash Buffer 2

Wash Buffer 2	母液浓度	50 ml
20 mM Tris-HCl pH7.5	1 M	1 ml
4 M NaCl	Solid	11.69 g
50 mM Imidazole	5 M	500 ul
10% glycerol	50 %	10 ml
DEPC-H2O	/	up to 50 ml

表 15 镍柱亲和层析 Elution Buffer

<b>Elution Buffer</b>	母液浓度	50 ml
20 mM Tris-HCl pH 7.5	1 M	1 ml
500 mM NaCl	5 M	5 ml
500 mM Imidazole	5 M	5 ml
10% glycerol	50 %	10 ml
DEPC-H2O	/	up to 50 ml

使用肝素柱对 DDX21 进行阳离子交换层析时所用到的低盐 (Heparin Buffer A) 与高盐 (Heparin Buffer B) 见表 16~17。

Heparin Buffer A	母液浓度	500 ml
20 mM Tris-HCl pH7.5	1 M	10 ml
350 mM NaCl	5 M	35 ml
5% glycerol	50 %	50 ml
DEPC-H2O	/	up to 500 ml

表 16 肝素柱阳离子交换层析低盐溶液 Heparin Buffer A

Heparin Buffer B	母液浓度	500 ml
20 mM Tris-HCl pH7.5	1 M	10 ml
2 M NaCl	固体	58.44 g
5% glycerol	50 %	50 ml
DEPC-H2O	/	up to 500 ml

表 17 肝素柱阳离子交换层析高盐溶液 Heparin Buffer B

使用分子筛 (Superdex 200 Increase 10/300 GL) 对 DDX21 进行体积排阻色谱 (size exclusion chromatography, SEC) 时所用到的分子筛缓冲液 AKTA SEC Buffer 见表 18.

<b>AKTA SEC Buffer</b>	母液浓度	500 ml
20 mM Tris-HCl pH7.5	1 M	10 ml
500 mM NaCl	5 M	50 ml
1 mM DTT	1 M	500 ul
DEPC-H2O		up to 500 ml

表 18 分子筛缓冲液 AKTA SEC Buffer

#### 2.5 实验方法

#### 2.5.1 载体构建

载体构建流程简述:使用带有同源臂的引物,以实验室合成的带有 DDX21 序列的质粒为模板进行 PCR (Polymerase Chain Reaction),获得目的片段后将其 与酶切的质粒进行同源重组,而后向感受态大肠杆菌 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 中转化,于无抗 LB 液体培养基中复苏 30 min 后将其 涂布在对应抗性的 LB 琼脂糖平板上,置于 37℃培养箱过夜。第二天挑选单克 隆送测,将测序结果符合预期的菌种接种在液体 LB 培养基中,置于 37℃摇床 中培养约 16 h,用质粒抽提试剂盒提取质粒。将提取好的质粒测定浓度,同时 再次送样测序以确定所用质粒序列无误。

#### 2.5.1.1 PCR

于八连管中配制 50 ul PCR 体系:模板加入约 50 ng,前后引物 Primer-F/R 10 uM 2ul,二甲基亚砜 (DMSO) 2 ul,加入双蒸水补足至 25 ul 后加入 2 ×

Phanta Flash Master 25 ul。将配置好的 PCR 体系混匀并瞬时离心后置于 PCR 仪 中反应,退火温度默认选用 55℃。若无法 PCR 出符合预期大小的目的条带,则 可尝试改变体系中 DMSO 浓度与尝试进行退火温度梯度实验以确定适宜的 PCR 条件。

pET-28a-EGFP-F/R 用于 PCR 重组入 pET28a 中的 EGFP 片段;

DDX21-1-F与 pET-28a-DDX21-710-R 用于 PCR 重组入 pET28a 中的 DDX21-1-710 (ΔC) 片段; DDX21-163-F与 pET-28a-DDX21-783-R 用于 PCR 重 组入 pET28a 中的 DDX21-163-783 (ΔN) 片段; DDX21-163-F 与 pET-28a-DDX21-710-R 用于 PCR 重组入 pET28a 中的 DDX21-163-710 (ΔNC) 片段; 以上 片段用于构建进行体外蛋白纯化的载体 pET-28a-EGFP-DDX21-ΔN/ΔC/ΔNC。

DDX21-1-F与 pEGFP-DDX21-710-R 用于 PCR 重组入 pEGFP 的 DDX21-1-710 (ΔC) 片段; DDX21-163-F与 pEGFP-DDX21-783-R 用于 PCR 重组入 pEGFP 的 DDX21-163-783 (ΔN) 片段; DDX21-163-F 与 pEGFP-DDX21-710-R 用于 PCR 重组入 pEGFP 的 DDX21-163-710 (ΔNC) 片段; 以上片段用于构建转染入 HeLa 细胞的载体 pEGFP-DDX21-ΔN/ΔC/ΔNC。

#### 2.5.1.2 载体酶切

配制 50 ul 酶切体系,加入需要进行酶切的目的质粒约 5 ug 后加入 New England Biolabs 公司的 10X rCutSmart<sup>™</sup> Buffer 5 ul,而后加入双蒸水将体系补 足至 49 ul 后加入 1 ul 对应目的切口的内切酶。吹吸混匀并瞬时离心后置于 37℃ 孵育约 3 h。

#### 2.5.1.3 琼脂糖凝胶电泳与胶回收

称取琼脂糖粉末以配制浓度 1%的琼脂糖凝胶,将粉末倒入锥形瓶后加入对 应体积的 1×TAE buffer 与 3 ul 10 mg/ml EB,微波炉加热使其充分熔化后将其 倒入胶槽中,待其充分冷却后取出凝胶梳子,将其放入电泳槽中点样,恒压 120 V 电泳 25 min。

将电泳结束的琼脂糖凝胶于紫外扫胶仪下切下目的条带,将凝胶置于体积为1.5 ml的 EP 管 (Eppendorf Tubes) 中,向 EP 管中加入与凝胶质量相同体积的

Buffer MB,将 EP 管置于 55℃孵育 5~10 min 以将凝胶充分溶解,后续使用 GenStar StarPrep DNA Gel Extraction Kit 按照说明书对目的条带进行胶回收。

#### 2.5.1.4 同源重组

配制 10 ul 同源重组体系,向八连管中加入胶回收的 PCR 片段约 30 ng 与胶 回收后的酶切好的线性载体 100 ng,加入 dd H2O 补齐体积至 5 ul 后加入 2 × Hieff Clone® Enzyme Premix 5 ul。充分混匀并瞬时离心后将其置于 PCR 仪中 50℃ 孵育 30 min 完成同源重组。

#### 2.5.1.5 感受态转化

将感受态 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 从-80℃冰箱 中拿出置于冰上解冻,等待约 5 min 感受态细胞解冻后加入 5 ul 完成孵育后的 同源重组体系。将其静置与冰上 25 min 后使用 42℃热激 45 s,将热激结束的感 受态细胞重新静置于冰上 5 min 完成转化。

