

两种微量热技术在蛋白-药物互作检测中的交叉验证

吴萌¹, 王凯华¹, 李弘¹, 高大明¹, 陈铭¹

(1.中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

摘要: 近年来, 关于生物分子间相互作用的研究在分子机制的探讨等研究领域内有很高的关注度。磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase PGK1, P1)是一种糖酵解酶, 可与药物分子盐酸特拉唑嗪(terazosin hydrochloride, TZ)结合, 释放三磷酸腺苷, 激活酶活性。该案例通过等温滴定微量热技术(ITC)和微量热泳动技术(MST)分别对 P1 和 TZ 之间的亲和力进行了定量检测, 并获得了可相互验证的亲和力数据; 从技术原理、检测特征、实验条件等不同方面对两种技术进行比较, 为分子互作检测方法的选择提供了新的思路。

关键词: 分子间相互作用, 等温滴定微量热, 微量热泳动

中图分类号: Q

文献标识码: A

Mutual verification of two microcalorimetry techniques in protein-drug interaction detection

Wu Meng¹, Wang Kaihua¹, Li Hong¹, Gao Daming¹, Chen Ming¹

(1.Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, CAS, Shanghai 200031, China)

Abstract: In recent years, the research on the interactions between biomolecules has attracted a lot of attention in many fields such as the exploration of the molecular mechanisms. Phosphoglycerate kinase PGK1 (P1) is a glycolytic enzyme that can bind to the drug terazosin hydrochloride (TZ) to release adenosine triphosphate and active the enzyme activity. In this case, the affinity between P1 and TZ was quantitatively detected by Isothermal Titration Microcalorimetry (ITC) and Micro Thermophoresis Technology (MST). The experimental results were mutually verifiable. This case compares the two technologies with different aspects such as the technical principles, the characteristics of detection, and the experimental conditions, then provides new ideas for the selection of the technologies for the detection of molecular interaction.

Keywords: Molecular Interaction, ITC, MST

1 引言

生物分子相互作用的深入探究不仅可以从分子水平上揭示生物体各项生理机能,并且对研究生命活动规律有重要意义,为探讨疾病的治疗和预防提供理论依据^[1]。传统用于分子互作研究的方法,如免疫共沉淀、酵母双杂交、融合蛋白沉降等技术,常因蛋白量低、抗体特异性差、操作时间长等因素导致实验结果的不确定性或重复性差^[2]。近年来一些用于分子间相互作用定量研究的新兴技术应运而生,如等温滴定微量热(isothermal titration calorimetry, ITC)、表面等离子共振(surface plasmon resonance SPR)、生物膜干涉(bio-layer interferometry, BLI)和微量热泳动(micro scale thermophoresis, MST)等^[3]。这些技术具有无需标记、实时表征且检测时间快速等特点,已广泛应用于分子相互作用检测领域。

已有文献报道药物分子盐酸特拉唑嗪(terazosin hydrochloride, TZ)与磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase PGK1, P1)之间存在着相互作用, TZ 结合 P1 后可促进 P1 释放三磷酸腺苷激活酶活性,结合常数 K_D 在微摩尔级别^[4]。本案例尝试用 ITC 和 MST 两种技术分别检测 P1 和 TZ 的结合情况,在初步得到实验结果的基础上对测试条件进行优化,得到了可交叉验证的亲和力常数,并在此基础上对两种检测技术的应用和特点进行了深入探讨。

2 材料与方法

2.1 实验仪器与材料

等温滴定微量热仪(ITC, 型号: MicroCal PEAQ-ITC, 马尔文帕纳科公司);

微量热泳动仪(MST, 型号: Monolith NT.115, 诺坦普科技有限公司);

微量分光光度计(型号: NanoDrop™ One, 赛默飞世尔科技有限公司);

磷酸盐缓冲液 PBS (10 X) (细胞培养级, 美仑生物);

盐酸特拉唑嗪(Terazosin hydrochloride, TZ) (纯度>99.7%, Tocris Bioscience 公司);

PGK1 蛋白(表达系统: 大肠杆菌, 纯度>95%, 分子量 45 KD), Nanodrop 测定蛋白浓度为 1.5 mg/ml (30 μ Mol);

