



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101893634 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 24

(21) 申请号 200910084155. 7

(22) 申请日 2009. 05. 20

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 陈畅 黄波

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 27/447(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 6 页

(54) 发明名称

特异检测蛋白质或多肽半胱氨酸巯基修饰的方法及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种在排除分子间二硫键干扰的条件下特异检测蛋白质或多肽半胱氨酸巯基相关修饰的方法;涉及执行所述方法的试剂盒,涉及所述试剂盒用于筛选新的生理病理相关的内源靶点或者外源半胱氨酸巯基相关修饰的蛋白质或多肽靶点,用于筛选与设计可以调节蛋白质或多肽半胱氨酸巯基相关修饰的药物,和用于检测样品中半胱氨酸巯基相关修饰含量的用途。

1. 一种特异检测蛋白质或多肽半胱氨酸巯基相关修饰的方法,包括下列步骤:

1) 使用自由巯基特异性封闭试剂封闭所述蛋白质或多肽上的自由巯基;

2) 除掉未结合的封闭试剂,使用所述半胱氨酸巯基相关修饰的特异性还原剂将被修饰的半胱氨酸巯基还原为自由巯基,同时加入巯基特异性不可逆的标记试剂将被还原的自由巯基标记为带有标签的巯基;

3) 除去未结合的标记试剂后,加入二硫键还原试剂,还原蛋白质或多肽分子间的二硫键;和

4) 亲和纯化具有带有所述标签的巯基的蛋白质或多肽,使用亲和素变性的方法来洗脱所述蛋白质或多肽,并随后对洗脱的蛋白质或多肽进行蛋白质或多肽印迹或者质谱鉴定。

2. 按照权利要求1的方法,其中所述二硫键还原试剂选自二巯基苏糖醇(dithioerythritol, DTT)、2-巯基乙醇(2-ME, 2-mercaptoethanol)、磷酸三丁酯(TBP, tributyl phosphate)、或磷酸三(2-氯乙)酯(TCEP, tris(2-chloroethyl)phosphate)。

3. 按照权利要求1的方法,其中所述巯基特异性不可逆的标记试剂包括三个部分:

一个巯基特异的巯基反应基团;

一个可以被特异识别纯化的标签分子(tag);和

一个连接这两部分的连接体(linker),

其中所述巯基反应基团选自马来酰亚胺、N-乙基马来酰亚胺或碘乙酰胺中的巯基反应基团,所述可以被特异识别纯化的标签分子选自生物素(biotin)、生物胞素(biocytin)、脱硫生物素(desthiobiotin),或被特异识别纯化的多肽段,所述多肽段包括His₆(6个组氨酸, six histidine residues),所述连接体是一个或多个,选自稳定同位素或遇光断开的连接基团。

4. 按照权利要求1的方法,其中所述巯基特异性不可逆的标记试剂选自生物素马来酰亚胺(biotin-M, biotin-maleimide)、生物素聚乙二醇马来酰亚胺(biotin-PEO-M, biotin-PEO-maleimide)、3-(马来酰亚胺丙酰)-生物胞素(3-(N-maleimidopropionyl)-biocytin)、N-碘乙酰-N-生物素己二胺(N-iodoacetyl-N-biotinylhexylenediamine, Iodoacetyl-LC-Biotin)、碘乙酰聚乙二醇生物素(Iodoacetyl-PEG2-Biotin)、1-生物素胺-4-(4'-[马来酰亚胺乙基-环己烷]-甲酰胺)丁烷(1-Biotinamido-4-(4'-[maleimidoethyl-cyclohexane]-carboxamido)butane)、或轻或重同位素亲和和标签试剂(ICAT reagents light or heavy)。

5. 用于特异检测蛋白质或多肽半胱氨酸巯基相关修饰的试剂盒,包括巯基特异性不可逆的标记试剂和二硫键还原试剂。

6. 按照权利要求5的试剂盒,还包括自由巯基特异性封闭试剂、所述半胱氨酸巯基相关修饰的特异性还原剂、亲和纯化缓冲液、亲和纯化介质或变性洗脱剂。

7. 按照权利要求5或6的试剂盒用于筛选新的生理相关的内源靶点或者外源半胱氨酸巯基相关修饰的蛋白质或多肽靶点的用途。

8. 按照权利要求5或6的试剂盒用于筛选和设计可以调节蛋白质或多肽半胱氨酸巯基相关修饰的药物中的用途。

9. 按照权利要求5或6的试剂盒在检测样品中半胱氨酸巯基相关修饰含量的用途。

10. 按照权利要求5或6的试剂盒在利用蛋白质组学技术来研究或者筛选半胱氨酸巯

基相关修饰的蛋白质中的用途。

特异检测蛋白质或多肽半胱氨酸巯基修饰的方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质或多肽翻译后修饰的检测领域,具体地,涉及蛋白质或多肽半胱氨酸巯基相关修饰的检测领域,更具体地,涉及检测蛋白质或多肽半胱氨酸巯基相关修饰的方法及其用途,以及执行该方法的试剂盒。

背景技术

[0002] 蛋白质或多肽上的半胱氨酸 (cysteine, cys) 含有一个自由巯基 (-SH)。这个巯基可以发生各种蛋白质翻译后修饰。每种修饰都有特殊的调节方式和生物学作用。随着蛋白质组学的发展,可以高通量筛选具有这些修饰的蛋白质靶点的方法逐渐被发展出来。而实际上,其中几种修饰可以用同一种原理来检测。它们的原理都是基于“生物素转换”后再纯化的方法 (biotin switch assay)。对于一种单一修饰而言,将样品中具有这种修饰的半胱氨酸都特异的转换为带有特异标签的半胱氨酸,之后纯化并鉴定这些有标签的蛋白或多肽,就可以确定原始样品中哪些蛋白质靶点或者半胱氨酸位点发生了修饰。

[0003] 具体步骤简要介绍为:第一步,封闭原始样品中蛋白质上的所有自由半胱氨酸的巯基,因为自由巯基会干扰最后的标签标记反应;第二步,去除过量封闭试剂后,使用对某一种修饰特异的还原试剂将被修饰的半胱氨酸还原为自由半胱氨酸,同时加入自由巯基特异的标记试剂,标记试剂上具有标签(比如,生物素 (biotin)),它们可以特异的标记这些还原出来的自由半胱氨酸,也就是说:标记上生物素的蛋白或多肽就是原始样品中存在修饰的蛋白或多肽;第三步,使用生物素特异的纯化试剂来纯化生物素化的蛋白或多肽并洗脱下纯化的蛋白或多肽;最后得到的纯化下来的蛋白或多肽可以使用蛋白质印迹或者质谱方法来鉴定。

[0004] 这类方法的比较早的应用是在蛋白质巯基亚硝基化的检测上¹⁻³。之后被应用到蛋白质巯基次磺酸化⁴和蛋白质巯基棕榈酰化^{5,6}中。下面以蛋白质巯基亚硝基化为例子介绍具体的研究方法。

[0005] 蛋白质巯基亚硝基化 (nitrosation, S-nitrosylation) 是一种一氧化氮 (nitric oxide, NO) 相关的基于蛋白质自由半胱氨酸 (cysteine, cys) 的蛋白质翻译后修饰:蛋白质自由半胱氨酸上的自由巯基 (Cys-SH) 被一氧化氮或其衍生物转换为亚硝基化的巯基 (Cys-SNO)。这种修饰被认为是一氧化氮信号转导的一种重要机制,广泛参与各种生理和病理过程⁷。很多蛋白质巯基亚硝基化靶点都是利用一种名叫“生物素转换方法” (biotin switch assay) 研究和鉴定的^{2,3}。原始的生物素转换方法可以检测蛋白质巯基亚硝基化,具体的实验步骤可以简略的介绍为:第一步,自由巯基使用巯基特异的封闭试剂 MMTS (methyl methanethiosulfonate, 甲基硫代磺酸甲酯) 封闭;第二步,使用丙酮沉淀去除多余的 MMTS 封闭试剂;第三步,蛋白质上的亚硝基化半胱氨酸 Cys-SNO 使用特异的还原剂 ascorbate (抗坏血酸钠) 还原为自由巯基,之后使用含有混合二硫键的可逆的生物素化试剂 biotin-HPDP (N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide, N-(6-[生物素胺]己基)-3, -(2, -吡啶二硫)丙酰胺) 标记这些自由巯基。最后生物素

化的蛋白使用链亲和素琼脂糖凝胶珠子 (streptavidin-agarose) 纯化并使用二硫键还原试剂洗脱, 比如 2-巯基乙醇 (2-mercaptoethanol, 2-ME)。洗脱下来的蛋白就是发生了巯基亚硝基化的蛋白, 这些蛋白可以使用蛋白印迹或者质谱检测来鉴定。

[0006] 原始方法已经申请了美国专利 (US Patent 7001738-Method for assaying protein nitrosylation) 和国际专利 ((WO/2002/039119) METHOD FOR ASSAYING PROTEIN NITROSYLATION)。简要内容包括:

[0007] 第一: 建立了一种分析蛋白质亚硝基化的方法。对于包含至少一种蛋白质的测试样品, 使用一种巯基烷基化试剂来封闭蛋白上的自由巯基。蛋白上的亚硝基化巯基键被还原为自由巯基。多余的巯基烷基化试剂从样品中去除。自由巯基和一种可以检测的带标签的, 活化的混合二硫键反应, 将标签转移到蛋白上。蛋白上可检测的标签被检测。

[0008] 第二: 建立了一种筛选调节蛋白质亚硝基化药物的方法。一个包含至少一种蛋白质的测试样品和一个测试化合物接触。使用一种巯基烷基化试剂来封闭蛋白上的自由巯基。蛋白上的亚硝基化巯基键被还原为自由巯基。多余的巯基烷基化试剂从样品中去除。自由巯基和一种可以检测的带标签的, 活化的混合二硫键反应, 将标签转移到蛋白上。蛋白上可检测的标签被检测。蛋白质上可检测标签的量与没有和测试化合物接触的对照样品中的量相比较。如果一种测试化合物可以增加或者减少测试样品中可检测标签的量, 相比对照样品而言, 那么这种测试化合物就是一种蛋白亚硝基化调节物。

[0009] 第三: 建立了一种检测蛋白质亚硝基化的试剂盒。这个试剂盒包括一种巯基烷基化试剂和一个带有可检测标签的活化混合二硫键试剂。每个试剂在试剂盒中是分开包装的。

[0010] 原始的生物素转换方法的策略是为了特异性的检测蛋白质巯基亚硝基化。自从这种方法发明之后, 它被广泛的应用于蛋白质巯基亚硝基化研究和蛋白质巯基亚硝基化靶点的筛选中^{1,8,9}。而且, 相同的策略也被应用在了其它形式半胱氨酸修饰的研究上⁴。

[0011] 但是我们发现经过生物素转换方法之后的蛋白样品有明显的分子间二硫键, 这表明生物素转换方法不是特异检测蛋白质巯基亚硝基化的: 分子间二硫键会干扰这种方法对蛋白质巯基亚硝基化的检测。

[0012] 实际上, 分子间二硫键是广泛存在的, 而且可以被细胞内氧化还原环境的改变所调节^{10,11}。所以分子间二硫键的干扰在蛋白巯基亚硝基化的研究或者其它半胱氨酸的修饰的研究中是不能被忽视的。在内源模型中, 蛋白的氧化还原相关的修饰形式是未知的, 分子间二硫键的改变可能会干扰生物素方法的检测, 而且可能导致蛋白质巯基亚硝基化和生物过程之间的错误的联系。尽管对于那些蛋白含量很低的内源亚硝基化靶点而言, 使用蛋白质印迹和生物素转换方法是一种方便的富集方法, 这样可以检测到巯基亚硝基化的水平或者变化。但是基于上面的实验结果, 生物素转换方法的使用已经被可能的分子间二硫键的干扰所限制了。

[0013] 对于蛋白质巯基次磺酸化 (sulfenation, Cys-SOH) 而言, 上面的问题也是存在的。现有的方法是使用马来酰亚胺来封闭自由巯基, 亚砷酸钠 (arsenite) 来还原次磺酸化的半胱氨酸, 并使用生物素-马来酰亚胺 (biotin-maleimide) 来标记还原出来的自由半胱氨酸。之后使用链亲和素琼脂糖凝胶珠子纯化生物素化的蛋白来鉴定发生了巯基次磺酸化的蛋白靶点。整个步骤中也没有考虑到分子间二硫键的干扰。这表明该方法不是特异检测

蛋白质巯基次磺酸化的：分子间二硫键会干扰这种方法对蛋白质巯基次磺酸化的检测。

[0014] 对于蛋白质巯基棕榈酰化 (S-palmitoylation) 而言, 上面的问题也是存在的。现有的方法是使用 N-乙基马来酰亚胺来封闭自由巯基, 羟胺 (hydroxylamine) 来还原棕榈酰化的半胱氨酸, 并使用 N-(6-[生物素胺]己基)-3'-(2'-吡啶二硫) 丙酰胺 (biotin-HPDP) 来标记还原出来的自由半胱氨酸。之后使用链亲和素琼脂糖凝胶珠子纯化生物素化的蛋白来鉴定发生了巯基棕榈酰化的蛋白靶点。整个步骤中也没有考虑到分子间二硫键的干扰。这表明该方法不是特异检测蛋白质巯基棕榈酰化的：分子间二硫键会干扰这种方法对蛋白质巯基棕榈酰化的检测。

[0015] 综上, 必须发展新的策略解决这个问题。

发明内容

[0016] 经过对原始生物素转换方法的仔细研究, 我们发现原始的生物素转换方法有一个理论上的缺点：分子间二硫键实际上是干扰生物素转换方法的。从原始的生物素转换方法的流程图中, 我们发现整个设计就没有考虑可能的分子间二硫键。如图 1a, -X 基团表示蛋白上需要纯化检测的基团, 自由巯基 (-SH), 谷胱甘肽小分子之间形成的二硫键 (-SSG), 分子内二硫键 (-S-S-), -S-S-Protein B 表示蛋白质 A (Protein A) 和蛋白质 B (Protein B) 的分子间二硫键。对于蛋白质巯基的 X 修饰而言, 如果蛋白 A 和蛋白 B 之间有分子间二硫键存在, 这两种蛋白之间的分子间二硫键在经过生物素转换方法的整个过程中一直是保持稳定的, 直到最后使用二硫键还原试剂将生物素化的蛋白从链亲和素琼脂糖凝胶珠子上洗脱下来。还原洗脱之后, 分子间二硫键断开就会释放出蛋白质 B, 而蛋白质 B 就可以在随后的蛋白质免疫印迹检测中被检测出来。虽然蛋白质 B 不是巯基 X 修饰的靶点, 但是如果研究中它恰好是兴趣蛋白质, 那么蛋白质 B 就被错误的鉴定为一个蛋白质巯基 X 修饰的靶点了。

[0017] 该问题可以这样解决：将原始生物素转换方法改进为“不可逆生物素转换分析方法”。如图 1b 所示, 我们改进了几个步骤并增加了一个步骤。第一步, 需要封闭 -SH, 使用巯基特异的封闭试剂。第二步, 先将 -SX 基团转换为 -SH, 再标记 -SH 基团。第三步, 使用二硫键还原试剂去除分子间二硫键, 将干扰的蛋白质 B 去除。第四步, 使用标签特异的纯化方法将蛋白质 A 纯化出来。在蛋白质巯基亚硝基化检测中, -X 是 -NO; 第二步中, 使用抗坏血酸钠还原 -SNO 为 -SH, 同时使用不可逆巯基标记试剂标记还原出来的 -SH。蛋白质巯基次磺酸化检测中：-X 是 -OH; 第二步中, 使用亚砷酸还原 -SOH 为 -SH, 同时使用不可逆巯基标记试剂标记还原出来的 -SH。在蛋白质巯基棕榈酰化检测中：-X 是 palmitoyl group (棕榈酰基); 第二步中, 使用羟胺还原 -S-palmitoyl group 为 -SH, 同时使用不可逆巯基标记试剂标记还原出来的 -SH。

[0018] 所研究的蛋白样品可以是纯化的蛋白或者组织裂解液或者细胞裂解液, 我们的方法可以在排除分子间二硫键的干扰的情况下研究蛋白质巯基亚硝基化。

[0019] 在自由巯基封闭步骤中, 蛋白质在完全变性的情况下, 使用巯基反应性试剂封闭蛋白质上的自由巯基, 比如甲基硫代磺酸甲酯 (MMTS), 马来酰亚胺 (maleimide), N-乙基马来酰亚胺 (N-ethylmaleimide), 碘乙酰胺 (iodoacetamide), 丙烯酰胺 (acrylamide) 等。这些封闭试剂可以在有 SDS 变性蛋白的情况下完成对自由巯基的封闭, 同时不影响蛋白中的已有的二硫键和 X 修饰。

[0020] 在除去多余的封闭试剂时,我们使用 2-4 倍体积的丙酮或乙醇来沉淀蛋白,离心后多余的封闭试剂在上清中,可以被除去,蛋白质沉淀下来。实验中,使用上面同样的方法除去多余的标记试剂,这样可以防止多余的标记试剂干扰后续的亲纯化,导致亲纯化效率降低。

[0021] 巯基特异的标记试剂一般包括三个部分:一个巯基特异的巯基反应基团,一个可以被特异识别纯化的标签分子(tag),和一个连接这两部分的连接体(linker)。其中巯基反应基团可以是马来酰亚胺、N-乙基马来酰亚胺、碘乙酰胺中的巯基反应基团,可以将自由巯基烷基化,形成稳定的,不能被二硫键还原试剂比如二巯基苏糖醇(DTT)等还原的化合物。可被特异识别检测的标签分子可以包括生物素(biotin)及其衍生物,如生物胞素(biocytin)、desthiobiotin(脱硫生物素),小的肽段,比如 His₆(6 个组氨酸, six histidine residues)等。连接体根据设计不同可以有多种变化,比如生物素聚乙二醇马来酰亚胺(Maleimide-PEO-Biotin Reagents)中,使用 PEO 作为连接体,可以有多个,一般 2 到 11 个甚至更多。连接体中可以有稳定同位素,如同位素亲和标签(isotope-coded affinity tag, ICAT, U. S. Patent 6670194),或者可以遇光断开的连接基团(光解亲和标签, photocleavable affinity tags, U. S. Patent 7145019)等。具体标记试剂有如生物素马来酰亚胺、3-(马来酰亚胺丙酰)-生物胞素(3-(N-maleimidopropionyl)-biocytin)、N-碘乙酰-N-生物素己二胺(N-iodoacetyl-N-biotinylhexylenediamine, Iodoacetyl-LC-Biotin)、碘乙酰聚乙二醇生物素(Iodoacetyl-PEG2-Biotin)、生物素聚乙二醇马来酰亚胺(PEO 作为连接体,可以有多个,一般 2 到 11 个)、1-生物素胺-4-(4'-[马来酰亚胺乙基-环己烷]-甲酰胺)丁烷(1-Biotinamido-4-(4'-[maleimidoethyl-cyclohexane]-carboxamido)butane)、轻或重同位素亲和标签(ICAT reagent light or heavy)等。

