



(21)申请号 201811451731.2

(22)申请日 2018.11.30

(71)申请人 中国科学院大连化学物理研究所
地址 116023 辽宁省大连市沙河口区中山
路457-41号

(72)发明人 王稳 朴海龙

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限
公司 21002

代理人 马驰

(51)Int.Cl.

G01N 30/88(2006.01)

G01N 30/08(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种细胞内MTDH结合代谢物的鉴定方法

(57)摘要

本发明公开一种利用经典的蛋白质亲和纯化手段结合灵敏的质谱分析,鉴定细胞内与MTDH发生原位结合的代谢物小分子的方法。具体采用表面装载链霉亲和素的琼脂糖珠,对细胞内表达有生物素片段的融合MTDH蛋白以及对照空载体表达蛋白进行亲和富集,同时结合蛋白免疫印迹实验证实蛋白质的亲和纯化结果,通过提取体系内代谢物并进行质谱鉴定,比较对照蛋白组与融合MTDH蛋白组的代谢物丰度差异,从而鉴定出可能与MTDH相互作用的代谢物,为后续深入展开生物大小分子功能相互干预相关研究提供指导。

1. 一种细胞内MTDH结合代谢物的鉴定方法,其特征在于:

1) 利用蛋白质亲和纯化手段富集细胞内空载蛋白与融合MTDH蛋白;具体为:采用表面装载链霉亲和素的琼脂糖珠,对细胞内表达有生物素片段的融合MTDH蛋白以及对照空载体表达蛋白进行亲和富集;

2) 鉴定细胞内与MTDH发生原位结合的代谢物小分子;具体为:对代谢物进行质谱鉴定,比较对照蛋白组与融合MTDH蛋白组的代谢物丰度差异,从而鉴定出与MTDH相互作用的代谢物

通过在HEK293T中过表达目的蛋白,结合免疫共沉淀的方法,获得较高含量的空载蛋白与融合MTDH蛋白。

2. 如权利要求1所述的鉴定方法,其特征在于:利用蛋白质亲和纯化手段富集细胞内空载蛋白与融合MTDH蛋白,包括以下步骤:

1) 转染前一天接种HEK293T细胞于2个5-10cm细胞培养皿;

2) 分别在293T细胞中转染6-10 μ g SFB-N与SFB-MTDH质粒;

3) 转染48-60h后吸去培养基,加入5-8ml PBS (Hyclone, SH30256.01) 洗去剩余培养基,吸走PBS,将细胞培养皿置于液氮中淬灭;

4) 每个培养皿加入1-1.2ml配制的NETN细胞裂解液,提取蛋白;

5) 每管蛋白裂解液中加入15-20 μ l链霉亲和素琼脂糖珠,4 $^{\circ}$ C富集2-4h。

3. 如权利要求1所述的的鉴定方法,其特征在于:对亲和纯化体系内的代谢物进行提取,衍生后进行质谱分析鉴定富集后的空载蛋白与融合MTDH蛋白结合的代谢物,包括以下步骤:

1) 采用离心式过滤柱分离琼脂糖珠-蛋白质-代谢物结合复合体与NETN裂解液;用500-800 μ l PBS,洗琼脂糖珠-蛋白质-代谢物结合复合体2-3次;

2) 200 μ l三蒸水重悬琼脂糖珠-蛋白质-代谢物结合复合体,加入800 μ l含有终浓度为5-10 μ g/ml正十三酸标准样品的甲醇(Merck,)静置提取30-50min;

3) 2000rpm离心10分钟后,对照组与实验组分别取等体积的上清,真空浓缩干燥6-8h;

4) 采用基于TMS的两步衍生法对获得的代谢样品衍生并进行GC-MS分析;

5) 提取代谢物后的琼脂糖珠-蛋白质结合复合体进行SDS-PAGE电泳,将凝胶上的蛋白转印至0.45 μ m的PVDF膜上;

6) 利用Flag特异抗体,通过Western Blot结合化学发光表征蛋白富集结果。

4. 根据权利要求1或3所述的的鉴定方法,其特征在于,通过比较空载蛋白组与融合MTDH蛋白组之间的代谢物含量差异,鉴定出细胞内可能与MTDH结合的代谢物。

一种细胞内MTDH结合代谢物的鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及到生物化学与分子生物学技术以及色谱质谱联用分析技术,具体涉及基于蛋白亲和富集与质谱分析联用的细胞内MTDH结合代谢物的鉴定方法,利用蛋白质亲和富集与气相色谱-质谱联用技术检测差异代谢物的方法。