Tween-20 (浓度 $\geq$ 40.0%, Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司);

Monolith™ RED-NHS 二代蛋白荧光标记试剂盒(MO-L011, 诺坦普科技有限公司);

MST 检测用毛细管(MO-K022, 诺坦普科技有限公司);

水为实验室自制超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 ITC 检测

生物分子相互作用过程中一般都有热量改变, ITC 技术可定量检测生物分子相互作用, 通过测量结合过程中体系热量变化, 测定生物分子之间的反应^[2]。ITC 采用功率补偿原理, 实验时将一个配体按照既定实验程序滴加入样品池中, 整个反应过程, 仪器通过加热补偿的方法保持仪器的样品池和参比池温度始终相同, 从而通过检测体系的热量变化^[5]。将实验过程中每滴加进去得到的热量变化进行峰值的积分, 运用合适的结合模型拟合^[6], 即可得到亲和力(K_D)、化学计量比(N)和热力学信息等。

PBS 缓冲液稀释至 1 X, 100 ml; 取蛋白 P1 溶液 200 μ l; 称取 23 mg TZ 溶于 100 μ l PBS 缓冲液, TZ 溶液浓度为 500 μ Mol/L, 实验体积 40 μ l。所有样品以 17000 xg, 离心 15 min 后上机检测。

保持 ITC 仪器恒温 25°C, 转速: 750 rpm。除第一滴体积 0.4 μ l 外, 其余 19 滴为 2 μ l, 共 20 滴, 间隔 120 s。分别对 TZ 滴定 P1 和 TZ 滴定 PBS 缓冲液进行检测。

2.2.2 MST 检测

温度梯度下溶液分子存在热扩散和质量浓度扩散现象, 即 Soret 效应^[7]。该现象描述了溶液分子在温度梯度内诱导产生的热量和分子流动^[8]。MST 技术基于热泳动现象, 通过表征生物分子的分子量、电荷数和构象等特性变化, 检测分子运动速率或轨迹的改变^[8-9], 进而定量检测生物分子间相互作用的强弱。实验时, 仪器内红外激光发射器照射于光路上, 并通过分色镜照射至毛细管, 管中样品内水分子即可吸收红外光发热形成温度梯度^[10], 样品的荧光强度会在激光器打开前、打开时和打开后发生变化^[8], 仪器通过检测该荧光变化得到分子间相互作用信息。带有荧光标记的样品(target)保持固定浓度, 另一个不含荧光的样品(ligand)做梯度稀释后与 target 混匀后上机检测。在保持 target 初始荧光强度一致的情况下, 通过检测经过红外激光加热后样品的荧光变化^[10], 并对该曲线进行拟合, 得到亲和力常数 K_D 。

按照试剂盒(MO-L011)方法对 P1 进行荧光标记, 最终得到 P1 溶液 550 μ l。取上述溶液 5 μ l, 用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液稀释至 20 μ l 后上机检测, 样品状态正常。后续所有 MST 检测实验均在含有 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液中完成。

药物分子 TZ 作为 ligand, 从 1 mMol/L 的浓度两倍比稀释 16 次, 最终获得体积为 10 μ l 但浓度依次降低的 ligand 溶液。稀释 P1 溶液至 500 nM 作为 target 溶液, 相同体积添加至每管 ligand 溶液中, 混合均匀后依次加入毛细管上机检测: Excitation Power: 20%, MST Power: 40%, Temperature: 25.4°C。相同实验条件重复两次。

3 分析与讨论

3.1 ITC 测试结果分析

TZ 滴定 P1(图 1)，TZ 滴定 PBS 的结果作为信号背景(control)(图 2)。用仪器处理软件 Analysis 对两次测试结果进行扣减处理后，One Set of Sites 模型拟合(图 3)，得到 P1-TZ 的亲合力常数 K_D 及 N 值等信息(表 1)。

表 1 ITC 测试结果及拟合

$K_D(M)$	$N(sites)$	$\Delta H(kcal/mol)$	$\Delta G(kcal/mol)$	$-T\Delta S(kcal/mol)$
$15.30E-6\pm3.40E-6$	0.73 ± 0.26	-4.54 ± 1.15	-6.58 ± 0.12	-2.04 ± 1.05

