



基于细胞热漂移测定(CETSA)技术鉴定活细胞内药物靶标的标准操作流程

王莉, 刘景芳, 李维林, 李二伟, 孙树涛, 李娟, 罗元明*

中国科学院微生物研究所公共技术中心, 北京 100101

王莉, 刘景芳, 李维林, 李二伟, 孙树涛, 李娟, 罗元明. 基于细胞热漂移测定(CETSA)技术鉴定活细胞内药物靶标的标准操作流程[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2488-2501.

WANG Li, LIU Jingfang, LI Weilin, LI Erwei, SUN Shutao, LI Juan, LUO Yuanming. A standard operating procedure for identification of drug targets in living cells based on cell thermal shift assay (CETSA)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(6): 2488-2501.

摘要: 【目的】细胞热漂移测定(cell thermal shift assay, CETSA)技术是一种检测细胞内药物(配体)和蛋白质(靶标)相互作用的技术, 原理是当蛋白质结合药物后, 其热稳定性会发生变化, 通过测定这种变化去鉴定药物和蛋白之间的相互作用。本研究以治疗多发性骨髓瘤的靶向药帕比司他(panobinostat)为例, 建立基于蛋白印迹杂交(Western blotting)和 CETSA 技术的药物靶蛋白鉴定的标准操作流程。【方法】首先用药物 panobinostat 处理培养的 K562 细胞, 然后加热处理细胞、裂解细胞及提取可溶性蛋白, 以及用抗靶蛋白的抗体经 Western blotting 定量可溶性蛋白。【结果】经 Western blotting 定量及曲线拟合, 成功得到 3 个蛋白——组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC1)、人突触蛋白(human syntaxin-4, STX4)以及四三肽重复结构域(tetratricopeptide repeat domain 38, TTC38)随温度变化的热溶解曲线和恒定温度条件下的药物剂量反应曲线。【结论】HDAC1、STX4 及 TTC38 为药物 panobinostat 在 K562 细胞中的靶蛋白。本研究建立了基于 CETSA 和 Western blotting 技术, 鉴定活细胞中药物靶标蛋白的标准操作流程。实验可在 2–3 d 内完成。

关键词: 细胞热漂移测定; 活细胞; 蛋白印迹杂交; 药物靶标鉴定

资助项目: 国家自然科学基金(31371445)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31371445).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807376, E-mail: luoym@im.ac.cn

Received: 2022-09-16; Accepted: 2023-02-08; Published online: 2023-02-14

A standard operating procedure for identification of drug targets in living cells based on cell thermal shift assay (CETSA)

WANG Li, LIU Jingfang, LI Weilin, LI Erwei, SUN Shutao, LI Juan, LUO Yuanming*

Institutional Center for Shared Technologies and Facilities, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] Cell thermal shift assay (CETSA) is a biophysical technique allowing the direct study of drug (ligand) binding to proteins (targets) in cells and tissues by measuring variation in the proteins' thermal stability upon ligand binding. In this paper, taking panobinostat, a drug targeting multiple myeloma, as an example, we developed a standard operating procedure for the identification of drug targets in K562 cells with Western blotting and CETSA. [Methods] Experimental procedures included treating cells with the drug, heat treatment of cells, cell lysis, total soluble protein extraction and quantitation by Western blotting with specific antibodies. [Results] Through quantification by Western blotting and curve fitting, we obtained the CETSA melting curve and isothermal dose-response curve of histone deacetylase (HDAC1), syntaxin-4 (STX4), and tetratricopeptide repeat protein 38 (TTC38) in K562 cells, respectively. [Conclusion] HDAC1, STX4, and TTC38 were the targets of panobinostat in K562 cells. A standard operating procedure for identifying the target proteins in living cells was established by CETSA and Western blotting. The experiment can be completed in 2–3 d.

Keywords: cell thermal shift assay (CETSA); living cell; Western blotting; identification of drug targets

在新药研发过程中,靶标的筛选和鉴定是限制药物使用和药物副作用认知的主要因素。传统的蛋白和药物相互作用研究往往采用体外纯化的蛋白质,但是蛋白在纯化过程中其构象可能发生改变,所获得的药物-靶标相互作用信息不能反映活细胞内的真实情况^[1]。另外,细胞生化代谢的复杂性导致药物在人体内的靶标可能并非唯一,并且在穿越细胞膜屏障时,药物自身可能被修饰或者活化。因此,在细胞层面正确识别靶蛋白,全方位解析药物的副作用,对药物设计和应用至关重要。

2013年瑞典卡罗琳斯卡(Karolinska)研究所开发了一种可以在体内检测药物与靶标结合强度的方法,即细胞热漂移测定(cell thermal shift

assay, CETSA)技术^[2-3]。CETSA技术从体外热漂移测定(thermal shift assays, TSA)发展而来。TSA是基于蛋白质随着温度增加而逐渐变性的原理,来表征蛋白质结构的技术。执行特定功能的蛋白质在细胞内具有稳定的三维结构,但随着环境的改变,比如pH值或者温度,蛋白的变性或解折叠就会迅速发生。对蛋白质而言,随着温度升高,部分蛋白会逐渐变性沉淀,当温度升高到某个值时,变性的蛋白质和未变性的蛋白质的数量相等,此时的温度称为熔解温度(melting point, T_m)^[4]。当温度超过 T_m 时,变性蛋白的数量大于未变性蛋白的数量,蛋白聚集呈指数增加,直至全部蛋白质分子变性聚集而沉淀。 T_m 作为蛋白质结构稳定性的指标之一,其值越高,蛋白质构

象的热稳定性就越高。 T_m 与溶液的 pH 值、盐浓度以及蛋白的翻译后修饰等有关,同时,配体的结合也会稳定蛋白质构象,从而使蛋白质的 T_m 值升高^[5]。TSA 技术广泛应用于检测药物与蛋白质在体外的相互作用,以及体外筛选特定蛋白的候选药物等^[6]。

