

封面：

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

巨噬细胞中脂多糖/Toll 样受体 4 信号通路的定量化研究

吴秀榕

工作完成日期 2017 年 5 月 3 日

报告提交日期 2017 年 5 月 6 日

厦门大学

2017 年 5 月

题名页

巨噬细胞中脂多糖/Toll 样受体 4 信号通路的定量化研究

Quantitative analyzing the dynamics of LPS/TLR4 signaling in
macrophages

博 士 后 姓 名 吴秀榕

流动站（一级学科）名称 化学

专 业（二级学科）名称 化学工程与技术

研究工作起始时间 2013 年 6 月

研究工作期满时间 2017 年 5 月

厦 门 大 学

2017 年 5 月

厦门大学博士后研究工作报告

著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（）， 2、不保密（）

纸本在 _____ 年解密后适用本授权书；

电子版在 _____ 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： _____ 日期： _____ 年 _____ 月 _____ 日

导师签名： _____ 日期： _____ 年 _____ 月 _____ 日

摘要

内 容 摘 要

细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 能够诱导天然免疫特别是巨噬细胞所介导的炎症反应, 与许多炎症性疾病的发生发展密切相关, 如脓毒性休克等。尽管已有许多相关研究, LPS 诱导激活巨噬细胞的信号通路仍未彻底搞清, 无法对此过程进行有效干预来抑制炎症反应, 而更深入的研究也受到当前研究手段的局限。我们充分利用基因编辑和定量质谱的最新技术, 发展出了一套系统性的研究方法, 可以对任一信号复合物进行其形成和解离的定量动态分析, 并能挖掘出复合物上的未知蛋白。我们应用这一最新方法, 在巨噬细胞中分析了 LPS 诱导的 Traf6 和 Nemo 信号复合物, 阐明了其形成和解离的动态过程, 并发现了一些可能参与 LPS 信号通路的新的调节蛋白, 对其功能进行了初步研究探讨。这一研究加深了人们对 LPS/TLR4 信号通路动态传递过程的认识, 并为研究其它信号通路提供了方法学范本。

关键词: 天然免疫; 脂多糖/Toll 样受体 4 信号通路; 定量质谱; 信号复合物的动态变化

Abstract

Bacterial lipopolysaccharide (LPS) via activating innate immune system, especially macrophages, to trigger inflammation, and the inflammation associates with many inflammatory diseases such as septic shock. Although LPS signaling is one of the most studied topics in innate immunity, there are still many gaps in our knowledge on the mechanisms of LPS-induced macrophage reactions, which limits our ability to inhibit LPS-mediated inflammation. Current research techniques may already be close to reach their limitation in obtaining further information of the mechanisms of LPS-induced macrophage activation. We have developed an effective method to dynamically and quantitatively analyze signaling pathways. This method has combined the recent advancements in gene editing and the most advanced quantitative Mass Spectrometry approaches. Here we use this newly developed method to analyze the Traf6 and Nemo signaling complexes, indicating the dynamic formation and dissociation of the signaling complexes in LPS stimulated macrophages. During this study, we also identified some new molecules in the complexes which may participate in LPS pathway and investigated the molecular mechanisms of the candidates. This study leads to great progress in the understanding of the dynamic signal transduction of LPS/TLR4 pathway and provides a useful method for studying other signaling pathways.

Keywords: innate immunity; LPS/TLR4 signaling pathway; quantitative mass spectrometry; dynamic changes of signaling complexes

目 录

目 次

1. 研究背景	1
1.1 LPS/TLR4 信号通路	1
1.2 定量质谱技术	4
1.3 立题背景	6
2. 主要实验技术与方法	8
2.1 基因敲除细胞系的构建	8
2.2 基因回补细胞系的构建	8
2.3 蛋白复合体的纯化	9
2.4 质谱样品的制备	10
2.4.1 肽段样品制备	10
2.4.2 酶解肽段的 C18 反相色谱柱脱盐	10
3. 实验结果	11
3.1 研发可分析 SWATH-MS 数据的算法软件 Group-DIA	11
3.2 构建 LPS 信号通路关键蛋白的基因敲除型细胞系	12
3.3 分析 Traf6 蛋白复合体	13
3.3.1 构建 Traf6 基因回补的 Raw64.7 细胞系	13
3.3.2 Traf6 蛋白复合体的纯化与分析	15
3.4 分析 Nemo 蛋白复合体	17
3.5 确定候选蛋白在 LPS 信号通路中的作用	19
3.6 结果讨论	20
参考文献	21
致谢	25
博士生期间发表的学术论文、专著	26
博士后期间发表的学术论文、专著	27
个人简历	28
联系地址	30

