

Phosphorylation sites of mouse gap junction protein 31 were determined by mass spectrometry

Ma Junjie

Chengdu University of Technology, Chengdu

Abstract: Connexin31(Cx31) is a member of the Connexin family. Currently, little is known about the function and regulation mode of Cx31. In this study, the phosphorylation sites of Cx31 in mice were determined by immunoprecipitation, sds-page separation, protein strip recovery, protein block enzymolysis, phenylisothiocyanate modification, psd-maldi-tof mass spectrometry, and data analysis.

Key words: Connexin31; Immunoprecipitation; phosphorylation

Received: 2019-08-01; Accepted: 2019-08-17; Published: 2019-08-20

基于质谱分析法的小鼠间隙连接蛋白 31 磷酸化位点确定

马俊杰

成都理工大学, 成都

邮箱: jjma23945@qq.com

摘 要: 间隙连接蛋白 31 (Connexin31, Cx31) 是间隙连接蛋白 (Connexin) 家族的一员, 目前对于 Cx31 的功能及其调节方式知之甚少。本文通过免疫沉淀、SDS-PAGE 分离、蛋白质条带回收、蛋白质胶块酶解、4- 磺酸苯异硫氰酸酯修饰、PSD-MALDI-TOF 质谱分析、数据分析、确定小鼠 Cx31 磷酸化位点。

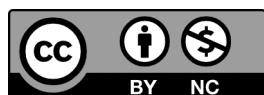
关键词: 间隙连接蛋白 31; 免疫沉淀; 磷酸化

收稿日期: 2019-08-01; 录用日期: 2019-08-17; 发表日期: 2019-08-20

Copyright © 2019 by author(s) and SciScan Publishing Limited

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



间隙连接 (gap junction) 是在相邻细胞间形成的一类聚合通道, 这类通道允许小分子物质如离子、第二信使以及代谢过程中产生的某些分子通过 [1] [2],

几乎所有的细胞与组织均利用间隙通道来传递信息。间隙连接通道在细胞增殖，胚胎发育和肿瘤抑制过程中均起着十分重要的作用 [3]。形成间隙连接的间隙连接蛋白 (Connexin) 是一多基因家族，该家族不同蛋白之间具有高度相似性：均由 4 个跨膜结构域，2 个胞外环，1 个胞内环和位于胞质部分的氨基端与羧基端组成。其中跨膜区与胞外环高度保守，而胞质部分则相对保守性较低 [4]。

间隙连接蛋白家族中目前发现除了间隙连接蛋白 Cx26 以外，其它间隙连接蛋白均有磷酸化 [5]，磷酸化是 Connexin 翻译后修饰的一种常见的形式。通过对氨基酸的分析说明在正常生长条件下，间隙连接蛋白的磷酸化常发生在 Ser (丝氨酸) 残基上，但是在 Thr (苏氨酸) 残基和 Tyr (酪氨酸) 残基上也有发生。间隙连接蛋白的磷酸化在间隙连接子的形成、转运、通道的形成以及通道的开关等一系列生理过程中有重要作用。

Musil 等人 [6] 证实小鼠细胞株 L929 和 S180 表达 Cx43 蛋白，但是不能将其磷酸化，不能将未磷酸化的 Cx43 运输至连接斑。然而，用鸡细胞粘合素基因 L-CAM 稳定转化 S180 细胞后，S180 细胞能将 Cx43 进行初步的磷酸化，并形成间隙连接通讯。这些结果暗示初步的磷酸化可能调节 Cx43 的运输。Musil 和

Goodenough 用实验证实 NRK 细胞中 Cx43 的一种磷酸化形式 (Cx43-P2) 不溶于 Triton X-100，几乎总是和间隙连接斑结合在一起；相反地，绝大多数非磷酸化的 Cx43 (Cx43-NP) 能溶于 Triton X-100，并且主要在细胞质内。生物素化实验也说明在 Cx43 组装成间隙连接斑期间或之后发生 Cx43-NP 至 Cx43-P2 的转化，这些实验说明在正常生长条件下，Cx43 是在组装成 Connexon 并运输至细胞表面之后才发生磷酸化。因此，磷酸化可能调节 Connexon 整合至连接斑之后的过程。Cx43 磷酸化对 Cx43 间隙连接通道的开关具有调节作用，当 Cx43 247 位酪氨酸磷酸化时，通道处于打开状态，而当 265 位酪氨酸进一步磷酸化时，通道将被关闭。如前所述，通过 Connexin 的磷酸化与去磷酸化的转换可调节 GJIC 的功能。目前对 Cx31 功能的研究十分有限，2004 年 Diestel S 等人在实验中突变小鼠 Cx31 两个假定的磷酸化位点 263 / 266，以非磷酸化氨基酸替代这两个位点，实验中他们发现：(1) 突变蛋白磷酸化水平下降；(2) 突变蛋白能运输至质膜；(3) 细胞间通讯在突变蛋白形成的间隙连接通道中减少。本研究

