

近红外双荧光系统在磷酸酯酶筛选中的应用

杨昕霆 阎海霞 沈翊珩 张 业

摘 要 **目的** 应用奥德赛(Odyssey)近红外双荧光系统筛选去甲基化酶 KDM3A 去磷酸化的磷酸酯酶。**方法** 使用磷酸酯酶干扰质粒转染 HEK293T 细胞,使用磷酸化的 KDM3A 抗体对细胞进行杂交,近红外荧光染料 DRAQ5 标记细胞核,利用奥德赛(Odyssey)近红外双荧光系统对细胞进行荧光扫描,荧光强度的比值可代表细胞内相对 KDM3A 磷酸化水平,进而筛选出相关的磷酸酯酶。**结果** 磷酸酯酶广谱抑制剂冈崎酸 OA 处理转染后的细胞,近红外双荧光扫描系统可以检测到 KDM3A 的磷酸化,初步筛选出 4 个可能参与 KDM3A 去磷酸化的磷酸酯酶亚基。**结论** 近红外双荧光系统可以应用于磷酸酯酶的初步筛选。

关键词 奥德赛近红外双荧光扫描系统 KDM3A 磷酸酯酶

[中图分类号] R393

[文献标识码] A

Application of Dual - infrared Fluorescence Scan System in Screening of Phosphatases for Demethylase KDM3A. Yang Xinting, Yan Haixia, Shen Yufei, et al. National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences CAMS & PUMC, Beijing 100005, China

Abstract Objective To determine the phosphates of histone demethylase KDM3A with the application of Odyssey dual - infrared fluorescence system. **Methods** HEK293T cells had been transfected with phosphates interfere plasmids. After incubating with phosphorylation - KDM3A antibody and infrared fluorescent nuclei dyes DRAQ5, HEK293T cells were scanned with Odyssey dual - infrared fluorescence scan system. The ratio of fluorescence intensity could represent the relative KDM3A phosphorylation level in vivo. **Results** Okazaki acid (OA), the broad - spectrum inhibitor of phosphates, was applied to treat the cells. The signals were detected for phosphorylated KDM3A by dual - infrared fluorescence scan system. Four phosphate subunits that may participate in the dephosphorylation of KDM3A were determined by Odyssey dual - infrared fluorescence scan system. **Conclusion** Odyssey dual - infrared fluorescence scan system was able to be applied in the screening for protein phosphatases.

Key words Odyssey dual - infrared fluorescence scan system; KDM3A; Phosphatases

奥德赛(Odyssey)近红外双荧光扫描系统是近年来引进的一种新技术。近红外双荧光扫描系统的工作原理是使用激光激发带有特殊标记的抗体或者荧光染料,受激发的抗体或染料释放出近红外荧光,样品发射出的 700nm 和 800nm 近红外荧光信号可以被扫描仪器接收,并且计量近红外荧光值,从而完成蛋白质的定性或定量测量。这种测量方式可以精确测定局部的蛋白质含量,并且可以通过计算总荧光量完成定性定量实验。

KDM3A 是 JHDM2 去甲基化酶家族中最早发现的成员,能够去除组蛋白 H3K9 的单甲基和双甲

基^[1]。研究表明,KDM3A 能够影响精子的发生,参与脂肪代谢及多种癌症的发生过程^[2~4]。

近红外双荧光扫描系统可以完成多种蛋白质定性定量实验,尤其是在 ICW(in cell western)中有着独特的优势。本实验初步证明了 KDM3A 能够发生去磷酸化修饰,并且利用奥德赛近红外双荧光扫描系统初步筛选到 4 种 PP1 与 PP2 磷酸酯酶家族中可能参与蛋白 KDM3A 去磷酸化过程的磷酸酯酶亚基。

材料与方法

1. 主要材料与试剂:磷酸化 KDM3A 抗体于 MBL 公司订购。DRAQ5 细胞核染料为 Cell Signalling Technology 产品。近红外双色荧光 Phospho - EGFR Tyr104 为 LI - COR 产品。转染试剂 Vigofect 为威格拉斯生物技术公司产品。冈崎酸 OA 为 Sigma 公司产品。磷酸酯酶 RNAi 干扰文库由哈佛医学院 Martin E. Dorf 教授惠赠。