虽然 CETSA 技术和 TSA 技术原理相同,即基于蛋白质热变性原理,但 CETSA 技术是一种在活细胞水平(培养细胞、活体组织等)鉴定靶标的新方法^[2],可检测细胞中可溶性蛋白的总量。加热处理细胞时,随着温度的升高,蛋白质逐渐变性沉淀,有活性的可溶性蛋白量逐渐减少,通过生化分析手段如蛋白印迹杂交(Western blotting)、基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)等就能够绘制出特定蛋白的可溶性蛋白含量随温度变化的曲线,即熔解曲线^[7]。对特定蛋白而言,可溶性蛋白量与变性蛋白量相等时的温度,或者可溶性蛋白量占总蛋白量一半时的温度,称为聚集温度(aggregation temperature),等同于熔解温度(T_m)^[7]。当细胞经药物处理后,药物和靶蛋白结合,使靶蛋白的热稳定性增强, T_m 值增加,根据药物处理前后 T_m 的变化情况,就可以确定靶蛋白和药物在生理水平上是否有相互作用。在 CETSA 测定中,蛋白质与药物化合物的反应是在蛋白质保持正确的亚细胞定位、翻译后修饰、代谢物反馈等条件下进行的,是一种更加可信的药物靶标筛选方法^[3,8]。同时,CETSA 方法还能评估在恒定温度下,随着配体浓度增加,靶标蛋白质可溶性蛋白量的变化,绘制等温剂量反应曲线,计算药物的有效浓度,为药物的临床使用提供参考,为不同患者间的药效比较提供依据^[9]。

Western blotting 是通过特异性抗体对靶蛋

白进行检测的技术。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白质按分子量大小进行分离后,再将蛋白转移到杂交膜上,通过抗原和抗体的特异性反应鉴定蛋白质,判断表达水平,以及亚细胞定位等。Western blotting 技术因其操作简便、特异性强、灵敏度高被广泛用于蛋白检测。

本研究以针对多发性骨髓瘤的靶向药帕比司他(panobinostat)为例,采用 CETSA 和 Western blotting 相结合的技术,在活细胞水平检测 panobinostat 的靶蛋白。我们详细介绍了该方法的标准操作流程,讨论了实验过程中的注意事项和此方法的应用局限,希望该方法能够为广大科研人员、药物研发公司和药物的临床使用提供借鉴和帮助。

1 材料与仪器

本研究使用的试剂主要为小分子化合物(靶向药)、细胞培养基、Western blotting 杂交用抗体等,具体信息见表 1。

本研究使用的仪器及相关耗材主要为加热处理细胞的 PCR 仪、分离可溶性蛋白的电泳仪、Western blotting 杂交的转膜仪、成像仪等,具体见表 2。

2 实验方法

2.1 实验设计

基于 Western blotting 的 CETSA 实验流程包括:药物处理细胞、加热细胞以变性和沉淀蛋白、细胞裂解、离心或者过滤去除细胞碎片和变性聚集(蛋白沉淀)、收集可溶性蛋白、可溶性蛋白的凝胶电泳和 Western blotting 定量检测(图 1)。可溶性靶蛋白经 Western blotting 确证后,将蛋白条带的定量结果进行曲线拟合,得到可溶性靶蛋白含量随着温度变化的熔解曲线(药物浓度保持不变,温度改变的拟合曲线,图 1A)、药物处

理前后的 T_m 值(图 1A)、等温剂量反应曲线(isothermal dose-reponse fingerprint, ITDRF) (温度保持不变, 药物浓度改变的拟合曲线, 图 1B),

以及可溶性靶蛋白浓度为总浓度一半时的药物浓度值(EC_{50}) (图 1B)。此实验流程可在任何生物化学和分子生物学实验室进行。

表 1 基于 CETSA 方法鉴定药物靶标实验中所用的试剂

Table 1 Reagents used in this CETSA-based method for identification of drug targets

试剂名称 Reagent	品牌与货号 Source and identifier
帕比司他 Panobinostat	碧云天 Beyotime, SC0294
K562 细胞系 K562 cell line	本实验室保存 Lab collection
杜尔贝科改良伊格罗培养基 DMEM medium	Gibco™, C11995500BT
青霉素-链霉素双抗	Gibco™, 15140122
Penicillin streptomycin solution (10 000 U/mL)	
胎牛血清 Fetal bovine serum (FBS)	Gibco™, 10437-028
二甲基亚砷 Dimethylsulphoxide (DMSO)	索莱宝 Solarbio, D8371
磷酸缓冲液 Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)	Gibco™, 10010023
不含乙二胺四乙酸的蛋白酶抑制剂	赛默飞世尔科技 Thermo Scientific™, A32965
EDTA-free protease inhibitor cocktail	
液氮 Liquid nitrogen	本地供应商 Local supplier
二硫苏糖醇 Dithiothreitol (DTT)	Amresco, 0281-5 G
三羟甲基氨基甲烷 Hydroxymethyl methyl aminomethane (Tris)	Amresco, 0826-1 KG
十二烷基硫酸钠 Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Amresco, 0227-500 G
溴酚蓝 Bromophenol blue	阿拉丁 Aladdin, B109642-25 G
甘油 Glycerol	北京化工厂 Beijing Chemical Factory
预染蛋白质分子量标准 Prestained protein marker	兰博利德 Lablead, P1018-250 μL
蛋白预制胶 Precast Protein Gels (LabPAGE 4%–12%)	兰博利德 Lablead, P41211
聚偏二氟乙烯转印膜 Polyvinylidene Fluoride (PVDF, 0.2 μm)	颇尔 PALL, BSP0161
甲醇 Methanol	北京化工厂 Beijing Chemical Factory
食盐 NaCl	北京化工厂 Beijing Chemical Factory
吐温 20 Tween 20	阿拉丁 Aladdin, T104863
脱脂奶粉 Skim milk	Amresco, M203-10 G-10 PK
兔源组蛋白去乙酰化酶 1 抗体 Anti-HDAC1 rabbit primary antibody	碧云天 Beyotime, AF5180
兔源人突触蛋白-4 抗体 Anti-syntaxin-4 rabbit primary antibody	义翘神州 SinoBiological, 200259-T38-50 μL
兔源四三肽重复结构域抗体	伊莱瑞特 Elabscience, E-AB-19056
Anti-tetratricopeptide repeat protein 38 rabbit primary antibody	
鼠源人肌动蛋白抗体 Anti-β-actin mouse primary antibody	碧云天 Beyotime, AF0003
辣根过氧化物酶标记二抗, 山羊抗小鼠 IgG	雅酶 EpiZyme, LF101
Goat anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody	
辣根过氧化物酶标记二抗, 山羊抗兔 IgG	雅酶 EpiZyme, LF102
Goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody	
蛋白质免疫印迹底物发光液	赛默飞世尔科技 Thermo Scientific™, 34580
SuperSignal™ West Pico PLUS chemiluminescent substrate	

表 2 基于 CETSA 方法鉴定药物靶标实验中所使用的仪器和耗材

Table 2 Instruments and materials used in this CETSA-based method for identification of drug targets