背景技术

[0002] 生物分子之间的相互作用存在于细胞内一系列的生命过程中,其中备受关注的经常是蛋白质与蛋白质之间的相互作用,或者蛋白质与DNA或RNA之间的结合作用。而随着各种分析检测手段的发展,代谢物小分子与蛋白质之间的功能调控关系也渐渐进入研究者的视野。近年来,越来越多的研究围绕生物大小分子相互作用鉴定的新方法建立以及深入的生物功能影响机制展开。

[0003] 鉴定蛋白质与代谢物相互作用的方法常见的有:1)通过特殊基质固载目的蛋白后与代谢物共孵育,经过洗脱提取等步骤鉴定与对照组出现差异的代谢物小分子来发现蛋白质代谢物的结合作用。该方法在分析的高通量方面有欠缺;2)基于化学蛋白质组学的活性蛋白质组学技术,即通过设计活性的小分子探针,利用点击化学反应对蛋白质小分子结合体系进行富集,结合蛋白质组学技术筛选潜在的代谢物作用的蛋白质靶点;3)蛋白质的亲和富集结合灵敏的质谱检测手段,鉴定细胞内原位发生的蛋白质与代谢物的相互作用。而分析结果的假阳性率高是后面两种检测手段共有的特性,需要结合各种生物学功能实验做进一步验证。

[0004] MTDH(metadherin,异黏蛋白)在多种恶性肿瘤中呈高表达状态,诸如前列腺癌、乳腺癌、神经母细胞瘤、肝癌、食管鳞状细胞癌、胃癌和非小细胞肺癌,并且与疾病的发展和不良的临床预后有关。围绕MTDH在多种肿瘤中的作用而展开的蛋白-蛋白相互影响的研究很多,但是参与其功能调控的生物小分子发现与机制研究相对较少。从蛋白质-代谢物相互作用的鉴定出发,发现与MTDH可能存在相互作用的代谢物可以为后续的生命基础研究,肿瘤的临床诊断与治疗,新药发现等方面提供重要指导。

[0005] 基于气相色谱-质谱技术(GC-MS)、液相色谱-质谱技术(LC-MS)和毛细管电泳-质谱技术(CE-MS)的代谢组学,是对某一生物或细胞内所有低分子质量代谢产物进行定性和定量分析的新学科。这种细胞内代谢物的灵敏检测手段为蛋白质-代谢物相互作用的鉴定提供强有力的辅助。

发明内容

[0006] 本发明涉及细胞内与MTDH相互作用的代谢物的鉴定,目的一是阐明在亲和富集融合MTDH蛋白过程中,MTDH在细胞内原位结合的代谢物也随之被富集;目的二,为蛋白质与代谢物的相互调控在癌症治疗、药物靶点鉴定、新药发现等临床转化应用中的重要作用提供基础。

[0007] 实验结果表明,通过亲和富集融合MTDH蛋白,结合GC-MS分析,鉴定出胆固醇为

MTDH可能结合的代谢物分子之一。

[0008] 一种基于蛋白亲和富集与质谱分析联用的细胞内MTDH结合代谢物的鉴定方法,包括如下步骤:

[0009] 融合MTDH蛋白与空载蛋白的亲和富集

[0010] 1) 转染前一天接种40%-50%汇合度的HEK293T细胞于10cm细胞培养皿。

[0011] 2) 在293T细胞中转染6-10 μ g SFB-N与SFB-MTDH质粒。

[0012] 3) 转染48-60h后吸去培养基,加入5-8ml PBS (Hyclone, SH30256.01) 洗去剩余培养基,吸走PBS,将细胞培养皿置于液氮中淬灭。

[0013] 4) 每个培养皿加入1-1.2ml NETN细胞裂解液,破碎细胞,提取蛋白。

[0014] 5) 每管蛋白裂解液中加入15-20 μ l链霉亲和素琼脂糖珠,4 $^{\circ}$ C富集2-4h。

[0015] 空载蛋白与融合MTDH蛋白结合的代谢物提取与鉴定

[0016] 1) 采用离心式过滤柱 (Pierce, 89868) 分离琼脂糖珠-蛋白质-代谢物结合复合体与 NETN裂解液。用500-800 μ l PBS (Hyclone, SH30256.01), 洗琼脂糖珠-蛋白质-代谢物结合复合体2-3次。