[0022] 在标记之后的二硫键还原步骤中,我们使用了可以还原二硫键的还原试剂比如二巯基苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇(2-ME)、磷酸三丁酯(TBP, tributyl phosphate)、磷酸三(2-氯乙)酯(TCEP, tris(2-chloroethyl)phosphate)等。除去多余的标记试剂后,加入二硫键还原试剂,比如 DTT,高温加热来还原可能的分子间二硫键,就可以去掉蛋白质 B 的干扰。

[0023] 在亲纯化步骤中我们使用亲纯化介质,对于我们使用的生物素标签而言,亲和素,链亲和素,中性链亲和素等和生物素有高亲和力的蛋白都可以作为亲和物来纯化含有生物素标签的蛋白或者多肽。亲和素等需要和固相支持物偶联,比如琼脂糖或者磁珠等,这样才可以方便地进行生物素化蛋白的纯化。

[0024] 亲纯化步骤是在亲纯化缓冲液中进行的,可以是常用的中性 pH(7-8)缓冲液,其中加入一定的 NaCl 来降低非特异的吸附,同时存在一定的去污剂或者变性剂保证蛋白溶解。

[0025] 蛋白纯化之后使用洗涤液洗涤珠子。洗涤后的珠子上就带有经过生物素转换方法所得到的带有生物素标签的蛋白了,可以使用变性洗脱剂来洗脱生物素化的蛋白或者多肽。使用中性 pH 缓冲液在高温和高浓度的变性剂存在下,使亲和珠子上的链亲和素(streptavidin)变性而释放生物素化的蛋白质。洗脱下来的样品就可以进行随后的蛋白质免疫印迹分析了。如果为了避免高温洗脱,那么可以使用亲和力弱的亲和素来纯化生物素

化的蛋白质,这样更温和的条件比如生物素洗脱或者酸性洗脱都可以将生物素化的蛋白质洗脱下来。或者使用高浓度的尿素或者盐酸胍来变性亲和素。

[0026] 我们的方法可以用来筛选新的生理病理相关的内源靶点或者外源亚硝基化的蛋白质靶点,比如:细胞增殖、凋亡、分化、神经毒性、神经递质释放、平滑肌舒张等过程中的新靶点。同样在筛选可以调节蛋白质亚硝基化的药物时,我们的方法也是必须的,依据新方法鉴定的亚硝基化蛋白靶点进行新的药物筛选与设计。在排除了分子间二硫键的干扰之后,经过不可逆生物素转换方法之后得到的蛋白样品就是特异的被亚硝基化的蛋白靶点。在比较病理组织和正常组织中亚硝基化含量变化或者定量检测时,我们的策略也是必须的。在利用蛋白质组学技术来研究或者筛选亚硝基化蛋白时,同样我们的方法也是必须的。同时在使用了原始生物素转换方法的其它半胱氨酸相关的氧化还原修饰的研究中,比如次磺酸化、棕榈酰化的检测中,我们的方法的策略也是必须的。我们所描述的蛋白质 B 对蛋白质 A 的干扰还可以扩展到肽段 B 对肽段 A 的干扰,所以基于酶解蛋白质技术的蛋白质组学应用中,我们的策略也是必须的。

[0027] 对于蛋白质巯基亚硝基化的检测而言,除掉多余的封闭试剂后,使用亚硝基化特异的还原剂,如抗坏血酸钠 (ascorbate) 还原亚硝基化的巯基为自由巯基,同时加入巯基特异的不可逆的带有标签的标记试剂,一般含有巯基特异性反应基团,比如生物素马来酰亚胺,将释放出来的自由巯基转换为有标签的巯基。这些不可逆的标记试剂是指他们可以 and 自由巯基形成稳定的,不能被二硫键还原试剂比如 DTT 等还原的化合键。第三步,除去多余的标记试剂后,加入二硫键还原试剂,比如 DTT,高温加热来还原可能的分子间二硫键,就可以去掉蛋白质 B 的干扰。最后,我们可以在没有分子间二硫键的干扰的情况下,进行亲和纯化生物素化的蛋白质,并使用链亲和素变性的方法来洗脱蛋白。纯化下来的蛋白就可以进行之后的蛋白质印迹或者质谱鉴定了。

[0028] 对于蛋白质巯基亚硝基化的检测而言,在标记亚硝基化巯基的步骤中,加入了亚硝基化巯基特异的还原试剂抗坏血酸钠。抗坏血酸钠可以还原亚硝基化的巯基为自由巯基,随后被巯基特异的标记试剂所标记。我们将可逆的生物素化试剂 N-(6-[生物素胺]己基)-3'-(2'-吡啶二硫)丙酰胺 (biotin-HPDP) 替换为不可逆的生物素化试剂生物素马来酰亚胺 (biotin-maleimide, biotin-M) 来生物素化亚硝基化的蛋白质。

[0029] 关于蛋白质巯基次磺酸化 (sulfenation, 蛋白质自由巯基转换为 -SOH, 次磺酸) 的检测。原始方法中,封闭自由巯基后,使用亚砷酸还原 -SOH 为 -SH,之后使用巯基标记试剂标记 -SH。之后使用珠子亲和纯化标记上的巯基就得到了次磺酸化的蛋白质靶点。在这个检测步骤中,同样我们的方法也可以应用其中。具体就是在标记试剂是不可逆标记试剂时,在亲和纯化步骤之前同样加上一步二硫键还原步骤。这样就可以排除分子间二硫键的影响。

[0030] 同样,在检测蛋白质巯基棕榈酰化 (S-palmitoylation) 的方法中,基于本方法的策略也可以进行前述的改进和应用。在封闭自由巯基后,使用羟胺 (hydroxylamine) 来还原棕榈酰化的巯基为 -SH,并使用 biotin-HPDP 标记。之后使用亲和纯化生物素得到棕榈酰化的蛋白靶点。在这里我们的策略也是必须的。必须的改进包括标记时使用不可逆的巯基标记试剂,并且在亲和纯化步骤之前加上一步二硫键还原步骤。这样就可以排除分子间二硫键的影响。

[0031] 我们所描述的方法可以方便的作为试剂盒使用,其中相关的试剂都是分开的,其中包括上文中所述的不可逆巯基标记试剂和二硫键还原试剂。至于上文中所述的巯基封闭试剂,和亲和纯化试剂等其它相关的试剂,也可以选择性的存在于试剂盒中。我们特别要指出的是不可逆巯基标记试剂,比如带有生物素标签的不可逆巯基标记试剂,同时需要指出的是二硫键还原试剂。

[0032] 综上所述,本发明的技术方案是:

[0033] 1. 一种特异检测蛋白质或多肽半胱氨酸巯基相关修饰的方法,包括下列步骤:

[0034] 1) 使用自由巯基特异性封闭试剂封闭所述蛋白质或多肽上的自由巯基;

[0035] 2) 除掉未结合的封闭试剂,使用所述半胱氨酸巯基相关修饰的特异性还原剂将被修饰的巯基还原为自由巯基,同时加入巯基特异性不可逆的标记试剂将释放出来的自由巯基标记为带有标签的巯基;

[0036] 3) 除去未结合的标记试剂后,加入二硫键还原试剂,还原蛋白质或多肽分子间的二硫键;和

[0037] 4) 亲和纯化具有带有所述标签的巯基的蛋白质或多肽,使用亲和素变性的方法来洗脱所述蛋白质或多肽,并随后对洗脱的蛋白质或多肽进行蛋白质或多肽印迹或者质谱鉴定。

[0038] 2. 按照以上 1 的方法,其中所述半胱氨酸巯基相关修饰是巯基亚硝基化,且在步骤 2) 的还原过程中加入亚硝基化特异性还原剂。

[0039] 3. 按照以上 2 的方法,其中所述亚硝基化特异性还原剂是抗坏血酸钠(ascorbate)。

[0040] 4. 按照以上 1 的方法,其中所述半胱氨酸巯基相关修饰是巯基次磺酸化,且在步骤 2) 的还原过程中加入次磺酸化特异性还原剂。

[0041] 5. 按照以上 4 的方法,其中所述次磺酸化特异性还原剂是亚砷酸。

[0042] 6. 按照以上 1 的方法,其中所述半胱氨酸巯基相关修饰是巯基棕榈酰化,且在步骤 2) 的还原过程中加入棕榈酰化特异性还原剂。

[0043] 7. 按照以上 6 的方法,其中所述棕榈酰化特异性还原剂是羟胺(hydroxylamine)。

[0044] 8. 按照以上 1-7 中任一项的方法,其中所述自由巯基特异性封闭试剂选自甲基硫代磺酸甲酯(MMTS, methyl methanethiosulfonate)、马来酰亚胺(maleimide)、N-乙基马来酰亚胺(NEM, N-ethylmaleimide)、碘乙酰胺(iodoacetamide)、碘乙酸(iodoacetic acid)或丙烯酰胺(acrylamide)。

