



实验教学导向的非变性质谱蛋白-配体互作 实验设计

万建, 刘珂

(华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

摘要: 以实验教学为导向, 结合实验材料易得、实验流程明晰、实验结果稳定、实验耗时较短等需求, 通过实验流程优化、核心耗材自制、动态评价体系构建等方式构建非变性质谱技术鉴定蛋白-配体互作实验教学, 解决大型仪器设备在实验教学应用中的难点。实验项目通过对专业热点领域最新实验技术的引入, 开阔学生视野, 增加学生专业认同感, 有利于学生专业核心素养的提升。

关键词: 非变性质谱; 实验教学; 大型仪器; 蛋白-配体互作

中图分类号: G642; Q7

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20240179

Experimental Design of Nonvariable Spectral Protein-Ligand Interaction Based on Experimental Teaching

WAN Jian, LIU Ke

(College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: Guided by experimental teaching combined with the requirements of easy availability of experimental materials, clear experimental process, stable experimental results, and short experimental time, the experimental teaching design for identification of protein ligand interaction by non-variable property spectrum technology is constructed by means of experimental process optimization, core consumables homemade, dynamic evaluation system construction, etc., to solve the difficulties in applications of large instruments and equipment in experimental teaching. Through the introduction of the latest experimental techniques in the professional hot fields, the designed experimental project is conducive to broadening student's horizon, which enhances their professional identity, and improves their core major quality.

Key words: non-deformable mass spectrometry; experimental teaching; large instruments; protein ligand interaction

生物学是一门典型的实验学科, 实验教学对高等院校生物学教育尤为重要^[1]。实验技能的提升是专业核心素养培养的重要一环, 将前沿科研成果转化为实验教学内容, 有利于开阔学生专业视野, 培养学生创新思维。实验教学内容的建设关键在于选取的科学研究成果需要与现有实验教学体系相匹配^[2]; 开发成熟的实验流程得到稳定实验结果并且构建动态实验课程评价体系; 涉及的大型仪器设备需要协调仪器使用机时, 同时解决大型仪器设备耗材昂贵的问题^[3]。

组学研究为当前生物学热点研究领域, 特别是代谢组学和蛋白组学领域。几乎所有的生命活动调控都有分子间相互作用的参与^[4]。阐明蛋白质同其他分子之间的相互作用有助于我们深层次地理解生命活动。2004年由 Gerhard Schwick 等提出了非变性条件下蛋白质质谱检测技术^[5], 在接近生理溶液环境下, 通过软电离技术将部分由非共价键相结合的复合物完整地离子化, 通过质谱完成定性定量分析。近年来, 非变性质谱技术在蛋白结构解析、蛋白互作、药物筛选等领域取得了不

收稿日期: 2024-04-07

基金项目: 华中师范大学 2023 年校级研究项目。

作者简介: 万建, 硕士, 实验师, 主要从事蛋白组学及大型仪器开放共享机制方面的研究。E-mail:

jianw@cnu.edu.cn

错的成果^[6-8]。本文结合目前在蛋白-配体相互作用的科研成果^[9],以实验教学实际需求为导向,创新纳升液相色谱结合非变性质谱技术流程,构建了包含非变性质谱样品前处理、气压法直接进样方法、非变性质谱检测、质谱数据分析与处理的实验流程。同时结合生物技术大实验、创新实验项目等多种手段构建实验教学动态评价体系,提高大型仪器在实验教学中的匹配程度^[10]。

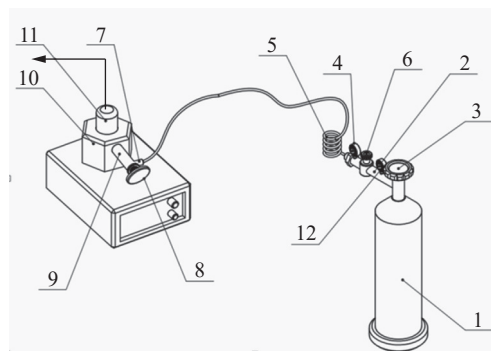
1 科研成果转化实验教学项目引领实验创新

引入“新技术赋能新实验”的理念,以生物领域前沿实验技术转化本科实验教学为契机构建创新型实验教学项目。最新科研成果表明,拟南芥的13个甲基化 CpG 结合域基因家族(*AtMBD1-13*)中 *AtMBD6* 基因表达的 MBD 蛋白与甲基化 DNA 有较强的结合能力^[11]。本项目基于以上科研成果,设计利用非变性质谱技术检测拟南芥中 *AtMBD6* 基因表达的 MBD 蛋白与甲基化 DNA 实验,使学生掌握质谱技术在蛋白与配体相互作用中的鉴定技术,理解实验技术手段的发展对本专业科学研究领域的促进作用。