报告正文

1. 研究背景

1.1 LPS/TLR4 信号通路

天然免疫是机体抵御病原微生物侵害的第一道屏障，宿主细胞通过模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 特异识别相应的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 例如 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 可以识别革兰氏阴性菌的脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS), 激活天然免疫应答, 产生并释放大量的炎症因子, 从而诱导炎症反应以清除病原体。虽然天然免疫应答诱导的炎症反应是机体的主动防御过程, 但其持续过度活化也会对机体造成损伤, 进而引发一些与感染免疫相关的疾病, 如自身免疫病, 过敏性反应等^[1]。特异性地抑制或阻断炎症反应一直是临床上研究抗炎症药物的热点, 而相应药物靶点的选择则需要建立在深入探明相关天然免疫信号通路的基础上。

巨噬细胞是一类重要的免疫细胞, 它可以被许多病原体的 PAMP 所激活, 在天然免疫诱导的炎症反应中起关键性的作用。细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是这些 PAMP 的一个代表, 它是革兰阴性菌的胞壁组成成分, 是目前已知的能够激活免疫系统并引起感染性休克的最强的刺激源之一。LPS 刺激在一定程度上可以模拟自然状况下革兰氏阴性菌的感染, 而且它易于制备和保存, 因而被广泛地用作免疫诱导剂。LPS 诱导的巨噬细胞活化是研究天然免疫应答的经典模型之一。宿主细胞对 LPS 的识别在研究天然免疫应答中有着特殊地位, 早在上世纪 60 年代, The Jackson Lab 就发现了一株自发突变的对 LPS 刺激不敏感的小鼠 C3H/HeJ, 之后许多科学家致力于探明 LPS 受体, 直到 1998 年, Bruce A. Beutler 实验室发现 C3H/HeJ 小鼠的 Tlr4 基因发生突变, 导致其不能识别 LPS, 从而确定了 TLR4 是 LPS 的受体^[2], 这一工作开启了研究天然免疫信号通路的新局面, Bruce A. Beutler 也因此项工作获得 2011 年诺贝尔生理医学奖。

作为最早被发现的模式识别受体, TLR 家族的研究最为深入, 与之相关的文章数以万计。目前已发现 10 种人源的 TLR 受体和 12 种鼠源的 TLR 受体。TLR 家族成员有着相似的结构特征, 都属于 I 型跨膜糖蛋白, 由 N 端的胞

外区、中间的跨膜区和 C 端的胞质区三部分组成。胞外区富含亮氨酸重复序列 (leucine-rich repeat, LRR), 负责识别病原微生物特异的 PAMP; 跨膜区是富含半胱氨酸的区域, 与 TLR 分子的亚细胞定位有关; 胞质区较为保守, 并且和白细胞介素-1 受体家族的胞质区高度同源, 称为 TIR 结构域 (Toll/IL-1 receptor domain), 可以与细胞内含有 TIR 的接头蛋白相互作用, 启动下游信号通路。不同的 TLR 可以识别病原体不同的配体, 如 TLR2 能够识别病原体的脂蛋白, TLR5 能够识别细菌的鞭毛蛋白, TLR9 能够识别病原体的非甲基化的 CpG DNA 基序等 [3]。

LPS 的识别除了 TLR4, 还需要其他三个蛋白的辅助, 包括 LBP (LPS binding protein)、CD14 和 MD-2 (myeloid differentiation factor-2)^[4-6]。LBP 是一种可溶性运输蛋白, 它可以直接与 LPS 结合并促进 LPS 与 CD14 的结合, 之后 CD14 将 LPS 转运到 TLR4/MD-2 复合物上, TLR4 识别 LPS 后, 形成二聚体, 引起构象改变, 募集胞质中含有 TIR 结构域的接头蛋白, 激活下游信号通路。根据接头蛋白分子的不同, TLR4 介导的下游信号通路可分为 MyD88 (myeloid differentiation factor-88) 依赖型和 TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β) 依赖型两类 (图 1)。