[0017] 2) 200 μ l三蒸水重悬琼脂糖珠-蛋白质-代谢物结合复合体,加入800 μ l含有终浓度为 5-10 μ g/ml正十三酸标准样品的甲醇 (Merck,) 静置提取30-50min。

[0018] 3) 低速离心后,对照组与实验组分别取等体积的上清,真空浓缩干燥6-8h。

[0019] 4) 采用基于TMS的两步衍生法对获得的代谢样品衍生并进行GC-MS分析。

[0020] 5) 提取代谢物后的琼脂糖珠-蛋白质结合复合体进行SDS-PAGE电泳,将凝胶上的蛋白转印至0.45 μ m的PVDF膜上;

[0021] 6) 利用Flag特异抗体,通过Western Blot进行化学发光。

[0022] 本发明采用表面装载链霉亲和素的琼脂糖珠,对细胞内表达有生物素片段的融合MTDH蛋白以及对对照空载体表达蛋白进行亲和富集,同时结合蛋白免疫印迹实验证实蛋白质的亲和纯化结果,通过提取体系内代谢物并进行质谱鉴定,比较对照蛋白组与融合MTDH蛋白组的代谢物丰度差异,从而鉴定出可能与MTDH相互作用的代谢物,为后续深入展开生物大小分子功能相互干预相关研究提供指导。

附图说明

[0023] 图1为鉴定细胞内MTDH相互作用代谢物的实验流程。

[0024] 图2为Western Blot验证蛋白亲和富集结果图;在HEK293T细胞中转染空载SFB-N作为阴性对照,转染另外的融合ERR α 蛋白作为阳性对照,验证亲和富集效率。

[0025] 图3为GC-MS检测对照蛋白组与融合MTDH组样品的总TIC图。

[0026] 图4为代谢物胆固醇在对照蛋白组与融合MTDH组之间表现差异及对应的质谱图。比较对照蛋白组与融合MTDH组之间的代谢物,鉴定出胆固醇可能为MTDH结合的代谢物之一。(A) 将对照蛋白组与融合MTDH组分析的TIC图叠加,其中红色曲线代表融合MTDH组的TIC图,黑色曲线代表对照蛋白组的TIC图。保留时间在48.1min-48.3min 之间的色谱峰鉴定为胆固醇峰;(B) 保留时间在48.1min-48.3min之间的对照蛋白组与融合MTDH组的色谱峰对应的质谱图比较。

[0027] 上方的图为对照蛋白组色谱峰对应的质谱图,未见明显的胆固醇特征碎片离子,

如 m/z 129, m/z 329, m/z 368等。下方的图为融合MTDH蛋白组色谱峰对应的质谱图,出现明显的 m/z 129, m/z 329, m/z 368碎片。

具体实施方式

[0028] 现结合实例,对本发明做进一步说明。实例仅限于说明本发明,而非对本发明的限定。

[0029] SFB-MTDH的质粒构建

[0030] 1) 空载质粒SFB-N (从别的实验室索取)。

[0031] 2) 购买cDNA文库,通过PCR扩增带有attB保守序列的MTDH。设计引物序列如下:

[0032] attB1-MTDH:

[0033] GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTGCACGGAGCTGGCAG

[0034] attB2-MTDH:

[0035] GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACGTTTCTCGTCTGGC

[0036] 3) BP反应:

	TE	补充至总体积 10 μ l
[0037]	pDonar(从别的实验室索取)	150ng
	PCR 产物	150ng
	BP 酶 (invitrogen)	1 μ l

[0038] 25 $^{\circ}$ C反应6小时。转化至DH5 α 感受态,涂布卡那平板,37 $^{\circ}$ C过夜,挑克隆,提质粒pDonar-MTDH,测序无误后进行下一步反应。

[0039] 4) LR反应:

	TE	补充至总体积 10 μ l
[0040]	SFB-N	150ng
	pDonar-MTDH	150ng
	LR 酶 (invitrogen)	1 μ l

[0041] 25 $^{\circ}$ C反应6小时。转化至DH5 α 感受态,涂布氨苄平板,37 $^{\circ}$ C过夜,挑克隆,提质粒SFB-MTDH。