仪器和耗材 Instruments and materials	品牌与货号 Source and identifier
二氧化碳培养箱 CO ₂ incubator	赛默飞世尔科技 Thermo Scientific™, Thermo 371
高负压电动吸引器 Negative pressure suction device	斯曼峰 SMAF, YX932D
倒置显微镜 Inverted microscope	蔡司 Zeiss, AXIOVERT 200
血清移液管 Serological pipettes	康宁 CORNING, 4487 and 4488
10 cm 培养皿 10 cm cell culture dish	康宁 CORNING, 430167
T75 聚苯乙烯培养瓶 Polystyrene tissue culture flask T75	赛默飞世尔 Thermo Fisher, 156499
六孔细胞培养板 Six-well culture plate	康宁 CORNING, 3516
离心机 Microcentrifuge	湖南湘仪 CENCE, TDZ5-WS
PCR 基因扩增仪 Polymerase chain reaction (PCR) gene amplification instrument	东胜创新 East Win, EDC-810
凝胶电泳装置 Gel electrophoresis system	龙方科技 Long Fang Xing Yu, LF-Mini4
半干转印槽 Gel transfer device	伯乐 Bio-Rad, Trans-Blot SD Cell
电泳仪电源 Electrophoresis power supply	六一 Liuyi, DYY-6C
多功能成像系统 Multifunctional imaging analysis system	威尔伯 VILBER LOURMAT, Fusion Fx
F3 可变量程单通道移液器 Variable and single channel pipette (10–1 000 μL)	赛默飞世尔 Thermo Fisher, 4640060
F3 可变量程单通道移液器 Variable and single channel pipette (20–200 μL)	赛默飞世尔 Thermo Fisher, 4640050
F3 可变量程单通道移液器 Variable and single channel pipette (2–20 μL)	赛默飞世尔 Thermo Fisher, 4640030
电动移液器 Portable pipette (0.1–100 mL)	吉尔森 Gilson, 9501
移液枪头 Pipette tips	爱思进 Axygen, YC-HC01017, YC-HC01016, YC-HC01015
离心管 Centrifugal tube	爱思进 Axygen, YC-HC01008, YC-HC01010
超纯水仪 Ultrapure water system	艾柯 AK, Advanced-UP

2.2 实验设计中需要注意的问题

2.2.1 材料的选择

根据药物研究方向选择合适的样本,如细胞系、动物组织器官、离体组织器官或者病人血清等。本研究中采用的小分子靶向药为 panobinostat,选择的样本材料为 K562 细胞系,其中含有和 panobinostat 相互作用的靶蛋白——组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC1)、人突触蛋白(human syntaxin-4, STX4)以及四三肽重复结构域(tetratricopeptide repeat domain 38, TTC38)^[7]。这些材料不仅需要足够的数量,还要具备一定的细胞密度或者组织新

鲜度,才能保证实验的重复性和准确性。

2.2.2 药物处理时间和浓度

在药物穿过细胞膜进入细胞内发挥作用时,有些化合物会被修饰或者被降解,从而失去与靶蛋白结合的能力,因此需要摸索合适的处理时间以减少药物的衍生化反应;许多药物都具有较高的脂溶性,需要用有机溶剂溶解,例如二甲基亚砜(DMSO),但有机溶剂影响细胞的存活率以及靶蛋白与药物的亲和力,因此,需要优化配体药物的使用浓度;最后,药物处理后的细胞、组织等需要及时清洗,避免药物的表面黏附,减少药物的非特异性结合。

