



高通量药物筛选现代检测技术研究进展

郑枫*, 刘文英, 吴峥

药品质量与安全预警教育部重点实验室; 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009

*通讯作者, E-mail: cpu_analyst@126.com

收稿日期: 2010-02-08; 接受日期: 2010-03-05

摘要 高通量药物筛选是发现创新药物的重要技术途径. 高通量筛选结果必须通过适当的检测方法才能反映出来, 检测技术是实现高通量药物筛选的基础. 本文综述了近年来有关光学分析、色谱分析、热分析、电化学分析、质谱、核磁共振等现代检测技术在高通量药物筛选研究中的进展.

关键词

高通量药物筛选
现代检测技术

1 引言

当今的药物合成研究领域利用组合化学结合计算机辅助技术的模式, 大大加速了候选药物的合成速度, 急剧增加了合成化合物的数目, 加上中药本身蕴含的庞大天然化合物库, 药物活性筛选的速度与规模成为制约新药研发的瓶颈环节, 因此对高通量药物筛选(high throughput screening, HTS)的研究愈显重要^[1-3].

高通量药物筛选技术是以分子水平和细胞水平的实验方法为基础, 采用自动化操作系统执行实验过程, 以灵敏快速的检测仪器采集实验数据, 再通过计算机对实验获得的数据进行分析处理. 由于高通量药物筛选模型中分子、细胞水平上的相互作用, 只有采用适当的检测方法才能以可视化的形式反映出来, 因此高通量的检测方法是实现 HTS 的关键技术之一^[4]. 本文综述了 HTS 中现代检测技术的研究进展, 主要涵盖光学分析、色谱分析、热分析、电化学分析、质谱、核磁共振等分析检测技术.

2 光学检测技术

在 HTS 中最常见的筛选方式是以微孔板作为反应载体, 将样品和生物活性分子均匀分布, 形成混合

状态的均相筛选法(homogeneous screening assay)^[5]. 这种筛选方式如果要想实现原位检测, 则筛选系统本身必须含有理想的检测信号, 用于评价样品的作用强弱, 而且检测系统能与微孔板反应载体兼容, 易于实现筛选操作的自动化. 光学检测信号在这方面体现出了特殊优势, 以微孔板为基础的高通量光学检测系统可以追溯到最初的酶标仪, 现在的高通量检测仪器兼容的微孔板密度已经由最初的 96 孔增加到 384 孔, 部分仪器甚至可以使用 1536 孔板进行测量, 大幅度提高了筛选通量^[6]. 光学检测技术也由单一的紫外-可见光检测扩大到化学发光检测、荧光检测和多种光学传感技术, 为高通量检测开辟了较广泛的应用领域.

2.1 紫外-可见光检测技术

紫外-可见光检测技术是酶抑制剂的高通量药物筛选中应用最为广泛的检测手段之一^[7], 主要检测形式是通过酶促反应产物的光吸收强度来测定酶活力, 进而评价不同抑制剂的抑制程度. 柳军等^[8]建立了筛选降糖药物的糖原磷酸化酶(GPa)抑制剂高通量筛选模型, 依据磷酸化酶水解糖原后生成的磷酸根与钼酸铵/孔雀绿反应的产物在 655 nm 处有特异性吸收的性质. Jimsheena 等^[9]建立的血管紧张素 1 转换酶(ACE)抑制剂 HTS 方法, 其检测原理是根据 ACE 酶

解底物后生成的马尿酸在 410 nm 处有强吸收的这一特性。

2.2 化学发光检测技术

化学发光检测技术也在酶抑制剂筛选中得到了应用, Guardigli 等^[10]通过酶促反应产物硫酸胆碱的化学发光信号强度来评价乙酰胆碱酯酶(AChE)的活力, 并据此原理建立了乙酰胆碱酯酶抑制剂的 HTS 方法。与紫外-可见光检测技术相比, 化学发光检测技术具有高灵敏度的优势, 最近 Aljofan 等^[11]又将其成功地应用于抗新型脑炎病毒药物的高通量筛选中。