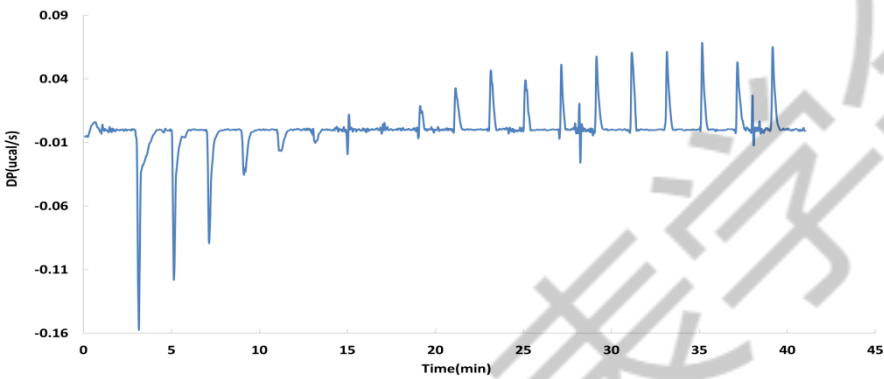


图 1 TZ-P1 滴定结果

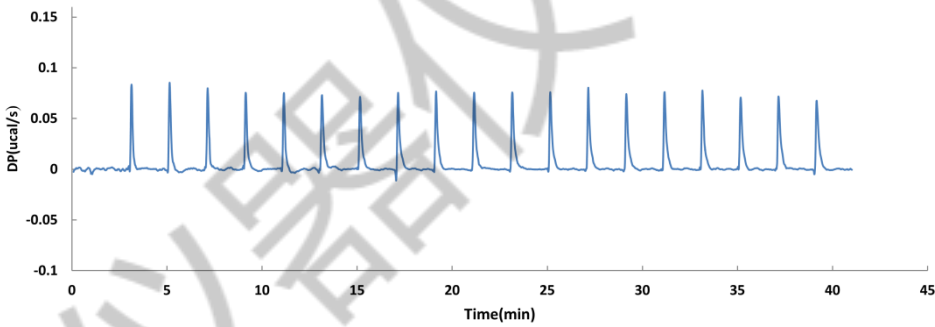


图 2 TZ-PBS 滴定结果

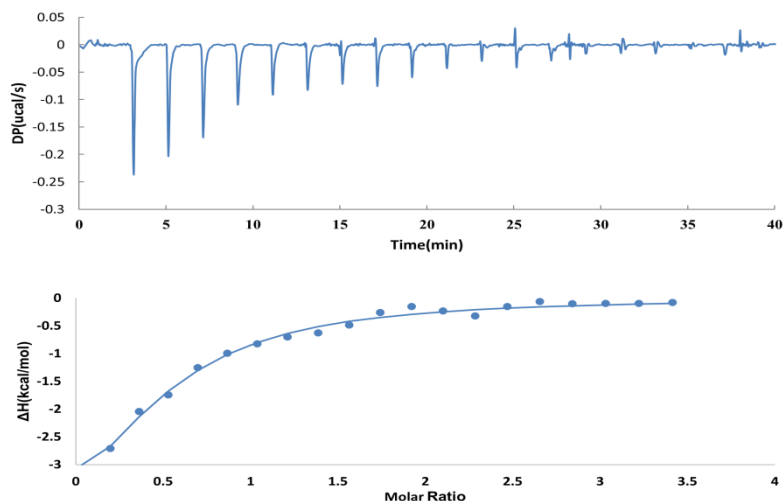


图3 扣减后的滴定结果及拟合

3.2 MST 测试结果分析

用仪器分析软件 Affinity Analysis software 对测试结果进行处理，得到标准化的荧光值 ΔF_{norm} (图 4)并绘制拟合结合曲线(图 5)，从而得到亲和力常数 K_D 等信息(表 2)。

表 2 MST 测试参数及拟合结果

target(M, fixed)	ligand(M)	K_D (M)	Response Amplitude	S/N
2.50E-07	0.50E-3to1.53E-9	43.60E-6±14.50E-6	2.78	15.80

