使用 Protein A 和链霉亲和素 IMCStips 进行磷酸酪氨酸肽的自动化免疫亲和富集

Sunil Hwang*[1], Todd Mullis[2], Michael Walla[2], Matthew Manter[1], Jingyun Lee[3], Christina M Furdui[3], L. Andrew Lee[1]

[1]Integrated Micro-Chromatography Systems, LLC, Columbia, SC; [2]University of South Carolina, Columbia, SC; [3]Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, NC

integrated micro-chromatography systems

摘要

- 建立了用于高通量样本前处理的自动化 Protein A 与链霉亲和素免疫亲和富集流程
- 基于抗磷酸酪氨酸抗体、Protein A / 链霉亲和素 IMCStips 技术平台，实现了超过 1000 种磷酸酪氨酸肽段的鉴定
- 通过采用 Hamilton® Microlab STAR 自动化工作站与 IMCStips 技术，达成了超过 94% 的磷酸酪氨酸肽段富集特异性

简介

蛋白质磷酸化的信号转导是真核细胞存活、维持与死亡的关键调控机制 [1-4]。目前，通过使用 IMCStips 技术结合自动化液体处理系统，基于固定化金属亲和色谱（IMAC）与二氧化钛（TiO_2）的磷酸丝氨酸与磷酸苏氨酸肽段的全局富集方法已成功优化。然而，由于磷酸酪氨酸（p-Tyr）肽段在整体磷酸化事件中的化学计量比极低 [5-11]，使用上述方法富集磷酸酪氨酸肽段的效率较差。本文介绍一种利用分散式移液萃取技术（IMCStips）进行抗磷酸酪氨酸抗体富集的方法。该方法采用自动化液体处理系统富集磷酸酪氨酸肽段，实现了高通量、重复性高的样本制备。

方法

结直肠癌细胞 HCT116 经 5 mM H_2O_2和 Na_3VO_4处理 30 分钟后，使用含蛋白酶与磷酸酶抑制剂混合物的 8 M 尿素缓冲液裂解。添加 10 mM 二硫苏糖醇于 56°C 反应 30 分钟以还原二硫键，随后加入 50 mM 碘乙酰胺在避光条件下进行 30 分钟巯基烷基化，继而在 37°C 进行过夜胰蛋白酶消化。

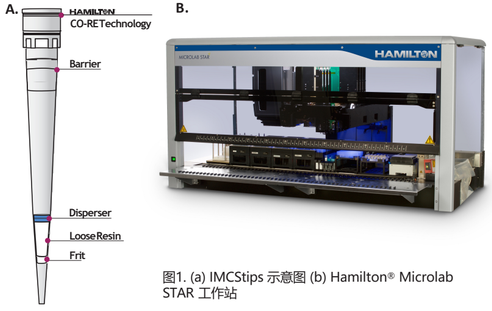


图1. (a) IMCStips 示意图 (b) Hamilton® Microlab STAR 工作站

实验使用购自 Cell Signaling Technology 公司的 p-Tyr-100 及 p-Tyr-1000 抗磷酸酪氨酸抗体（含/不含生物素标签），以及购自Millipore Sigma 公司的 4G10 抗磷酸酪氨酸抗体（含/不含生物素标签）。针对自动化样本处理，我们 Hamilton® Microlab STAR 工作站开发了 IMCStips 操作方法（图1）。

磷酸酪氨酸肽段使用 0.1% 甲酸水溶液洗脱并彻底干燥，冻存于 -80°C。复溶于 20 µL 含 3% 乙腈与 0.5% 甲酸的溶液后进行 LC-MS/MS 分析。

为测定富集肽段总量，采用 UPLC TSQ Endura 三重四极杆质谱仪进行定量分析（优化条件数据未展示）。针对全局磷酸化肽段鉴定，使用 Q Exactive™ HF 高分辨质谱联用 Ultimate 3000 nano_x0002_UHPLC 分析混合抗体富集样本。采用数据依赖采集模式：每次全扫描后选取前 20 个最强离子进行 MS/MS 碎裂，动态排除时间设为 10 秒。