#### 2.5.1.6 复苏与平板涂布

向转化后的感受态细胞加入 600 ul 不含抗性的 LB 液体培养基,将其置于 37℃摇床中培养约 30 min 后,5000 g 离心 2 min,吸出上清 LB 培养基,加入 60 ul LB 液体培养基重悬沉淀菌体,将其涂布在对应抗性的 LB 琼脂糖平板上, 置于 37℃培养箱中过夜培养约 12 h。

#### 2.5.1.7 单克隆菌落挑选

将过夜培养的涂布平板上的单个菌落挑出,置于 1.5 ml EP 管中,加入 700 ul 对应抗性的 LB 液体培养基,置于 37℃摇床培养 3 h 后送测。

#### 2.5.1.8 质粒抽提

将测序结果符合预期的菌种扩大培养至 100 ml 对应抗性的 LB 液体培养基中,置于 37℃摇床中培养 16 h 后, 5000 g 离心 15 min 后倒出上清 LB 培养基,将菌体沉淀用试剂盒 NucleoBond Xtra Midi kit for transfection-grade plasmid DNA

中的 Buffer RES 重悬,并按照试剂盒说明书进行质粒抽提。将抽提好的质粒用 Nano drop 测定浓度并将其送样测序以确保质粒无误。

#### 2.5.2 蛋白纯化

蛋白纯化流程简述:将质粒转化入大肠杆菌感受态 Rosetta (DE3)中,复苏 涂板,挑选单克隆进行预诱导,考染脱色挑选目的蛋白表达量高的菌种,将其 扩大培养于1L体积的LB培养基中,待其OD值为0.6~0.8时加入IPTG至终 浓度约为0.5 mM,16℃培养诱导蛋白表达24h,离心将菌体沉淀用Lysis Buffer 重悬,用高压细胞破碎仪将大肠杆菌破碎后进行镍柱亲和层析、肝素柱 阳离子交换层析、分子筛体积排阻色谱,最后将其用超滤管浓缩液氮速冻储存。

#### 2.5.2.1 质粒转化

将质粒向补充了大肠杆菌缺乏的六种稀有密码子的感受态 Rosetta(DE3) Chemically Competent Cell 中转化用作蛋白表达,向冰上解冻的大肠杆菌感受态 Rosetta(DE3)加入约 500 ng 质粒,将其于冰上静置 25 min,静置后 42℃金属浴 热激 45 s,将热激结束的感受态细胞重新静置于冰上 5 min 完成转化。

#### 2.5.2.2 挑选单克隆预诱导

挑取多个单克隆菌落接种于对应抗性的 700 ul LB 培养基中,置于 37℃摇床培养 3 h 后加入 0.35 ul 1 M IPTG 至于终浓度 0.5 mM,同时留 1 组不加入 IPTG 的单克隆菌落作为对照,于 37℃摇床中诱导约 6 h 后 5000 g 离心 2 min,菌体沉淀用于 SDS-PAGE 考染脱色以检验蛋白表达量。

#### 2.5.2.3 SDS-PAGE 考染脱色挑选高表达目的蛋白菌种

向预诱导后的菌体沉淀加入 1×SDS loading Buffer 50 ul, 95℃煮样 10 min 后,取样 10 ul 进行 SDS-PAGE,约 80 V 电泳 40 min 待条带跑出 6%凝胶浓度 的浓缩胶后,升高电压至 120 V 电泳约 100 min 待溴酚蓝跑出凝胶后停止电泳。 取电泳后凝胶于考马斯亮蓝 R-250 染色液中孵育约 20 min 后换为考马斯亮蓝脱 色液,脱色过夜。脱色过夜后将胶扫描,对比未加入 IPTG 的对照组确定诱导 表达的目的蛋白条带,同时依据表达相对稳定的其他蛋白条带进行归一化,选 择表达目的蛋白效率最高的菌种用于后续的扩大培养。

#### 2.5.2.4 扩大培养表达蛋白

将表达目的蛋白效率最高的菌种接种于 100 ml 对应抗性的 LB 液体培养基 中置于 37℃摇床培养过夜,取 20 ml 过夜培养的菌液接种于 1 L 体积的 LB 液体 培养基中,将其置于 37℃摇床培养约 1.5 h 后测定 OD 值,将其培养至 OD 600 约 0.6~0.8 时,加入 500 ul 的 1 M IPTG 诱导蛋白表达。将加入 IPTG 的菌液置 于 16℃摇床培养 24 h 使得目的蛋白充分表达。

#### 2.5.2.5 大肠杆菌细胞破碎

取已在 16℃摇床培养 24 h 充分表达目的蛋白的菌液 5000 g 离心 30 min, 收集菌体沉淀弃去培养基上清,每1L 菌液收集得到的菌体沉淀加入约 50 ml Lysis Buffer 充分重悬。Lysis Buffer 重悬后的菌体用高压破碎细胞机器进行大肠 杆菌细胞破碎,先将压力升高至 200 bar 保持约 5 min,确保重悬菌液中没有沉 淀后,缓慢加压至 800 bar 并保持约 10 min,至流出液透明澄清,此时大部分大 肠杆菌细胞已被破碎。将大肠杆菌细胞破碎后液体 15000 g 离心 30 min 后,取 上清液用 0.22 um 的滤膜过滤,取滤出液用于后续的亲和层析。

#### 2.5.2.6 镍柱亲合层析

将滤出液加入预先填充好的镍柱中,使其所携带的组氨酸标签(6×His-tag) 与二价镍离子结合,收集 Flow Through,用 Wash Buffer1 洗涤两个柱体积后使用高盐的 Wash Buffer2 洗涤两个柱体积,再用 Wash Buffer1 洗涤至流出液不使Bradford 试剂明显变色后使用 500 mM 咪唑浓度的 Elution Buffer 进行洗脱,收集洗脱液用于后续肝素柱阳离子交换层析。

#### 2.5.2.7 肝素柱阳离子交换层析

将镍柱亲合层析后的洗脱液透析过夜至盐浓度为 350 mM NaCl,而后利用 AKTA pure 25L 系统将其上样至肝素柱中,上样完成后用 Heparin Buffer A 对柱

子进行 wash 等待流出液 UV 值降低回基线水平后用高盐的 Heparin Buffer B 与 低盐的 Heparin Buffer A 混合后进行盐浓度线性升高的洗脱。

取洗脱收集板中的洗脱液进行 SDS-PAGE 并考染脱色,选取含有目的蛋白 大小条带且少有杂蛋白的洗脱孔,收集其中洗脱液用于后续超滤管浓缩。

#### 2.5.2.8 超滤管浓缩蛋白

使用 Miliipore 公司的 Amicon® Ultra 超滤管,100 kDa MWCO,收集洗脱液,2000 g 离心至蛋白样品液体积浓缩至1 ml 以内,吸出浓缩后的蛋白样品用于后续体积排阻色谱。

