

学校项目编号: [14743]

国家/上海市项目编号: []

复旦大学本科生学术研究资助计划 (FDUROP)

曦源项目结题报告

(2015 年版)

课题名称 高通量检测蛋白质降解速度的方法
探究

所属学科 生物学 [代码 180]

项目负责人 杨禾青

院 系 生命科学学院

导 师 鲁伯坝

填表日期 2015 年 4 月 1 日

结题报告

高通量检测蛋白质降解速度的方法探究

——以亨廷顿蛋白（Htt）为例

生命科学学院 杨禾青

指导教师 鲁伯坝

摘要：蛋白质降解及其相关参数对理解蛋白质的生物学功能、研究蛋白降解机制及其调控手段、以及针对疾病蛋白降解的药物研发等有着重要的意义。由于现有的蛋白质降解测量方法都存在一定的局限性，本课题立足于建立一种新型的能够高通量检测内源性蛋白降解速率的技术。该技术基于脉冲-示踪实验原理，通过联用张力诱导的叠氮-炔基环加成反应（SPAAC）和均相时间分辨荧光共振技术（HTRF），高通量、高精度、高特异性地对目标蛋白进行定量，以计算其降解速率。通过不断的优化和技术突破，我验证了该技术原理的可行性，并在初步的高通量实验中获得了成功。

关键词：蛋白降解 点击化学 均相时间分辨荧光共振 高通量

Abstract: Protein degradation and its parameters are of great importance for us to understand the biological functions of proteins, study the mechanism and regulation approaches of protein degradation machinery and screen for drugs targeting the degradation of disease-causing proteins. Given that available protein turnover rate measuring methods all have certain disadvantages, this project is aimed at establishing a novel protein turnover rate measuring technology, which is capable of measuring endogenous protein degradation in a high-throughput manner. This technology is based on the rationale of pulse-chase, and by combining Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition (SPAAC) and Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF), we are able to measure protein turnover rate with high throughput, accuracy and specificity. After tries and optimizing, I verified the validity and practicality of this new method, and succeed in applied it into a high-throughput way.

Keywords: protein degradation, Click Chemistry, HTRF, high-throughput

引言

蛋白质降解其相关参数（降解速度及半衰期等）对理解蛋白质功能、小分子调控物对蛋白的预期作用、以及针对特定疾病蛋白的降解研发药物有着重要意义。目前发现的蛋白质降解途径主要有蛋白酶体降解以及溶酶体降解两种途径。蛋白质通过

这两种途径的降解异常时，都可能产生疾病。例如，多种神经退行性疾病（如亨廷顿病等）^{[1][2]}由变异蛋白的错误折叠及不正常降解引起，而增强溶酶体或蛋白酶体对疾病蛋白的降解在疾病细胞及动物模型中可以有效的治疗这些疾病^[3]。近年多项研究表明，溶酶体降解的不正常，是导致多种癌症的原因之一^[4]。此外，在生物学研究中，蛋白降解机制的研究对理解蛋白的生物学功能有着重要意义。因此，筛选和发现调控蛋白降解调控基因和小分子化合物，在医药产业界及生命科学界有着重要意义及迫切需求。

目前蛋白质降解速率测量的一般思路是采用脉冲-示踪（pulse-chase）的方法，即首先将新生成的蛋白标记上某种标记物（脉冲），随后将被标记的蛋白在不存在标记物的环境中经历正常的降解过程，最后通过相应的方法检测被标记蛋白（示踪），以计算其降解速率^[9]。但现有的各种检测方法都有较大的缺点，并且缺少一种可以高通量检验特定的内源性蛋白降解的技术手段。经典的检测方法主要利用同位素^{35S}标记进行脉冲-示踪实验（Pulse-chase）^[5]。但存在对实验室要求高、有安全隐患、操作流程复杂难以兼容高通量、定量不准确等缺点。由于这些缺点，近年来又出现了利用蛋白质翻译阻断剂放线菌酮来研究蛋白的降解^{[6][7]}，其优点是操作方便，并且有可能进行高通量筛选。但缺点主要是非特异性强、细胞毒性大，因此不适用于研究降解速度较慢的蛋白。而与此同时，很多疾病致病蛋白，例如神经退行性疾病蛋白等，降解速率缓慢。因此，对于进行这些致病蛋白的研究，生物医学界需要更好的方法来研究此类蛋白。