针对单一抗体的评估实验，样本复溶于 10 µL 含 20 mM 柠檬酸与 2% 乙腈的溶液，进样 4 µL。在 Waters nano-ACQUITY UPLC 系统使用 25 cm × 75 µm HSS T3 C18 色谱柱（55°C），以 0.4 µL/min 流速进行 90 分钟乙腈梯度（3-30%，含 0.1%甲酸）分离，随后通过 Thermo Fusion Lumos 质谱仪分析（MS1 分辨率 120k，MS2 HCD 碎裂分辨率 15k）。

使用 Proteome Discoverer v2.2（Thermo Scientific）的 Sequest HT 算法检索人源 UniProt 蛋白质数据库（2017年3月版，20,119条序列）。检索参数设置：仪器类型 FT-trap，母离子质量误差容限 10 ppm，碎片离子误差容限 0.02 Da（单同位素），可变修饰包括甲硫氨酸氧化（+15.995 Da）及丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸磷酸化（+79.966 Da），固定修饰为半胱氨酸氨基甲酰甲基化（+57.021 Da）。

采用 Venny 及 Venn diagram 在线工具进行数据独特组分与共有组分分析 [12,13]，通过 STRING（v10.5）与DAVID（v6.8）在线工具完成通路分析、功能注释及数据挖掘 [14,15]。

结果

对Hamilton® Microlab STAR 工作站的优化

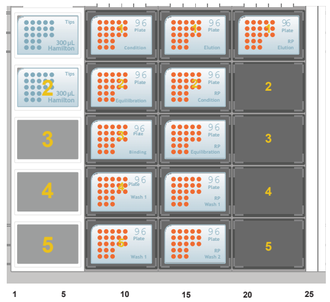


图2：Hamilton® Microlab STAR工作站用于磷酸酪氨酸免疫亲和富集的布局。

已对 Hamilton® Microlab STAR 工作站进行优化，实现了使用 300 µL 移液吸头（每个吸头含 5 µL Protein A 或链霉亲和素树脂）的自动化样本制备。该系统用于免疫亲和富集及反相脱盐的台面布局如 图2 所示。完整的自动化亲和捕获流程耗时低于 50 分钟且需极少人工操作，后续可根据需要进行肽段脱盐处理以供 LC-MS/MS 分析（见表1）。

简言之，胰酶消化物中的抗磷酸酪氨酸抗体于 4°C 旋转孵育过夜后，通过 Hamilton® Microlab STAR工作站按以下流程捕获抗体复合物。我们优化了该工作站用于免疫亲和富集的液体操作程序，具体参数设置如下（表2）。

#	Procedure	Buffer	Buffer, µL	Aspiration, µL	Cycle#
1	Condition	TBS	600	300	3
2	Equilibration	TBS	600	300	3
3	Binding	TBS	400	300	20
4	Washing 1	TBS	600	300	3
5	Washing 2	Water	600	300	3
6	Elution	0.5% FA	400	300	5
7	RP - Condition	100% ACN	600	300	3
8	RP – Equilibration	1% TFA	600	300	3
9	RP – Binding	1% TFA	600	300	10
10	RP – Washing 1	1% TFA	600	300	3
11	RP – Washing 2	0.5% FA	600	300	3
12	Elution	50% ACN, 0.5% FA	400	300	5

表1. 使用 Hamilton® Microlab STAR 工作站的磷酸酪氨酸肽段免疫亲和富集与纯化工作流程

	Aspiration (µl/sec)	Dispense (µl/sec)	Swap speed (mm/ sec)	Settling time (sec)
ProteinA	100	5	2	1
Streptavidin	100	5	2	1
Desalting	100	10	2	1

表2. Hamilton® Microlab STAR 工作站的液体类别设置（使用 300 µL 吸头进行免疫亲和富集与脱盐）

使用 Protein A 或链霉亲和素 IMCStips 进行磷酸酪氨酸免疫亲和富集

为测试磷酸酪氨酸肽段的大规模高通量免疫亲和富集，我们采用 1 mg HCT116 结直肠癌细胞酶解产物与三种抗磷酸酪氨酸抗体。每次实验中，将 20 µL 三种非生物素化或生物素化的抗磷酸酪氨酸抗体加入含 1 mg HCT116 细胞酶解产物的 400 µL 1× Tris 缓冲盐溶液（TBS，pH 7.4）中，于 4°C 旋转孵育过夜。