通过自行建立的磷酸化蛋白质分析方法,采用固相金属离子亲和色谱亲和提取凝胶电泳分离蛋白质的酶解肽混合物,用 4- 磺酸苯异硫氰酸酯 (SPITC) 进行化学修饰,用 PSD-MALDI-TOF (post-source decay matrix assist laser desorption ionization time of fly) 质谱分析磷酸肽质量指纹图谱,对小鼠 Connexin31 进行磷酸化定位。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器与试剂

Pioneer 多肽合成系统 (ABI 公司), 基质辅助激光解析飞行时间质谱 (ABI 公司), 高效液相色谱 (Waters 公司)。

1.2 主要试剂

PAL-PEG-PS resin, Fmoc-AA-OH, HATU, DIPEA, DMF, Piperidine, TFA (ABI 公司), 匙孔槭血蓝蛋白 (Pierce 公司), 弗氏佐剂 (GibicoBRL 公司), sulfolink coupling gel (Pierce 公司), Sepharose 4B, PVDF membrane, ECL Plus Detection Kit (Pharmacia 公司), Protein A Agarose, pcDNA3.1/myc-his (-) B (Invitrogen 公司), HT1080 cell, Hela cell (CCTCC 公司), anti-rabbit IgG/HRP, 4- 磺酸苯异硫氰酸酯 (Sigma 公司), ZipTipC18 (Millipore 公司), ZipTipMC (Millipore 公司)。

2 方法

2.1 磷酸化定位方法建立

2.1.1 模式磷酸肽的合成设计合成磷酸肽序列: LQARGFHpTAYGDDQR。磷酸肽的合成采用 Fmoc 法: 在合成至 Fmoc-Tyr(PO_3H_2)-OH 时, 重复偶联一次, 合成完毕, 裂解, 收集沉淀, 合成样品采用反相 HPLC 纯化, C_{18} 柱, MALDI-TOF 质谱分析, 确定目的峰。

2.1.2 用 SPITC 修饰结合至 ZipTip_{C18} 上的多肽将磷酸肽结合至 ZipTip_{C18}。将 SPITC 配制成 2.6mg/ml 修饰液 (50mM Tris-HCl, pH8.2)。用吸附了磷酸肽的 ZipTip_{C18} 吸取修饰液并浸泡在修饰液中, 50℃反应 1 小时, 反应完毕, 用 0.1%TFA 水溶液洗涤 ZipTip_{C18}, 反复洗涤 20 次, 用 2.5 μl 50% 乙腈 /0.5%TFA 洗脱, 收集洗脱液, 准备进行 PSD MALDI-TOF 质谱分析。

2.1.3 PSD-MALDI-TOF 质谱分析洗涤干净点样板, 晾干, 将修饰好的磷酸肽 2 μl 与 5 μl CCA 基质液 (CCA 基质液用 0.1%TFA/49.5% 乙腈 /49.5% 水饱和 CCA) 混合。点 1 μl 样品液至点样板, 晾干。质谱效正标准液点样至另外一个点样孔作为外标。选择被 SPITC 修饰的磷酸肽进行 PSD 分析, 确定磷酸肽序列以及磷酸化位点, 所有的离子片段均采用平均分子量。

2.2 小鼠 Connexin31 磷酸化定位

2.2.1 质粒的构建与表达将小鼠 Cx31 全长编码区克隆至 pcDNA3.1/myc-his (-) B, 得到表达质粒 Cx31-pcDNA3.1/ myc-his (-) B。表达质粒转染 HT1080 细胞。HT1080 细胞于 DMEM/10%FBS 培养, 将生长状态好, 分裂旺盛, 80% 左右汇合的 HT1080 细胞收获用于转染。采用电击法转染, 电击条件: 260V, 725 μ F, 10.8msec。转染后的细胞于 DMEM/10%FBS 中恢复培养 24 小时后, 加 G418 至 600 μ g/ml 筛选 10~15d, 至单克隆长出。挑选单克隆, 用 c-myc 单克隆抗体, western blot 检测表达 Cx31-myc 融合蛋白的阳性克隆。