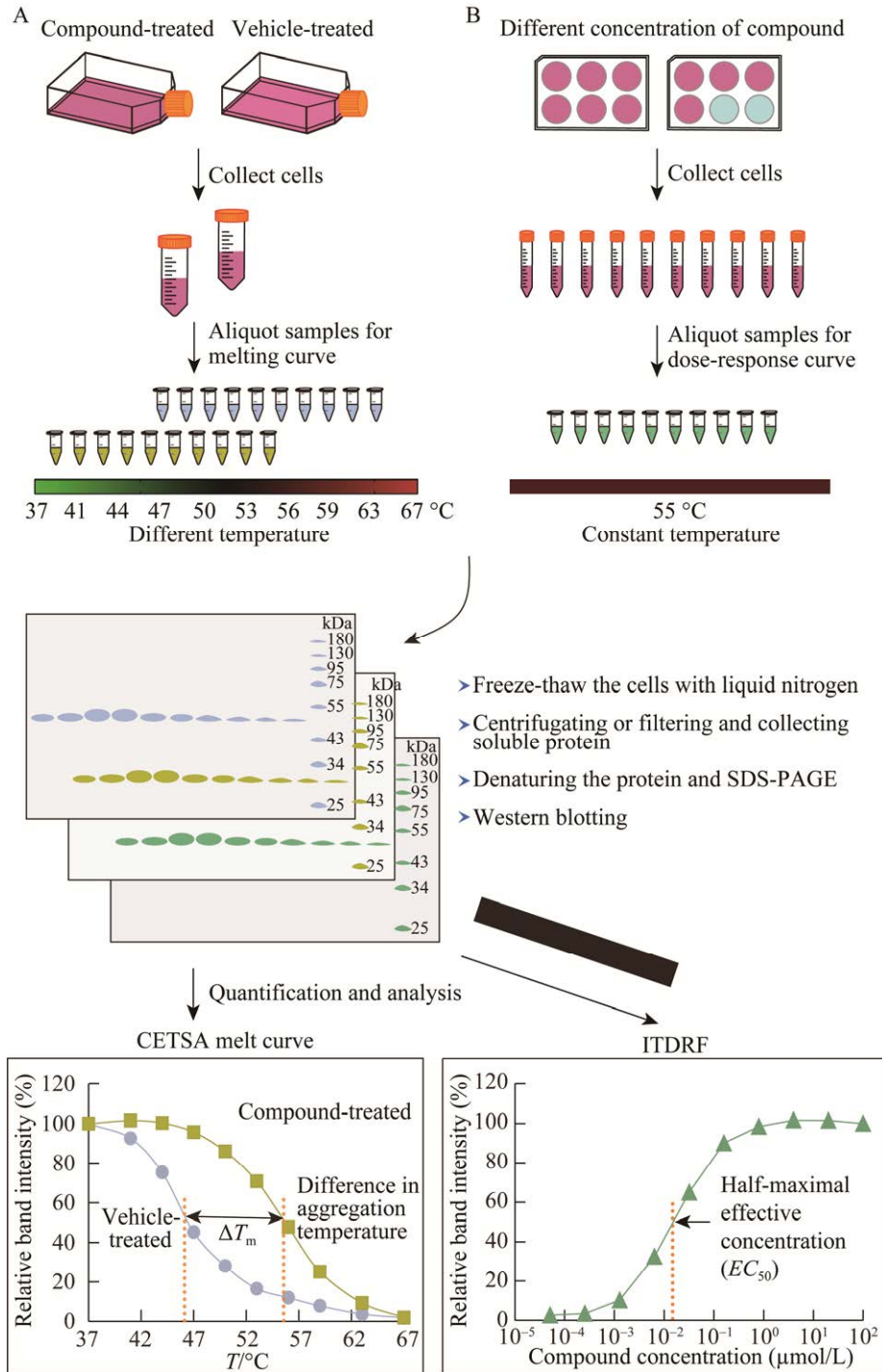


图 1 细胞水平的 CETSA 溶解曲线(A)和等温剂量反应曲线(B)实验流程图

Figure 1 Schematic illustration of CETSA melting curve (A) and ITDRF (B). Once the samples have been collected from the cells, they are aliquotted to 10 different tubes, and subjected to CETSA melting curve (A) or ITDRF (B) experiments. The CETSA melting curve is obtained when the samples are heated to various temperatures after exposure to the same dose of compound. The ITDRF is tested at a constant temperature following addition of a series of concentrations of compounds. After the heat treatment, the cells were lysed and separated, and the soluble proteins were obtained by centrifugation or filtration. The results are determined by Western blotting. ITDRF, isothermal dose-response fingerprints.

2.2.3 合适的温度范围

由于细胞、组织和血清等材料对温度变化的敏感性不同,而不同靶标蛋白的溶解温度也存在差异,因此有必要在对细胞进行药物处理前,优化加热处理的温度范围,确保感兴趣蛋白质的 T_m 在溶解曲线的中间位置。在加热处理细胞的过程中,还应对样品体积、细胞密度和加热时间等参数进行优化。

2.2.4 细胞裂解方式

根据药物的作用机制,靶标可能是可溶性蛋白或者膜蛋白。可以采用反复冻融或者液氮研磨等方法得到可溶性蛋白。在提取膜蛋白时,需要加入表面活性剂并摸索表面活性剂的种类和用量,以达到降低蛋白变性,同时不影响提取效率的目的。

2.2.5 可溶性蛋白的分离

细胞或者组织裂解后,可以通过离心或者过滤的方式去除提取液中的蛋白聚集体和细胞碎片。离心法快速简单,但蛋白沉淀物的去除不彻底,可采用超离心技术,尽可能去除杂质,降低变性蛋白的干扰。在条件允许的情况下,可以用 $0.45\ \mu\text{mol/L}$ 亲水性聚偏二氟乙烯转印膜(PVDF)材质的过滤器过滤去除杂质,该技术得到的可溶性蛋白杂质少、背景低。

2.2.6 质量合格的单克隆或者多克隆抗体

在本研究中,采用抗靶蛋白的抗体进行Western blotting实验。抗体的质量至关重要,纯度高、特异性强的抗体杂交得到的结果为单一蛋白条带。如果是自制的多克隆抗体血清,最好用盐析、离子交换、亲和层析等方法进一步分离纯化后再使用。

2.2.7 等温剂量反应曲线中温度的选择

本实验操作流程除CETSA溶解曲线(图1A)外,还能获得一定温度条件下,药物浓度依赖的剂量反应曲线(图1B)。具体的温度选择原则是:在该温度下,经药物处理的细胞中,总可溶性蛋白含量与对照组相比有显著差别。为了降低药物对细胞的

损害,选择某特定温度时,要同时兼顾尽可能低的药物使用量。卡罗琳斯卡研究所的研究者们选用略大于 T_m 值的温度进行等温剂量反应实验^[2]。

2.3 样品制备及 Western blotting 分析

2.3.1 表观溶解曲线实验

使用低浓度靶向药panobinostat处理K562细胞系,检测10个不同温度下(37–67 °C)可溶性蛋白的含量水平。以panobinostat的溶剂DMSO处理细胞作为阴性对照。实验过程见图1A,具体实验步骤如下。

细胞培养和化合物处理(6–7 h):

(1) 将含有1 mL K562细胞悬液的冻存管在37 °C水浴中迅速解冻,加入5 mL DMEM+10% FCS培养基混合均匀。300×g离心5 min,弃去上清液,用1 mL培养基重悬细胞后加入到含9 mL培养基的10 cm培养皿中,在37 °C、5% CO₂浓度的二氧化碳培养箱培养2 d。

(2) 显微镜下检查细胞密度,如果细胞密度达80%–90%,即可进行传代培养。

(3) 收集细胞,300×g离心5 min,弃去上清液,用3 mL培养液重悬混匀细胞,将细胞悬液按1:9的比例添加到新的含9 mL培养基的10 cm培养皿中,在37 °C、5% CO₂浓度的二氧化碳培养箱培养2 d;共3皿细胞。

(4) 显微镜下检查细胞密度,如果细胞密度达80%–90%,继续传代培养。

(5) 收集细胞,300×g离心5 min,弃去上清液,分别用3 mL培养液重悬混匀细胞,将细胞悬液按1:9的比例添加到新的含9 mL培养基的10 cm培养皿中,在37 °C、5% CO₂浓度的二氧化碳培养箱培养2 d;可传代9皿细胞。

(6) 显微镜下检查细胞密度,按照10 cm培养皿可收获的细胞量 13.7×10^6 计算,即细胞密度为 1.4×10^6 个/mL。

需要注意的是,精确的细胞密度应该用血球

计数板计数。取上述细胞悬液稀释至合适倍数,按 1:1 的比例加入 0.4% 溴酚蓝染液,反应 3–5 min 后滴加到血球计数板和盖玻片之间,低倍镜(10×10 倍)下观察计数,分别计 9 个大方格中 4 角大方格的细胞数目。计数时,只计没有被溴酚蓝染色的活细胞,不计蓝色死细胞。一般计下线细胞不计上线细胞,计左线细胞不计右线细胞,若细胞聚成一团则按一个细胞进行计数。按照每毫升细胞悬液细胞数等于 4 角大格细胞总数的平均值乘以 10 000 计算细胞数目,最终的细胞数要乘以稀释倍数。

(7) 分别转移 24 mL 培养液至 2 个 T75 培养瓶,共 48 mL。

(8) 加 120 μL /0.2 mmol/L 的 panobinostat (panobinostat 母液浓度是 10 mmol/L,使用前用 DMSO 稀释至 0.2 mmol/L)至一个 T75 培养瓶,终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$;加 120 μL DMSO 溶剂至另一个 T75 培养瓶作为阴性对照。