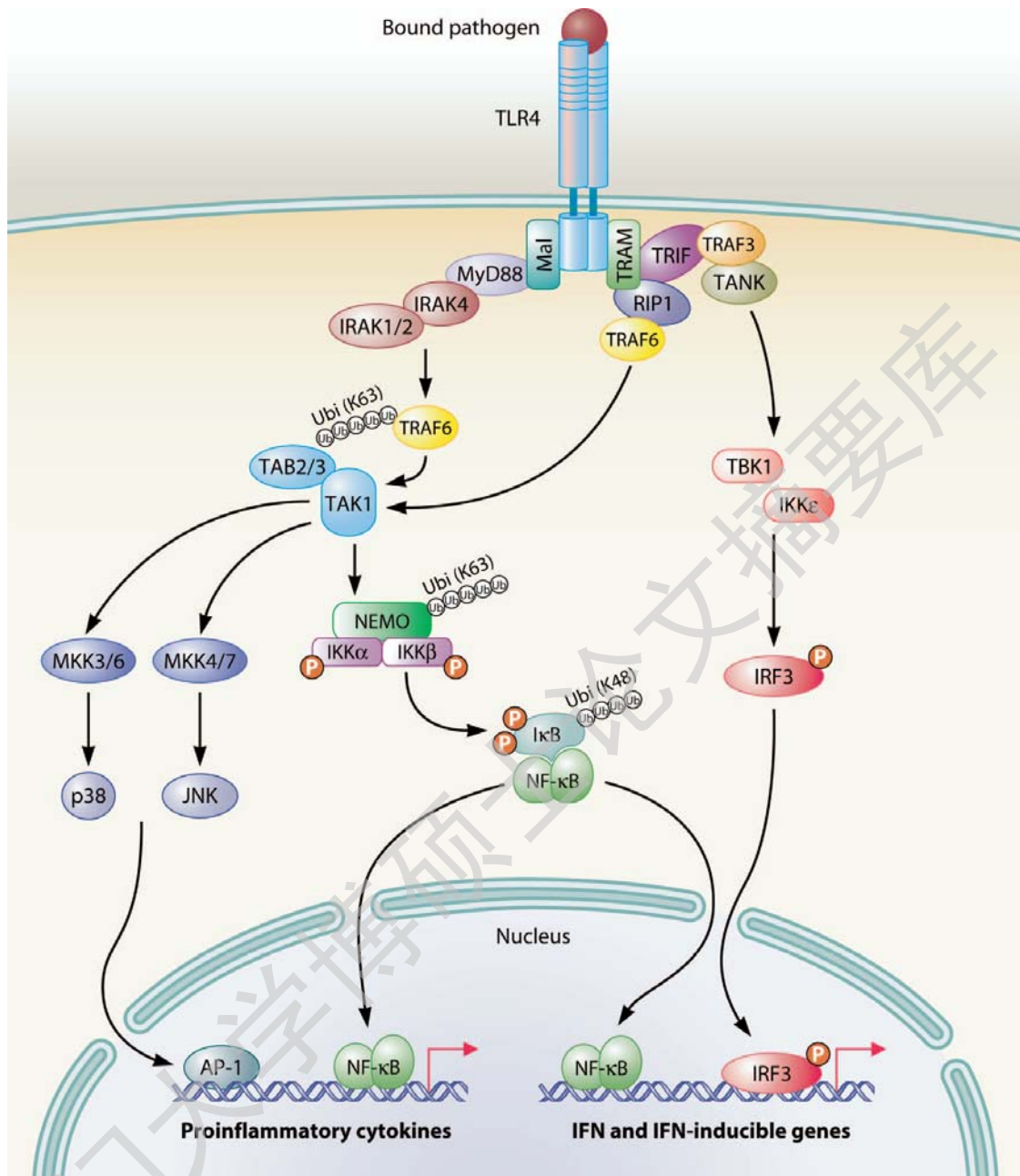


图 1 TLR4 信号通路^[7]。

MyD88 是 TLR 信号通路中最重要的接头蛋白，除了 TLR3，其它的 TLR 都依赖 MyD88 向下游传导信号。MyD88 包含一个 N 端的 DD (death domain) 结构域和一个 C 端的 TIR 结构域，但它不能直接与 TLR4 或 TLR2 相互作用，而需要通过另一个含有 TIR 结构域的接头分子 Mal (MyD88 adaptor-like protein, 也称为 TIRAP, TIR domain-containing adaptor protein) 。TLR4 通过 Mal 募集 MyD88，激活的 MyD88 先与 IRAK4 (IL-1R-associated kinase 4) 相互作用，IRAK-4 继