此外，还有很多利用给目标蛋白加标签，再通过标签的检测来测量蛋白质降解的方法，例如 Bleach-chase^{[8][9]}，BL-tag^[10]等。但这些方法的主要缺点有：一、需要给蛋白加标签，这些标签往往都是几十 kDa 的蛋白，最小也是较长的肽段，所以对蛋白本身的性质、功能及降解很可能有着较大的影响；二、由于要给蛋白加标签，所以一般只能用于检测外源表达的蛋白，除非利用较繁琐的耗时很长的基因敲入手段敲入带标签的融合蛋白基因。

综上所述，目前已有的蛋白降解检测方法均有重大缺陷。基于这一现状，本项目意在通过联用叠氮-炔基环加成反应（Azide-Alkyne Cycloaddition, AAC）^[11]与均相时间分辨荧光共振技术（Homogeneous Time-Resolved Fluorescence, HTRF）^{[12][13]}提供一种测量细胞内蛋白质降解速率的新方法，不仅能够直接检测内源蛋白降解，而且实现灵敏、准确，并能够兼容高通量。具体地，本课题的思路是使用甲硫氨酸的类似物 L-azidohomoalanine (L-AHA) 在脉冲阶段对新生成的蛋白标记叠氮基，随后再通过 AAC 反应给尚未降解的被标记蛋白上的叠氮基连接上生物素（Biotin）^{[14][15]}，在检测阶段通过分别偶联有荧光供体和受体的识别目标蛋白不同表位的两种抗体，利用 HTRF 检测生物素-链霉亲和素免疫沉淀前后目标蛋白的含量，通过差值反映被生物素标记的目标蛋白含量，从而计算其降解速率。该方法在多个

方面具有其他已有的细胞内蛋白质降解测量方法无法取代的优势。

本项目以已有的前沿技术手段为基础，创新性地设计了新的高通量检测蛋白降解的技术手段，在多个方面具有其他已有方法无法取代的优势，可用于医药产业界筛选疾病蛋白降解相关药物，以及学术界对特定蛋白降解相关信号通路的研究，有着广阔应用前景。