2. 细胞系:HEK293T 细胞系为本课题组保留。

3. 细胞培养:用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

基金项目:教育部博士点基金资助项目(20111106110024)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系、医学分子生物学国家重点实验室(杨昕霆、阎海霞为并列第一作者)

通讯作者:沈翊珩,电子信箱:yfshen@pumc.edu.cn; 张业,电子信箱:yezhang@pumc.edu.cn

4. 细胞转染:转染 24h 前接种 HEK293T 细胞,细胞汇合度达 60% ~80% 时进行转染。根据 Vigofect 转染试剂说明书将磷酸酯酶干扰质粒瞬时转染入 HEK293T 细胞中。转染 6h 后更换新鲜培养液,36 ~48h 后收取细胞进行后续实验。

5. 细胞免疫荧光:赖氨酸包被盖玻片 10min,PBS 冲洗 3 次,紫外照射 1h。接种细胞,待细胞汇合度达 60% ~80% 时进行转染。转染 6h 后,更换含有一定浓度 OA 的新鲜 DMEM 培养液继续培养细胞。36h 后,用含 4% 多聚甲醛的 PBS 缓冲液固定细胞 10min,PBS 漂洗 3 次;用 0.2% Triton X-100 透化细胞 15min,PBS 漂洗 3 次。加入含 1% BSA 的 PBS 缓冲液 37℃ 静置 30min,封闭非特异性抗原表位。封闭结束后,将相应的特异性抗体按照一定稀释比例加入缓冲液中,于 4℃ 杂交过夜。孵育结束后用 PBS 洗 3 次。加入带有荧光标记的二抗,室温孵育 1h,PBS 洗 3 次。DAPI 工作液染细胞核 5min,PBS 冲洗后封片,用激光共聚焦显微镜进行观察。

6. 细胞近红外双荧光扫描:将 HEK293T 细胞接种于 96 孔板,待细胞汇合度达 60% ~80% 时转染细胞。细胞培养 24h 后用含 4% 多聚甲醛的 PBS 缓冲液固定细胞 10min,PBS 漂洗 3 次;使用 0.2% Triton X-100 透化细胞 15min,PBS 漂洗 3 次。Odyssey 封闭液室温处理细胞 30min,封闭非特异性抗原。封闭结束后,加入磷酸化 KDM3A 的抗体 4℃ 杂交过夜;用含 0.1% Tween-20 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次。加入近红外荧光二抗 Phospho-EGFR Tyr1045 室温孵育 1h;PBS 缓冲液漂洗 3 次。用近红外荧光染料 DRAQ5 染细胞核 5min,PBS 漂洗后使用近红外荧光扫描仪进行扫描分析。

结 果

1. 免疫荧光验证 KDM3A 去磷酸化过程:冈崎酸 OA(Okazaki acid)是磷酸酯酶 PP1 和 PP2 的广谱抑制剂,不同浓度的 OA 可以抑制不同家族磷酸酯酶的活性^[5,6]。免疫荧光结果表明未经 OA 处理的对照组 HEK293T 细胞中仅有极微弱的荧光信号;高浓度(15nmol/L)OA 处理的实验组 HEK293T 细胞中出现明显增强的荧光信号(图 1)。本实验初步证明在 HEK293T 细胞中存在 KDM3A 的去磷酸化过程。

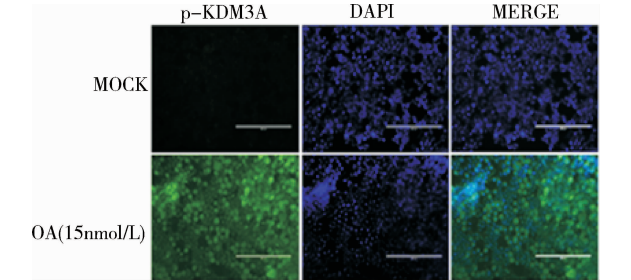


图 1 冈崎酸 OA (15nmol/L) 处理后 HEK293T 细胞中存在 KDM3A 的去磷酸化过程(免疫荧光, ×100)

p-KDM3A. 磷酸化 KDM3A; DAPI. 4',6-二脒基-2-苯基吡啶;MOCK. 未加冈崎酸 OA 处理的对照组;OA. 冈崎酸处理组;MERGE. 磷酸化 KDM3A 荧光与代表细胞核的 DAPI 荧光重叠