使用 Protein A IMCStips 分离抗体-肽段复合物，并以 0.1% 甲酸水溶液洗脱磷酸酪氨酸肽段。共洗脱的抗体经反相 IMCStips 纯化后完全干燥。对于生物素化抗磷酸酪氨酸抗体及其磷酸酪氨酸肽段免疫复合物，则使用链霉亲和素 IMCStips 进行分离。

通过 Protein A 与链霉亲和素吸头富集的所有鉴定磷酸化肽段中，磷酸酪氨酸肽段的富集特异性分别为 94.1% 和 94.6%（图3 A）。使用两种不同吸头鉴定出的磷酸酪氨酸蛋白重叠率为 78.4%（图3 B）。

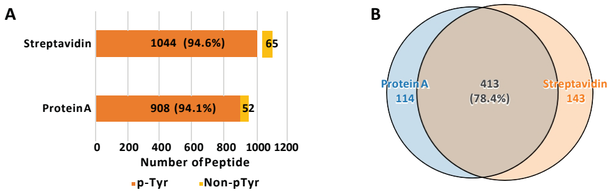


图3. （A）磷酸酪氨酸富集特异性分析（基于鉴定磷酸化肽段）；（B）磷酸酪氨酸蛋白重叠分布

为验证抗磷酸酪氨酸抗体的特异性，我们分别使用 20 µL p-Tyr-1000 抗体（Cell Signaling Technology公司）、4G10 抗体（MilliporeSigma公司）以及两种抗体的 1:1 混合溶液，并比较了鉴定出的含磷酸酪氨酸蛋白质的重合情况。

如图4 ，在 p-Tyr-1000 与 4G10 抗体富集结果中，仅 55.5% 的含磷酸酪氨酸蛋白质为两者共有；在 4G10 抗体与混合抗体富集结果中，有 84.8% 的含磷酸酪氨酸蛋白质为两者共有；在 p-Tyr-1000 抗体与混合抗体富集结果中，有 75.4% 的含磷酸酪氨酸蛋白质为两者共有。而共有蛋白的数量依次为 334、385 和 454。

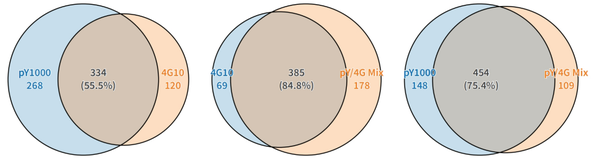


图4. 两种不同抗体鉴定的磷酸酪氨酸蛋白重叠分析

全面的磷酸蛋白质组分析

为全面捕获磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸和磷酸酪氨酸肽段的整体信号信息，我们在免疫亲和富集后的流穿液中，分别使用了固定化金属亲和色谱填料 PolyTi™（Tymora Analytical 公司）和 ZrO_2 IMCStips 进行后续富集（详见另一篇海报：#ThP 638，不同 IMAC 填料在 HCT116 细胞系深度磷酸化蛋白质组自动化富集中的比较）。虽然这两种填料对新鲜酶解产物的富集效率没有显著差异，但 PolyTi™ IMCStips 鉴定到的磷酸化肽段数量是 ZrO_2 吸头的 1.7倍 以上（图5）。

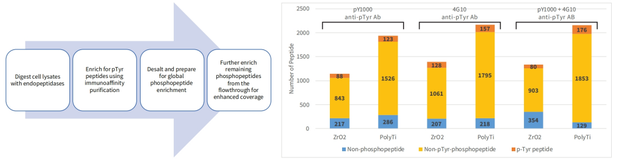


图5. 使用ZrO_2 与PolyTi™ IMCStips对磷酸酪氨酸免疫亲和层析流穿液进行的全局磷酸化肽段富集效果对比

通路分析、功能注释与数据挖掘

我们使用 STRING 与 DAVID 等在线工具，对通过肽段谱图匹配数进行相对定量的已鉴定磷酸酪氨酸肽段进行数据挖掘。通过 PSM 数据筛选，并借助 STRING 软件将总体网络精炼为受调控的磷酸酪氨酸信号转导聚焦网络（图6 A与B）。同时，我们运用 DAVID 工具完成了对数据的功能注释汇总、疾病关联分析、分类归属、基因本体富集、通路解析、蛋白结构域鉴定以及聚类分析（图6 C）。