1 寻找与 HTRF 兼容的 click 反应体系

本课题技术的思路大致如下图所示：

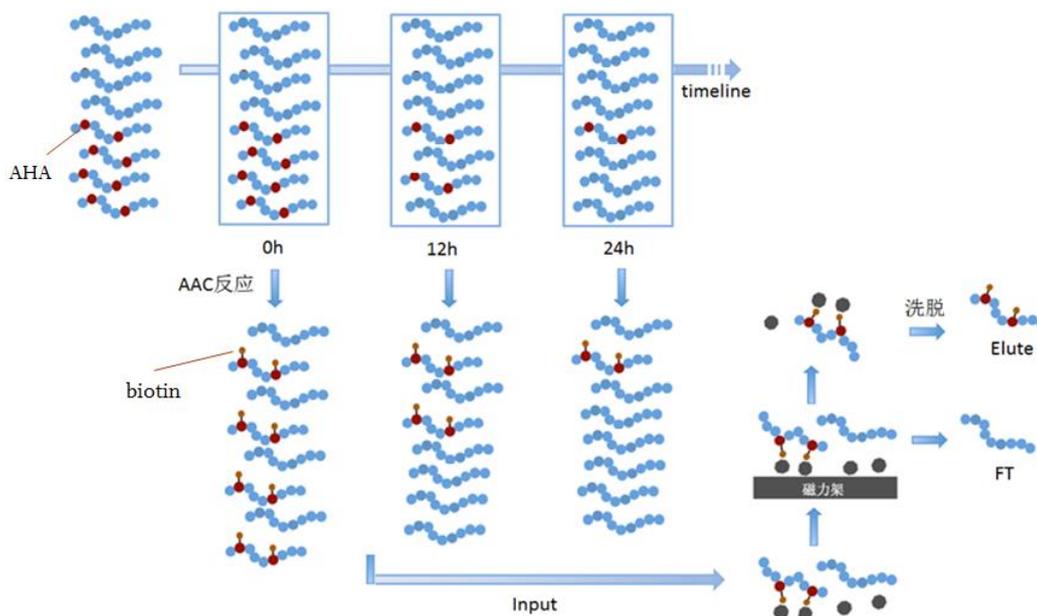


图 1 实验流程图

在脉冲阶段：用甲硫氨酸的类似物 L-azidohomoalanine (L-AHA) 对新生成的蛋白标记叠氮基，随后再通过 AAC 反应给尚未降解的被标记蛋白上的叠氮基连接上生物素 (Biotin)。在检测阶段：通过生物素-链霉亲和素免疫沉淀来分离被标记的蛋白和未被标记的蛋白；再用分别偶联有荧光供体和受体的、能识别目标蛋白不同表位的两种抗体来与蛋白样品发生反应，利用 HTRF 检测生物素-链霉亲和素免疫沉淀前后目标蛋白的含量，并通过差值反映被生物素标记的目标蛋白含量，从而计算其降解速率。

因此，保证均相时间分辨荧光共振技术 (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence, HTRF) 体系和点击化学 (click chemistry) 叠氮-炔基环加成反应 (Azide-Alkyne Cycloaddition, AAC) 体系兼容，是实现高通量的基础之一。

1.1 CuAAC 无法直接与 HTRF 联用

最初，我们选用了点击化学体系中较常见的、试剂已经商业化的 CuAAC 反应，

但在郁申量师兄的前期实验中我们看到铜/亚铜离子在与蛋白共存时会干扰 HTRF 信号，具体的，应该是 CuAAC 反应体系中的铜/亚铜离子会与蛋白发生相互作用，并直接释放非特异性信号，从而覆盖 HTRF 的信号。即 CuAAC 反应体系与 HTRF 检测体系不兼容。并且，在我们的尝试下发现这种干扰无法通过铜离子的螯合剂、硫醇硅胶来消除。

1.2 SPAAC 与差减法联用的技术探索

为了能够实现最后向高通量转移的目的，我们又寻找了能不使用铜离子，即非铜催化的 AAC 反应——SPAAC (Strain-promoted AAC)。我们购买了商业化的反应试剂 Biotin DIBO Alkyne，按照说明书的建议来进行 SPAAC 反应，并在尝试过程中将 DIBO 的反应浓度调整为了 $5 \mu\text{M}$ ，反应温度设定为 37°C 。并根据其检测灵敏度较低的问题将检测阶段的直接法（即在检测阶段用 HTRF 检测洗脱液中标记蛋白的含量来表示收细胞时细胞中标记蛋白的含量）改为间接法（用免疫沉淀前后标记蛋白的含量差来表示收细胞时细胞中标记蛋白的含量），在实验中得到了理想的结果（如图 2）。