[0045] 9. 按照以上 1-7 中任一项的方法,其中在步骤 2) 的标记过程中使用加热条件加速标记反应。

[0046] 10. 按照以上 1-7 中任一项的方法,其中所述二硫键还原试剂选自二巯基苏糖醇(Dithioerythritol, DTT)、2-巯基乙醇(2-ME, 2-mercaptoethanol), 磷酸三丁酯(TBP, tributyl phosphate)、或磷酸三(2-氯乙)酯(TCEP, tris(2-chloroethyl)phosphate)。

[0047] 11. 按照以上 1-7 中任一项的方法,其中在步骤 3) 中,在加热条件下使用 DTT。

[0048] 12. 按照以上 1-7 中任一项的方法,其中所述巯基特异性不可逆的标记试剂包括三个部分:

[0049] 一个巯基特异的巯基反应基团;

- [0050] 一个可以被特异识别纯化的标签分子 (tag) ;和
- [0051] 一个连接这两部分的连接体 (linker),
- [0052] 其中所述巯基反应基团选自马来酰亚胺、N-乙基马来酰亚胺或碘乙酰胺中的巯基反应基团,所述可以被特异识别纯化的标签分子选自生物素 (biotin)、生物胞素 (biocytin)、脱硫生物素 (desthiobiotin),或被特异识别纯化的肽段,所述肽段包括 His₆(6 个组氨酸, six histidineresidues),所述连接体是一个或多个,选自稳定同位素或遇光断开的连接基团。
- [0053] 13. 按照以上 1-7 中任一项的方法,其中所述巯基特异性不可逆的标记试剂选自生物素马来酰亚胺 (biotin-M, biotin-maleimide)、生物素聚乙二醇马来酰亚胺 (biotin-PEO-M, biotin-PEO-maleimide)、3-(马来酰亚胺丙酰)-生物胞素 (3-(N-maleimidopropionyl)-biocytin)、N-碘乙酰-N-生物素己二胺 (N-iodoacetyl-N-biotinylhexylenediamine, Iodoacetyl-LC-Biotin)、碘乙酰聚乙二醇生物素 (Iodoacetyl-PEG2-Biotin)、1-生物素胺-4-(4'-[马来酰亚胺乙基-环己烷]-甲酰胺)丁烷 (1-Biotinamido-4-(4'-[maleimidoethyl-cyclohexane]-carboxamido)butane)、或轻或重同位素亲和标签试剂 (ICAT reagents light or heavy)。
- [0054] 14. 按照以上 12 的方法,其中所述可以被特异识别纯化的标签分子是生物素 (biotin),且用亲和素 (avidin)、链亲和素 (streptavidin)、或中性链亲和素 (neutravidin) 检测生物素。
- [0055] 15. 用于特异检验蛋白质或多肽半胱氨酸巯基相关修饰的试剂盒,包括巯基特异性不可逆的标记试剂和二硫键还原试剂。
- [0056] 16. 按照以上 15 的试剂盒,其中所述半胱氨酸巯基相关修饰是巯基亚硝基化。
- [0057] 17. 按照以上 15 的试剂盒,其中所述半胱氨酸巯基相关修饰是巯基次磺酸化。
- [0058] 18. 按照以上 15 的试剂盒,其中所述半胱氨酸巯基相关修饰是巯基棕榈酰化。
- [0059] 19. 按照以上 15 的试剂盒,还包括自由巯基特异性封闭试剂、所述半胱氨酸巯基相关修饰的特异性还原剂、亲和纯化缓冲液、亲和纯化介质或变性洗脱剂。
- [0060] 20. 按照以上 19 的试剂盒,其中所述半胱氨酸巯基相关修饰是巯基亚硝基化,且所述半胱氨酸巯基相关修饰的特异性还原剂是亚硝基化特异性还原剂。
- [0061] 21. 按照以上 20 的试剂盒,其中所述亚硝基化特异性还原剂是抗坏血酸钠 (ascorbate)。
- [0062] 22. 按照以上 19 的试剂盒,其中所述半胱氨酸巯基相关修饰是巯基次磺酸化,且所述半胱氨酸巯基相关修饰的特异性还原剂是次磺酸化特异性还原剂。
- [0063] 23. 按照以上 22 的试剂盒,其中所述次磺酸化特异性还原剂是亚砷酸。
- [0064] 24. 按照以上 19 的试剂盒,其中所述半胱氨酸巯基相关修饰是巯基棕榈酰化,且所述半胱氨酸巯基相关修饰的特异性还原剂是棕榈酰化特异性还原剂。
- [0065] 25. 按照以上 24 的试剂盒,其中所述棕榈酰化特异性还原剂是羟胺 (hydroxylamine)。
- [0066] 26. 按照以上 15-25 中任一项的试剂盒,其中所述巯基特异性不可逆的标记试剂包括三个部分:
- [0067] 一个巯基特异的巯基反应基团;

- [0068] 一个可以被特异识别纯化的标签分子 (tag) ;和
- [0069] 一个连接这两部分的连接体 (linker),
- [0070] 其中所述巯基反应基团选自马来酰亚胺、N- 乙基马来酰亚胺或碘乙酰胺中的巯基反应基团,所述可以被特异识别纯化的标签分子选自生物素、生物胞素、脱巯生物素,或被特异识别纯化的多肽段,所述多肽段包括 His₆ (6 个组氨酸, six histidine residues),所述连接体是一个或多个,选自稳定同位素或遇光断开的连接基团。
- [0071] 27. 按照以上 15-25 中任一项的试剂盒,其中所述巯基特异性不可逆的标记试剂选自生物素马来酰亚胺、生物素聚乙二醇马来酰亚胺、3-(马来酰亚胺丙酰)-生物胞素、N- 碘乙酰-N-生物素己二胺、碘乙酰聚乙二醇生物素、1-生物素胺-4-(4'-[马来酰亚胺乙基-环己烷]-甲酰胺)丁烷、或轻或重同位素亲和标签试剂。
- [0072] 28. 按照以上 15-25 中任一项的试剂盒,其中所述二硫键还原试剂选自二巯基蔗糖醇、2-巯基乙醇、磷酸三丁酯或磷酸三(2-氯乙)酯。
- [0073] 29. 按照以上 19-25 中任一项的试剂盒,其中所述自由巯基特异性封闭试剂选自甲基硫代磺酸甲酯、马来酰亚胺、N-乙基马来酰亚胺、碘乙酰胺、碘乙酸或丙烯酰胺。
- [0074] 30. 按照以上 15-29 中任一项的试剂盒用于筛选新的生理相关的内源靶点或者外源半胱氨酸巯基相关修饰的蛋白质或多肽靶点的用途。
- [0075] 31. 按照以上 15-29 中任一项的试剂盒用于筛选和设计可以调节蛋白质或多肽半胱氨酸巯基相关修饰的药物中的用途。
- [0076] 32. 按照以上 15-29 中任一项的试剂盒在检测样品中半胱氨酸巯基相关修饰含量的用途。
- [0077] 33. 按照以上 15-29 中任一项的试剂盒在利用蛋白质组学技术来研究或者筛选半胱氨酸巯基相关修饰的蛋白质中的用途。

附图说明

[0078] 图 1. 用于半胱氨酸巯基修饰检测的原始生物素转换方法的理论分析和新的不可逆生物素转换方法的建立。

[0079] a. 原始生物素转换方法流程图。如图 1a, -X 基团表示蛋白上需要纯化检测的基团,自由巯基 (-SH), 谷胱甘肽小分子之间形成的二硫键 (-SSG), 分子内二硫键 (-S-S-), -S-S-Protein B 表示蛋白质 A (Protein A) 和蛋白质 B (Protein B) 的分子间二硫键。对于蛋白质半胱氨酸巯基的 X 修饰而言,如果蛋白 A 和蛋白 B 之间有分子间二硫键存在,这两种蛋白之间的分子间二硫键在经过生物素转换方法的整个过程中一直是保持稳定的,直到最后使用二硫键还原试剂将生物素化的蛋白从链亲和素琼脂糖凝胶珠子上洗脱下来。还原洗脱之后,分子间二硫键断开就会释放出蛋白质 B,而蛋白质 B 就可以在随后的蛋白质免疫印迹检测中被检测出来。虽然蛋白质 B 不是巯基 X 修饰的靶点,但是如果研究中它恰好是兴趣蛋白质,那么蛋白质 B 就被错误的鉴定为一个蛋白质巯基 X 修饰的靶点了。

[0080] 在蛋白质巯基亚硝基化检测中,-X 是 -NO;次磺酸化检测中:-X 是 -OH;在蛋白质巯基棕榈酰化检测中:-X 是 palmitoyl group (棕榈酰基)。