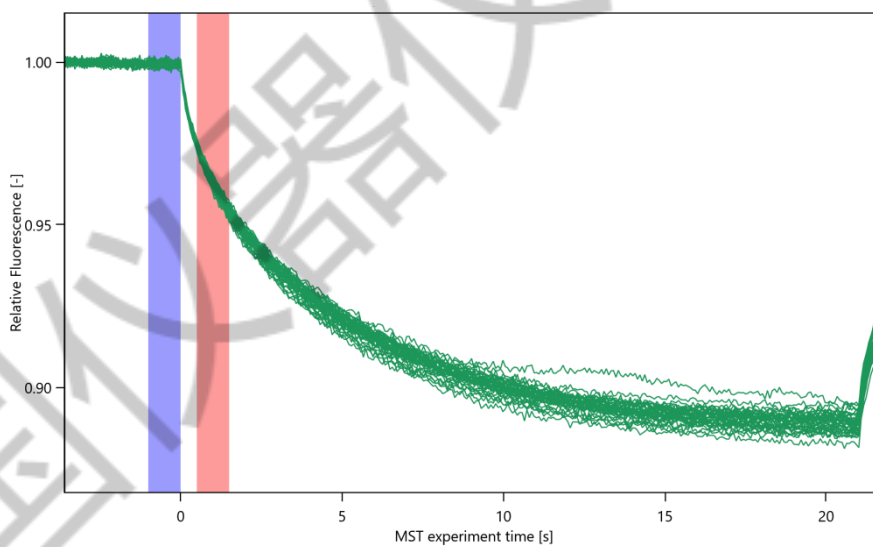


图4 TZ-P1 MST 检测结果

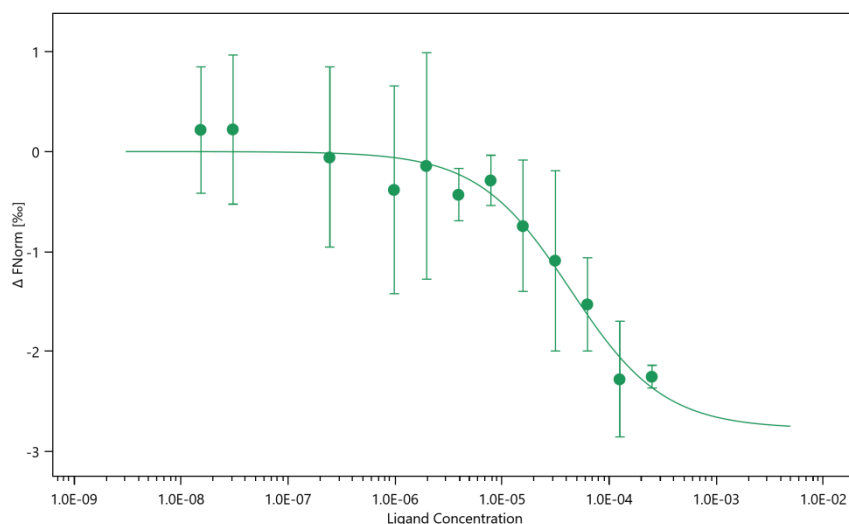


图5 TZ-P1 亲和力拟合

3.3 讨论与展望

将 ITC 和 MST 各项技术参数及实验测试结果进行比较, 如表 3 所示。在 ITC 实验中, 样品无需标记, 但缓冲液条件要求严格, 所需样品量较大。MST 技术对样品溶解性、缓冲液条件等较友好, 所需样品量较少, 但对其中一个样品需要做荧光标记, 该标记过程可能会对实验体系有所干扰。本实验中, P1 蛋白在毛细管中有吸附现象, 由此引入的含量为 0.05% 的 Tween-20 可能是 MST 测得亲和力较弱的原因。本案例中, ITC 和 MST 技术虽原理不同, 但检测结果可相互验证, 且 ITC 可提供热力学参数信息, 为后续研究提供更多的实验数据^[5]。但当所检测样品量较少、检测样品的缓冲液不一致或者缓冲液成分复杂的情况下, 可选择 MST 技术进行检测, 同样可以得到亲和力常数等结合信息。因此, 实验者面对不同的检测需求时, 可根据具体实验条件: 包括样品性质、缓冲液成分以及最终的实验目的而选择最适合的技术手段。