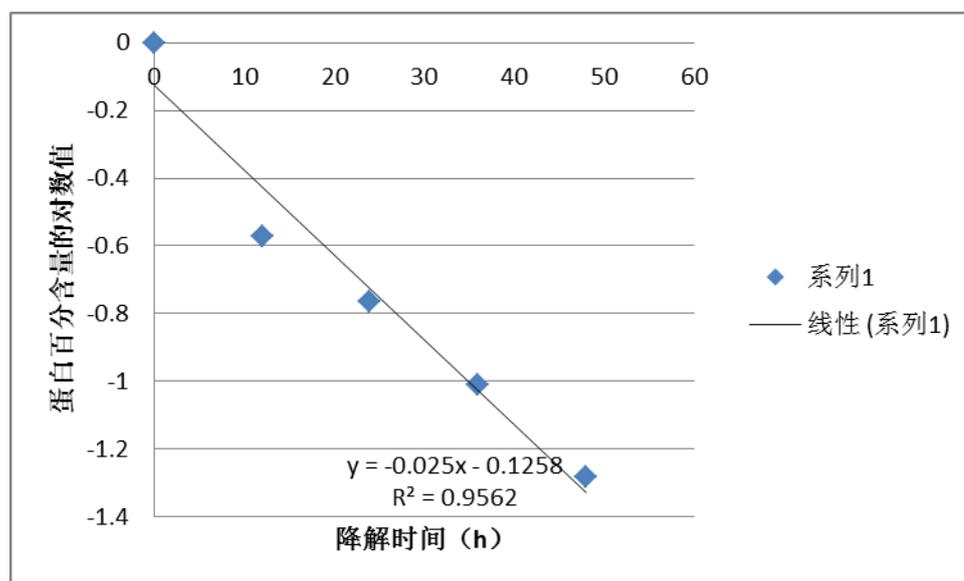


图 2 293T 细胞中 HTT 蛋白的降解曲线

以理论中 0h 时标记蛋白的含量为 100%，从图中可以看到，随后 12h、24h、36h、48h 时刻的标记蛋白含量成指数衰减趋势（纵坐标取对数后拟合曲线即表现为直线）。拟合得到的曲线满足 $y = 0.9165e^{-0.017x}$ ，相关性系数 $R = 0.9562$ ，由此算得 293T 细胞中表达的野生型 HTT 蛋白的半衰期为 40.7h。虽然该半衰期数据与国际上其他实验室发表的多个结果有所出入，但得到拟合较好的降解曲线本身，也是该技术标志性的一个突破了。

2 高通量技术转移

在获得降解曲线之后，我开始尝试用 96 孔板等高通量实验材料来进行（模拟）高通量实验，修改了以往流程中与高通量实验不合的步骤，如删去了进行 BCA 检测

样品中蛋白浓度的步骤。同时，由于高通量之后每份样品的蛋白含量下降，故一方面调整了各项操作以适应高通量实验，并初步设定了一套与 96 孔板体系相匹配的技术参数，另一方面对重复数的要求进行了统计计算。