[0081] b. 新的不可逆生物素转换方法流程图。我们改进了几个步骤并增加了一个步骤。第一步,需要封闭 -SH,使用巯基特异的封闭试剂。第二步,先将 -SX 基团转换为 -SH,使用

不可逆巯基标记试剂标记还原出来的 -SH。第三步,使用二硫键还原试剂去除分子间二硫键,将干扰的蛋白质 B 去除。第四步,使用标签特异的纯化方法将蛋白质 A 纯化出来。

[0082] 在蛋白质巯基亚硝基化检测中,-X 是 -NO;第二步中,使用亚硝基化特异性还原剂,如:抗坏血酸钠,还原 -SNO 为 -SH,同时使用不可逆巯基标记试剂标记还原出来的 -SH。在蛋白质巯基次磺酸化检测中:-X 是 -OH;第二步中,使用次磺酸化特异性还原剂,如:亚砷酸,还原 -SOH 为 -SH,同时使用不可逆巯基标记试剂标记还原出来的 -SH。在蛋白质巯基棕榈酰化检测中:-X 是 palmitoyl group(棕榈酰基);第二步中,使用棕榈酰化特异性还原剂,如:羟胺,还原 -S-palmitoyl group 为 -SH,同时使用不可逆巯基标记试剂标记还原出来的 -SH。

[0083] 图 2. 对于蛋白质巯基亚硝基化,原始生物素转换方法的理论分析和新的不可逆生物素转换方法的建立。

[0084] a. 原始生物素转换方法流程图。如果一个蛋白质 A 和蛋白质 B 之间有分子间二硫键存在,同时蛋白质 A 被亚硝基化了(存在 -SNO),其它巯基表示为自由巯基(-SH),或者蛋白质分子内二硫键(-S-S-),或者与谷胱甘肽小分子之间形成的二硫键(-SSG)。封闭自由巯基之后,使用 SNO 特异还原剂还原 SNO,并使用巯基标记试剂来生物素化释放出来的自由巯基,表示为 -SS-Linker-Biotin。之后进行亲和纯化生物素化的蛋白,由于亲和素纯化之前没有断开蛋白质 A 和蛋白质 B 之间的分子间二硫键,蛋白质 B 被错误地检测为一个亚硝基化的靶点。

[0085] b. 新的不可逆生物素转换方法流程图。在纯化之前加入一步还原步骤,可以将蛋白质 B 释放出来,这样蛋白质 B 就不会被亲和纯化下来,从而去除蛋白质 B 的干扰。在第二步中,我们将可逆的生物素化试剂 biotin-HPDP 替换为不可逆的生物素化试剂 biotin-M(biotin-maleimide) 来生物素化亚硝基化的蛋白质。在我们增加的第三步中,样品在生物素化纯化之前,使用二巯基苏糖醇(Dithioerythritol, DTT) 还原来断开可能的分子间二硫键,就可以去掉蛋白质 B 的干扰。最后,我们可以在没有分子间二硫键的干扰的情况下,进行亲和纯化生物素化的蛋白质,并使用链亲和素变性的方法来洗脱蛋白。

[0086] 图 3. 分子间二硫键存在并干扰生物素转换方法。

[0087] a. 对角线电泳分析小鼠脑匀浆蛋白经过原始生物素转换后纯化的蛋白样品。多余的蛋白条带出现在对角线的下方,如箭头所示。

[0088] b. 经过或者不经过 40 μ M GSNO 处理的小鼠脑匀浆并经过原始生物素转换方法后纯化的蛋白样品,使用蛋白质印迹方法来分析。GAPDH 除了以单体形式存在之外,还以高分子量形式存在,如箭头所示。

[0089] c. 和 b 一样,只是蛋白样品是纯化之前的样品。在还原 SDS-PAGE 中,DTT 可以还原分子间二硫键,GAPDH 只以单体形式存在。

[0090] d. 和 c 一样,只是 biotin-HPDP 被替换为 biotin-M 或者 biotin-PEO-M。

[0091] e. 和 b 一样,只是蛋白样品是在裂解时就有 MMTS 存在的情况下制备的。

[0092] 图 4. 对角线电泳分析经过原始生物素转换方法纯化的蛋白样品。使用不同的巯基封闭试剂,纯化试剂,生物素化试剂。分子间二硫键在各种情况下都存在。

[0093] a. 小鼠脑匀浆用 40 μ M GSNO 处理后,NEM 封闭,biotin-HPDP 标记,链亲和素琼脂糖凝胶珠子纯化。

[0094] b. 小鼠脑匀浆用 40 μ M GSNO 处理后, NEM 封闭, biotin-HPDP 标记, 亲和素琼脂糖凝胶珠子纯化。

[0095] c. 小鼠脑匀浆用 40 μ M GSNO 处理后, MMTS 封闭, biotin-Maleimide 标记, 链亲和素琼脂糖凝胶珠子纯化。

[0096] 图 5. 经过原始生物素转换方法后, 兴趣蛋白都存在高分子量蛋白条带。

[0097] a. 经过或者不经过 40 μ M GSNO 处理的小鼠脑匀浆并经过原始生物素转换方法后纯化的蛋白样品, NEM 作为封闭试剂, 使用蛋白质印迹方法来分析。GAPDH 除了以单体形式存在之外, 还以高分子量形式存在, 如箭头所示。在还原 SDS-PAGE 中, DTT 可以还原分子间二硫键, GAPDH 只以单体形式存在。

[0098] b. 经过原始生物素转换方法之后 Parkin 的高分子量条带, 其他条件与 a 相同。

[0099] c. 经过原始生物素转换方法之后 NSF (N- 乙基马来酰亚胺敏感因子) 的高分子量条带, 其他条件与 a 相同。

[0100] d. 经过原始生物素转换方法之后 NSF 的高分子量条带, biotin-Maleimide 作为生物素化试剂, 其他条件与 c 相同。

[0101] e. NEM 作为封闭试剂时, GAPDH 的高分子量蛋白条带仍然存在, 其他条件与 a 相同。

[0102] 图 6. 不可逆生物素转换方法排除了分子间二硫键干扰, 并可以成功特异检测蛋白质巯基亚硝基化修饰。

[0103] a. 对角线电泳分析经过不可逆生物素转换方法纯化的小鼠脑匀浆蛋白样品, 使用 biotin-maleimide 或者 biotin-PEO-maleimide 作为不可逆生物素化试剂。

[0104] b. 经过或者不经过 40 μ M GSNO 处理的小鼠脑匀浆并经过不可逆生物素转换方法后纯化的蛋白样品, 使用蛋白质印迹方法来分析。蛋白样品在 SDS-PAGE 之前使用 DTT 还原。

[0105] c. 经过或者不经过 40 μ M GSNO 处理的小鼠脑匀浆并经过不可逆生物素转换方法后纯化的蛋白样品, 使用蛋白质印迹方法来分析。原始方法中 GAPDH 有高分子量条带存在, 而改进方法中 GAPDH 只以单体形式存在, 高分子量形式条带消失了, 说明成功的去除了分子间二硫键的干扰。

具体实施方式

[0106] 实施例 1: 材料和方法

[0107] 动物

[0108] 我们使用 4-5 周 C57BL/6 小鼠 (SPF 级, 北京维通利华实验动物技术有限公司)。中国科学院生物物理研究所动物管理委员会认可了所有动物相关的操作。

[0109] 原始生物素转换方法

[0110] 小鼠大脑使用 5ml 的 HEN 缓冲液匀浆 (25mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-erhanesulfonic acid, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸) pH 7.7, 0.1mM EDTA (乙二胺四乙酸), 10mM neocuproine (2,9-二甲基-1,10-菲罗啉)), 匀浆液中加入 1% NP40 (Nonidet P-40, 乙基苯基聚乙二醇), 蛋白酶抑制剂, 1mM PMSF (苯甲基磺酰氟), 12,000g 4°C 离心 10 分钟。一半上清使用 40 μ M NO 供体 GSNO (S-亚硝基谷胱甘肽) 常温处理 30 分钟。NO 供体使用丙酮沉淀去除, 样品中加入 2 倍体积预冷丙酮, 沉淀蛋白, 20 分钟后 2,000g 离心 10 分钟得到蛋白沉淀。蛋白沉淀使用封闭试剂 (含有 2.5% SDS 和 20mM MMTS

的 HEN 缓冲液) 重悬, 并调整蛋白浓度到 1mg/ml 之下。自由巯基在 50°C 封闭 20 分钟。多余的 MMTS 使用丙酮沉淀去除, 样品中加入 2 倍体积预冷丙酮, 沉淀蛋白, 20 分钟后 2,000g 离心 10 分钟得到蛋白沉淀。蛋白沉淀使用 HENS 缓冲液 (含有 2.5% (w/v) SDS 的 HEN 缓冲液) 重悬, 加入 0.4mM biotin-HPDP (N-(6-[生物素胺]己基)-3'-(2'-吡啶二硫)丙酰胺) 和 10mM ascorbate (抗坏血酸钠), 常温标记反应 2 小时。多余的标记试剂使用丙酮沉淀去除, 样品中加入 2 倍体积预冷丙酮, 沉淀蛋白, 20 分钟后 2,000g 离心 10 分钟得到蛋白沉淀。重悬蛋白沉淀到 HENS 缓冲液中, 加入 2 倍体积的中和液 (HEN 缓冲液和 NaCl), 同时加入链亲和素琼脂糖凝胶珠子 (购自 Sigma-aldrich) 纯化生物素化的蛋白。将琼脂糖凝胶珠子使用中和液洗涤彻底。生物素化的蛋白随后洗脱: 琼脂糖凝胶珠子在 2×SDS-PAGE 上样缓冲液中 (2 倍浓度的普通聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液), 高温洗脱。样品即可以进行后续分析。