而磷酸化激活 IRAK-1 和 IRAK-2。活化后的 IRAKs 与 MyD88 解离并与 TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) 结合, TRAF6 是一个 E3 泛素连接酶, 在 Ubc13 和 Uev1A 复合物的催化下能进行自身的 K63 泛素化, 泛素化的 TRAF6 与 TAK1 (TGF- β -activated kinase 1)、TAB1 (TAK-1 binding protein 1)、TAB2 和 TAB3 形成复合体, 从而激活下游不同的信号途径。一条是激活 IKK 复合物, 引起 I κ B 磷酸化, 使其被泛素化降解, 释放 NF- κ B, NF- κ B 入核激活各种促炎性细胞因子的表达。另一条重要的途径是激活 Erk, Jnk, 和 p38 MAPK 通路进而激活 AP-1, CREB 转录因子来调控各种炎症因子的转录^[8,9]。

TLR4 识别 LPS 后除了能直接在细胞质膜上募集 Mal-MyD88 激活下游信号通路, 还可以导致 TLR4 从质膜向胞内转运, 激活 TRIF 依赖的信号通路, TLR4 也是 TLR 受体家族中唯一能够同时激活这两条信号通路的蛋白。TLR4 与 TRIF 的结合需要 TIR 接头蛋白 TRAM (TRIF-related adaptor molecule) 的介导, TRIF 激活后一方面可以与 TRAF3 相互作用, 激活 TBK1 (TRAF-family-member-associated NF- κ B activator binding kinase I) 和 IKK ϵ , 这两个激酶可以磷酸化 IRF3, 活化后的 IRF3 形成二聚体入核, 启动 IFN 的表达。此外 TRIF 也可以激活 NF- κ B 和 MAPKs, 诱导细胞因子的表达, 这一过程在时间上略晚于 MyD88 介导的激活过程, 对维持 LPS 信号通路的持续性有重要意义^[10,11]。

1.2 定量质谱技术

最近十年里, 以质谱为基础的蛋白组学在蛋白鉴定和蛋白定量方面有了长足的发展。蛋白组学可以大概分为鸟枪法蛋白组学 (shotgun proteomics) 和靶标蛋白组学 (targeted proteomics)^[12], 前者广泛地用于蛋白鉴定, 质谱以信息依赖性的采集模式 (IDA, Information Dependent Acquisition) 工作, 在这种模式下, 质谱会选择强度高的肽段离子进行打碎, 然后收集打碎的子离子信息。搜索引擎利用这些母离子以及打碎的子离子信息, 进行定性分析; 而一些算法软件则可以利用这些信息进行定量分析。IDA 有着天生的缺陷, 如动态排除和随机挑选母离子, 导致样品间不可重复性的定性和定量。鸟枪法蛋白组学中为了消除这种非重复性, 引入了标记定量法, 如 SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) 和 iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) 等, 但是