2.2.2 ZipTip_{C18} 吸附富集与 SPITC 修饰将 Cx31myc/HT1080 细胞裂解物用 anti-Cx31 沉淀, 沉淀样品 12%SDS-PAGE 分离, 胶内蛋白条带用胰蛋白酶酶解, 回收酶解产物。ZipTip_{C18} 用 50% 乙腈 /0.5%TFA 洗涤, 以去除 ZipTip_{C18} 上可能带有的杂质, 反复洗涤 20 次。用 0.1%TFA 水溶液平衡 ZipTip_{C18}, 反复洗涤平衡 20 次。将平衡好的 ZipTip_{C18} 吸附酶解回收液, 反复吸附 10 次。用 0.1%TFA 水溶液洗涤 ZipTip_{C18}, 反复洗涤 20 次, 洗尽可能存在盐离子等杂质。将吸附了蛋白质样品的 ZipTip_{C18} 在 0.5M O- 甲基异尿盐溶液中进行修饰, 将羧基端赖氨酸残基的 ε 氨基修饰, 修饰 2 小时, 修饰完毕, 用含 0.1% 三氟乙酸的水清洗 ZipTip_{C18}。然后, 将 SPITC 配制成 2.55mg/ml 修饰液, 50mM Tris-HCl, pH8.2。

将 ZipTip_{C18} 吸取修饰液并浸泡在修饰液中, 50℃反应 1 小时, 反应完毕, 用 0.1%TFA 水溶液洗涤 ZipTip_{C18}, 反复洗涤 20 次, 用 2.5 μl 80% 乙腈 /0.5%TFA 洗脱, 收集洗脱液。

2.2.3 ZipTip_{MC} 富集磷酸肽用去离子水反复洗 ZipTip_{MC} 20 遍。将新鲜配制的 0.3mol/L FeCl₃ 反复吸附 ZipTip_{MC} 20 遍, 用去离子水反复洗 ZipTip_{MC} 20 遍。用 0.1M 乙酸洗涤 20 遍。将 SPITC 修饰后洗脱液调节至 pH2.5–3.0 乙酸溶液, 10% 乙腈溶液中, 用处理好的 ZipTip_{MC} 反复吸附 20 遍。用 pH2.5–3.0 乙酸溶液洗涤 20 遍, 用 10% 乙腈洗涤 20 遍以去除非特异性吸附肽。用 1% 氨水 10 μl 洗脱, 收集洗脱液。

2.2.4 PSD MALDI-TOF 质谱分析洗涤干净点样板, 晾干, 将修饰好的磷酸肽 2 μl 与 5 μl CCA 基质液 (CCA 基质液用 0.1%TFA/49.5% 乙腈 /49.5% 水饱和 CCA) 混合。点 1 μl 样品液至点样板, 晾干。质谱效正标准液点样至另外一个点样孔作为外标。质谱仪采用 ABI 公司 DE-STR 型, 配备 N₂ 激光, 激光波长 377nm, 脉冲宽度 3ns, 重复率 20Hz, 采用反射式延迟提取模式。选择被 SPITC 修饰的磷酸肽进行 PSD 分析, 确定磷酸肽序列以及磷酸化位点, 所有的离子片段均采用平均分子量。

3 结果

3.1 磷酸肽的合成

用 Fmoc 法合成的磷酸肽经高效液相纯化 (图略) 后经 MALDI-TOF 质谱鉴定 (图 1), 主峰 (peak1) $m/z=1691.8$, 与理论分子量一致, 证明合成成功。

3.2 SPITC 修饰

磷酸肽将纯化的磷酸肽主产物结合至 ZipTip_{C18} 上, 进行 SPITC 修饰, 修饰完毕, 采用 50% 乙腈洗脱, 取部分洗脱液进行 MALDI-TOF 质谱分析 (图 2), 从图 2 可知, 磷酸肽大部分被修饰, 修饰后的样品分子量 $m/z=1906.2$, 比修饰前分子量大 215Da, 修饰效果理想。