2.3 荧光标记检测技术

检测手段最为丰富多样者当属荧光检测技术, 除常规的荧光强度检测(fluorimetry)^[12]外, 基于荧光猝灭现象的荧光猝灭检测(fluorescence quenching, FQ)^[13]、测量荧光分子受偏振光激发后发射光偏振程度的荧光偏振检测(fluorescence polarization, FP)^[14]、测量由荧光受体向荧光受体能量转移引起光强度变化的荧光共振能量转移检测(fluorescence resonance energy transfer, FRET)^[15]和均相时间分辨荧光共振能量转移检测(homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer, HTRF)^[16]等多种荧光检测技术均在高通量筛选中得到了应用, 荧光检测技术适用范围也从酶抑制剂^[17, 18]筛选拓展到以受体^[19, 20]、离子通道^[21]、细胞^[22]为靶点的高通量药物筛选。

荧光检测技术的缺陷在于可产生荧光的化合物仅为少数, 对于缺乏荧光活性的筛选系统一般采用将荧光活性分子与筛选系统内分子键合标记, 作为探针反映样品的作用情况^[23, 24]。这种荧光标记检测技术灵活多样, 极大地扩展了荧光检测技术的应用范围, 使其成为HTS中应用最为活跃的检测手段之一^[25]。2005 年由国家重大科技专项“新药筛选平台研究”课题组建立的针对心血管系统药物靶点的HTS平台, 就是以荧光标记的荧光偏振检测技术为基础构建的^[26]。但值得指出的是生物活性分子键合荧光标记分子后, 也可能产生构象变化、活性结合位点的覆盖和空间阻碍等不利因素, 造成生理活性被改变^[27]。比较典型的一个例子是: Howitz等^[28]根据荧光标记检测结果认为白藜芦醇等多酚抗氧化剂能有效激活去乙酰化酶SIRT1, 但随后Kaeberlein等^[29]和Borra等^[30]的研究分别证实这种激活作用实际上依赖于检

测所用荧光标记试剂。因此, 研究者应对标记技术有可能造成HTS中出现假阳性或假阴性筛选结果的问题有足够的重视。

2.4 邻近闪烁分析技术

除了荧光标记技术, 放射性同位素标记技术也在一些药物筛选模型上得到了应用^[31], 但该技术需要在检测前将游离的配体分子过滤分离, 筛选通量受到一定限制, 多结合一种称为邻近闪烁分析(scintillation proximity assay, SPA)的检测技术进行应用。SPA 技术主要采用一种键合有受体分子的荧光微球, 当同位素标记的配体与受体分子结合时, 放射性同位素分子与荧光微球之间的距离足够近, 此时放射性同位素发射出的 β 粒子能够激发微球发射荧光, 而游离的同位素标记配体与荧光微球距离较远, 不能激发荧光, 因此无需分离游离的和结合的标记配体, 只要通过检测筛选系统的荧光强度变化就可以实现受体的亲和力筛选。SPA 技术灵敏度高, 特异性强, 已被广泛应用于以酶、蛋白受体为靶点的 HTS 中^[32, 33]。由于放射性同位素的使用可能造成环境污染, 近年来出现以光敏感剂取代放射性同位素激发荧光的 Alphascreen 筛选法, 迅速在酶抑制剂^[34]及以细胞^[35]、RNA^[36]为靶点的高通量药物筛选中得到了广泛应用。这些技术在检测原理上都是以荧光检测为基础, 在应用上也有颇多类似之处, 比如 HTRF 法实际上可视为以镧系元素作为光敏感剂的 Alphascreen 筛选法, 因此广义而言只是荧光标记检测技术的应用拓展。

2.5 光学传感器技术

鉴于光学标记检测技术存在着一些固有的缺陷, 近年来具有非标记检测特征的光学传感器技术迅速成为高通量筛选检测技术研究中的“宠儿”^[37]。目前应用于药物筛选的光学传感器多是通过包被在传感器敏感膜表面(sensor substrate)的生物识别分子, 与筛选分子特异性结合时引起传感器件的光电物理特性(如光强, 折射率或电阻等)的变化, 再通过适当的换能器转换为检测信号, 从而定性、定量地检测样品的作用情况(图 1)^[38]。

光学传感检测技术特有的非标记优点, 使得其中的代表性技术如表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)技术^[39]和反射光干涉(reflectometric