#### 2.5.2.9 体积排阻色谱

取浓缩后的蛋白样品,使用上样环将其上样至分子筛 Superdex 200 Increase 10/300 GL 中,用 AKTA SEC Buffer 将其洗脱,记录峰形并与洗脱收集板中收集 孔相对应。取洗脱收集板中的洗脱液进行 SDS-PAGE 并考染脱色以确定收集孔 中是否为目的蛋白。

#### 2.5.2.10 超滤管浓缩收集蛋白样品

使用 Miliipore 公司的 Amicon<sup>®</sup> Ultra 超滤管,100 kDa MWCO,与峰形相 对应收集洗脱液并 2000 g 离心进行收集浓缩,将浓缩后的蛋白样品分装出 5 ul 用于 BSA 蛋白定量,大部分样品液氮速冻后置于-80℃冰箱保存备用。

#### 2.5.2.11 BSA 定量目的蛋白浓度

以 1 mg/ml 的 BSA 为标准品,分别取 0.5 ul、1 ul、2 ul、4 ul、8 ul用 AKTA SEC Buffer 补齐体积至 16 ul 后加入 4 ul 5 × SDS loading Buffer 混匀瞬时 离心制样用于制作标准曲线,取样品蛋白分别 0.5 ul、1 ul、2 ul 用 AKTA SEC Buffer 补齐体积至 16 ul 后加入 4 ul 5 × SDS loading Buffer 混匀瞬时离心制样, 95℃ 煮样 5 min 后将样品冷却后瞬时离心,取 10 ul 上样 SDS-PAGE 并进行考 马斯亮蓝染色脱色,以 1 mg/ml BSA 制得标准曲线对样品蛋白浓度进行定量。

#### 2.5.3 Western Blot

将蛋白样品加入 5×SDS loading Buffer, 95℃, 5 min 煮样放于冰上至其冷却后瞬时离心。离心后上样,空白孔用 1×SDS loading Buffer 补齐体积,80 V 电泳约 40 min 至蛋白跑出浓缩胶后升高电压至 120 V 电泳 100 min 至溴酚蓝跑 出分离胶。利用 GeneScript eBlot™ L1 快速湿转仪与试剂盒 eBlot L1 PVDF Membrane Transfer Kit 按照说明书快速转膜。转膜结束后用 PBST 清洗 5 min 后 使用 3% BSA 室温摇床孵育 1 h 进行封闭。将一抗稀释于 3% BSA 中 4℃过夜摇 床孵育,PBST 清洗 3 次每次 5 min,而后使用稀释于 3% 的 BSA 中二室温摇床 孵育 1 h 后使用 PBST 清洗 3 次每次 5 min。使用显影液试剂盒 Omni-ECL™ Femto Light Chemiluminescence Kit 进行显影。

#### 2.5.4 DNA 酶、RNA 酶、蛋白酶 K 消化后琼脂糖凝胶电泳

#### 2.5.4.1 DNA 酶与 RNA 酶消化

取蛋白样品约 20 ug 并加入 20 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM NaCl 补齐体积 至 19.5 ul,加入 0.5 ul Tubor DNase 或 RNase A, 37℃孵育 1 h 以消化 DNA 或 RNA。

#### 2.5.4.2 蛋白酶 K 消化

取消化 DNA 或 RNA 后样品加入 1 ul Proteinase K, 50℃孵育 1 h 以消化蛋白 DDX21。

#### 2.5.4.3 琼脂糖凝胶电泳

取核酸酶、蛋白酶消化后样品 10 ul 加入 2 ul 6 × loading Buffer, 混匀瞬时 离心, 1%琼脂糖凝胶使用 120 V 电压恒压电泳 25 min。

#### 2.5.5 细胞转染

使用 Lipofectamine<sup>™</sup> 3000 向细胞转染目的质粒。将细胞培养至约 70~90% 密度时进行转染。取 125 ul Opti-MEM Medium 中加入 5 ul Lipo-3000 Reagent 稀释;取 125 ul 的 Opti-MEM 培养基,加入 2.5 ug 的目的质粒和 5 ul 的 P3000

Reagent 以稀释目的质粒。将稀释好的 Lipo-3000 和 DNA&P3000 1:1 混匀,室 温孵育 10~15 min 后将其加入到细胞培养皿中。转染 6~8 h 将培养基后更换为全 培养基,转染两到三天后于显微镜下观察。

# 三、研究结果

#### 3.1 DDX21 蛋白特征分析

#### 3.1.1 DDX21 蛋白结构域分析与三维结构预测

DDX21蛋白是一种分布在核仁 PDFC (Periphery of Dense Fibrillar Component) 区域<sup>[31]</sup>的具有保守的 DEAD-box 序列的 RNA 解旋酶,其相分离的 形态与流动性将显著影响 Pol I的转录活性。而在体外纯化 DDX21 时,使用分 子筛分离纯化的蛋白 DDX21 不仅出现了两个紫外吸收峰,两个紫外吸收峰的 DDX21蛋白还具有显著不同的相分离形态。为研究 DDX21 出现不同相分离形 态的具体机制,我们首先对其蛋白序列及其结构域进行分析,从而对 DDX21 的性质与功能进行初步了解并对其发生相分离的可能机制进行一定的推测。



#### 图 2. 蛋白 DDX21 的结构域分析与三维结构预测

A 蛋白 DDX21 的结构域分析, DEAD/DEAH box helicase domain 和 Helicase C-terminal domain 为解旋酶核心结构域, DD 为 Dimerization domain, GUCT 为 Gu 蛋白家族 C-terminal domain。 B, C, D 为 AlphaFold2 对 DDX21 蛋白三维结构的预测的正视、俯视 及自选角度视图,箭头所示为 DDX21 蛋白的 N 端

DDX21 具有 DEAD-box Helicase domain、C-Helicase terminal domain、 Dimerization domain (DD) 和 Gu C-terminal domain (GUCT) 四个结构域。其解旋 酶核心 (Helicase core) 为 DEAD-box Helicase domain 和 C-Helicase terminal domain,发挥 DDX21 作为 RNA 解旋酶的生物功能。Dimerization domain 的存 在的提示了 DDX21 存在二聚或寡聚乃至多聚的可能,其具体的聚合形式有待 进一步深入研究<sup>[32]</sup>。同时 DDX21 作为 RNA helicase II/Gualpha 家族的蛋白成员, 也具有 Gu C-terminal domain。此外, DDX21 富含精氨酸与甘氨酸的 C 端, 很 可能具有结合核酸的功能<sup>[33]</sup>。在体外纯化 DDX21 时获得的 DDX21 蛋白是否存 在核酸结合也很可能影响其出峰位置与相分离形态。此外, DDX21 的 N 端与 C 端末端序列均无明显的典型的蛋白结构域(图 2A)。