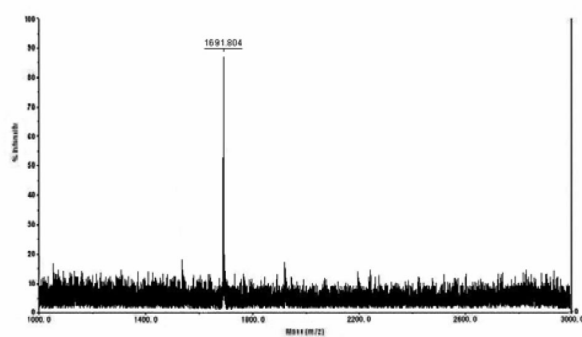


图 1 合成磷酸肽 MALDI-TOF 质谱分析

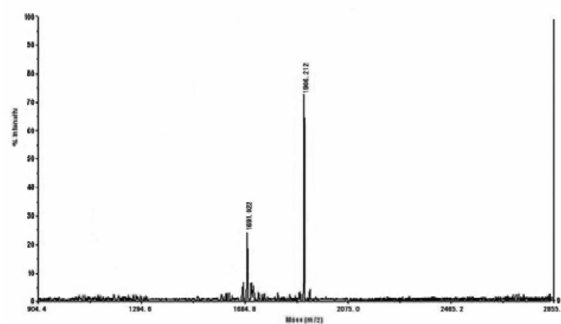


图 2 SPITC 修饰肽 MALDI 质谱分析

3.3 PSD-MALDI-TOF 质谱分析结果

经 SPITC 修饰的磷酸肽进行 PSD-MALDI 质谱分析, 分析结果如图 3b 所示; 图 3a 为未经 SPITC 修饰的磷酸肽直接进行 PSD-MALDI 质谱分析。从图 3a 与图 3b 比较可知, 经 SPITC 修饰后进行 PSD-MALDI-TOF 质谱分析, 图谱大大简化, 使得解谱分析简便易行。

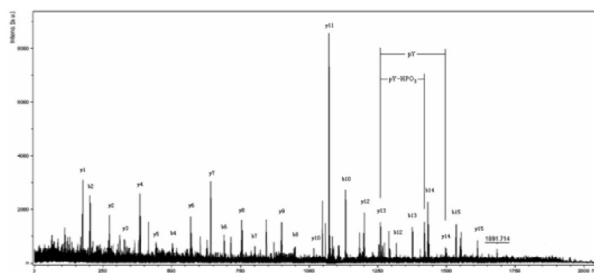


图 3a MALDI-PSD 模式分析磷酸肽结果

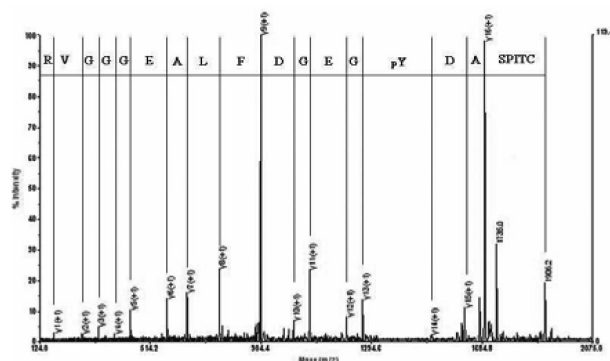


图 3b MALDI-PSD 模式分析 SPITC 修饰磷酸肽结果

3.4 Cx31 蛋白 PSD-MALDI-TOF 分析

采用免疫沉淀从 Cx31-myc/HT1080 细胞中抽提出 Cx31 蛋白质后, 进行 SDS-PAGE 电泳分离, 将回收的蛋白条带进行酶解、回收后吸附至 ZipTip_{C18} 上, 进行 SPITC 修饰, 修饰完毕, 采用 50% 乙腈洗脱, 收集洗脱液, 调整乙酸浓度至 0.1%, 乙腈浓度至 10% 后, 用 ZipTip_{MC} 纯化 SPITC 修饰的磷酸肽片段, 进行 PSD-MALDI-TOF 质谱分析, 结果如图 4, 通过对图 4 进行计算分析, 其序列为: LQApSAPSLTPI, 通过分析发现小鼠第 263 位丝氨酸发生磷酸化, 而 266 位丝氨酸没有检测到磷酸化。