[0111] 有些实验中, 我们使用 NEM 替换了 MMTS, 或者亲和素琼脂糖凝胶珠子 (购自 PIERCE) 替换了链亲和素琼脂糖凝胶珠子。

[0112] 不可逆生物素转换方法

[0113] 样品处理和封闭步骤和上面的原始生物素转换方法一样。改变的地方包括标记试剂, 珠子纯化前 DTT 还原步骤。具体标记时使用生物素马来酰亚胺和 10mM 抗坏血酸钠, 常温标记反应 2 小时。多余的标记试剂使用丙酮沉淀去除。之后加入了一步还原分子间二硫键的步骤: 重悬蛋白沉淀到 HENS 缓冲液中, 加入 DTT, 高温还原去除分子间二硫键。之后珠子纯化步骤和洗脱步骤和上面的原始生物素转换方法一样。

[0114] 在一些实验中, 20mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 替换了 MMTS, 或者 0.2mM 生物素聚乙二醇马来酰亚胺替换了生物素马来酰亚胺。由于 MMTS 是可逆的巯基封闭试剂, 而且在还原分子间二硫键时会产生难闻的气味, 所以在我们的不可逆生物素转换方法中, 推荐使用不可逆的巯基反应试剂 NEM。同时生物素聚乙二醇马来酰亚胺或者任何不可逆的巯基生物素化试剂可以用来替换生物素马来酰亚胺。

[0115] 对角线电泳

[0116] 蛋白样品在经过第一向 12% 凝胶非还原 SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 分析后, 切下电泳条带, 在含有 DTT 的电泳缓冲液中还原蛋白。之后将电泳条带平放在第二块 12% 凝胶上进行还原 SDS-PAGE。之后使用银染来显示蛋白条带。

[0117] 实施例 2 使用“对角线电泳”(diagonal electrophoresis)^{10,11} 和蛋白质印迹方法分析检测原始生物素转化方法受分子间二硫键干扰 (图 3)

[0118] 经过第一向的非还原 SDS-PAGE 之后, 切下整个电泳泳道, 进行第二向的还原 SDS-PAGE。如果没有分子间二硫键的存在, 那么蛋白条带的分子量就不会改变, 而且会处于一条对角线上; 而如果有分子间二硫键存在, 那么蛋白的分子量就会减小而且移动到对角线的下面^{10,11}。在洗脱经过生物素转换方法的蛋白样品时, 我们使用了非还原的变性洗脱方式: 高温和高浓度的变性剂。这样能保证在洗脱之后, 潜在的分子间二硫键仍保持完整, 可以被后续的对角线电泳分析。

[0119] 我们使用 40 μM 的一氧化氮供体 GSNO (S-nitrosoglutathione) 处理小鼠脑匀浆, 之后经过生物素转换方法, 纯化生物素化的蛋白并使用对角线电泳来分析, 如图 3a 所示。有多余的蛋白条带移动到了对角线的下面, 如箭头所示, 这表明原始检测蛋白质巯基亚硝

基化的生物素转换方法被分子间二硫键所干扰。

[0120] 除了使用对角线电泳来检测总体的分子间二硫键,我们使用了蛋白质印迹和特异抗体来分析没有还原剂洗脱下来的蛋白样品。我们发现甘油醛-3-磷酸-脱氢酶(GAPDH)在经过生物素转换方法之后除了以单体 GAPDH 存在之外,还以一些高分子量条带存在(图 3b)。这些高分子量条带不能完全用 GAPDH 的多聚体来解释,表明有未知的蛋白和 GAPDH 形成分子间二硫键,而且这些被 GAPDH 带下来的蛋白可能被错误地鉴定为蛋白质巯基亚硝基化的靶点。我们也分析了没有经过生物素化蛋白纯化步骤之前的样品,发现 GAPDH 的高分子量条带在生物素化蛋白纯化步骤之前已经存在了(图 3c,MMTS 作为封闭试剂)。在还原 SDS-PAGE 中(图 3c 右),这些分子间二硫键可以被 DTT 还原打断。我们改变了生物素标记试剂 biotin-HPDP 为其它标记试剂,biotin-maleimide(biotin-M) 或者 biotin-PEO-maleimide(biotin-PEO-M),这些与 GAPDH 形成的分子间二硫键仍然存在(图 3d)。在内源蛋白质巯基亚硝基化的检测中,巯基封闭试剂(比如 MMTS)应该在细胞裂解时就加入以防止可能的转亚硝基化反应。所以我们在组织裂解时就加入了 MMTS 并分析了 GAPDH 的分子量分布,其高分子量蛋白条带仍然存在(图 3e)。

[0121] 实施例 3 使用不同的巯基封闭试剂,纯化试剂,生物素化试剂。分子间二硫键在各种情况下都存在(图 4)

[0122] 我们怀疑这些分子间二硫键是否是在 MMTS 封闭步骤形成的,所以我们将可逆的巯基封闭试剂 MMTS 换成了一种不可逆的巯基封闭试剂 NEM (N-ethylmaleimide),但是我们在经过生物素转换之后的蛋白样品中仍然发现了分子间二硫键(图 4a)。随后我们将生物素化试剂 biotin-HPDP 换成 biotin-maleimide 或者将纯化试剂链亲和素琼脂糖凝胶珠子换成亲和素琼脂糖凝胶珠子,分子间二硫键仍然存在(图 4b,图 4c)。这些结果暗示检测到的分子间二硫键不是来源于生物素转换方法过程,而是来源于小鼠脑匀浆原始样品中的。

[0123] 实施例 4 使用蛋白质印迹方法分析,经过原始生物素转换方法后的蛋白样品, Parkin, NSF 都存在高分子量蛋白条带(图 5)

[0124] NEM(图 5a) 作为封闭试剂时,我们仍发现 GAPDH 在经过生物素转换方法之后除了以单体 GAPDH 存在之外,还以一些高分子量条带存在。而且,我们进一步分析了另外两种已知的蛋白质亚硝基化蛋白:Parkin 和 NSF,仍然发现它们以单体之外的形式存在高分子量蛋白条带(图 5b,图 5c)。这些高分子量条带不像 GAPDH 里面的那么清晰,说明有各种不同的蛋白和它们形成了分子间二硫键。我们改变了生物素标记试剂 biotin-HPDP 为其它标记试剂,biotin-M 或者 biotin-PEO-M,这些与 NSF 形成的分子间二硫键仍然存在(图 5d),而且 NEM 作为封闭试剂也不能去掉这些分子间二硫键(图 5e)。

[0125] 实施例 5 不可逆生物素转换方法排除了分子间二硫键干扰,并可以成功特异检测蛋白质巯基亚硝基化修饰(图 6)

[0126] 蛋白样品经过 40 μ M GSNO 处理和不可逆生物素转换方法之后,也就是我们在图 2b 的第二步中使用了不可逆生物素标记 biotin-M,在新增的第三步中加入了还原步骤来去除分子间二硫键的影响。我们使用对角线电泳的方法检测了纯化样品中是否存在分子间二硫键,结果发现对角线下面的条带消失了,说明样品中的分子间二硫键的干扰去除了,我们的新策略是成功的(图 6a)。同时,在我们将 biotin-M 替换为另一种不可逆生物素标记

试剂 biotin-PEO-M 之后,有一样的结果。

[0127] 之后,我们验证了新方法检测蛋白质巯基亚硝基化的能力。如图 6b,经过 40 μ M GSNO 处理和不可逆生物素转换方法之后,不管我们使用 MMTS 或者 NEM 作为封闭试剂,或者 biotin-M 或 biotin-PEO-M 作为生物素化试剂,我们都可以成功地检测到经过 GSNO 外源处理导致的蛋白巯基亚硝基化的信号升高。这些信号的升高表明新方法可以成功检测和鉴定发生了巯基亚硝基化的蛋白质。我们还分析了经过纯化洗脱的蛋白样品,发现相比使用原始方法而言,新的改进方法中 GAPDH 的高分子量蛋白条带消失了,说明不可逆生物素转换方法可以成功地排除分子间二硫键的干扰(图 6c),实现了特异检测蛋白质巯基亚硝基化修饰。这些结果证明我们的方法可以成功的应用于蛋白质巯基亚硝基化的检测中。

[0128] 参考文献

[0129] 1. Derakhshan, B. , Wille, P. C. , &Gross, S. S. Unbiased identification of cysteine S-nitrosylation sites on proteins. *Nat. Protoc.* 2, 1685-1691 (2007).

[0130] 2. Jaffrey, S. R. , Erdjument-Bromage, H. , Ferris, C. D. , Tempst, P. , &Snyder, S. H. Protein S-nitrosylation :a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* 3, 193-197 (2001).