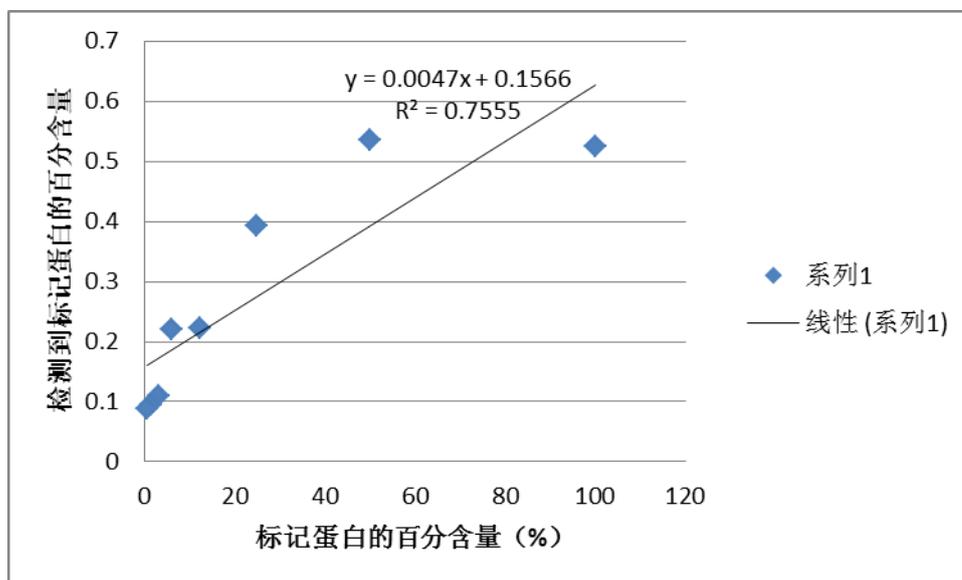


图 3 293T 细胞中标记蛋白含量与检测信号的线性关系图

图 3 中，标记蛋白的百分含量分别为 0%、3.125%、6.25%、12.5%、25%、50%、100%。可以看到，当标记蛋白含量在 0%-50%时，标记蛋白含量与检测到标记蛋白的含量是成线性关系的（如图 4），相关性系数 $R=0.9456$ 。说明当标记蛋白浓度在一定范围内时，这套高通量技术是可以准确检测出标记蛋白的含量的，我们可以据该结果调整铺种的细胞密度，从而将蛋白浓度调整至线性范围内。