需要注意的是,DMSO 或者其他有机溶剂对细胞生长会有一些的损伤,在正式实验前应该先做有机溶剂耐受性的预实验,使用细胞量开始减少的最高有机溶剂用量,一般情况下 DMSO 的浓度不超过 1% (体积分数)。药物使用浓度和反应时间也需要经过预实验确定。

(9) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 浓度的二氧化碳培养箱反应 5 h。

(10) 将细胞反应液分别转移到 2 个 50 mL 离心管中。

(11) 室温,300 $\times g$ 离心 5 min 得细胞沉淀。

(12) 沉淀用 20 mL PBS 洗 2 次,300 $\times g$ 离心 5 min。

(13) 用 0.8 mL 含蛋白酶抑制剂的冰预冷 PBS 重悬细胞沉淀。

(14) 各取 80 μL 分装至 10 个 0.2 mL PCR 管(约 3.4×10^6 个/管),panobinostat 和 DMSO 各

10 个温度(37–67 $^{\circ}\text{C}$),共 20 管。

细胞悬液的热处理(10 min):

(15) PCR 仪设置 6 个温度点(37、41、44、47、50、53 $^{\circ}\text{C}$),将 PCR 管放入 PCR 仪加热 3 min,立即取出室温放置 3 min,液氮冷冻样品(处理过程中温度和反应时间一定要保持恒定)。

(16) PCR 仪设置 4 个温度点(56、59、63、67 $^{\circ}\text{C}$),将 PCR 管放入 PCR 仪加热 3 min,立即取出室温放置 3 min,液氮冷冻样品。

(17) 样品可在–80 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。

需要注意的是,不同厂家、不同型号 PCR 仪能够设置的温度点不同,如果 PCR 仪中能一次性处理 10 个温度点,实验可一次性操作完成。本实验使用的 PCR 仪单次最多能设置 6 个符合要求的温度点,因此样品分 2 次处理。

(18) 细胞裂解(1 h)。

细胞在液氮和设置为 25 $^{\circ}\text{C}$ 的加热模块间反复冻融 2 次,每次解冻后,振荡混匀。裂解后的细胞放冰上。

(19) 振荡混匀,转移细胞裂解物到 1.5 mL 离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 000 $\times g$ 离心 20 min,离心后样品放在冰上。

(20) 小心取 70 μL 可溶性蛋白上清液,转移至新的 1.5 mL 离心管,冰上放置,最多放 1–2 h。

(21) Western blotting (5–6 h or 1–2 d)。

取 40 μL 样品加 10 μL 5 \times SDS 上样缓冲液 [250 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8); 10% SDS (质量体积分数); 0.5% 溴酚蓝(质量体积分数); 50% 甘油(体积分数); 500 mmol/L DTT],70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min。

(22) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 000 $\times g$ 离心 20 min,取上清。

(23) 组装 4%–12% Bis-Tris 蛋白预制胶,加 Tris-MOPS-SDS 电泳缓冲液(50 mmol/L Tris, 50 mmol/L MOPS, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, pH 7.7)。

(24) 取 15 μL 可溶性蛋白样品(约 $2.0\times$

10^5 cells)上样,按照温度从低到高的顺序上样。

(25) 120 V 电泳 1.5 h。

(26) 电泳完成后取出凝胶,并在托盘中用去离子水短暂冲洗凝胶。

(27) 按照滤纸、甲醇活化的 PVDF 膜、凝胶和滤纸的顺序组装半干转膜三明治层,按照 3 倍膜面积计算电流,恒流模式转膜,转膜 30 min。

(28) 取出 PVDF 膜,并将膜转移至装有 TBST 缓冲液[20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5–7.6); 150 mmol/L NaCl; 0.05% Tween 20]的容器或托盘中,清洗 10 min。

(29) 室温下用封闭缓冲液(含 5%脱脂牛奶的 TBST 缓冲液)封闭 1 h,或 4 °C 封闭过夜。

(30) 按照 1:5 000 的比例用 TBST 缓冲液稀释 HDAC1 一抗或者其他抗体,取 PVDF 膜至一抗稀释液孵育 1 h,或 4 °C 孵育过夜。

(31) TBST 缓冲液洗膜,每次 10 min。

(32) 按照 1:7 500 的比例用 TBST 缓冲液稀释 HRP-conjugated IgG 二抗,室温孵育 1 h。

(33) TBST 缓冲液洗膜,每次 10 min (可以增加清洗时间和次数以减少背景)。

(34) 在干净塑料纸上加 100 μ L ECL 底物反应 A 液和 100 μ L ECL 底物反应 B 液,混匀,用干净的镊子将膜放置在反应液上,再盖一张干净塑料纸将反应液均匀,确保溶液均匀覆盖整个膜,室温孵育 5 min。

(35) 用 Fusion Fx 成像仪曝光成像,选择合适的化学发光通路和曝光时间,获取一系列图像。

(36) 用 Image J 软件量化处理不同抗体显色得到的特异性蛋白条带:在 Image J 中打开图片,转化为 8-bit 的灰度图;消除背景后选择合适的像素值;用矩形选框工具选择第一个特异性条带;复制矩形选框选择第 2 个特异性条带,重复该步骤直到选择所有条带;下拉 Analyze 选项

的 Gels,点击 Plot Lanes,显示条带的灰度曲线图;用直线工具将所有 10 个小峰的峰值封闭;选择魔法棒工具,依次点击封闭后的各个小峰,即可得到峰面积,也就是对应条带的灰度值;将数值导入 Excel 表进行数据分析,每组最低温度特异性条带的显色强度设为 100%,其他条带显色强度与此相比获得不同温度点的相对强度值。

(37) 通过 GraphPad Prism 软件绘制以温度尺度为横坐标、特异性条带相对强度为纵坐标的函数曲线,以此表示靶标蛋白可溶性蛋白量随温度变化的趋势,称为表观溶解曲线。用 Boltzmann Sigmoid^[10]等式计算溶解温度 T_m 。

2.3.2 等温剂量反应实验

对于等温剂量反应实验,除了是在恒温条件下加不同浓度的药物外,其他反应流程与表观溶解曲线实验一致(图 1B)。本研究采用的温度是 55 °C, panobinostat 浓度从 10 μ mol/L 逐渐降低至 0.000 15 μ mol/L,以溶剂 DMSO 为阴性对照。

细胞培养和化合物处理(6–7 h):