[0042] 融合MTDH蛋白与空载蛋白的亲富集

[0043] 1) 转染前一天接种 10^6 个HEK293T细胞分别于2个10cm细胞培养皿。

[0044] 2) 分别在2个培养皿293T细胞中转染10 μ g SFB-N (空载蛋白组) 与SFB-MTDH质粒 (MTDH蛋白组)。

[0045] 3) 转染48-60h (在此实施例中为60h) 后吸去培养基,加入5-8ml (在此实施例中为6ml) PBS (Hyclone, SH30256.01) 洗去剩余培养基,吸走PBS,将细胞培养皿置于液氮中淬灭。

[0046] 4) 配制NETN细胞裂解液 (20mM Tris.HCl (pH 8.0); 100mM NaCl; 1mM EDTA; 0.5% NP-40) 中按1:100分别加入蛋白酶抑制剂 (Biomake, B14001&B15001), 往每个培养皿中加入1ml裂解液,用细胞刮子刮取细胞并转移混合物到1.5ml EP管中,放入DNA混合仪,于4 $^{\circ}$ C混合50min破碎细胞,提取蛋白。

[0047] 5) 将EP管放入预冷至4 $^{\circ}$ C的离心机中,13000g,离心15min后,每管样品取50 μ l 上清作为细胞内全蛋白检测样品,空载蛋白组与融合MTDH蛋白组分别取等量上清至另一离心管中。

[0048] 6) 往每管蛋白裂解液中加入20 μ l链霉亲和素琼脂糖珠,放入DNA混合仪中混匀,4℃富集4h。

[0049] 空载蛋白与融合MTDH蛋白结合的代谢物分别提取

[0050] 1) 采用0.8ml离心式过滤柱(Pierce,89868),1500rpm,4℃离心5min,分离琼脂糖珠-蛋白质-代谢物结合复合体与NETN裂解液。加入800 μ l PBS(Hyclone,SH30256.01),1500rpm,4℃离心5min,洗琼脂糖珠-蛋白质-代谢物结合复合体,重复清洗过程2次。

[0051] 2) 200 μ l三蒸水重悬琼脂糖珠-蛋白质-代谢物结合复合体至另外的EP管,加入800 μ l 含有终浓度为5 μ g/ml正十三酸标准样品的甲醇(Merck,)静置提取30min。

[0052] 3) 1500rpm,4℃离心10min,分别取对照组(空载蛋白组)与实验组(MTDH蛋白组)中800 μ l上清,真空浓缩干燥6-8h至样品完全干燥。

[0053] 代谢样品衍生及GC-MS分析

[0054] 1) 基于TMS的两步法衍生。每管样品中加入50 μ L甲氧胺溶液(含20mg/mL,吡啶),涡旋2min,超声5min后,置于37℃水浴中肟化反应1.5h,以保护羰基,然后加入40 μ L MSTFA(N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺),置于37℃水浴中硅烷化反应1h,以增加代谢物的挥发性。硅烷化反应完成后,离心取上清液70 μ L用于后续的GC-MS分析。

[0055] 2) GC-MS分析。QP 2010 GC-MS系统耦合AOC-20i自动进样器(Shimadzu,Japan)。DB-5 MS熔融石英毛细管柱(30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m,Agilent Technologies,USA)用于代谢物的色谱分离。进样量1 μ L,分流比1:10。进样口温度为300℃。氦气(99.9995%,China)作为载气,流速40cm/s,恒线速模式。程序升温条件为:柱温在70℃保持3min,以5℃/min升至300℃,保持10min。质谱调谐采用全氟三丁胺(PFTBA),离子化采用70eV的电子轰击电离源(EI)。检测电压依据调谐结果设置。传输线和离子源温度分别为280℃和230℃。溶剂切割时间5.0min,MS采集范围33-600m/z,采集频率4scans/s。

[0056] Western Blot实验验证蛋白亲和富集结果

[0057] 1) 提取代谢物后的琼脂糖珠-蛋白质结合复合体体系,加入0.5倍体积的3X LDS Loading buffer,并将混合物在95℃加热10min使蛋白质变性。

[0058] 2) 将凝胶固定到电泳装置上后,加入Tris-甘氨酸电泳缓冲液后,加样。

[0059] 2) 连接好电源后用80V电压跑胶,当样品经过浓缩胶到达分离胶时,将电压增大到120V直至溴酚蓝接近凝胶末端然后结束电泳。

[0060] 3) 取出电泳好的凝胶,并切除外源及上层的积层胶。

[0061] 4) 转膜:将膜及4片滤纸剪成所需胶的大小。先将PVDF膜浸于甲醇中浸泡5分钟。按照顺序:正级-海绵+滤纸+膜+胶+滤纸+海绵-负极,将膜夹紧,每一层都要压平,防止产生气泡。