这些标记定量法都有很明显的缺陷，如成本较高，标记的样品数目有限等。靶标蛋白组学的出现是为了消除 IDA 中挑选母离子的随机性，其中选择性反应监控技术（SRM, Selected Reaction Monitoring）运用的最为广泛。SRM 通常是运行在三重四级杆（QQQ, Triple Quadrupole）质谱仪上，其第一和第三个四级杆作为质量过滤器，分别选择性地检测某个特定的肽段离子和其子离子信息，质量检测器记录多个子离子信号随着时间的变化曲线，这些曲线可以用作此肽段的精确定量。与 IDA 相比，SRM 定量结果的准确性和重复性都较高，而且样品数量不受限制，从而成为非标记定量方法的“金标准”。然而，SRM 方法也有其明显的缺陷，其每次最多只能检测约 100 个的蛋白，通量太低，而且需要提前获知目标蛋白的信息，以及大量的先期实验来构建目标肽段的特征文库。连续母离子窗口采集技术（SWATH-MS, consecutive precursor isolation windows MS acquisition）是最新的质谱采集方法^[13]，这种采集方式将样品中的所有肽段都转化为一个高分辨率的数字图谱，囊括了所有肽段的子离子信息。在后期的数据分析过程中，可以将肽段的子离子质量数和洗脱时间从这个图谱中抽提出来，从而达到对此肽段的定性和精确定量的目标。这种技术融合了 IDA 和 SRM 的优点，不但可以运用于多个样品之间高度重复性的蛋白定量，而且每次可以定性和定量数百至成千的蛋白。

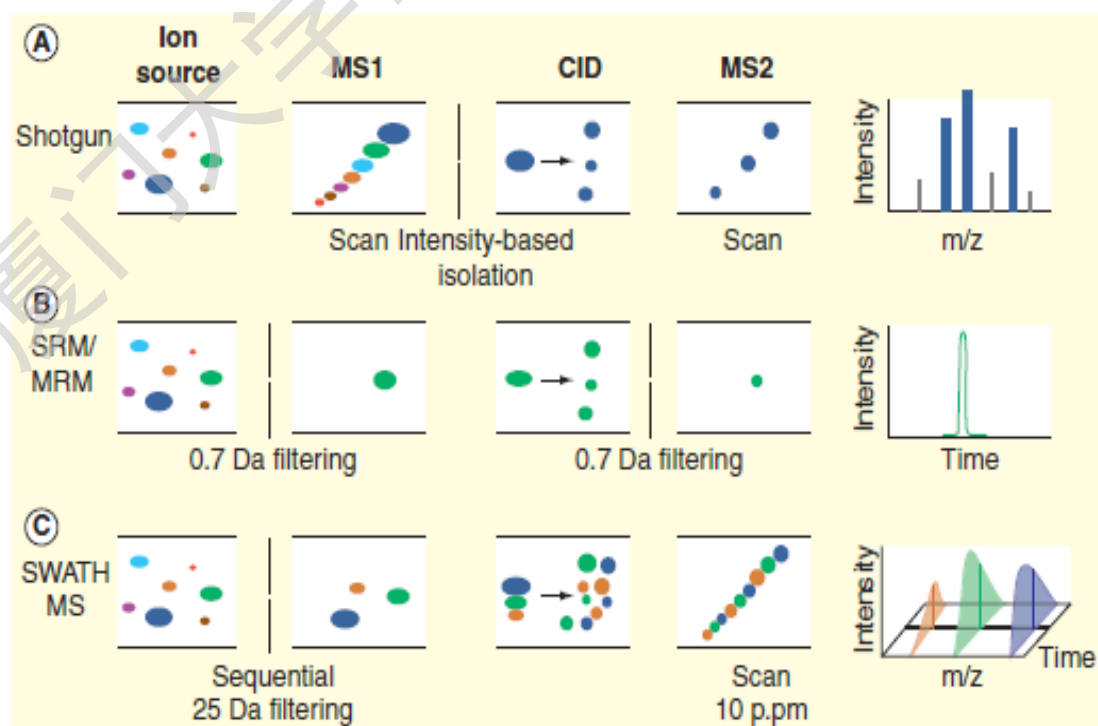


图 2. Shotgun、SRM 和 SWATH-MS 的质谱采集模式原理图。A. 第一个质量分析器(MS1) 扫描所有肽段离子，挑出特定的某些强度较高的母离子在碰撞池（CID, Collision-induced dissociation）中进行打碎，产生的子离子信息被第二个质量分析器（MS2）所记录。B. 在 MS1 中，某个特定的母离子被选择，且在 CID 中打碎，某个特定的子离子在 MS2 中被选择，然后质量检测器检测此离子随着时间的强度变化曲线。C. SWATH-MS 是一种信息非依赖型的质谱采集技术（IIA, Information Independent Acquisition）。母离子通过质量数分成 32 个 25Da 的连续窗口，每个窗口的所有母离子都进行打碎，并记录所有所有子离子的信息。我们将用能够采集所有母离子和子离子信息的 SWATH-MS 质谱采集模式对蛋白复合体进行分析。