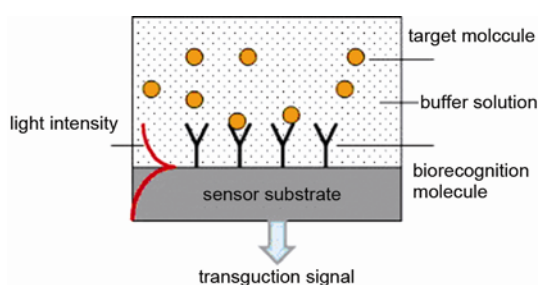


图1 光学传感器的检测原理示意图^[38]

interference spectroscopy, RIFS)^[40]技术已在高通量筛选结果验证中发挥了重要作用, 但与传统的光学检测器相比, 光学传感器技术的仪器检测成本较高, 限制了该技术的广泛应用^[41]. 比如传感器件用作能量转换中介时, 一般需要高纯度的光学材料, 如硅、光导纤维, 并经过光刻、介质沉积、等离子蚀刻等程序进行修饰, 价格不菲; 同时由于传感器件又作为筛选体系的高通量载体, 这使得光学传感器筛选通量的成本异常高昂, 因此 Cunningham 等^[42]开始研究易于增加筛选通量的传感器件如光子晶体 (photonic crystal, PC), 也有研究者转向价格较为低廉的基于光化学特性的传感器^[43].

3 色谱-光谱联用检测技术

3.1 亲和色谱技术

现代色谱法是药物研究中应用最为活跃的分离分析技术之一, 在药品质量控制、新药研发、生物医学分析等领域占据举足轻重的地位. 在种类繁多的现代色谱法分支中, 有一种利用生物分子间亲和力进行分离的液相色谱技术, 称之为亲和色谱法 (affinity chromatography, AC). 该技术最初主要用于分离纯化蛋白质等生物大分子, 随着药物筛选技术研究的深入, 亲和色谱法在高通量筛选领域的应用价值开始受到重视^[44, 45].

高通量筛选中的亲和色谱技术, 常将生物靶分子固定于基质作为固定相, 在色谱分离过程时样品与受体的特异性结合能力决定了样品的保留, 因此通过保留时间可以直接获得样品与受体亲和力的信息, 从而实现药物的活性筛选. 最早应用于药物活性筛选当属模拟生物膜结构的磷脂膜色谱 (immobilized artificial membrane chromatography, IAMC)^[46], 该法将磷脂作为色谱固定相, 用于筛选药物的亲脂性. 相

对于其他生物活性分子, 磷脂性质稳定, 色谱制备较为方便, 因此 IAMC 已经作为药物亲脂性筛选的有力手段而广受认同, IAMC 柱也已有商品化出售. 另外一种研究较多的是 HSA 蛋白质柱 (immobilized human serum albumin chromatography), HSA 柱较早主要应用于手性化合物的分离, 近年来开始用于筛选药物与蛋白的亲合力大小, 如 Mallik 等^[47]应用 HSA 柱研究了维拉帕米两种对映异构体与人血浆蛋白结合力的差异.

随着色谱技术的发展, 亲和色谱筛选技术的研究热点也层出不穷. 首先是固定化的生物活性分子种类不断增加, 纷纷涌现出以酶^[48]、受体蛋白^[49]、离子通道^[50]为作用靶点的各种色谱筛选模型. 其次, 色谱分离的检测手段日益多样化, 特别是研究者将高灵敏度的质谱检测器与亲和色谱技术联用^[51], 拓展了 AC 筛选技术的应用范围. 此外, 随着亲和色谱分离机制的研究深入, 也出现了新的亲和色谱筛选方式, 如 Schiel 等^[52]以色谱峰的峰宽来研究小分子药物与蛋白的结合速率. 而对于国内研究者而言, 应用亲和色谱进行中药活性成分筛选无疑是目前最为热门的研究领域之一^[53]. 应该说, 从筛选通量看, 亲和色谱法可能很难达到光学检测技术的规模, 但这种筛选方式的最大优势在于集分离与受体亲和力筛选于一体, 将其应用于中药活性成分筛选正是恰如其分.

3.2 毛细管电泳技术

近年来, 与亲和色谱法类似的亲和毛细管电泳法 (affinity capillary electrophoresis, ACE)^[54]在高通量药物筛选应用中开始崭露头角, Lewis 等^[55]应用 ACE 法快速筛选了 44000 多个小分子化合物与新的抗微生物蛋白靶点的亲合力, Pascoe 等^[56]应用类似的囊泡电动毛细管电泳法 (vesicular electrokinetic chromatography, VEKC) 筛选药物的亲脂性. 电泳法分离快速、高效的特点是 ACE 在高通量药物筛选应用中的突出优势之一, 但是 ACE 采用常规的紫外检测时灵敏度较低, 多需要与质谱检测器联用.