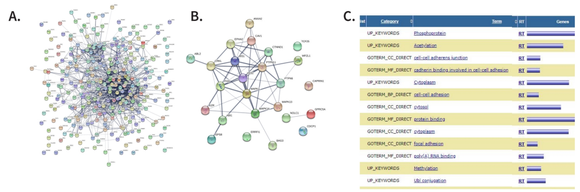


图6. 基于STRING构建的蛋白质功能关联网络（A、B）及基于DAVID实现的功能注释分析（C）

结论

通过优化 Hamilton® Microlab STAR 工作站的磷酸酪氨酸肽段富集流程，我们得以在一小时内鉴定出超过 1000 种磷酸酪氨酸肽段，并实现 90% 以上的富集特异性。

未来将开发进一步缩短处理时间的新流程，该流程将在单一过程中集成缓冲液分液、板上免疫捕获、固定化金属亲和色谱以及联合反相脱盐纯化步骤。

采用自动液体处理系统结合 Protein A 与链霉亲和素 IMCStips 进行磷酸酪氨酸肽段免疫富集，显著提升了生物制药研究领域的分析通量与结果重现性。

致谢

感谢杜克大学蛋白质组学与代谢组学共享资源中心的 J. Will Thompson 老师提供的 LC-MS/MS 分析技术支持。

参考文献

1. Abe, Y., Nagano, M., Tada, A., Adachi, J., and Tomonaga, T. (2017).
2. Artemenko, K.A., Bergström Lind, S., Elfineh, L., Mayrhofer, C., Zubarev, R.A., Bergquist, J., and Pettersson, U. (2011).
3. Bergström Lind, S., Molin, M., Savitski, M.M., Emilsson, L., Aström, J., Hedberg, L., Adams, C., Nielsen, M.L., Engström, A., Elfineh, L., et al. (2008).
4. Bllaci, L., Torsetnes, S.B., Wierzbicka, C., Shinde, S., Sellergren, B., Rogowska-Wrzesinska, A., and Jensen, O.N. (2017).
5. Boersema, P.J., Foong, L.Y., Ding, V.M.Y., Lemeer, S., van Breukelen, B., Philp, R., Boekhorst, J., Snel, B., den Hertog, J., Choo, A.B.H., et al. (2010).
6. Kettenbach, A.N., and Gerber, S.A. (2011). Lind, S.B., Artemenko, K.A., and Pettersson, U. (2012).
7. van der Mijn, J.C., Labots, M., Piersma, S.R., Pham, T.V., Knol, J.C., Broxterman, H.J., Verheul, H.M., and Jiménez, C.R. (2015).
8. Possemato, A.P., Paulo, J.A., Mulhern, D., Guo, A., Gygi, S.P., and Beausoleil, S.A. (2017).
9. Schumacher, J.A., Crockett, D.K., Elenitoba-Johnson, K.S.J., and Lim, M.S. (2007).
10. Swaney, D.L., and Villén, J. (2016).
11. Oliveros, J.C. (2007-2015)Venny.
12. Jol, S.J. (2015)
13. Szklarczyk et al.
14. Glynn Dennis Jr., Brad T. Sherman, Douglas A. Hosack, Jun Yang, Michael W. Baseler, H. Clifford Lane, Richard A. Lempicki.

缩略语对照表

ACN：乙腈
FA：甲酸
IMAC：固定化金属亲和色谱
p-Tyr：磷酸酪氨酸
PSMs：肽段谱图匹配数
RP：反相
TBS：Tris缓冲盐溶液
TFA：三氟乙酸