1.1 优化成果转换流程,适配实验教学

基于本科实验教学的实验项目优化,需要在实验材料制备以及样品需求量上进行优化,以保证在规定的实验课程内完成实验教学任务。传统的蛋白质组学通过选用纳升电喷雾(nano electrospray ionization, nESI)离子化方法完成进样,采用纳升液相色谱需要设计系统冲洗、色谱柱平衡、体系压力构建以及溶液梯度建立,需较长的仪器平衡冲洗时间。

在本科教学过程中,常采用分实验小组的教学模式,保证实验教学效果,而较长的色谱平衡时间不利于实验教学的开展。通过对进样模式的改造,选用气压法直接进样,简化上样步骤,自制气压上样装置,纳升液相色谱质谱连接流路如图1所示。通过惰性气体氮气产生高压将样品直接由样品池通过管路压入离子源进入质谱进行检测。进样装置小巧,同时通过对样品管路进行优化,使得进样管路小于20 cm、进样量小于10 μL ,有利于实验样品的制备。



1-氮气高压气瓶; 2-硬质通气管; 3-开关阀门; 4-第二压力表;
5-加压管线; 6-调节阀; 7-插管; 8-调节把手; 9-输气管;
10-样品池; 11-密封盖; 12-第一压力表。

图1 纳升液相色谱质谱连接流路示意图

1.2 创新自制核心耗材,降低实验教学成本

将科研成果转化为本科实验教学项目的过程中,涉及大型仪器在实验教学中应用的适配问题,需要解决大型仪器使用过程中耗材与本科教学实验的匹配、实验材料制备、样品需求量优化的问题,以保证在规定的实验课程内完成实验教学任务。传统的蛋白质组学使用ESI源,由于溶液流速较快,通常大于1 $\mu\text{L}/\text{min}$,受限于喷嘴管的直径,形成的初始液滴较大,在电喷雾离子源内大直径的液滴离子化效率较低,使得质谱检测过程中灵敏度下降。本项目选用纳升电喷雾离子化方法,使用过程中毛细管柱为核心耗材,价格昂贵,故使用拉针仪自制毛细管喷针,通过多段程序拉制方式,乙腈混悬法填充,将传统的四步纳喷毛细管高压液相色谱柱制备流程(包括毛细管外部覆膜去除、筛板烧结、毛细管尖端拉制、填料填充)优化为毛细管色谱柱拉制、填柱两个步骤。该方法申请专利一项(申请号:201911124668.6),极大地降低了大型仪器耗材使用成本,更加有利于本项目在实验教学中的应用^[12]。

1.3 改革课程评价体系,满足教学周期要求

本项目构建的基于非变性质谱技术的本科实验教学设计,涉及大型仪器设备质谱仪的使用。大型仪器承担较多的科学研究任务,仪器机时普遍饱满,而传统的实验教学课程设计需要师生在规定的时间与空间内完成实验教学任务。本文设计以实验项目为导向,多种实验效果评价方式相结合构建动态课程评价体系。借助于气压法直接进样的实验流程设计,将样品检测时间由传统方

法的 90 min 缩短为 5~10 min, 极大地缩减了样品检测时长。将实验项目进行模块化设计, 将其融入本科生生物技术大实验、大学生创新实习等项目, 使实验项目评价模式更加灵活。同时鼓励学生在大学生实验操作技能竞赛、大学生创新创业

挑战赛、本科生毕业论文等过程中使用本实验项目, 学院提供相应的实验支持, 并且对参与和使用本实验项目的学生根据实际使用情况出具实验效果评价。融合大型仪器的实验教学课程建设基本流程如图 2 所示。