除了对 DDX21 蛋白的一级氨基酸序列中的典型结构域进行分析外,我们 利用了 AlphaFold2 对 DDX21 的三维结构进行了预测,以期从结构角度上对蛋 白 DDX21 的性质、功能等特征有更全面的了解。

AlphaFold2 对 DDX21 蛋白结构预测的结果提示,其核心的 DEAD-box Helicase domain 和 C-Helicase terminal domain 在 DDX21 蛋白结构中占据核心位 置,其N端与C端难以准确预测其三维结构(图 2B),是内在无序区域 (intrinsically disordered regions, IDRs)。AlphaFold2 预测结果与 DDX21 蛋白序列 结构域特征相匹配,进一步提示了 DDX21 蛋白 N 端与 C 端是两端较长的 IDRs。 而 IDRs 序列往往是蛋白质发生相分离的关键驱动因素<sup>[30]</sup>,因而我们推测蛋白 DDX21 的 N 端与 C 端 IDRs 区域将会显著影响 DDX21 蛋白相分离的发生与形态。

#### 3.1.2 DDX21 蛋白内在无序区域 (IDRs) 预测

为了在其结构域与三维结构预测的基础上,进一步确定 DDX21 蛋白 N 端 与 C 端是否存在内在无序区域 (IDRs) 的序列,我们使用 IUpred2A 与 PredA 等 多种方式对 DDX21 进行 IDRs 序列分析。



图 3. 蛋白 DDX21 的序列无序性分析

A, B, C, D 分别为 iPDA, IUPred Long, DISPROT (VSL2), RONN 等几种不同的序列无序 性分析方法对 DDX21 进行的序列分析。得分大于 0.5 的序列其无序性较强,多种不同 分析方法均显示了 DDX21 蛋白 N 端与 C 端的序列无序性

iPDA、IUPred Long、DISPROT (VSL2) 和 RONN 等多种不同的无序序列生物信息学分析方式均显示 DDX21 蛋白的 N 端与 C 端末尾的序列,其无序性显著强于蛋白中间的 domain 区域,为内在无序区域 (IDRs),很可能与 DDX21 的相分离现象有关。

综合上述对 DDX21 蛋白结构域、三维结构预测、IDRs 序列预测的结果, 我们认为 DDX21 一方面作为 RNA 解旋酶,其与核酸的结合将很可能影响其体 外纯化时的出峰位置与相分离形态,另一方面,结合 AlphaFold2 对 DDX21 蛋 白的三维结构预测和多种不同的 IDRs 分析方法,我们精准划定 DDX21 N 端的 1-163 位氨基酸序列与 C 端的 710-783 为氨基酸序列为其 IDRs 序列,这两段 IDRs 序列很可能对 DDX21 蛋白的相分离的发生与形态变化影响显著。因而在 后续的研究中,我们一方面将探究体外纯化时 DDX21 蛋白的两个紫外吸收峰 的核酸含量是否存在差异以期解释其出峰位置差异,另一方面我们结合体外生 化实验深入探究 DDX21 蛋白 N 端与 C 端 IDRs 序列分别对其相分离发生与其相分离形态变化有何作用。

#### 3.2 体外纯化的 DDX21 蛋白的两个峰值核酸含量差异显著

#### 3.2.1 凝胶电泳检验 DDX21 蛋白两个峰值核酸含量

DDX21 蛋白作为 RNA 解旋酶,同时也因其具有富含精氨酸与甘氨酸的 C 端序列,很可能具有结合核酸的功能。我们首先推测在体外纯化过程中,核酸 结合与否是影响 DDX21 体外纯化时出现两个紫外吸收峰的重要因素。我们一 方面利用双通道 UV 监测器监测色谱纯化过程中 A260,A280 的变化情况,另一 方面将体外纯化时 DDX21 蛋白的两个紫外吸收峰对应的蛋白分别收集浓缩后 用蛋白酶 K 消化后跑胶并 EB 染色以观察是否存在核酸。





图 4. 体外纯化 DDX21 时不同的紫外吸收峰核酸含量不同

A 在体外纯化蛋白完成亲和层析后,使用分子筛纯化蛋白 DDX21 时使用 260、280 双 通道 UV 监测器,检测纯化过程中的蛋白(A280)与核酸(A260)含量。B 将体外纯 化 DDX21 蛋白时两个紫外吸收峰 Peak1 和 Peak2 对应的蛋白分别收集浓缩后用蛋白酶 K 消化并用琼脂糖凝胶电泳检测。C 将体外纯化 DDX21 蛋白的 Peak2 蛋白收集浓缩后 分别加入分子筛缓冲液或含细胞 total RNA 的分子筛缓冲液,再次上样分子筛,通过 UV 监测器观察其出峰位置

由图 4 可见,前言中提到的体外纯化蛋白 DDX21 时,出现的两个均为 DDX21 但出峰位置不同的 Peak1 和 Peak2 在核酸含量上差异较大。在纯化过程 中使用波长 260、280nm 的双通道 UV 监测器可见相对于 Peak2 的 DDX21 蛋白 而言,Peak1 中的 DDX21 蛋白的核酸含量更高(图 4A)。同时,将 Peak1 和 Peak2 中的蛋白分别收集浓缩后,经 BSA 定量后取相同量的蛋白经蛋白酶 K 消 化后进行琼脂糖凝胶电泳,可见在 Peak1 (P1) 泳道中有较为明显的核酸分布, 而 Peak2 (P2) 泳道中无法分辨出核酸痕迹(图 4B)。

此外,我们将认为核酸含量少的 DDX21 Peak2 蛋白收集浓缩后,分别加入 分子筛 buffer 或含有细胞 total RNA 的分子筛 buffer,再次上样分子筛,通过 UV 监测器观察其出峰位置变化,我们发现加入 total RNA 后,原本出峰位置靠 后的 DDX21 Peak2 蛋白出峰位置明显前移至 Peak1 对应位置(图 4C),因而我 们认为核酸含量差异是影响 DDX21 蛋白出峰位置的关键,推测可能是核酸与 DDX21 的结合使其聚合状态发生变化进而导致了出峰位置的变化。

综合体外纯化过程中 UV 监测器与琼脂糖凝胶电泳结果,我们认为体外纯 化 DDX21 时出现两个紫外吸收峰的原因在于 DDX21 结合核酸的差异,当 DDX21 结合较多核酸时,聚合在一起的 DDX21 蛋白较多,分子量大,其对应 的紫外吸收峰为 Peak1 (P1,出峰位置更靠前),而当 DDX21 结合的核酸较少乃 至不结合核酸时,聚合在一起的 DDX21 蛋白相较于 Peak1 较少,分子量小于 Peak1 中的聚合体,其对应的紫外吸收峰为 Peak2 (P2,出峰位置较为靠后)。