2. 抗体浓度优化:将磷酸化 KDM3A 的一抗及二抗按照不同比例进行稀释。不同稀释比例的抗体杂交后进行近红外双荧光扫描。将扫描所得数值绘制成柱形图(图 2)。结果表明,抗体浓度过高时,扫描值会溢出;抗体浓度过低时,检测灵敏度下降,背景值过高。后续实验按照磷酸化 KDM3A 一抗 1:400,二抗 Phospho-EGFR Tyr1045 1:800 的稀释比例进行。

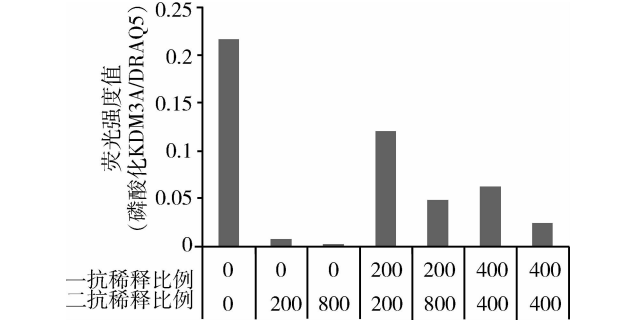


图 2 抗体浓度优化

DRAQ5:细胞渗透远红外荧光核染料

3. 利用磷酸酯酶 RNAi 干扰文库筛选 KDM3A 的去磷酸化磷酸酯酶:将 PP1 和 PP2 磷酸酯酶家族蛋白的 RNAi 干扰文库(共 357 个干扰质粒)转染入 HEK293T 细胞,OA 处理 24h 后进行 ICW 实验,每个干扰质粒设置 3 个复孔。通过近红外双荧光系统进行扫描(图 3),将 OA 处理的实验组与未处理的对照组荧光比值进行对比,分析发现其中 4 种磷酸酯酶亚基(表 1)的荧光强度比值较高,推测这几种磷酸酯酶亚基在 KDM3A 去磷酸化过程中可能起到关键作用。

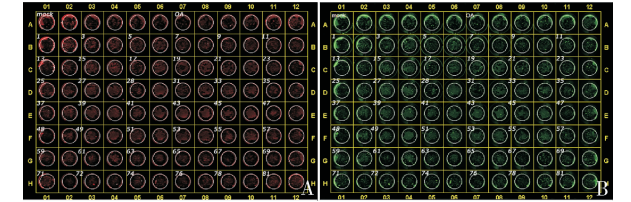


图 3 冈崎酸处理转染磷酸酯酶 RNAi 干扰文库的 HEK293T 细胞远红外双荧光扫描图

A. DRAQ5 (代表细胞核) 荧光图;B. 磷酸化 KDM3A 荧光图

讨 论

去甲基化酶 KDM3A 最早是在减数分裂和减数分裂后期雄性精子的 cDNA 文库中发现的,是一种 H3K9 单甲基化和双甲基化的去甲基化酶^[7]。越来越多的研究表明,KDM3A 不仅在激素诱导的基因转录调控中起着重要作用,还参与生物体发育与疾病等

表 1 可能参与 KDM3A 去磷酸化过程的磷酸酯酶亚基

磷酸酯酶亚基	全称
Ppp1r12c	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12C (蛋白质磷酸酯酶 1, 调节亚基 12C)
Ppp1r14a	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A (蛋白质磷酸酯酶 1, 调节亚基 14A)
Ppp2r3a	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", alpha (蛋白质磷酸酯酶 2, 调节亚基 B - α)
Ppp2r3	SERINE/THREONINE Protein Phosphatase 2A, 72/130 KDA REGULATORY SUBUNIT B (PP2A, SUBUNIT B, B" - PR) (丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酯酶 2A, 72/130KDA 调节亚基 B)