1.3 立题背景

炎症反应在众多人类疾病的发生发展过程起着重要的作用，包括脓毒症，风湿性关节炎，乃至一些恶性肿瘤，特异性地抑制或阻断炎症反应有可能成为治愈这些疾病的关键。在过去的十几年间天然免疫信号通路的研究飞速发展，越来越多的模式识别受体及其下游的信号通路被鉴定，使得人们对炎症反应起始的分子机制有了更深入的了解，但同时也发现许多问题值得更为细致的思考和探究，又使我们意识到人们对炎症反应的认识依然十分有限。即使是对研究历史最为长久的 LPS 信号通路，也仍然存在许多值得探讨的问题，例如（1）IRAKs 激酶活性是否是 TLR 信号通路所必须的以及其如何激活下游的 TRAF6。哺乳动物中一共有四个 IRAKs，其中 IRAK-1, IRAK-2 以及 IRAK-4 具有激酶活性，IRAK-4 是 TLR 信号通路所必须的，IRAK-1 和 IRAK-2 功能上可以互补，而 IRAK-M 没有激酶活性，被认为是负调控因子^[14-16]。研究表明，过量表达 IRAK-1 的激酶活性突变体依然可以激活 NF- κ B^[17]，而 IRAK-2 的激酶活性突变体则不行^[15]，有关 IRAK-4 激酶活性是否 TLR 信号通路所必须的仍存在争议，三个研究小组几乎在同时各自构建了 IRAK-4 激酶活性突变的基因敲入型小鼠，成体水平都表现为抵抗 LPS 引起的死亡，但细胞水平的表型各有不同，其中两个研究小组认为 IRAK-4 的激酶活性是 TLR 信号通路所必须的，而另一个则认为其激酶活性只影响 JNK 而不影响 ERK, p38 和 NF- κ B 的激活，但是激酶活性突变后各细胞因子 mRNA 的稳定性降低了，进而影响其蛋白表达^[18-21]。另外，IRAK-1/2 是否直接以及如

何激活 TRAF6 尚不明确，虽然一直以来 IRAK-1 被认为是直接激活 TRAF6 的 IRAK 家族成员，但是过量表达 IRAK-2 可以引起 TRAF6 的泛素化而 IRAK-1 不行^[22]。(2) TAK1-TAB1-TAB2/3 complex 在 TLR 信号通路中的作用也存在争议，虽然体外实验表明这一复合体同时可以激活 IKK 复合物以及 MAPKs，一直以来都被认为是这两条下游信号的分叉点，但基因敲除小鼠中的数据并不支持这一观点。在 TAB1、TAB2 以及 TAB3 的基因敲除型小鼠中，NF- κ B 及 MAPKs 的激活都不受影响^[23-26]。TAK1 的功能在不同的细胞系中差异很大，在 TAK1^{-/-} 的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 中，NF- κ B 及 MAPKs 的激活基本被抑制，但在原代巨噬细胞中则基本不受影响，而在中性粒细胞 (neutrophils) 中，TAK1 敲除反而会增强 NF- κ B、p38 及 JNK 的激活^[23, 27, 28]。(3) 研究表明在 TRAF6^{-/-} 的 MEF 中，LPS 诱导的 NF- κ B 及 MAPKs 的激活完全被抑制，说明 TRAF6 是 Myd88 和 TRIF 的共同下游激活分子，但在巨噬细胞中，只影响 LPS 诱导的早期的 NF- κ B 和 MAPKs 激活而不是晚期，说明 TRAF6 不影响 TRIF 的信号通路^[29-31]。另外有报道称 TRIF 可以通过募集 RIP1 (receptor interacting protein kinase 1) 和 TRADD (TNFR-associated death domain protein) 激活 NF- κ B 和 MAPKs，然而大部分的结论是基于 MEF 中的相关研究得出的，巨噬细胞中的信号通路是否如此仍不能确定^[32-35]。上述的这类问题不仅反映了天然免疫信号通路的复杂性，更说明有许多未知的调节分子和调控机制有待更为深入的挖掘。科学研究在一定程度上受制于实验方法，细胞信号转导是一个复杂的动态过程，传统的实验技术方法已经不能满足日益发展的科研需求，未来的研究急需新兴有效的研究方法，为此，我们发展改进了一种基于定量质谱和基因编辑技术，从动态的角度出发，定量、动态地分析信号通路的方法，运用这一先进的方法来研究巨噬细胞中 LPS 诱导的信号转导通路，能够较为彻底地阐述清楚 LPS 信号转导过程中的详细机制，并找到一些尚未发现的细胞内信号调节因子，增强人们对炎症反应机制的认识，为治疗炎症相关疾病提供新的分子靶点。同时我们的研究也会成为细胞信号通路研究的范本，为今后其他信号通路的研究提供新方法。