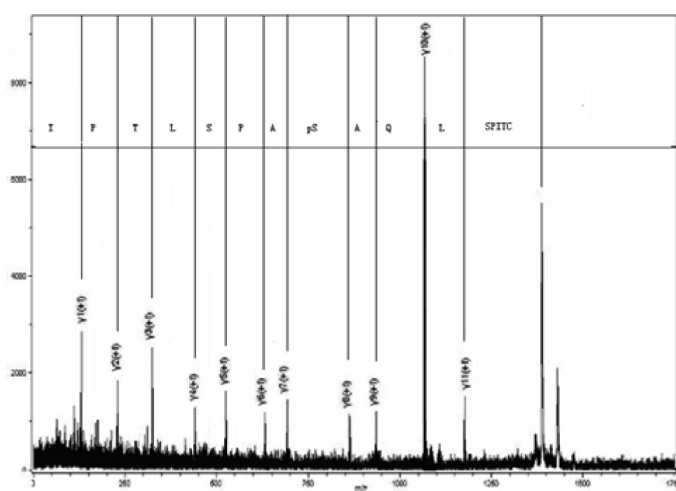


图 4 MALDI-PSD 模式分析 SPITC 修饰小鼠 Cx31 磷酸化

4 讨论

蛋白质的磷酸化是生物体内重要的共价修饰方式,磷酸化与去磷酸化调节着生物体内信号传到、代谢途径等绝大部分生命活动。对蛋白质磷酸化定位的研究是蛋白质结构与功能研究的重要一环。了解蛋白质磷酸化位点可以更深入了解酶与底物的关系,从而更深入地了解生命活动的本质。目前,蛋白质的磷酸化分析也是蛋白质组学研究的重要研究内容。蛋白质的磷酸化是蛋白质翻译后修饰,无法从基因水平上解决,只能在蛋白质水平上进行研究。对磷酸化蛋白质进行磷酸化定位已经成为蛋白质结构与功能研究不可或缺的技术。传统的蛋白质磷酸化定位大多采用 [^{32}P] 进行标记,然后进行酶解、二维磷酸肽作图、高效液相分离以及 Edman 降解等方法鉴定蛋白质磷酸化位点。这种方法一是存在放射性污染,操作很不方便,二是对不能用放射性标记的体内实验样品无法进行磷酸化分析。

近年来发展起来的电喷雾 (Electrospray ionization, ESI) 和基质辅助激光解吸 / 电离 (Matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI) 飞行时间质谱,是一种软电离质谱技术,可以使生物大分子等不容易挥发的物质气化成带电荷的分子离子,从而鉴定其分子量, MALDI-TOF 结合酶解的肽指纹图谱目前已经成为一种常规的蛋白质序列鉴定方法。在正离子模式下进行 MALDI-TOF 质谱分析磷酸肽时,获得的谱图峰太多,既有 y 离子又有 b 离子,同时磷酸化修饰蛋白质形成的是酯键,而酯键的键能比肽键的键能要低,可能发生 β 消除,从而导致解谱困难。存在的另外一个问题是,由于磷酸肽中磷酸基团带负电,导致磷酸肽信号较弱,从而导致鉴定磷酸肽的磷酸化位点较困难。而采用金属亲和纯化后,磷酸肽的丰度有很大程度的提高,同时结合采用 SPITC 修饰磷酸肽的 N 端后,由于 N 端带有强负电荷,导致 b 离子峰峰值很低,基本检测不到 b 离子的存在,从而导致获得的谱图只含有 y 离子峰,从而使图谱的解析变得简单易行。

参考文献

- [1] Kumar N. The gap junction communication channel [J]. Cell, 1996, 84.

- [2] Reaume A, De Sousa P, Kulkarni S, et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43 [J] . Science, 1995, 267 (5205) : 1831–1834.
- [3] Goodenough D A, Goliger J A, Paul D L . Connexins, Connexons, and Intercellular Communication[J]. Annual Review of Biochemistry, 1996, 65(1): 475–502.
- [4] Hertzberg E L, Disher R M, Tiller A A, et al. Topology of the Mr 27,000 liver gap junction protein. Cytoplasmic localization of amino– and carboxyl termini and a hydrophilic domain which is protease–hypersensitive [J] . Journal of Biological Chemistry, 1988, 263 (35) : 19105.
- [5] Sáez JC, Martínez AD, Brañes MC, et al. Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. [J] . Brazilian Journal of Medical & Biological Research, 1998, 31 (5) : 593–600.
- [6] Mege R M, Matsuzaki F, Gallin W J, et al. Construction of Epithelioid Sheets by Transfection of Mouse Sarcoma Cells with cDNAs for Chicken Cell Adhesion Molecules [J] . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85 (19) : 7274–7278.