[0062] 5) 将组装好的夹子放入装有转膜缓冲液的电泳槽中,放入冰盒,转子后加盖,并将电泳槽外围加入冰水混合物后放在磁力搅拌器上接通电源。恒流250mA 2h。

[0063] 6) 将转好的膜放入TBST缓冲液中洗涤5min,洗涤两次。

[0064] 7) 封闭:用TBST缓冲液配置体积含量5%的脱脂牛奶并混匀,将PVDF膜浸泡在含5%脱脂牛奶的TBST中,室温摇晃封闭1h。

[0065] 8) 将膜放入TBST缓冲液中洗涤,每次5min,洗涤三次,将PVDF膜放在抗体孵育盒中,用5%BSA溶液按1:1000稀释Flag兔抗体(proteintech,20543-1-AP)加入孵育盒中,4℃

摇床过夜。

[0066] 9) 将PVDF膜取出,用TBST清洗3次,每次15min。

[0067] 10) TBST配制5%脱脂牛奶,1:3000稀释羊抗兔二抗(Milipore,AP132P),加在膜上,置于摇床上室温孵育2h。

[0068] 11) 将膜用TBST清洗3次,每次15min。

[0069] 12) 将高灵敏的ECL免疫印迹液(Tanon,180-501)按1:1的比例将A、B液混合。用镊子夹起PVDF膜的边缘,用吸水纸吸去膜边缘多余水,加发光液于膜上,曝光。实例1Western Blot实验验证蛋白亲和富集结果准确。

[0070] 在HEK293T细胞中过表达空载蛋白与融合MTDH蛋白后,通过蛋白质提取与装载链霉亲和素的琼脂糖珠的亲和富集,如图2所示基于链霉亲和素与生物素的亲和作用,空载蛋白与融合MTDH蛋白得到有效富集。

[0071] 实例2鉴定出空载蛋白组与融合MTDH蛋白组中的胆固醇丰度存在差异。

[0072] 利用GC-MS对空载蛋白组与融合MTDH蛋白组中提取的代谢物进行分析,得到的总TIC图如图3。通过对其中代谢物的定性定量,如图4所示鉴定出胆固醇可能为细胞内MTDH原位结合的代谢物之一。

[0073] 通过上述实验表明,这种利用经典的蛋白质亲和纯化手段结合灵敏的质谱分析,鉴定细胞内与MTDH发生原位结合的代谢物小分子的方法是可行并具有重要意义的。从蛋白质-代谢物相互作用的鉴定出发,发现与MTDH可能存在相互作用的代谢物可以为后续的生命基础研究,肿瘤的临床诊断与治疗,新药发现等方面提供重要指导。