亲和毛细管电泳法中供筛选的生物活性分子一般添加在缓冲液中, 虽然与亲和色谱法中的受体固定化方法相比应用较为简便, 但是在运行过程中蛋白消耗量较大, 从这一角度看毛细管电泳前沿分析 (frontal analysis-capillary electrophoresis, FACE) 可能更适合于药物与受体的亲和力筛选. FACE 以常规的

缓冲溶液为分离介质, 进样样品为平衡的药物与受体混合物, 运行过程中游离的药物与受体分离, 经检测器检测形成平台峰, 利用峰高可以计算游离药物的浓度, 进而求得药物与受体的亲和力大小(图 2)^[57]. FACE 提供了一种与 AC、ACE 完全不同的筛选方式, 该法测定平衡状态下的亲和力也与人体实际生理环境更为接近, 是一种极具特色的受体亲和力筛选方法. FACE 目前已用于药物与血浆蛋白亲和力的筛选^[58], 随着与芯片电泳^[59]、质谱^[60]等联用技术的不断发展成熟, 毛细管电泳前沿分析技术必将在高通量药物筛选中发挥更为重要的作用.

4 质谱检测技术

质谱法是药物研究中应用最为广泛的分析技术之一, 特别是以电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)和基质辅助激光解析离子源(matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)为代表的现代质谱离子源的出现, 极大地扩展了质谱法的分析对象和应用领域, 使其成为药物靶发现与确认的重要技术手段^[61]. 应用质谱法进行药物筛选可以同时检测剩余底物量和生成产物量, 因而比光学检测技术能够提供更多的样品作用信息. 如 Deng 等^[62]应用质谱检测技术进行了 MurC 酶抑制剂的筛选, 方法灵敏度高、线性范围宽, 与传统的比色法相比避免了大量的

假阳性筛选结果. 正是具备这些优点, 质谱检测技术已经在以酶^[63]、RNA^[64]、受体蛋白^[65]为靶点的高通量药物筛选中得到了应用.

4.1 ESI离子源

在 HTS 中应用最多的还是 ESI 离子源及与之类似的 APCI 离子源, 但这类离子源难以兼容高离子强度、含不挥发性盐的溶液, 而药物筛选体系本身就是一个含有大量缓冲盐的系统, 因此质谱直接流动注射分析(flow injection analysis, FIA)技术并不适合于高通量药物筛选, 样品检测前需经过分离步骤以除去干扰组分^[66].

高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)联用技术是目前在生物样本分析中最为常用的一种分离分析技术, 不过由于色谱分离所需时间一般都需要数分钟, 不利于提高筛选通量; 即使以较短的 HPLC 分析时间 2 min/次为标准计算, 筛选 384 孔样品仍超过 12 h. 为了提高筛选通量, Roddy 等^[67]应用 Waters 公司生产的四个电喷雾离子源并行于同一质谱仪的多重离子源装置(MUX)和 Gilson 公司推出的含有多个自动进样器的 Multiple Probe 进样装置, 四台液相色谱仪连续不断进样分析, 筛选 384 孔酶抑制剂样品的时间在 2 h 左右. 这种高通量筛选模式依赖于多重离子源装置, 不仅仪器价格昂贵, 而且质谱检测灵敏度相应降低且交叉污染较难避免.

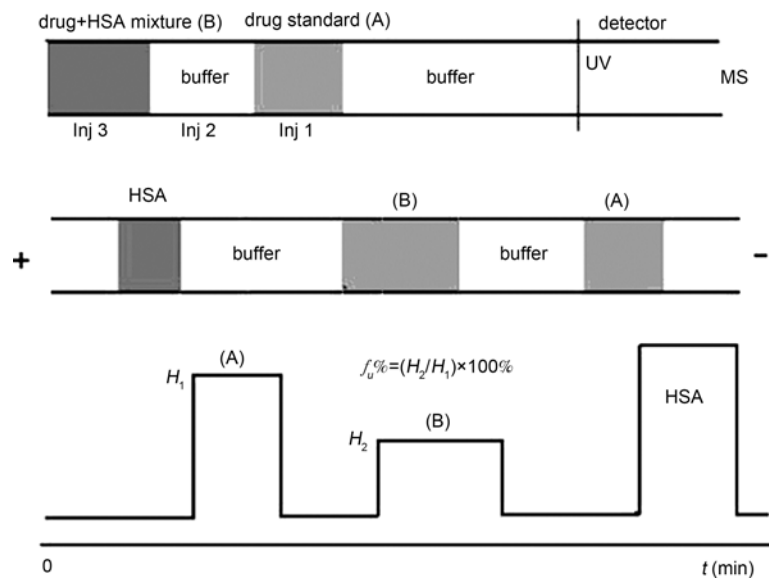


图2 FACE法测定药物与HSA亲和力示意图: H_1 代表药物对照品进样分析后的峰高, H_2 代表药物与HSA混合物进样分析后游离药物的峰高, 两者比值 $f_u = H_2/H_1$ 代表了药物与HAS的亲和力大小^[57]