2. 主要实验技术与方法

2.1 基因敲除细胞系的构建

1) 构建 CRISPR-CAS9 质粒载体：在 CRISPR 基因组工程网址 (<http://www.genome-engineering.org/crispr>) 上设计靶向目的基因的序列，合成相应的引物，取 2 ul 10^{*}M buffer、9 ul 100 uM sense strand、9 ul 100 uM anti-sense strand 混合均匀，95℃ 中反应 5 mins 后，室温静置 10 mins，取出 1 ul 混合液加入至 499 uL 灭菌水中，混合均匀备用；使用 bbs1 酶消化 gRNA 载体，并经过琼脂糖凝胶回收，将上述引物混合物和载体于 T4 DNA 连接酶反应体系中反应 1 小时，转化感受态细菌，涂布 LB 平板后挑取单克隆菌落摇菌，提取质粒 DNA。

2) 脂质体转染 Raw264.7 细胞：转染步骤参照 Thermo Turbofect 使用说明书，以转染 12 孔板的 RAW264.7 细胞为例简要介绍转染过程。转染前 16-24 小时消化细胞，以约 40%-60% 的密度均匀地铺于 12 孔板培养皿中，取 200 ul opti-medium 与 2 ug 目的质粒于 1.5 mL EP 管中，用枪头吹吸混匀，加入 4 ul TurboFect 转染试剂，混匀后室温静置 15-20 min，将上述混合液缓慢滴加入细胞培养液，摇晃混匀，4 h 后更换培养液，24 小时后观察转染效率。

3) 单克隆细胞的筛选：转染 36 小时后，将旧培养液换成含有 blasticidin (10 ug/mL) 的新鲜培养液，转染了 Cas9 表达质粒的细胞因能合成抗性蛋白而得以存活。以只转染 GFP 表达质粒的细胞为阴性对照，判定筛选情况。当阴性对照细胞全部死光后，将含有 blasticidin 的培养液替换成正常的新鲜培养液，此时刚经过药物筛选剩下的细胞比较脆弱且量少，需要培养 24 小时或者 48 小时。待细胞正常生长后，将细胞以适当的数目分到 96 孔板中，保证每个孔中只含有一个细胞，多于一个细胞的孔弃去。待单克隆细胞长满后，取一部分细胞通过测序或 Western Blot 鉴定出目的基因敲除的单克隆细胞。

2.2 基因回补细胞系的构建

1) 构建目的基因带有 3*Flag 标签的表达质粒

2) 慢病毒的包装：采用四质粒系统，用稳定表达大 T 抗原的 HEK293 细胞 (293T) 包装慢病毒颗粒。用磷酸钙转染法在 6 孔板的 293T 细胞内共转染四个质粒 (三个包装质粒 pVSV-G、pMDLg/pRRE 和 pRSV-Rev 及表达目的基因的主质粒)

粒)，12-16小时后，去除旧培养液，更换成2.5 mL新鲜培养基，放回37℃培养箱继续培养。由于慢病毒是包膜病毒，会释放到上清中，因此，转染后36-48小时收集细胞上清培养液即得到病毒液。

3) 细胞的病毒感染：感染前12-24小时消化细胞，根据需求铺到相应的孔板中，细胞密度要均一，使感染时的细胞密度约为30-50%。以6孔板为例（其他规格培养板按比例增减），感染时病毒液和新鲜培养基的总体积为2.4 mL，病毒用量需根据病毒包装效率和实验需求而定。在2.4mL的病毒混合液中加入终浓度为10 μg/mL的polybrene，混匀后，以2,500 rpm离心30分钟，离心结束后将细胞放回37℃培养箱中，4小时后，更换新鲜培养液。