多种重要的生理病理过程^[8, 9]。KDM3A 能够通过调控 HOXA1 基因的转录来调控肿瘤细胞的细胞周期^[10]。KDM3A 的缺失会导致精子细胞染色质凝聚过程异常, 最终造成雄性小鼠不育^[11]。KDM3A 能够去除干性基因 Tcf1、Tcfcp211 和 Zfp57 等基因启动子的 H3K9 二甲基化, 从而维持细胞的干性^[12]。

本课题组以往工作发现在 Jurkat 细胞的热应激反应中 KDM3A 会发生特异位点的磷酸化, 该位点磷酸化后 KDM3A 能够特异结合到某些免疫相关基因的启动子区, 激活与热应激反应相关基因的表达。虽然 KDM3A 的磷酸化通路已经找到 (待发表), 但其去磷酸化的过程及机制尚不明确。

实验首先通过磷酸酯酶抑制剂 OA 处理 HEK293T 细胞, 初步证明 PP1 和 PP2 磷酸酯酶家族蛋白可能参与 KDM3A 去磷酸化过程。近红外双荧光扫描系统是最近几年的新技术, 它能够利用激光激发近红外荧光信号, 并且通过捕获这些信号对细胞内目标蛋白进行定量检测。近红外双荧光扫描系统可以快速的对高通量的目标蛋白进行定性与定量的分析, 笔者利用近红外双荧光扫描系统初步筛选出 4 种可能参与 KDM3A 去磷酸化过程的磷酸酯酶亚基, 进一步的鉴定需要更多的实验手段与方法来实现。KDM3A 在精子的发生、脂肪代谢及多种癌症的发生过程中都发挥着至关重要的作用, 研究 KDM3A 的磷酸化与去磷酸化修饰过程与机制将对多种疾病的治疗提供新的线索与靶点。

参考文献

1 Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. JmjC - domain - containing proteins and histone demethylation [J]. Nat Rev Genet, 2006, 7 (9) : 715 - 727

2 Okada Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis [J]. Nature, 2007, 450 (7166) : 119 - 123

3 Okada Y, Tateishi K, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is involved in male infertility and obesity [J]. J Androl, 2010, 31 (1) : 75 - 78

4 Krieg AJ. Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia - inducible factor 1 alpha enhances hypoxic gene expression and tumor growth [J]. Mol Cell Biol, 2010, 30 (1) : 344 - 353

5 Goris J. Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in Xenopus laevis oocytes [J]. FEBS Lett, 1989, 245 (1 - 2) : 91 - 94

6 Franchini A, Malagoli D, Ottaviani E. Targets and effects of yessotoxin, okadaic acid and palytoxin; a differential review [J]. Mar Drugs, 2010, 8 (3) : 658 - 677

7 Yamane K. JHDM2A, a JmjC - containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor [J]. Cell, 2006, 125 (3) : 483 - 495

8 Yamada D. Role of the hypoxia - related gene, JMJD1A, in hepatocellular carcinoma; clinical impact on recurrence after hepatic resection [J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19 Suppl 3 : S355 - 364

9 Pedersen MT, Helin K. Histone demethylases in development and disease [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20 (11) : 662 - 671

10 Cho HS. The JmjC domain - containing histone demethylase KDM3A is a positive regulator of the G1/S transition in cancer cells via transcriptional regulation of the HOXA1 gene [J]. Int J Cancer, 2012, 131 (3) : E179 - 189

11 Inagaki T. Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a - deficient mice [J]. Genes Cells, 2009, 14 (8) : 991 - 1001

12 Ma DK. G9a and Jhdm2a regulate embryonic stem cell fusion - induced reprogramming of adult neural stem cells [J]. Stem Cells, 2008, 26 (8) : 2131 - 2141

(收稿日期 : 2013 - 11 - 04)
(修回日期 : 2013 - 12 - 05)