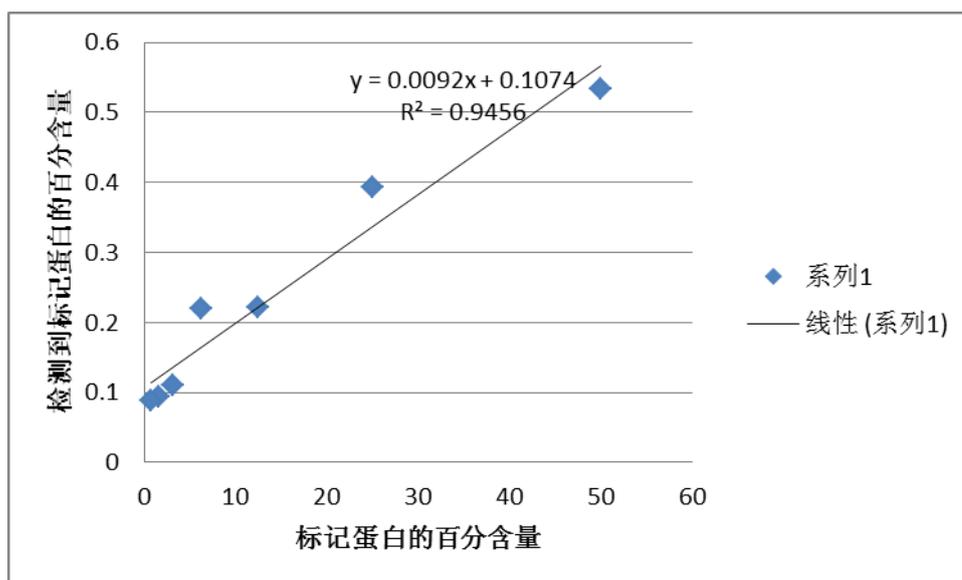


图 4 293T 细胞中标记蛋白含量与检测信号的线性关系图（去 100%点）

3 本技术合理性与正确性的验证

为了进一步验证该技术确实可以准确反映出细胞内某种蛋白的含量，我又用药物处理作对照组进行了实验（如图 5）。

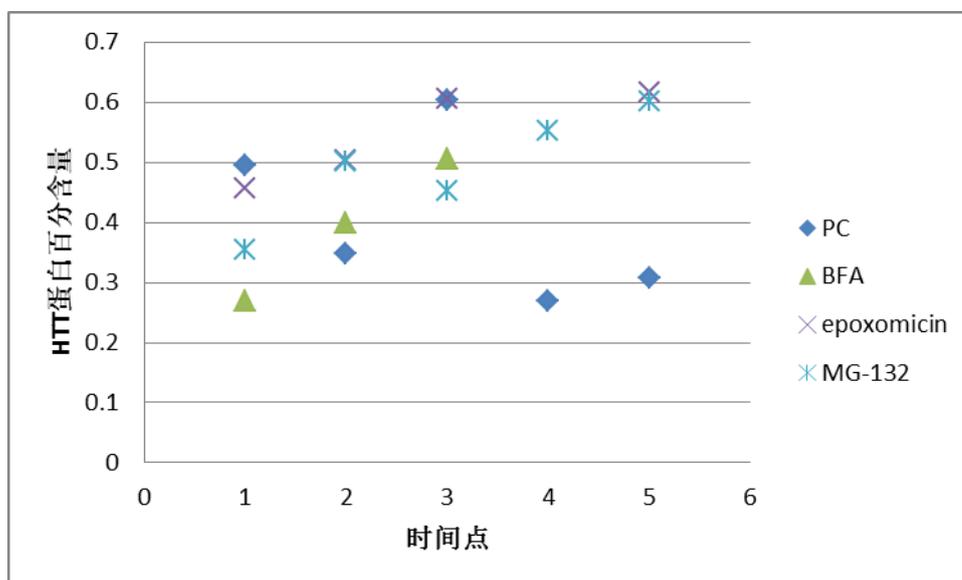


图 5 药物处理后细胞内 HTT 蛋白降解曲线图

其中，BFA、epoxomicin、MG-132 分别为三种能阻断蛋白质降解的药物，即用药物处理后 HTT 的降解速度会变慢，表现在图表上为降解曲线变缓；五个时间点分别为 0h、12h、24h、36h、48h。而在图上，我们也确实可以看到，与 PC（无药物处理）组相比，有蛋白质降解阻断药处理的三组均有降解速率明显减小的趋势。虽然也有奇怪的地方，也就是为什么药物处理的三组的 HTT 蛋白百分含量会随着时间推移而增高。

由以上我们可以看到，经过一系列的调整和修改，本课题所建立的技术已基本可以准确测量出细胞内目标蛋白的含量，并据此刻画蛋白质降解曲线，计算蛋白质降解速率，可以说，本课题已初步完成。但与此同时，我们也可以看到，实验结果仍存在一些有待解释、有待改进的地方。在课题结束后，还有待我们进一步优化实验体系，从而实现该技术的生产化。

参考文献

[1] Manzoni, C., Lewis, P. A. Dysfunction of the autophagy/lysosomal degradation pathway is a shared feature of the genetic synucleinopathies. *FASEB J.* (2013) 27(9), 3424-3429.

[2] Menzies, F. M., Moreau, K., Rubinsztein, D. C. Protein misfolding disorders and

macroautophagy. *Curr Opin Cell Biol.* (2011) 23(2), 190–197.

[3] Lu, B., et al. Identification of NUB1 as a suppressor of mutant Huntingtin toxicity via enhanced protein clearance. *Nat Neurosci.* (2013) 16(5), 562–570.

[4] Høyer-Hansen, M., Jäätelä M. Autophagy: an emerging target for cancer therapy. *Autophagy.* (2008) 4(5), 574-580.

[5] Takahashi, M., Ono, Y. Pulse-chase analysis of protein kinase C. *Methods Mol Biol.* (2003) 233, 163-170.

[6] Zhou, P. Determining protein half-lives. *Methods Mol Biol.* (2004) 284, 67-77.

[7] Görner, K., et al. Differential effects of Parkinson's disease-associated mutations on stability and folding of DJ-1. *J Biol Chem.* (2004) 279(8), 6943-6951.

[8] Geva-Zatorsky, N., et al. Using bleach-chase to measure protein half-lives in living cells. *Nat Protoc.* (2012) 7(4), 801-811.

[9] Eden, E., et al. Proteome half-life dynamics in living human cells. *Science.* (2011) 331(6018), 764–768.