在其他生物样品前处理技术中, 固相萃取技术(solid-phase extraction, SPE)所需样品量少, 便于自动化操作, 可以大大缩短样品制备时间, 处理后的样品通过流动注射直接进入质谱分析, 对于质谱法的高通量筛选检测较为有利. Ozbal 等^[68]和 Forbes 等^[69]应用 SPE 前处理技术分别建立了乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂和磷脂酰丝氨酸脱羧酶(PSD)抑制剂的质谱 HTS 模型. Maxine 等^[70]应用 BioTrove 推出的带有快速自动进样器的 RapidFire 质谱仪, 与 96 孔板固相萃取自动化装置联用后 8 h 内可以筛选的酶抑制剂样本超过 5000 个, 如采用 384 孔板筛选通量还可以进一步提高. Quercia^[71]应用该技术进行了蛋白激酶 B(PKB/AKT1)抑制剂的高通量筛选, 并与传统的邻近闪烁分析技术作了比较, 两者的筛选结果较为接近, 验证了这种质谱检测方式在 HTS 中的可行性. 虽然 SPE-FIA-MS 检测技术已经可在一定程度上满足 HTS 的要求, 但为了避免交叉污染固相萃取柱无法多次使用, 再加上本身的价格和高通量筛选必备的自动化装置更进一步增加了检测成本, 这是目前制约其广泛应用的主要障碍之一.

4.2 MALDI离子源

从检测方式上看 MALDI 离子源检测无需分离程序, 与微孔板兼容性更好, 分析速度和筛选通量较 ESI 离子源更易提高, 最近在 HTS 中也开始得到应用. 由于 MALDI 检测的基质组分会对低分子量段的质谱检测产生干扰, 不利于检测小分子底物^[72], Jason 等^[73]将 MALDI 离子源与选择性很高的三重四极杆质量分析器(MS/MS)联用后可以有效消除这种干扰. 随后 Hofner 等^[74]将 MALDI-MS/MS 技术与 96 微孔板联用, 成功用于甘露糖(α 1, 3)糖蛋白 β -1,2-N 乙酰葡萄糖氨基转移酶(mGAT1)靶点的高通量亲和力筛选(图 3), 该法通过检测标记物 NO 711 含量反映酶活力, 获得酶促反应曲线进而计算样品与靶点的亲和力大小. 而 Greis 等^[75]应用传统的飞行时间质量分析器(TOF)同样实现了酶抑制剂的高通量筛选. 这些 HTS 模型在 8 h 内的样品筛选数目都在 9000 个左右, 筛选通量要显著高于 ESI 离子源, 但是 MALDI 离子源的定量重现性较差^[76], 应用该检测技术的 HTS 模型的筛选质量仍有待进一步评价.

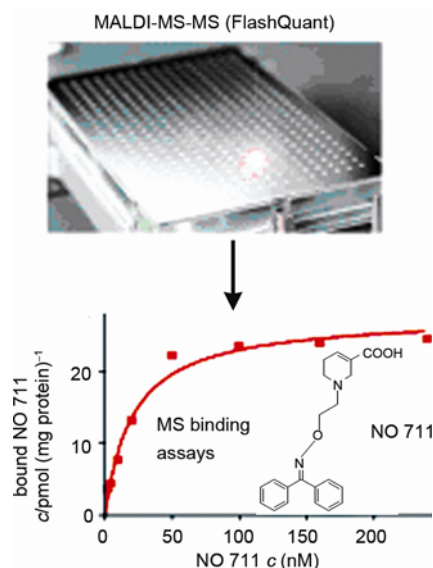


图3 MALDI 筛选 mGAT1 靶点亲和力示意图^[74]