[0131] 3. Jaffrey, S. R. &Snyder, S. H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci. STKE.* 2001, L1 (2001).

[0132] 4. Charles, R. L. et al. Protein sulfenation as a redox sensor : proteomics studies using a novel biotinylated dimedone analogue. *Mol. Cell Proteomics.* 6, 1473-1484 (2007).

[0133] 5. Roth, A. F. et al. Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell* 125, 1003-1013 (2006).

[0134] 6. Kang, R. et al. Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature* 456, 904-909 (2008).

[0135] 7. Hess, D. T. , Matsumoto, A. , Kim, S. O. , Marshall, H. E. , &Stamler, J. S. Protein S-nitrosylation :purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 150-166 (2005).

[0136] 8. Hao, G. , Derakhshan, B. , Shi, L. , Campagne, F. , &Gross, S. S. SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 1012-1017 (2006).

[0137] 9. Greco, T. M. et al. Identification of S-nitrosylation motifs by site-specific mapping of the S-nitrosocysteine proteome in human vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 7420-7425 (2006).

[0138] 10. Brennan, J. P. et al. Detection and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 279, 41352-41360 (2004).

[0139] 11. Cumming, R. C. et al. Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 279, 21749-21758 (2004).

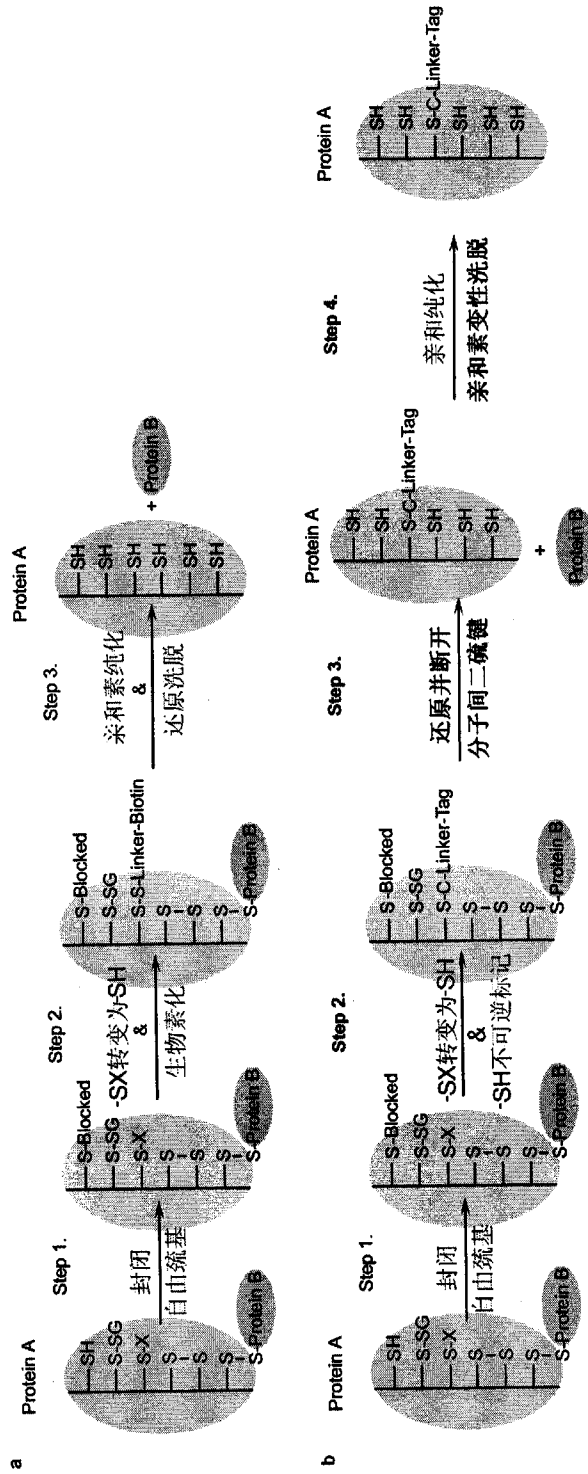


图 1

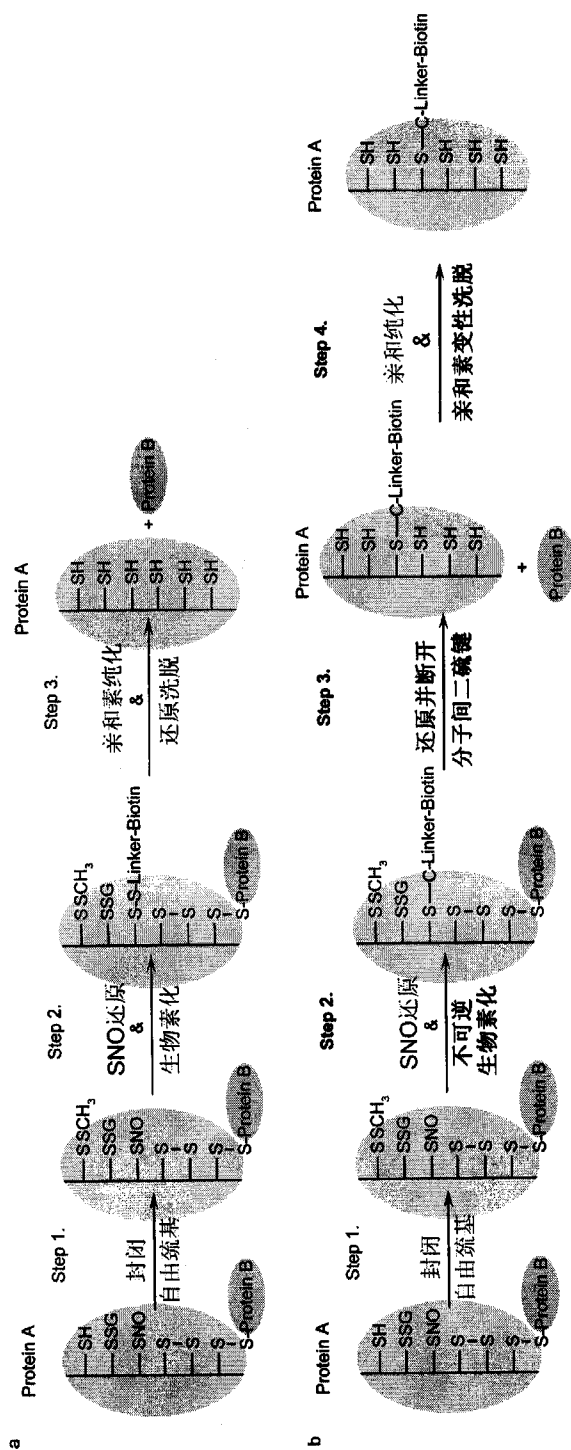


图 2

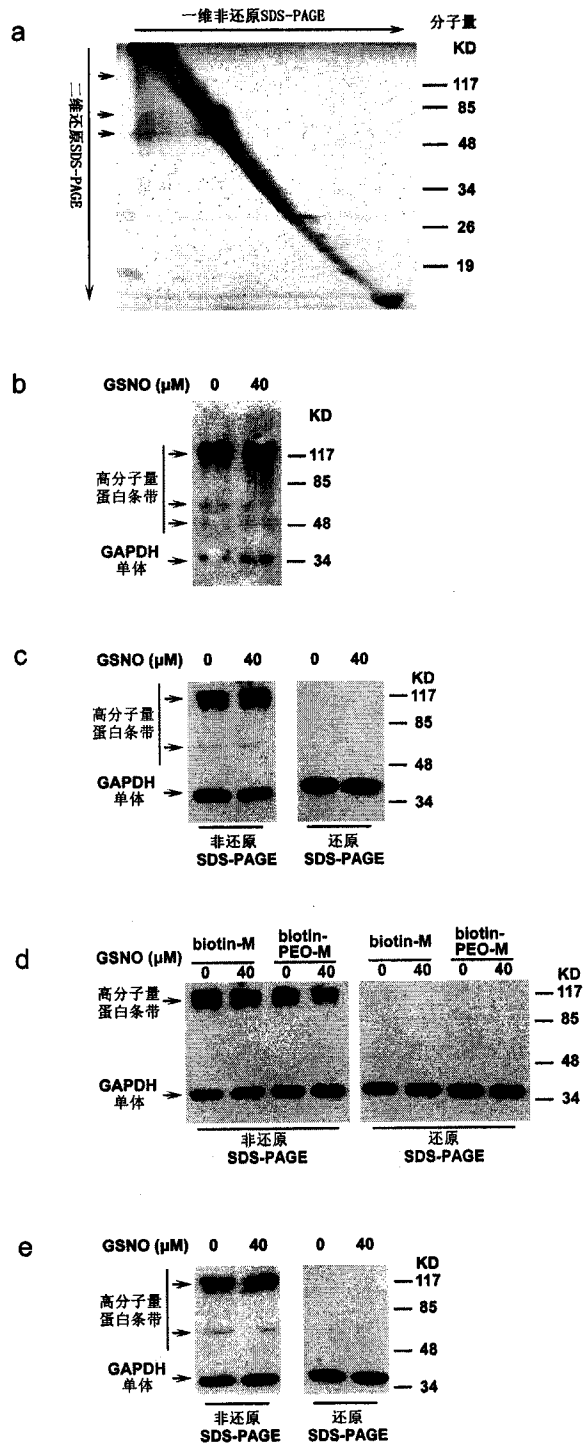


图 3

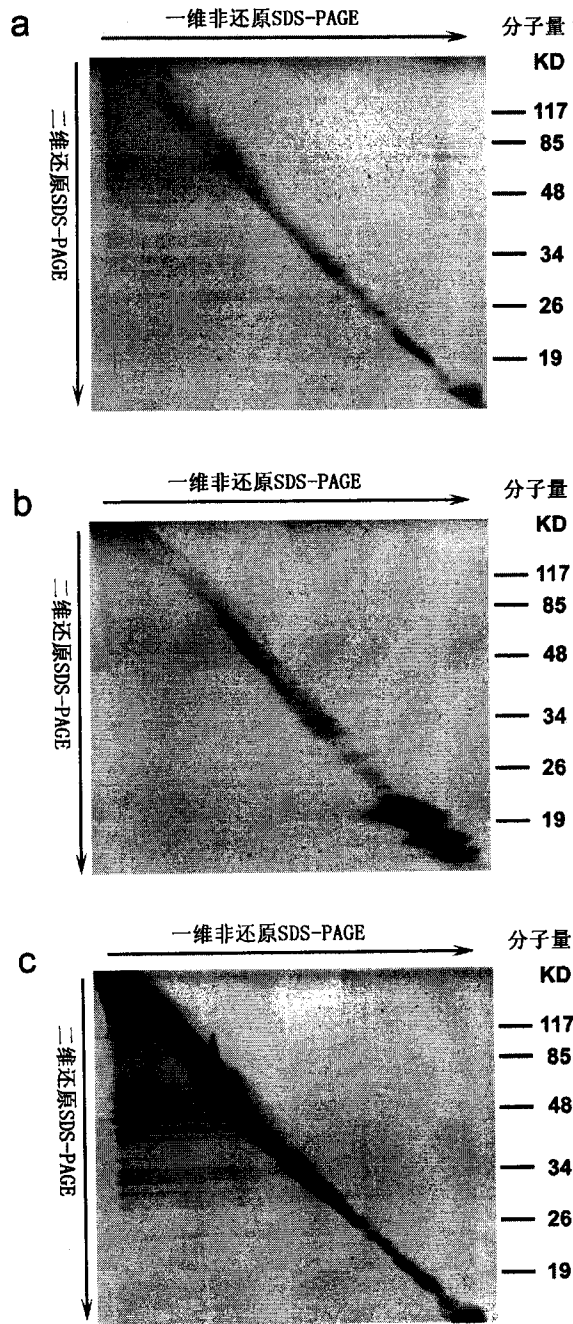


图 4

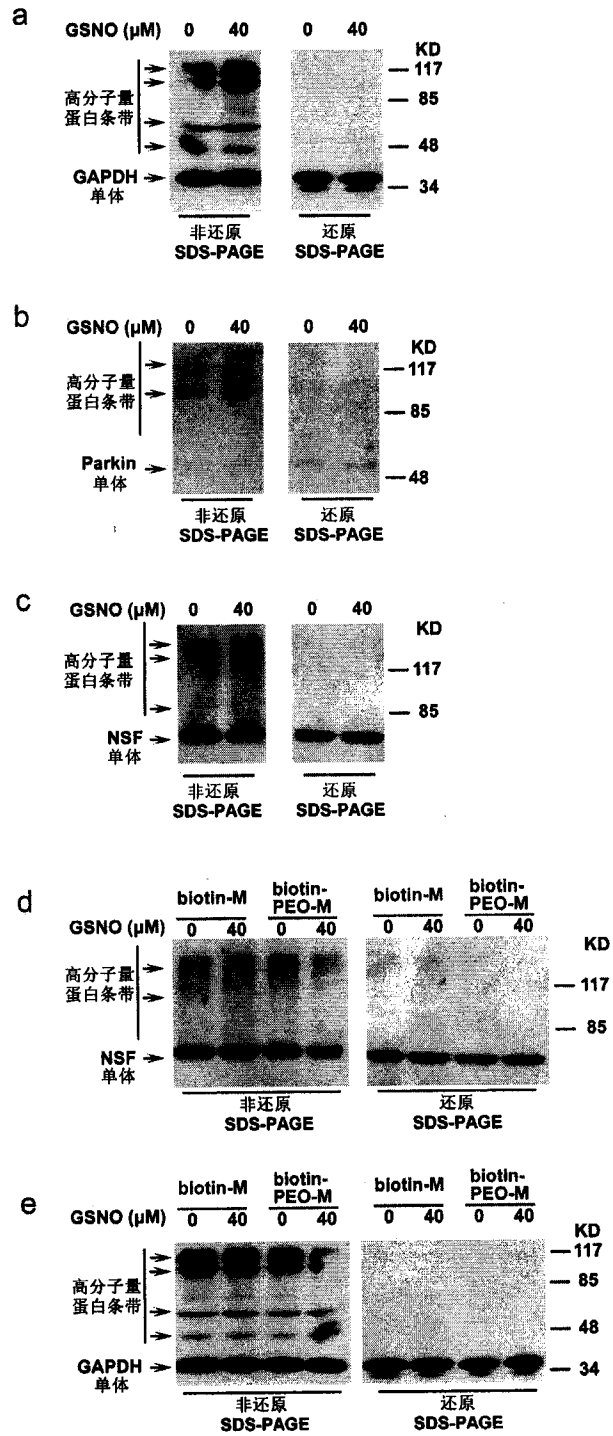


图 5

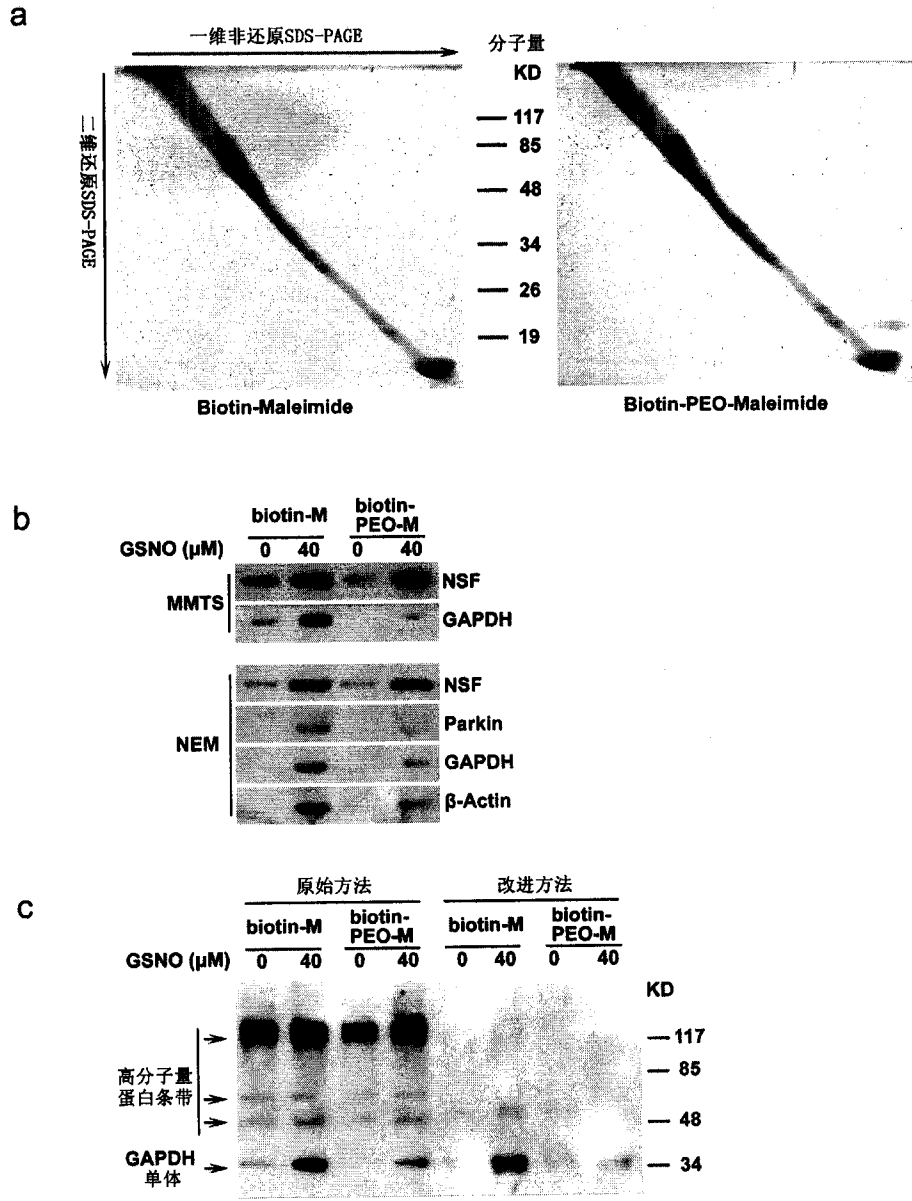


图 6