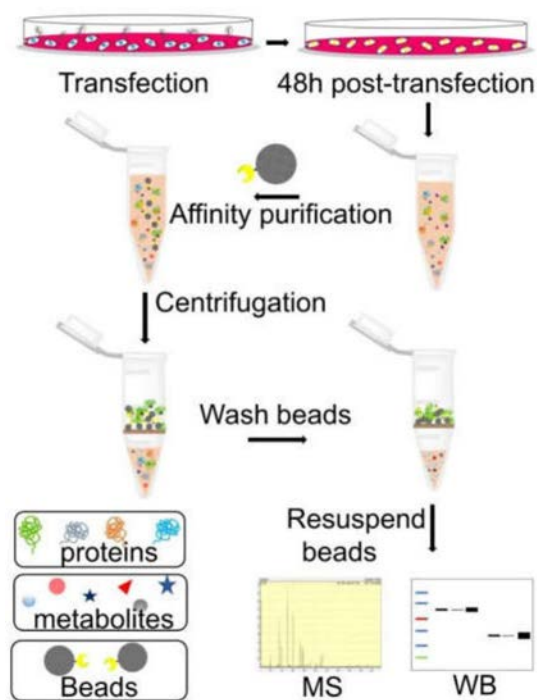


图1

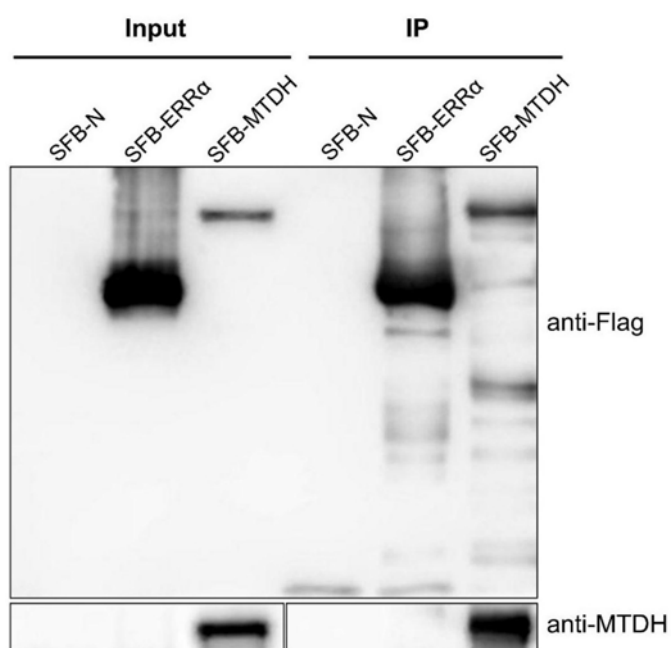


图2

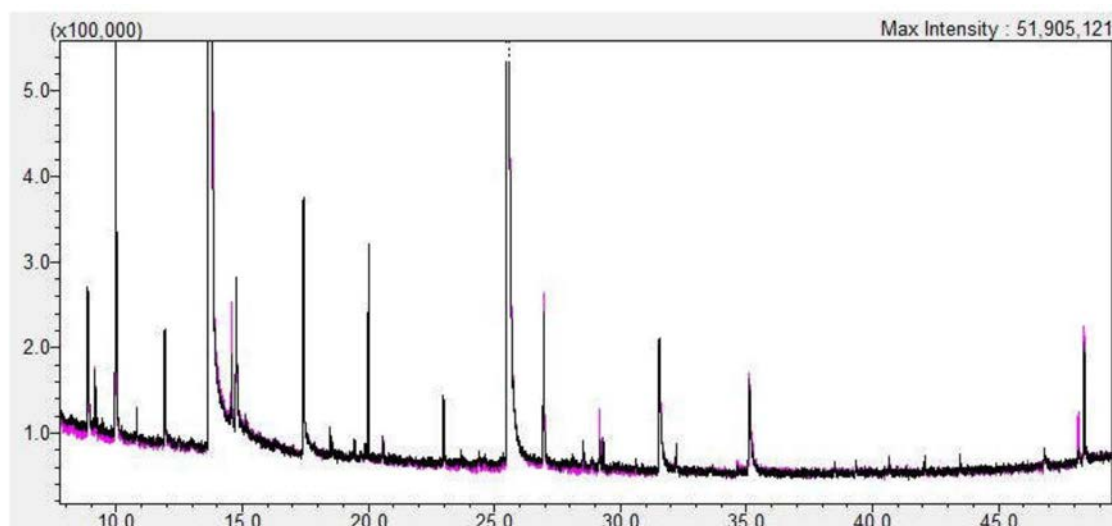
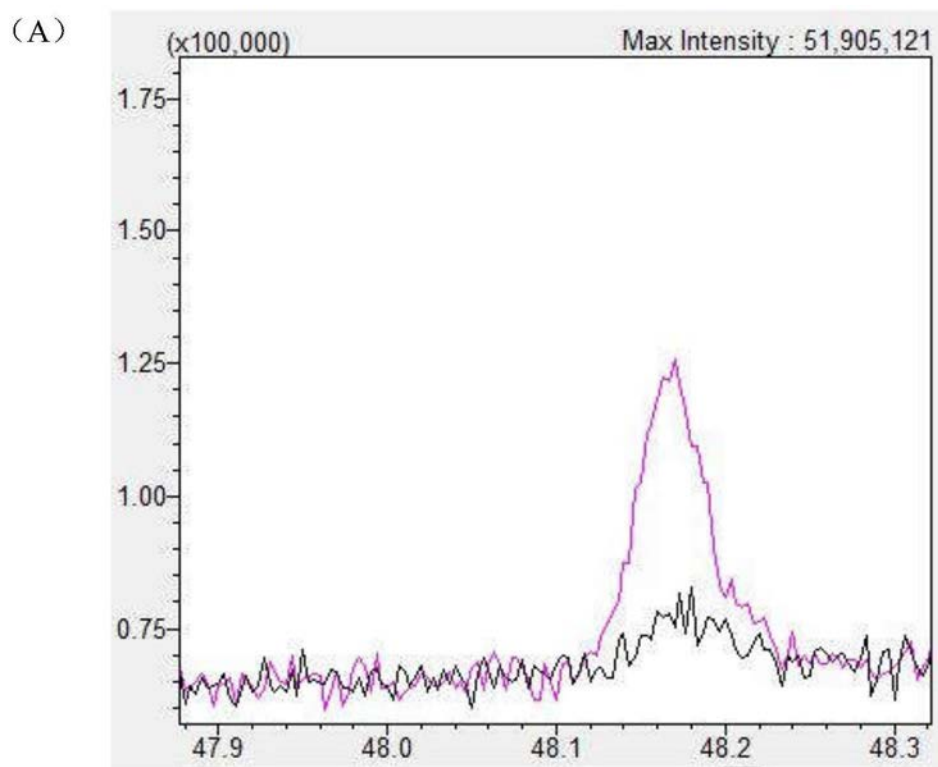