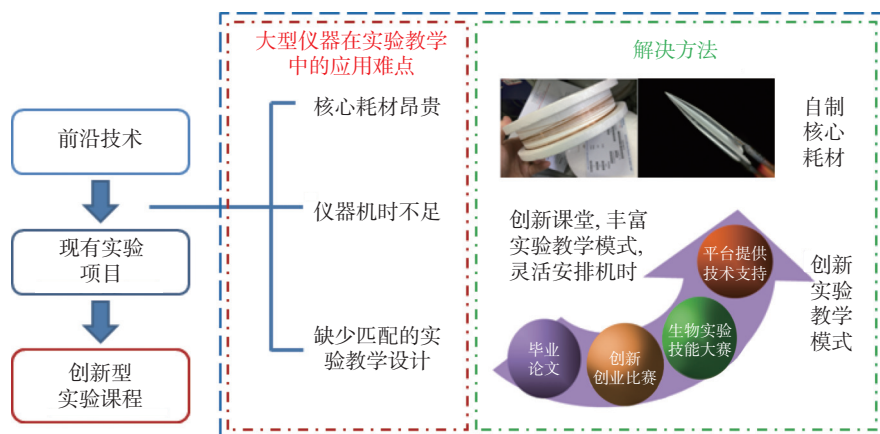


图 2 融合大型仪器的实验教学课程建设基本流程图

2 实验教学流程及优化

2.1 实验材料及设备

材料: C18 填料(Agela 公司); 乙腈(Fisher 公司); 0.1% 甲酸水(Fisher 公司); AtMBD6 基因表达的 MBD 蛋白、甲基化 DNA(自制); 氯化钠、醋酸铵(国药); 洗脱缓冲液(Qiagen)。

设备: 高分辨液质联用仪 Q Exactive Plus、nEasy1200 纳升液相色谱仪(ThermoFisher 公司); 激光拉针仪(Sutter 公司); 超滤管 30KD(Sartorius 公司)。

2.2 样品前处理

蛋白质-小分子反应配体反应:

1) 实验体系中蛋白终浓度为 1 mg/mL, 蛋白:小分子按照摩尔比 1:8(可根据蛋白和小分子的结合能力调整)混合;

2) 蛋白质-小分子室温反应 1.5 h(根据实验可设梯度)。

反应溶液体系 buffer 置换包含以下 3 个步骤:

1) 4 °C, 12800 r/min 离心取上清(若要检测沉淀, 用 50% 乙腈重悬沉淀后离心去取上清质检);

2) 上清用 10 kD 浓缩杯(浓缩杯根据蛋白大小调整), 50 mmol/L 醋酸铵浓缩换 buffer 7 次左右(先浓到 100 μ L, 再补充 50 mmol/L 醋酸钠到 500 μ L 后离心到 100 μ L, 反复 7 次), 此步骤的目

的是将溶液中的 Tirs、HEPES 等缓冲液替换;

3) 最终浓缩到 100 μ L 后测蛋白浓度, 稀释到 4 mg/mL 后取 20 μ L 上样^[13]。

2.3 进样方法设定

使用自制进样系统, 设定上样体积 10 μ L, 上样压力为分压阀 4 MPa, 管路使用石英毛细管。

2.4 质谱数据采集方法设定

本项目使用质谱仪型号为赛默飞世尔公司 Q Exactive Plus, 离子源为 ESI。主要质谱采集数据参数如下。

1) 正离子采集模式的离子源电压设为 2.1 kV。质谱采集设置如下: 一级采集分子量范围为 500~3000 m/z、分辨率为 140000、Microscans 设定值为 5、AGC 最大目标值为 5E6; 二级质谱最大离子注入时间 100 ms。

2) 质谱手动采集模式在液相色谱仪完成样品采集后进行质谱数据采集。

2.5 实验数据分析

使用 Xcaliber 软件对质谱结果进行分析, 分析质谱的总离子流色谱图(total ion chromatogram, TIC), AtMBD6 基因表达的 MBD 蛋白分子离子峰为质核比(M/Z)8987.2957, AtMBD6 基因表达的 MBD 蛋白结合甲基化 DNA 分子离子峰为质核比(M/Z)16250.7201。检测过程中采用纳升点喷雾的离子化模式, 蛋白在质谱中表现为多价态的形

式, AtMBD6 基因表达的 MBD 蛋白主要以 5 价态质核比 (M/Z) 1798.2656 和 6 价态质核比 (M/Z) 1498.7217 正离子模式存在, 由于同位素的存在, 在质谱图中表现为成簇的信号峰, 如图 3(a) 所示。结合甲基化 DNA 后蛋白与结合配体以 4 价态质核比 (M/Z) 1831.0947 和 7 价态质核比 (M/Z) 2322.3957 正离子模式存在。由于生物样品中蛋白

与配体结合效率以及非共价结合后的稳定性问题, 在离子化过程中离子化效率偏低, 结合后的质谱峰信号较弱, 质谱检测的相对分子质量和理论值的偏差均在 10×10^{-6} 以下, 如图 3(b) 所示。通过数据分析可以明显看到 AtMBD6 基因表达的 MBD 蛋白在质谱中被鉴定到, 同时结合甲基化 DNA 后蛋白-配体复合体也可被质谱鉴定。