(1) K562 细胞用 DMEM+10% FCS 培养基培养至 1.4×10^6 /mL,共培养 25 mL。

(2) 转移 2.5 mL (约 3.5×10^6 cells)至 6 孔细胞培养板,从 1–10 做好标记。

需要注意的是,6 孔细胞培养板的底面积是 9.6 cm²,最适细胞接种体积是 2.5 mL,最少可收获的细胞量是 2.5×10^6 cells。

(3) 加 60 μ L 2 mmol/L 的 panobinostat 至第 1 个 0.2 mL PCR 管,加 45 μ L DMSO 到 2–10 个 PCR 管,从 1–10 做好标记。

(4) 按 15 μ L 的体积序列稀释药物,混匀 7 次,稀释到第 9 孔即可,第 10 孔为 DMSO。

(5) 取 22 μ L 稀释好的化合物至新的 0.2 mL PCR 管,–20 °C 保存备用。

(6) 取 12.5 μ L 稀释好的化合物至对应标记的 6 孔细胞培养板中,混匀(不同孔化合物浓度

分别为 10、2.5、0.625、0.156 25、0.039 06、0.009 77、0.002 44、0.000 61、0.000 15 $\mu\text{mol/L}$ 和 DMSO vehicle)。

(7) 在 37 °C、5% CO_2 浓度的二氧化碳培养箱反应 5 h。

(8) 将细胞反应液分别转移到 10 个 15 mL 离心管中。

(9) 室温, 300 \times g 离心 5 min 得细胞沉淀。

(10) 沉淀用 20 mL PBS 洗 2 次, 300 \times g 离心 5 min。

(11) 100 μL 含蛋白酶抑制剂的冰预冷 PBS 重悬细胞沉淀。

(12) 重悬液转移至 10 个 0.2 mL PCR 管(约 3.5×10^6 cells/管);

(13) 4 °C、300 \times g 离心 3 min, 小心取出 20 μL 上清液, 轻轻将剩余 80 μL 细胞弹起, 4 °C 放置备用。

细胞悬液的热处理(10 min):

(14) PCR 仪设置成 55 °C, 将 PCR 管放入 PCR 仪加热 3 min, 立即取出室温放置 3 min, 液氮冷冻样品。

(15) 样品可在 -80 °C 放置过夜。

细胞裂解和 Western blotting 步骤同 2.3.1。

3 结果与分析

3.1 细胞内不同靶蛋白的表观熔解曲线

Panobinostat 是组蛋白去乙酰化酶(HDAC)的广谱抑制剂, 本研究选取药物 panobinostat 最具代表性的细胞内靶蛋白 HDAC1, 建立基于 CETSA 方法的细胞内靶标鉴定的标准操作流程。药物处理前后的表观熔解曲线如图 2A 左图所示, HDAC1 的特异性杂交图谱如图 2A 右图所示。结果表明, 随着温度的升高, HDAC1 的特异性条带强度逐渐降低, 由于 panobinostat 对靶蛋白的稳定作用, 加药处理后熔解曲线显著右

移。利用 Boltzmann Sigmoid 等式计算 T_m 值, 加药前为 39.82 °C, 加药后为 63.33 °C。

为了提供更具说服力的证据, 还挑选了另外 2 个已证明是 panobinostat 作用位点的靶蛋白人突触蛋白(human syntaxin-4, STX4)和四三肽重复结构域(tetratricopeptide repeat domain 38, TTC38)^[7]。结果如图 2B–2C 所示, 药物处理后 STX4 和 TTC38 表观熔解曲线显著右移, 表明这 2 个蛋白在药物作用下稳定性增强, 相同温度条件下可溶性蛋白量增加。加药前后 STX4 的 T_m 值分别是 49.17 °C 和 57.13 °C, TTC38 的 T_m 值分别是 47.10 °C 和 53.56 °C。

与 HDAC1 的 ΔT_m 值相比, STX4 和 TTC38 的 ΔT_m 偏移值跨度较小, 造成这种差异的原因可能是蛋白本身的性质, 或者结合强弱, 也有可能是同一蛋白几种不同形式的折叠中间体与配体结合的综合结果^[3,11]。同时, ΔT_m 值不能反映配体与靶标的亲和力大小, 这是因为在细胞环境中, 蛋白的可溶性和聚集变性是一个动态过程, 产生 T_m 位移的蛋白折叠焓和热容量变化与配体浓度没有确定的相关性。靶标和配体结合的亲和力大小需要通过体外的 TSA 或者其他实验确定。

以看家基因 β -actin 作为阴性对照, 药物处理前后可溶性蛋白含量随温度变化的波动幅度在理论上应该一致, 但本研究中 β -actin 的 T_m 值在药物处理前后也有小范围变化, 分别为 52.27 °C 和 56.83 °C(图 2D)。这可能是实验过程中细胞密度的微小变化、细胞裂解后可溶性蛋白的提取效率, 以及 Western blotting 的转膜效率等操作误差造成的。因此, 建议用等温剂量曲线再次验证靶标和药物配体的结合。

3.2 不同靶蛋白的等温剂量反应曲线

Western blotting 结果显示, 随着药物浓度的增加, HDAC1、STX4 和 TTC38 的可溶性蛋白量逐渐增多(图 3), 根据该拟合曲线计算可溶性