图3



(B)

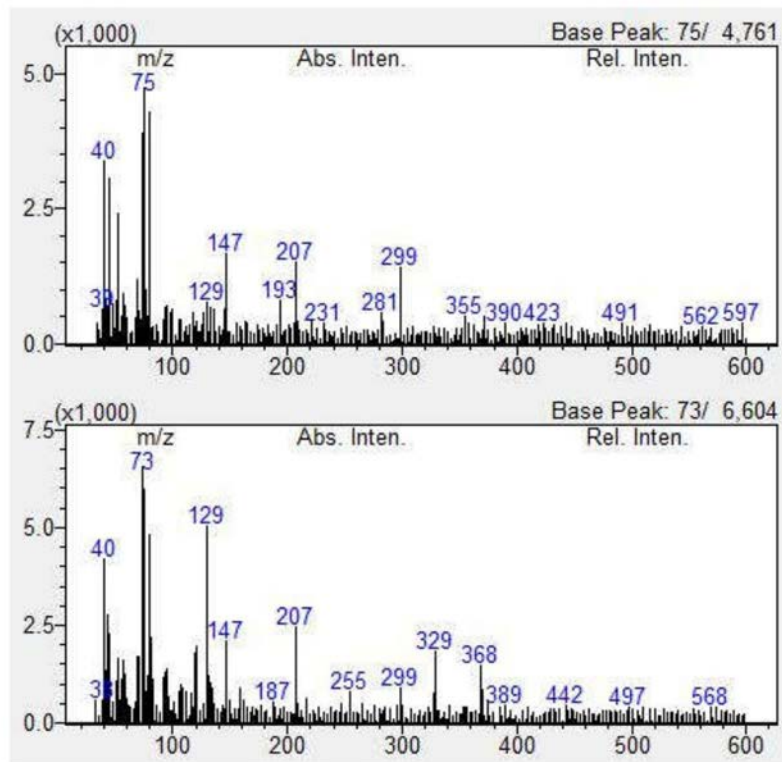


图4

专利名称(译)	一种细胞内MTDH结合代谢物的鉴定方法		
公开(公告)号	CN111257482A	公开(公告)日	2020-06-09
申请号	CN201811451731.2	申请日	2018-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
[标]发明人	王稳 朴海龙		
发明人	王稳 朴海龙		
IPC分类号	G01N30/88 G01N30/08 G01N33/532 G01N21/76		
代理人(译)	马驰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种利用经典的蛋白质亲和纯化手段结合灵敏的质谱分析，鉴定细胞内与MTDH发生原位结合的代谢物小分子的方法。具体采用表面装载链霉亲和素的琼脂糖珠，对细胞内表达有生物素片段的融合MTDH蛋白以及对照空载体表达蛋白进行亲和富集，同时结合蛋白免疫印迹实验证实蛋白质的亲和纯化结果，通过提取体系内代谢物并进行质谱鉴定，比较对照蛋白组与融合MTDH蛋白组的代谢物丰度差异，从而鉴定出可能与MTDH相互作用的代谢物，为后续深入展开生物大小分子功能相互干预相关研究提供指导。

TE	补充至总体积 10μl
pDonar(从别的实验室索取)	150ng
PCR 产物	150ng
BP 酶 (invitrogen)	1μl