#### 3.2.2 DNA 与 RNA 酶处理探究 DDX21 蛋白结合核酸类型

DDX21 作为 RNA 解旋酶的一种,我们推断在体外纯化过程中 Peak1 蛋白 所结合的核酸主要为 RNA,因而我们分别使用 DNA 酶与 RNA 酶对体外纯化的 DDX21 进行消化后进行琼脂糖凝胶电泳。





A 使用全能核酸酶 Nuclease、蛋白酶 K 检验体外纯化的 DDX21 Peak1 蛋白的核酸, Ctrl 为不使用全能核酸酶或蛋白酶 K 消化直接取 DDX21 Peak1 蛋白进行琼脂糖凝胶电 泳。B 用 DNA 酶、RNA 酶 A 与蛋白酶 K 消化体外纯化的 DDX21 Peak1 蛋白以检验其 含有的核酸类型, Ctrl 为仅用蛋白酶 K 消化而不用 DNA 酶或 RNA 酶消化的 DDX21 Peak1 蛋白琼脂糖凝胶电泳。 我们首先使用全能核酸酶和蛋白酶 K 对体外纯化的 DDX21 Peak1 蛋白进行 消化,仅用核酸酶消化 DDX21 Peak1 蛋白时难以将核酸消化干净,且存在堵孔 现象,而如果同时使用蛋白酶 K 和全能核酸酶消化 DDX21 Peak1 蛋白能够较为 高效的消化 DDX21 Peak1 蛋白中所含的核酸。为检验 DDX21 Peak1 蛋白所含 核酸的类型,我们使用 DNA 酶、RNA 酶 A 与蛋白酶 K 消化体外纯化的 DDX21 Peak1 蛋白后进行琼脂糖凝胶电泳。对比仅用蛋白酶 K 消化而不用 DNA 酶或 RNA 酶的对照组可见,在使用蛋白酶 K 的同时,若仅使用 DNA 酶 或仅用 RNA 酶,均无法将 DDX21 Peak1 蛋白所含的核酸汽全消化干净,说 明 DDX21 尽管作为 RNA 解旋酶,但在体外纯化过程中的 DDX21 Peak1 蛋白既 含有 DNA 又含有 RNA (图 5),提示 DDX21 可能具有的非特异性的核酸结合 能力,而其具体结合机制仍有待深入研究。

#### 3.2.3 核酸含量显著影响 DDX21 相分离形态

核酸与 DDX21 蛋白的结合,影响 DDX21 聚合状态进而影响其出峰位置的同时,也很可能因其聚合状态的改变而影响了其相分离形态。



### EGFP-DDX21 P2

#### 图 6. 结合 total RNA 的 DDX21 聚合程度显著提高

将体外纯化的 EGFP-DDX21 Peak2 收集浓缩后分别加入分子筛缓冲液或含细胞 total RNA 的分子筛缓冲液孵育后于荧光显微镜下进行观察。

体外纯化的 EGFP-DDX21 Peak2 蛋白在 20 mM Tris-Cl 7.5 与 150 mM NaCl 的溶液环境中发生相分离现象,可见对照条件下的 EGFP-DDX21 Peak2 蛋白发 生相分离且蛋白呈现液滴状聚合,而结合 total RNA 时,可见 EGFP-DDX21 Peak2 蛋白其聚合状态显著提高,由原先小范围聚合的液滴状相分离形态转向 为聚合形成高聚化的纤维状类似的形态,提示了核酸的存在会显著影响 DDX21 的状态,进而影响其相分离形态(图 6)。

#### 3.3 N 端与 C 端不同 IDRs 序列对 DDX21 相分离的影响

#### 3.3.1 DDX21 N 端与 C 端截短体质粒构建

除了核酸会对 DDX21 的相分离发生与形态产生影响外,根据生物信息学 对 DDX21 结构域、三维结构, IDRs 序列的分析与预测,我们认为 DDX21 的 N 端与 C 端 IDRs 区域也会对 DDX21 的相分离发生与形态影响显著。

我们以 pET28a 为载体使用同源重组法构建了带有 EGFP 荧光标签的 DDX21 蛋白 N 端与 C 端 IDRs 序列截短体。



#### 图 7. 构建 DDX21 蛋白 N 端与 C 端 IDRs 序列截短体

根据生物信息学的预测,综合多种内在无序区域预测方法,DDX21 的 1-163 位氨基酸 序列为 N 端内在无序区域 (N-IDR),710-783 位氨基酸序列为 C 端内在无序区域 (C-IDR),并构建了 N 端截短体 (ΔN), C 端截短体(ΔC)以及 N 端与 C 端共同截短体 (ΔNC)

利用带有同源臂的引物对 EGFP 和 DDX21 进行 PCR 的片段与酶切后的 pET28a 空载进行同源重组后的载体转化感受态大肠杆菌并复苏涂板,挑取单克 隆送测,将测序确认无误的所需菌种扩大培养至 100 ml LB 液体培养基中培养 约 16 h 后抽提质粒,并将质粒再次取样送测确认无误。 使用构建完成的 DDX21 N 端与 C 端截短体质粒,转化并筛选高效表达 DDX21 蛋白 N 端与 C 端截短体的菌种。将构建好的 DDX21 N 端与 C 端截短体 质粒向兼容真核生物六种稀有密码子的 *E.coli*. Rosetta (DE3)感受态菌种中转化, 复苏涂板挑取多个单克隆进行预诱导,挑选能够表达目的蛋白且表达效率较高 的菌种扩大培养并甘油保藏,用于体外纯化 DDX21 N 端与 C 端截短体蛋白。

体外纯化 DDX21 N 端与 C 端截短体蛋白时,首先取表达目的蛋白的菌种 先将其扩大培养至 100 ml LB 液体培养基中再取部分菌液将其接种至 1 L LB 液 体培养基中,37℃培养待其 OD 值约为 0.6 时加入 IPTG 至 0.5 mM 终浓度诱导 蛋白表达,16℃培养 24 h 以使得蛋白充分表达且不易形成包涵体。

将表达蛋白的菌液离心后用 Lysis Buffer 重悬并用高压细胞破碎仪破碎菌体, 将破碎后的菌体离心后取上清用 0.22 um 滤膜过滤,取滤液先用镍柱进行亲和 层析,使用 500 mM NaCl,50 mM 咪唑浓度的 Wash buffer 1 和高盐的 4 M NaCl, 50 mM 咪唑浓度的 Wash buffer 2 充分洗柱以洗掉杂蛋白与部分核酸后,再用 500 mM 咪唑浓度的 Elution buffer 洗脱目的蛋白,再过肝素柱以期尽量洗去部 分核酸,最后过分子筛柱进行体积排阻层析,根据出峰位置将纯化蛋白的同时 分离出 DDX21 蛋白的 Peak1 和 Peak2,使用 Millipore 超滤管浓缩收集 Peak1 蛋 白 Peak2 蛋白用于后续实验。