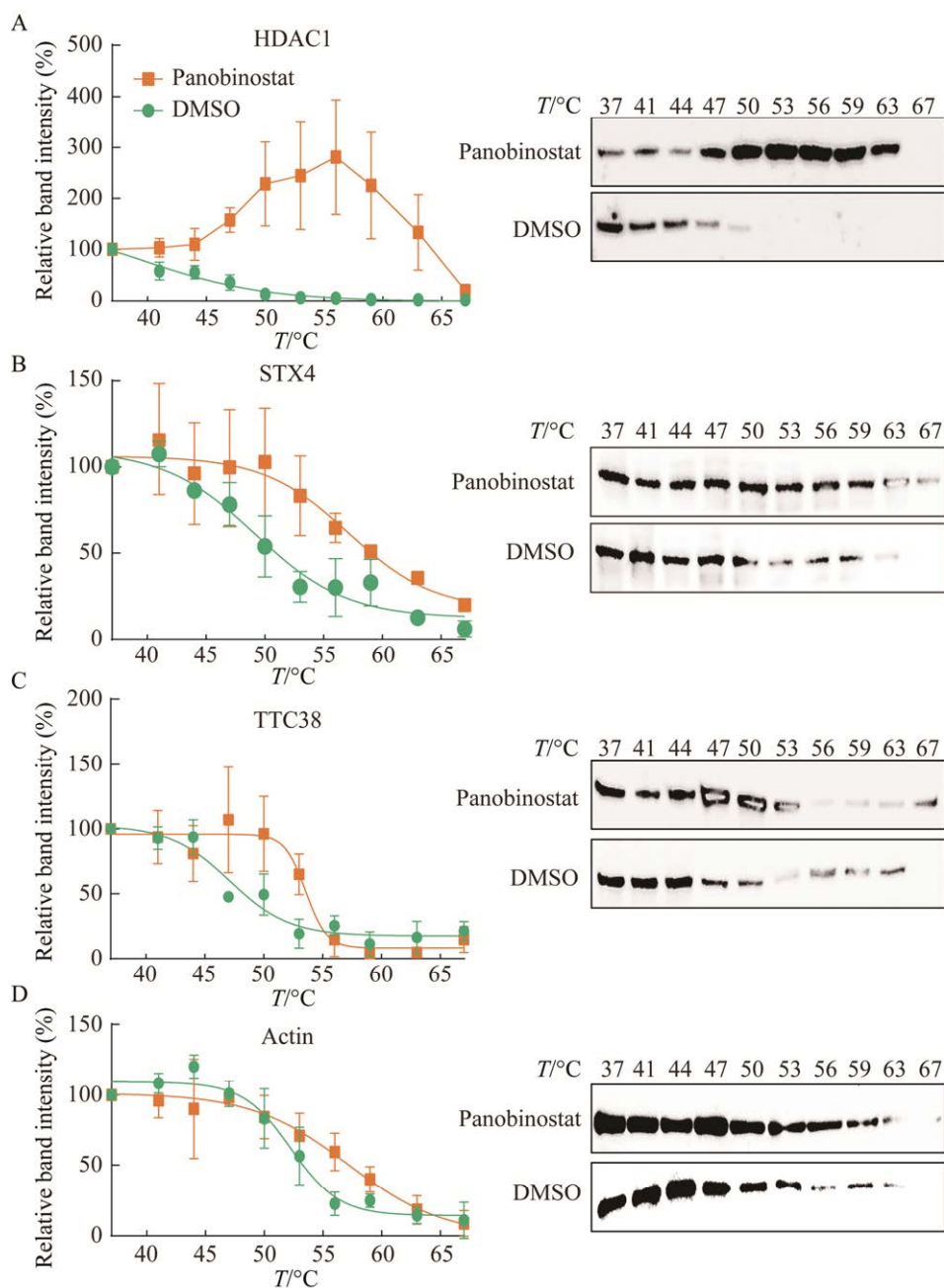


图 2 CETSA 熔解曲线示例

Figure 2 Examples of CETSA melting curve. Illustration of drug induced melting curves of target proteins HDAC1 (A), STX4 (B) and TTC38 (C). K562 cells was activated by low concentration of panobinostat, and the remaining amount of soluble proteins was detected as a function of temperature. The treatment without compound was the negative control. The left figures of A, B, C and D were quantitated results based on Western blotting assay, and the right figures were the representative raw pictures of Western blotting. The treatment of internal reference protein β -actin (D) was the non-target negative control. All experiments were performed 2–3 times and the average of protein band intensity at different temperatures was obtained. The solid lines were fitted by using Boltzmann Sigmoid equation within the GraphPad Prism software. Analysis were repeated three times, and results of a representative experiment are shown. Data are means of three biological replicates with standard deviation.

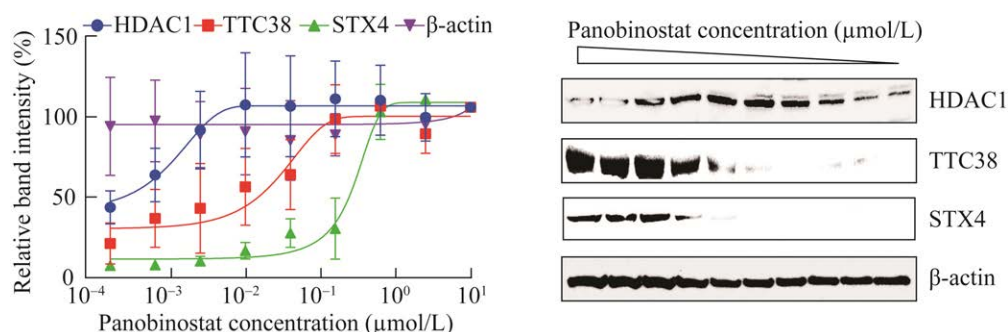


图3 ITDRF 等温计量曲线示例

Figure 3 Examples of ITDRF. Illustration of the amount of stabilized soluble protein of HDAC1, STX4 and TTC38 in the presence of increasing concentrations of compounds in K562 cells. The samples were treated at constant temperature of 55 °C. The internal reference protein β -actin was the negative control. The left figures were quantitated results based on Western blotting assay, and the right figures were the representative raw pictures. All experiments were performed 2–3 times and the average of protein band intensity was obtained. The solid lines were fitted by using Boltzmann Sigmoid equation within the GraphPad Prism software. Analysis were repeated three times, and results of a representative experiment are shown. Data are means of three biological replicates with standard deviation.

靶蛋白浓度为总浓度一半时的药物浓度值(EC_{50} 值), HDAC1 为 0.932 70 nmol/L, STX4 为 258.60 nmol/L, TTC38 为 18.43 nmol/L。等温剂量反应曲线的确定进一步证明这 3 个蛋白是 panobinostat 的直接靶标。 β -actin 可溶性蛋白含量杂交结果显示, 随着配体浓度的增加 β -actin 条带强度没有显著变化, 表明 β -actin 的确不是 panobinostat 的作用位点。

以上结果显示, 55 °C 的热处理温度比较适合这 3 个蛋白的鉴定, 在此温度条件下, 未加药物处理时 HDAC1、STX4 和 TTC38 蛋白主要处于部分变性和沉淀的状态, 但随着药物浓度增加至饱和水平时, 靶蛋白被药物稳定, 蛋白可溶性部分就会增加。等温剂量反应中温度的选择至关重要, 不能太高, 以避免错过一些弱相互作用的靶点; 也不能太低, 从而导致药物稳定样品前后可溶性蛋白的表达量没有统计学差异。