[10] Mizukami, S., Watanabe, S., Akimoto, Y., Kikuchi, K. No-wash protein labeling with designed fluorogenic probes and application to real-time pulse-chase analysis. *J Am Chem Soc.* (2012) 134(3), 1623-1629.

[11] Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. Click Chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed.* (2001) 40(11), 2004– 2021.

[12] Degorce, F., Card, A., Soh, S., Trinquet, E., Knapik, G. P., Xie, B. HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications. *Curr Chem Genomics.* (2009) 3, 22–32.

[13] Baldo, B., et al. TR-FRET-Based duplex immunoassay reveals an inverse correlation of soluble and aggregated mutant huntingtin in Huntington's Disease. *Chem Biol.* (2012) 19(2), 264–275.

[14] Becer, C. R., Hoogenboom, R., Schubert, U. S. Click Chemistry beyond metal-catalyzed cycloaddition. *Angew Chem Int Ed.* (2009) 48(27), 4900–4908.

[15] Agard, N. J., Prescher, J. A., Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J Am Chem Soc.* (2004) 126(46), 15046–15047.

后记: 十分感谢在该课题进展过程中鲁老师以及实验室的师兄师姐对我的指导、帮助、乃至在生活上的关心和爱护。课题的进展可以说是不容易的，是导师和师兄师姐们的帮助和启发，才有了该课题今天的结果。

参加该项目的心得和感悟：

一年前，带着对生命科学的好奇和从事疾病研究的热情，我进入了鲁伯坝老师的实验室，并在他的指导下申请、开展了该曦源项目。在项目即将告一段落之际，回首过去一年里与该项目的点点滴滴，不禁感慨良多。

科创项目在科研上给我的知识，不仅仅是完成一系列实验这么简单，在这个过程中我学会了如何用实验实现自己的设想，进一步地，当设想和实验遇到矛盾时思考并探索出问题所在，然后修正条件、解决问题。每次一个实验周期结束，我都会和导师、师兄讨论交流实验结果和过程中遇到的困难，逐渐的，向他们学习到了实验设计的原则和方法，完善了科学的思维和解决问题的能力，并提高了自己的时间管理和统筹规划的能力。无论是科研中，还是生活中，这些都让我受益匪浅。除此之外，在曦源项目的执行过程中，我更学会了如何进行课题汇报、如何查阅文献资料，可以说得到了系统的科研体验和科研素质训练。

值得一提的是，在进行这个项目的过程中，我了解到，科研工作者需要的不仅仅是优秀的科研技能，更重要的是一个严谨的学术态度。在课题刚开始的一段时间里，除了指导各种实验方法、实验思路外，还经常特意提醒并监督我详细记录实验笔记，以及定期总结实验工作。慢慢地，我发现，这种严谨的态度不仅有助于我在写总结时有详细的参考，更大大提高了我每次实验的可重复性。这一细节也让我意识到，一个研究项目的成功靠的不是一日之功，而是平时实验中点点滴滴的细致记录。

而除了学习到基本的实验研究手段、养成了实验研究习惯、体验了实验过程的辛苦和惊喜外，在曦源项目中我还有一大收获，就是和导师以及师兄师姐们相处的每一段时光。从捉襟见肘的新手，到逐渐训练成为可以自己设计并熟练、成功地完成实验的“老手”，这个过程少不了他们不倦的教诲。课题的进展可以说是不容易的，我时不时就会遇到困难，但是导师和师兄师姐们一次一次耐心的讲解，手把手的带领，让我在这个过程中一点点进步。而导师敏锐的学术洞察力、对科研的热情、严谨的工作态度，也成了我暗暗向自己立下的人生标杆。

总之，参与这期曦源项目促使我进步、思考，是我学生生涯的宝贵经验。感谢在这过程中鲁老师以及实验室的师兄师姐对我的指导、帮助、乃至在生活上的关心和爱护。

项目负责人（签名）：

日期： 年 月 日