#### 3.3.2 DDX21 N 端与 C 端截短体蛋白的相分离形态差异

将带有 EGFP 荧光标签的 DDX21 N 端与 C 端截短体分别纯化收集并于荧光 显微镜下观察其相分离形态。



#### 图 8. DDX21 蛋白 N 端与 C 端 IDRs 截短体出峰位置与相分离形态

A 带有 EGFP 荧光标签的蛋白 DDX21 不同截短体进行体积排阻层析时的出峰位置。 B 将带有 EGFP 荧光标签的蛋白 DDX21 不同截短体的 Peak 1 (P1) 与 Peak 2 (P2) 对应收 集孔分别收集浓缩后,在 5 uM 浓度下于荧光显微镜下观察其相分离形态。EGFP-DDX21-ΔN 在进行体积排阻层析时只有一个出峰位置,因而未区分 Peak1 与 Peak2

全长的 EGFP-DDX21 在体外纯化进行分子排阻色谱纯化时,会出现第一个 明显的 Peak 1 和峰值较低的出峰位置略靠后的 Peak 2 (图 8A),浓缩收集 Peak 1 与 Peak 2 对应的目的蛋白浓缩,在 20 mM Tris,150 mM NaCl 的条件下,浓 度为 5 uM 目的蛋白会形成不同的相分离形态。Peak 1 对应的蛋白呈现纤维样高 聚化的聚集形态,而 Peak 2 对应的蛋白则呈现出液滴状的聚集程度相较于 Peak 1 更低的聚集状态 (图 8B)。 而在将 DDX21 蛋白的 C 端截短 (EGFP-DDX21-ΔC),使其仅剩 N 端 IDRs 序列存在后,Peak 1 的出峰位置并未出现较大差异,在约 13 ml 处出现了峰值 较低的小峰 Peak 2 (图 8A),将其分别收集浓缩后,于荧光显微镜下观察发现 无论 Peak 1 或 Peak 2,均呈现纤维样的聚集状态,尽管 Peak 2 的聚集程度似乎 略低于 Peak 1,但并未显现出液滴状相分离形态 (图 8B)。

若将 DDX21 蛋白的 N 端截短 (EGFP-DDX21-ΔN),当其仅剩 C 端 IDRs 序 列时,可见其仅出现一个出峰位置,且相较于全长 EGFP-DDX21 或 EGFP-DDX21-ΔC 的 Peak 1,其出峰位置明显后移至约 12.5 ml 左右(图 8A),对其收 集浓缩后于荧光显微镜下观察其相分离形态,可见其明显的液滴状形态(图 8B)。

而如果将 DDX21 蛋白的 N 端与 C 端 IDRs 序列均截短 (EGFP-DDX21-ΔNC),使其仅剩中间 domain 部分,有趣的是,在体积排阻层析时可见两个明 显的出峰位置,分别在 8.5 ml 和 12 ml 左右,分别与 EGFP-DDX21-ΔC 的 Peak 1 和 EGFP-DDX21-ΔN 的出峰位置相对应(图 8A),而将其收集浓缩后也可在 显微镜下见其聚集状态,分别与 EGFP-DDX21-ΔC 的纤维状聚集、EGFP-DDX21-ΔN 的液滴状聚集形态相对应(图 8B)。

结合前文所述核酸对 DDX21 相分离形态的影响,我们认为 DDX21 的 N 端和 C 端 IDRs 序列对其相分离形态有着不同作用,其 N 端 IDRs 序列,促使 DDX21 结合大量核酸,聚合成形成高度聚集的纤维状形态;而其 C 端 IDRs 序列,则促使 DDX21 以液滴状形态寡聚;除去 DDX21 的 N 端与 C 端 IDRs 序列,则促使 DDX21 以液滴状形态寡聚;除去 DDX21 的 N 端与 C 端 IDRs 序列,其中间多个 domain 区域形成的区段既有着结合核酸形成高度聚集的纤维状形态的倾向,又有一定的以液滴状形态寡聚的倾向。因此 N 端和 C 端 IDRs 与中间其他 domain 区域共同相互作用调控了 DDX21 相分离的过程。但是,这些不同的 domain 在 DDX21 相分离的过程中具体扮演了什么样的角色,以及他们是如何与核酸相互作用,从而形成不同的聚集凝聚状态,这可能是一个较为复杂的互作网络,需要我们后续进一步深入探究其中的奥秘。我们已经通过构建其他一些突变体及截短体,并且结合体外生化实验和结构生物学的手段,初步获得了一些更为全面的了解。

#### 3.4 DDX21 蛋白体内亚细胞定位受 N 端与 C 端 IDRs 影响

除了体外纯化带有 EGFP 荧光标签的蛋白 DDX21 不同截短体并观察其相分 离形态外,为了进一步探究其 N 端与 C 端 IDRs 序列对 DDX21 的亚细胞定位及 生理功能的可能影响,我们以 pEGFP 为载体,构建了 DDX21 N 端与 C 端 IDRs 截短体质粒(图 9A)。将以 pEGFP 为载体的 DDX21 N 端与 C 端 IDRs 截短体 质粒转染入 HeLa 细胞中以观察其亚细胞定位与形态。



#### 图 9. DDX21 蛋白 N 端与 C 端 IDRs 截短体的亚细胞定位

A 以 pEGFP 为载体构建的 DDX21 N 端与 C 端 IDRs 截短体质粒图谱。B 将带 DDX21 蛋白 N 端与 C 端 IDRs 截短体的 pEGFP 载体使用 Lipo 3000 转染入 HeLa 细胞中,于荧光显微镜下观察活细胞状态下 DDX21 蛋白 N 端与 C 端 IDRs 截短体的亚细胞定位与形态。

在活细胞状态下,正常情况下的全长的 DDX21 分布于核仁的 PDFC 区域, 形成不太规整的甜甜圈样的分布形态。而如果将其 C 端 IDRs 序列截短,仅剩 其 N 端 IDRs 序列时,可见其在核仁内的分布较为弥散,并未仅仅分布在 PDFC 区域而是在 FC 区域至 GC (Granular Component) 区域等均有分布。若将 N 端 IDRs 序列截短,仅剩其 C 端 IDRs 序列时,可见其相较于全长 DDX21 分布仍然 出现在核仁内弥散的情况,但是相较于 C 端 IDRs 序列截短的 EGFP-DDX21-ΔC, 当其 N 端 IDRs 序列截短保留 C 端 IDRs 序列时,DDX21 将分布在 FC 区域外, 说明了其 C 端 IDRs 序列帮助 DDX21 定位在核仁 FC 区域外。而如果将 N 端与 C端的 IDRs 序列均截短, DDX21 甚至无法定位在细胞核内, 提示其 N 端与 C 端序列可能具有的辅助入核作用(图 9)。