4 讨论与结论

本文建立了以 Western blotting 定量检测为判定手段的 CETSA 方法标准操作流程, 该方法对药物的已知靶标或感兴趣靶标具有直观且准确的鉴定和确证能力。Western blotting 入门级别低, 是分子生物学实验室蛋白检测的常规操作手段, 以 Western blotting 检测为起点, 大大降低了药物靶标筛选的难点和对仪器的依赖程度。同时, Western blotting 检测可以为将来建立基于定量质谱及蛋白组学的 CETSA 方法摸索条件^[7], 如药物浓度、细胞处理量、细胞处理时间和温度、细胞体积、蛋白提取方法等, 这样可以极大提高制备样品的质量, 减少后期仪器使用费用。

Western blotting 印记杂交很少产生假阳性结果, 但是包括复合体在内的大蛋白对热漂移的敏感性较低, 容易出现假阴性结果。另外,

如果被修饰蛋白、水解蛋白或者变构蛋白是药物的正确靶标，而该蛋白抗体不识别这些抗原决定簇，也会造成假阴性结果。更为重要的是，基于 Western blotting 的 CETSA 方法只能鉴定或者确证少数已知的靶蛋白，不适合大规模的靶标筛选。因此，迫切需要建立基于定量质谱和蛋白组学的 CETSA 方法，实现在全蛋白组水平、高通量和深度化的对靶标和药物的相互作用进行判定^[7]，该方法不仅可以区分直接靶标，间接靶标以及非靶标蛋白，还可以深度挖掘一些未知靶标。对于一些有翻译后修饰、水解或者变构，抗体不能识别的靶标的鉴定，基于质谱的 CETSA 方法具有独特优势^[12]。该方法还能够和表型检测相结合，详细解读药物的代谢过程和副作用^[13-14]，为临床用药提供指导，为药物设计提供思路。除了在生物医药领域用于药靶鉴定外，基于定量质谱的 CETSA 方法在合成生物学领域也具有广阔应用前景，如鉴定和优化酶的底物^[15]、鉴定新合成蛋白质^[16]、验证基因编辑的结果^[17]等。因此，我们下一步目标就是建立基于定量质谱的 CETSA 方法并实现标准化。

参考文献

- [1] SCHENONE M, DANČÍK V, WAGNER BK, CLEMONS PA. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery[J]. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(4): 232-240.
- [2] MARTINEZ MOLINA D, JAFARI R, IGNATUSHCHENKO M, SEKI T, LARSSON EA, DAN C, SREEKUMAR L, CAO YH, NORDLUND P. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay[J]. *Science*, 2013, 341(6141): 84-87.
- [3] JAFARI R, ALMQVIST H, AXELSSON H, IGNATUSHCHENKO M, LUNDBÄCK T, NORDLUND P, MOLINA DM. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(9): 2100-2122.
- [4] SEMISOTNOV GV, RODIONOVA NA, RAZGULYAEV OI, UVERSKY VN, GRIPAS' AF, GILMANSHIN RI. Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe[J]. *Biopolymers*, 1991, 31(1): 119-128.
- [5] HUYNH K, PARTCH CL. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay[J]. *Current Protocols in Protein Science*, 2015, 79(1): 28.9.1-28.9.14.
- [6] NGUYEN C, WEST GM, GEOGHEGAN KF. Emerging methods in chemoproteomics with relevance to drug discovery[J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N J), 2017, 1513: 11-22.
- [7] FRANKEN H, MATHIESON T, CHILDS D, SWEETMAN GMA, WERNER T, TÖGEL I, DOCE C, GADE S, BANTSCHIEFF M, DREWES G, REINHARD FBM, HUBER W, SAVITSKI MM. Thermal proteome profiling for unbiased identification of direct and indirect drug targets using multiplexed quantitative mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(10): 1567-1593.
- [8] BECHER I, DITTMANN A, SAVITSKI MM, HOPF C, DREWES G, BANTSCHIEFF M. Chemoproteomics reveals time-dependent binding of histone deacetylase inhibitors to endogenous repressor complexes[J]. *ACS Chemical Biology*, 2014, 9(8): 1736-1746.
- [9] HUANG J. Tracking drugs[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2013, 369(12): 1168-1169.
- [10] NIESEN FH, BERGLUND H, VEDADI M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(9): 2212-2221.
- [11] TSYTLONOK M, ITZHAKI LS. The how's and why's of protein folding intermediates[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2013, 531(1/2): 14-23.
- [12] HUANG JX, LEE G, CAVANAUGH KE, CHANG JW, GARDEL ML, MOELLERING RE. High throughput discovery of functional protein modifications by hotspot thermal profiling[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 894-901.

- [13] HUANG Y, FURUNO M, ARAKAWA T, TAKIZAWA S, de HOON M, SUZUKI H, ARNER E. A framework for identification of on- and off-target transcriptional responses to drug treatment[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 17603.
- [14] GOROSHCHUK O, KOLOSENKO I, KUNOLD E, VIDARSDOTTIR L, PIRMORADIAN M, AZIMI A, JAFARI R, PALM-APERGI C. Thermal proteome profiling identifies PIP4K2A and ZADH2 as off-targets of polo-like kinase 1 inhibitor volasertib[J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2021, 35(7): e21741.
- [15] SAEI AA, BEUSCH CM, SABATIER P, WELLS JA, GHARIBI H, MENG ZW, CHERNOBROVKIN A, RODIN S, NÁREOJA K, THORSELL AG, KARLBERG T, CHENG Q, LUNDSTRÖM SL, GAETANI M, VÉGVÁRI Á, ARNÉR ESJ, SCHÜLER H, ZUBAREV RA. System-wide identification and prioritization of enzyme substrates by thermal analysis[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 1296.
- [16] SAVITSKI MM, ZINN N, FAELTH-SAVITSKI M, POECKEL D, GADE S, BECHER I, MUELBAIER M, WAGNER AJ, STROHMER K, WERNER T, MELCHERT S, PETRETICH M, RUTKOWSKA A, VAPPIANI J, FRANKEN H, STEIDEL M, SWEETMAN GM, GILAN O, LAM EYN, DAWSON MA, et al. Multiplexed proteome dynamics profiling reveals mechanisms controlling protein homeostasis[J]. *Cell*, 2018, 173(1): 260-274.e25.
- [17] SMITS AH, ZIEBELL F, JOBERTY G, ZINN N, MUELLER WF, CLAUDER-MÜNSTER S, EBERHARD D, FÄLTH SAVITSKI M, GRANDI P, JAKOB P, MICHON AM, SUN H, TESSMER K, BÜRCKSTÜMMER T, BANTSCHIEFF M, STEINMETZ LM, DREWES G, HUBER W. Biological plasticity rescues target activity in CRISPR knock outs[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1087-1093.