4) 单克隆细胞的筛选：感染36小时后，将细胞以适当的数目分到96孔板中，保证每个孔中只含有一个细胞，多于一个细胞的孔弃去。待单克隆细胞长满后，取一部分细胞通过Western Blot检测目的基因的表达，挑取表达量与野生型接近的细胞进行后续实验。

2.3 蛋白复合体的纯化

各基因回补的 Raw264.7 细胞用 LPS 刺激不同的时间点后，吸掉培养液，加入预冷的 PBS，用细胞刮子将细胞刮下，转移至 50ml 离心管中，每个时间点需要 15 个 15cm 盘（约 5×10^8 个）的细胞，之后于冷冻离心机 4 °C 以 1,000 g 离心 3 分钟，吸去 PBS，加入 50ml 预冷的裂解缓冲液（lysis buffer），用枪吹吸将细胞悬起，于冰上裂解 1 小时，之后 4 °C 以 35,000 g 离心 30 分钟，将上清转移至新的 50ml 离心管中。离心好的细胞裂解物取 100 μl，并加入等体积的 2× SDS 上样缓冲液，混匀后于 100 °C 煮沸变性 10 分钟，用于 Western blot 分析细胞全裂解液中的蛋白表达水平；剩余的细胞裂解物加入 300μl 的 Flag M2 beads，固定于 4°C 垂直混匀器上缓慢旋转吸附过夜，之后用 50ml lysis buffer 洗涤 beads 三次，每次于 4 °C 下 1,000 g 离心 3 分钟。最后一遍洗完后吸去上清，然后加入 400ul 溶解了 3*Flag peptide 的 lysis buffer, 在 4°C 金属混匀器上震荡洗脱 30 分钟，随后 1,000 g 离心 3 分钟，收集洗脱液，重复此步骤两次，即获得了目的蛋白复合体，可用于后续实验。

2.4 质谱样品的制备

2.4.1 肽段样品制备

1) 在上述蛋白复合体溶液中加入TCA至终浓度为20%，4℃放置30min后于冷冻离心机4℃以13,200 rpm离心30min,去上清，加入1ml预冷的丙酮（清洗蛋白沉淀及去除TCA），于4℃以13,200 rpm离心10min，去上清，丙酮清洗三次后抽干。

2) 加入200ul新鲜配置的UA溶液（8M Urea (0.48g/ml) in 50mM NH₄HCO₃），在震荡器上震荡1min，使蛋白复合物沉淀充分溶解。

3) 加入TCEP（终浓度为10 mM）和CAA（终浓度为40 mM），37℃避光反应30min。

4) 加入3倍体积的50mM NH₄HCO₃，使Urea的浓度降到2 M，之后加入胰酶（trypsin），37℃温育12-18h，加入1% FA（终浓度）终止反应，如果有沉淀，12000rpm，5min之后，取上清进行脱盐步骤。

2.4.2 酶解肽段的C18反相色谱柱脱盐

我们用自制的 STAGETIP C18 对上述肽段进行脱盐，脱盐步骤如下：

1) 制作TIP holder：用剪刀在1.5ml EP管盖上戳一个洞，将STAGETIP放入洞中，保证tip不要露出EP管太多，以防离心的时候甩出。用微量注射器往STAGETIP中注入适量C18膜。

2) 将STAGETIP放入到TIP holder中。加入50 μl 甲醇到STAGETIP中(活化C18膜)，5000g，1min。

3) 加入50 μl 70%ACN/1%FA，5000g，1min。

4) 加入50 μl 1%FA，5000g，1min。

5) 将上述样品加入STAGETIP中，4000-5000g，5-10min，直至所有的液体都离光。

6) 加入50ul 1%FA，5000g，离光所有液体。重复此步骤一次。

7) 将STAGETIP放入新的1.5 ml EP管中，加入50ul 70%ACN/1%FA，1000g，5-10min，洗脱肽段。重复此步骤一次。

8) 将获得的肽段样品真空抽干，置于-80℃保存备用。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库