综合体内活细胞状态下,DDX21 蛋白的 N 端与 C 端 IDRs 序列截短体的亚 细胞定位情况,我们认为其 N 端与 C 端 IDRs 序列对 DDX21 蛋白的入核以及在 核仁内的定位尤为重要,N 端与 C 端序列均有帮助其入核的作用,同时,N 端 与 C 端 IDRs 序列同时存在的情况下才能使其准确的定位在核仁的 PDFC 区域 内而不在核仁内弥散。此外,而 C 端 IDRs 序列对 DDX21 蛋白定位在 FC 区域 以外有着尤为重要的作用。

# 四、讨 论

实验室前期研究发现 sno-lncRNA, *SLERT* 通过调节 DDX21 的构象变化影响 DDX21 与 Pol I的结合,进而影响 Pol I对 rDNA 的转录活性。此外还从相分离 的角度进一步发现,*SLERT* 对 DDX21 的调控将会引起其细胞内相分离状态的 改变,在 sno-lncRNA, *SLERT* 存在的条件下,DDX21 分布所在的核仁内区域将 会有着更强的流动性和更大的体积,进而影响核仁内 FC 区域的大小与流动性 等性质,很可能也是影响了 Pol I的转录活性的原因之一。

因此对 DDX21 蛋白相分离的发生、形态与机制的深入研究,有助于进一步理解其调控 Pol I转录活性的生理功能,乃至有助于研究核仁结构的形成与分布<sup>[28]</sup>。此外,由于 DDX21 对核糖体生成这一非常重要的生物学过程的深入参与,DDX21 的突变或异常表达与许多恶性肿瘤联系紧密,不仅在结直肠癌中常见其突变,还可作为一种泛癌的生物标志分子<sup>[24]</sup>。因此对其相分离机制的深入研究有着深远的实际意义,或将为理解癌症发生机制、进行生物标志分子开发、开发新的癌症检测手段或治疗角度,奠定必要的研究基础。

我们的研究聚焦于对 DDX21 蛋白相分离机制的探索,在前人研究的基础 上,较为深入的研究了核酸与 IDRs 序列对 DDX21 蛋白相分离发生与形态的影 响。我们首先利用生物信息学的手段对 DDX21 蛋白的结构域、三维结构与内 在无序序列进行了初步预测,而后一方面确认了包括 DNA 和 RNA 在内的核酸 将会显著影响 DDX21 蛋白的相分离形态与聚集程度,另一方面在体外和体内 角度下初步探究了 DDX21 的 N 端与 C 端 IDRs 序列对其相分离发生与形态的影 响。我们发现 DDX21 与核酸的结合将会使其由液滴状较为寡聚的相分离形态 向纤维状的高聚化形态转变。同时 DDX21 的 N 端 IDRs 序列对其与核酸的结合 和形成纤维状高聚化形态尤为重要,而其 C 端 IDRs 序列则对 DDX21 形成液滴 状相分离形态、定位在核仁内 FC 区域以外十分重要,N 端与 C 端 IDRs 序列共 同发挥作用帮助其相对有序的分布在核仁 PDFC 区域内而不在核仁内弥散。

我们目前的研究仍存在许多不足,比如目前研究中体外实验较多而和体内 生理功能联系不够紧密;尚未对不同类型的 RNA 对蛋白 DDX21 的相分离形态 的影响进行探究;在体外环境下难以完全模拟核仁内部环境。而在接下来的研

究当中,我们也会更加关注 DDX21 蛋白的相分离形态与其生理功能的联系, 进一步丰富我们的研究。

在今后的研究中,一方面我们将深入研究 DDX21 的 IDRs 序列对其相分离 的影响,我们计划通过 FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) 等手段对不同 DDX21 截短体 的相分离状态与性质进行更为细致的测定以判断 N 端与 C 端 IDRs 序列对其相 分离发生的具体作用与原因,以判断其所形成的相的流动性、极性、粘度等性 质;另一方面我们将进一步聚焦于 DDX21 的相分离与其生理功能的联系,我 们将尝试通过 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 等手段联系体外纯 化的 DDX21 的两种不同相分离状态与体内 DDX21 的两种不同构象,从而更为 清晰的解释 DDX21 的相分离对核仁组织架构与 Pol I转录活性的具体影响。

通过对 DDX21 的相分离机制,分子间互作,与其生理功能的深入研究, 我们期望以此对核仁的组织架构的形成与稳定,rDNA 的转录与 pre-rRNA 的加 工、核糖体的形成产生更深刻的理解,同时也为研究癌症发生过程中核糖体的 变化、癌症发生过程中生物标志分子的开发与癌症治疗提供新的视角。

参考文献

- 1. Yang L, Duff M O, Graveley B R, et al. Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs. [J]. Genome Biol, 2011, 12(2): R16.
- Yin Q-F, Yang L, Zhang Y, et al. Long noncoding RNAs with snoRNA ends. [J]. Mol Cell, 2012, 48(2): 219-30.
- 3. Chen L-L. Linking Long Noncoding RNA Localization and Function. [J]. Trends In Biochemical Sciences, 2016, 41(9): 761-72.
- 4. Xing Y-H, Yao R-W, Zhang Y, et al. SLERT Regulates DDX21 Rings Associated with Pol I Transcription. [J]. Cell, 2017, 169(4).
- 5. Wu M, Xu G, Han C, et al. lncRNA SLERT controls phase separation of FC/DFCs to facilitate Pol I transcription. [J]. Science (New York, NY), 2021, 373(6554): 547-55.
- 6. Cargill M, Venkataraman R, Lee S. DEAD-Box RNA Helicases and Genome Stability. [J]. Genes-Basel, 2021, 12(10).
- Chen Z, Li Z, Hu X, et al. Structural Basis of Human Helicase DDX21 in RNA Binding, Unwinding, and Antiviral Signal Activation [J]. Adv Sci (Weinh), 2020, 7(14): 2000532.
- Sloan K E, Leisegang M S, Doebele C, et al. The association of late-acting snoRNPs with human pre-ribosomal complexes requires the RNA helicase DDX21. [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(1): 553-64.
- Zhang B, Li Y, Zhang J, et al. ADAR1 links R-loop homeostasis to ATR activation in replication stress response. [J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(21): 11668-87.
- Lindström M S, Jurada D, Bursac S, et al. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. [J]. Oncogene, 2018, 37(18): 2351-66.
- Xie J, Wen M, Zhang J, et al. The Roles of RNA Helicases in DNA Damage Repair and Tumorigenesis Reveal Precision Therapeutic Strategies. [J]. Cancer Research, 2022, 82(5): 872-84.
- 12. Bora P, Gahurova L, Hauserova A, et al. DDX21 is a p38-MAPK-sensitive nucleolar protein necessary for mouse preimplantation embryo development and cell-fate specification. [J]. Open Biology, 2021, 11(7): 210092.
- 13. Calo E, Gu B, Bowen M E, et al. Tissue-selective effects of nucleolar stress and rDNA damage in developmental disorders. [J]. Nature, 2018, 554(7690): 112-7.
- 14. Hondele M, Sachdev R, Heinrich S, et al. DEAD-box ATPases are global regulators of phase-separated organelles. [J]. Nature, 2019, 573(7772): 144-8.
- 15. Yang H, Zhou J, Ochs R L, et al. Down-regulation of RNA helicase II/Gu results in the depletion of 18 and 28 S rRNAs in Xenopus oocyte. [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(40): 38847-59.
- Calo E, Flynn R A, Martin L, et al. RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. [J]. Nature, 2015, 518(7538): 249-53.