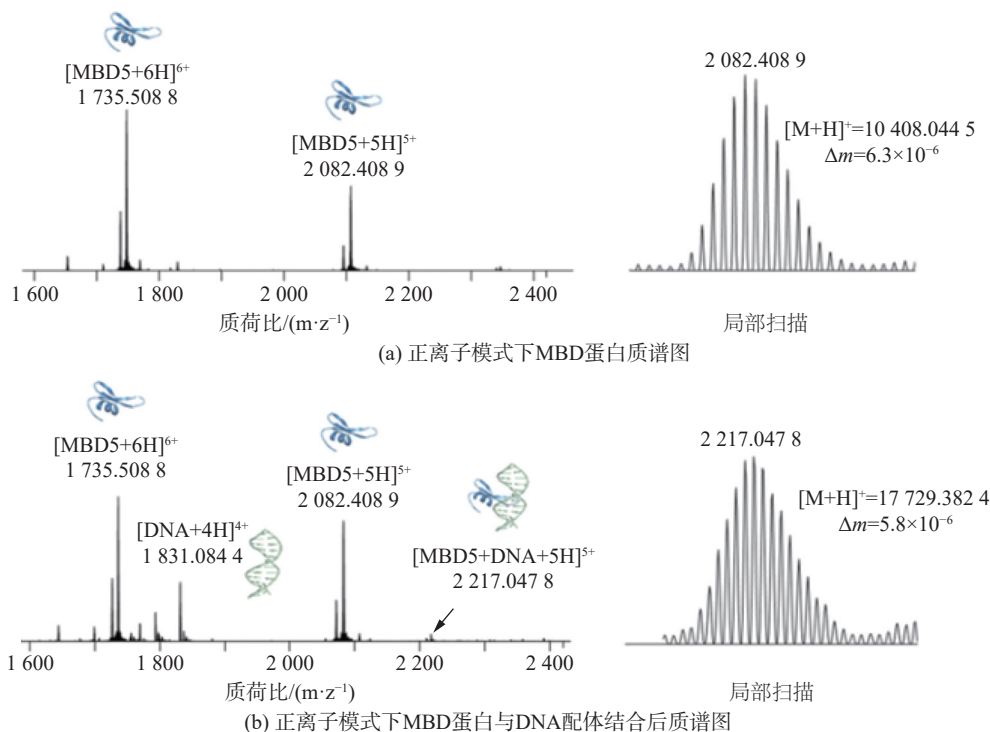


图3 蛋白-配体互作质谱图

3 结束语

科学研究成果离不开实验方法与实验技术的革新^[14]。实验动手能力与实验技能是生物专业的学生核心素养中的重要内容^[15]。将前沿科研成果运用到实验教学中, 有利于提高学生的专业视野。目前项目已广泛用于本科生与研究生的实验教学以及创新创业大赛项目中, 受到师生的一致好评。本项目参与本科毕业论文 12 篇、大学生创新创业大赛 6 项、教职工创新创业大赛 1 项, 参赛项目获省级优秀创新奖 1 项。根据教育部对本科研究生一体化培养模式的要求, 后续我们将会对实验教学项目进行拆分和模块化设计, 实验课教师可以根据实验教学需求进行模块间的自由组合, 提高项目在本科生和研究生不同培养阶段的适配性, 采用如 PPT 项目汇报、实验技能竞赛融合等灵活多样的实验报告形式, 进一步提升实

验教学项目模块化建设优势, 充分发挥新技术赋能新实验的实验教学改革成效, 更好地服务不同教学需求的师生, 在本专业一流人才培养过程中贡献新思路、新方法。

参考文献

- [1] 刘彦强, 阎冰, 王天瑞, 等. 高校贵重仪器设备在教学中的使用情况调研与分析[J]. 实验技术与管理, 2023, 40(6): 228-231.
- [2] 孟思璇. 高分辨液相色谱质谱联用仪开放共享模式探索[J]. 实验室科学, 2023, 26(2): 174-176.
- [3] 郭建军, 周文, 苏文倩. 质谱在蛋白质生物标志物发现中的应用策略[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(23): 3183-3188.
- [4] 胡军, 陈芸, 陈洪渊, 等. 基于纳米毛细管的非变性质谱分析[J]. 质谱学报, 2022, 43(6): 717-729.

(下转第 77 页)