表 3 ITC 和 MST 测试结果及参数对比

技术名称	ITC	MST
实验目的	定量检测亲和力常数	定量检测亲和力常数
实验结果	亲和力大小及热力学常数	亲和力大小
实验时间(h)	1	0.2-0.5
K _D 范围(Mol)	10 ⁻² -10 ⁻⁹	10 ⁻³ -10 ⁻⁹
样品状态	溶液	溶液
缓冲液成分	PBS	PBS+0.05% tween20
样品量	P1 30 μmol/L, 200 μL	P1 500 nmol/L, 180 μL

	TZ 500 $\mu\text{mol/L}$, 40 μL	TZ 1 mmol/L , 20 μL
是否需要标记	无需标记	需荧光标记
耗材	无	荧光染料、脱盐柱、毛细管
$K_D(\text{Mol})$	15.30E-6	43.60E-6
K_D 是否一致	是	是

目前, 分子间相互作用定量检测技术呈现多元化发展趋势^[11]。本文通过 ITC 和 MST 两种技术分别检测 P1-TZ 的结合且亲和力结果可互为验证。生物大分子间相互作用形成复合物结构, 基本上都是热量驱动过程。ITC 技术可灵敏地检测到整个结合过程中的热量变化, 准确测定结合常数(K_D)、反应化学计量比(N)、焓(ΔH)和熵(ΔS)等热力学信息^[5], 为阐明潜在的分子间相互作用机制提供了相应的实验依据, 有利于深入了解蛋白质结构与其功能之间的关系^[12]。MST 技术是近几年才发展起来用于研究分子间相互作用的新技术^[9]。该技术巧妙地结合了热泳动现象的差异性及荧光检测的灵活性, 在分子相互作用检测领域有其独特的优势。MST 因其样品用量低、操作简单、检测速度快等特点, 近几年迅速发展成为生物分子特性表征的强大技术工具。分子间相互作用检测技术的发展, 从分子层面对蛋白质科学的探索有强大推动作用^[8]。技术发展有利于生物科学研究的推进, 多元化检测方法在靶向化合物筛选等方面有巨大潜力^[13], 将来必将更好地辅助科研人员在苗头化合物选择和先导化合物优化方面的研究, 有助于实验人员从多方面入手, 选择更适合实验体系的检测技术和方法。

***后附 ITC 和 MST 两种技术的操作视频。**

参考文献:

- [1]孙宇,贾凌云,任军. 蛋白质相互作用的研究方法.分析化学评述与进展,2007, (35): 760-766
- [2]余丹丹,邬瑞光.等温滴定量热技术在药物研究中的应用.中草药, 2018, 49(22): 5463-5467
- [3]吴萌,李竑,陈铭. 两种实验技术在蛋白质-蛋白质相互作用检测中的应用.生命的化学, 2021, 41(2): 353-360
- [4]Chen X P, Zhao C Y, Li X L, et al. Terazosin activates pgk1 and Hsp90 to promote stress resistance. Nature Chemical Biology, 2015, 11:19-25
- [5]Saboury A A. A review on the ligand binding studies by isothermal titration calorimetry. Journal of the Iranian Chemical Society, 2006, 3(1): 1-21

- [6] Falconer RJ, Penkova A, Jelesarov I. Survey of the year 2008: applications of isothermal titration calorimetry, *J Mol Recognit*, 2010, 23(5):39
- [7] 艾秋实, 曹向宇, 赵芊, 等. 微量热泳动原理及其在研究生物分子互作方面的应用. *生物技术通报*, 2015, 31(6): 67-73
- [8] Seidel SAI, Wienken C J, Geissler S, et al. Label-free microscale thermophoresis discriminates sites and affinity of protein–ligand binding. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 10656-10659
- [9] Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, et al. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun*, 2010, 1: 100
- [10] M Jerabek Willemssen, T Andre, R Wanner, et al. Micro Scale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure*, 2014, 1077: 101–113
- [11] Vikishg, Guankl. Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*, 2004, 261:175-186
- [12] Falconer RJ, Penkova A, Jelesarov I. Survey of the year 2008: applications of isothermal titration calorimetry, *J Mol Recognit*, 2010, 23(5):39
- [13] 刘先早, 蛋白质相互作用研究的技术方法和应用, *西南国防医药*, 2009, 19, 2