- Chen G, Liu C-H, Zhou L, et al. Cellular DDX21 RNA helicase inhibits influenza A virus replication but is counteracted by the viral NS1 protein. [J]. Cell Host & Microbe, 2014, 15(4): 484-93.
- 18. Abdullah S W, Wu J E, Zhang Y, et al. DDX21, a Host Restriction Factor of FMDV IRES-Dependent Translation and Replication. [J]. Viruses, 2021, 13(9).
- 19. Li J, Fang P, Zhou Y, et al. DEAD-box RNA helicase 21 negatively regulates cytosolic RNA-mediated innate immune signaling. [J]. Front Immunol, 2022, 13: 956794.
- Lu P, Yu Z, Wang K, et al. DDX21 Interacts with WDR5 to Promote Colorectal Cancer Cell Proliferation by Activating CDK1 Expression. [J]. Journal of Cancer, 2022, 13(5): 1530-9.
- Gao H, Wei H, Yang Y, et al. Phase separation of DDX21 promotes colorectal cancer metastasis via MCM5-dependent EMT pathway. [J]. Oncogene, 2023, 42(21): 1704-15.
- Jung Y, Lee S, Choi H-S, et al. Clinical validation of colorectal cancer biomarkers identified from bioinformatics analysis of public expression data. [J]. Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association For Cancer Research, 2011, 17(4): 700-9.
- Tanaka A, Wang J Y, Shia J, et al. DEAD-box RNA helicase protein DDX21 as a prognosis marker for early stage colorectal cancer with microsatellite instability.
   [J]. Sci Rep-Uk, 2020, 10(1): 22085.
- Hu A, Wang Y, Tian J, et al. Pan-cancer analysis reveals DDX21 as a potential biomarker for the prognosis of multiple tumor types. [J]. Front Oncol, 2022, 12: 947054.
- 25. Brangwynne C P, Eckmann C R, Courson D S, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. [J]. Science (New York, NY), 2009, 324(5935): 1729-32.
- 26. Hnisz D, Shrinivas K, Young R A, et al. A Phase Separation Model for Transcriptional Control. [J]. Cell, 2017, 169(1): 13-23.
- Banani S F, Lee H O, Hyman A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2017, 18(5): 285-98.
- Lafontaine D L J, Riback J A, Bascetin R, et al. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021, 22(3): 165-82.
- 29. Hyman A A, Weber C A, Jülicher F. Liquid-liquid phase separation in biology. [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2014, 30: 39-58.
- Alberti S, Gladfelter A, Mittag T. Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. [J]. Cell, 2019, 176(3): 419-34.
- 31. Shan L, Xu G, Yao R-W, et al. Nucleolar URB1 ensures 3' ETS rRNA removal to prevent exosome surveillance [J]. Nature, 2023, 615(7952): 526-34.

- 32. Marcaida M J, Kauzlaric A, Duperrex A, et al. The Human RNA Helicase DDX21 Presents a Dimerization Interface Necessary for Helicase Activity [J]. iScience, 2020, 23(12): 101811.
- 33. King M R, Ruff K M, Lin A Z, et al. Macromolecular condensation organizes nucleolar sub-phases to set up a pH gradient [J]. Cell, 2024, 187(8).

# 致 谢

在我写下这段致谢时,忽然间意识到自己已经在不知不觉中即将走完这段 大学本科的生活。回望从入学时的懵懂到即将毕业时的怅然,四年的时间显得 又长又短,当我在期末熬夜复习时时间总是很长,而当这个学期结束忽然发现 不会再有下个学期时,时间又显得那么短。仔细想来,四年的时间与生活足够 精彩,让我无论在生活上还是学习上都见到了许多,学到了许多,也成长了不 少,但回首望去,想来又会觉得或许还可以再努力一点,再疯狂一点,即便已 经觉得自己并未光阴虚度,想到这段日子不会再有时也依然免不了有些遗憾。

于这篇毕业论文而言,我要感谢很多人,而于我的成长而言,我要感谢更 多人。首先要感谢的是我的父母,在我面临困难和抉择时,总会想到他们对我 的安慰和鼓励,他们总让我放手去做,大不了就回家,让我始终得以保持良好 的心态,坦然面对未知。而后我还要感谢自己,感谢自己的认真和坚持,不必 在意旁人所视,只管做自己认为正确的事,做自己想做和该做的事。回顾自己 本科阶段的成长,我还要感谢我的室友徐浩翔和刘铠铭,感谢周围寝室的同学 们,樊卓雨、邰睿、王邺鹏、邓洲豪、赵睿康、何远降,感谢工作负责的辅导 员姜鹤,感谢在本科阶段罗小金老师实验室时的王莹老师、罗小金老师、蓝登 勇师兄。在这里我尤为要感谢的是我的室友们和王莹老师,我的室友们总是愿 意互相交流学习互帮互助,我们共同进步共同成长,我们互相倾诉遇到的困难 挫折,他们也总愿意包容我有时不规律的休息时间和半夜爬起来学习工作的阴 间作息,没有他们的支持和陪伴,我想我的本科生活将少一些快乐,多不少苦 闷。而王莹老师是我本科阶段开始接触科研的领路人,从实验规划到实验细节, 王莹老师愿意花费她的时间和精力,不厌其烦的教会了当时我刚刚接触科研的 我许多。更为感谢的,是她对我精神上的鼓励和人生上的指引,我尤记得她对 我说,侯明林,你是个聪明的小孩,但你会遇到挫折和进展缓慢的时刻,只是 不要虚度光阴就好。"不要虚度光阴就好",这句话我始终记得。

同时,在保研实习和完成本篇毕业论文时,我还要感谢的是陈玲玲老师, 潘宇航师兄,单琳师姐,王潇师姐,徐奕锋师兄,邹博宇师兄,南杉师姐,孟 子璇师姐以及刘骏骐同学,在我学习和科研的过程中给了我很多宝贵的指点与

建议。这里尤为要感谢的是潘宇航师兄,给了我从实验设计与操作到课题的思 考与推进上,乃至科研习惯上的全方面的指导,让我得以更加熟悉生化与细胞 方面的实验与科研进展,更好的从事科研工作。

感谢一路走来遇到的所有人,帮助过我的也好,伤害过我的也罢,都让我 在成长的道路上不断向前。最后,我想以毛泽东同志的《七绝·改西乡隆盛诗 赠父亲》中的一句诗为我毕业论文的结尾,"埋骨何须桑梓地,人生无处不青 山。"

人生无处不青山。