5 电化学检测技术

电化学检测技术作为现代分析技术的重要分支, 在药物分析领域有着较为广泛的应用. 近年来, 依托膜片钳技术(patch-clamp technique)的电化学检测手段在以离子通道为靶点的高通量药物筛选中展现出了独特优势^[77, 78]. 细胞膜上的离子通道是一类重要的药物筛选靶点, 作用于离子通道的药物在很多重大疾病的治疗中发挥着重要作用^[79]. 虽然与疾病相关的离子通道不断被成功克隆, 但是对离子通道特别是以电压门控离子通道为靶点的高通量筛选一直受限于合适检测手段的缺乏^[80]. 由于离子通道的功能主要体现在控制细胞内外离子的进出, 因此研究离子通道功能的最佳方法就是依托膜片钳技术直接测定通过离子通道的电流, 其他的检测手段如荧光标记技术只是间接反映这种功能的变化^[81].

膜片钳技术一般将玻璃电化学微电极尖端吸附于细胞膜, 在微电极尖端的边缘与细胞膜之间形成高阻抗封接, 记录通过离子通道的微小离子电流, 从而研究其功能. 膜片钳技术信息含量大、分辨率高, 被认为是离子通道分析的“金标准”^[82]. 但是该技术每次只能对单个细胞进行操作, 且操作步骤繁琐复杂, 因此对高通量膜片钳技术的开发成为研究者必然的选择^[83]. 目前研究较多的是以带有微孔的平面电极板代替传统玻璃微电极的平板膜片钳技术(planar patch clamp technique). 平面电极板一般采用

硅、玻璃、塑料等绝缘材料为载体,在载体上构建 1~2 μm 的微孔作为电极,微孔上方作为细胞外室,下方作为细胞内室,并输入细胞内液流体,再在细胞外室插入金属丝构成完整的平板膜片电极,测定时将细胞引导到微孔上与细胞膜形成高阻抗封接,这样就可以简便快捷地实现多个细胞同时测定(图 4)^[84, 85]。

平板膜片钳技术的发展为离子通道活性的大规模平行筛选提供了可能,因此各大公司纷纷推出以该技术为基础的测量仪器。较早的商品化仪器是 Molecular Devices 公司生产的 Ionworks 系统,近来 Karczewski 等^[86]应用该系统成功建立了以电压门控的 Kv1.5 钾离子通道为靶点的筛选模型;Farre^[87]等将 Nation 公司生产的 Port-a-Patch 系统应用于 HEK 细胞钠离子通道的研究,显著提升了筛选通量。Tao 等^[88]使用 Axon Instrument 公司生产的 PatchXpress 技术平台研究小分子化合物对 hERG 钾离子通道的药理作用,在保证测量可靠性的同时体现了较高的筛选通量。

应用这些检测仪器,平板膜片钳技术的筛选通量可达到 384 孔样品/h,已经可在一定程度上满足离子通道的 HTS 要求。然而目前得到应用的筛选模型成功率普遍在 70%左右,而且检测仪器昂贵,特别是实现高通量检测的平面电极板价格不菲且难以循环使用,这无疑限制了该技术的进一步应用。当然针对上述不足,研究者也仍然在不断发展、改善该项检测技术,我们有理由相信以电化学检测为基础的膜片钳电极阵列技术将在离子通道的 HTS 中发挥更为重要的作用。

6 热分析检测技术

各种热分析技术是药物熔点测定、纯度检查、多晶型分析、药物中结晶水与吸附水确认等新药研究项目中不可或缺的重要技术。其中差示扫描量热法

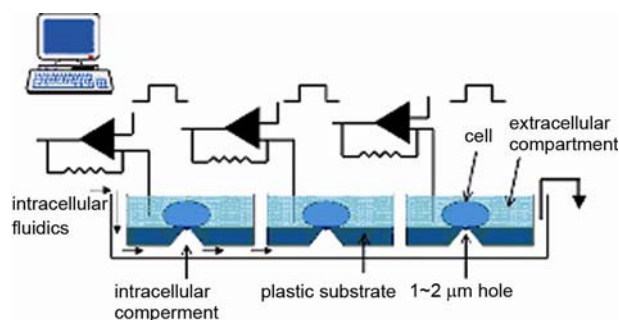


图 4 平板膜片钳技术工作示意图^[84]

(differential scanning calorimetry, DSC)是通过测量热量变化与温度、时间之间关系的一种技术。以该技术原理为基础的等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)目前已经在分子识别、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质-小分子相互作用等生物热力学研究中得到了广泛应用^[89]。药物分子与生物活性分子如蛋白受体、酶之间的相互作用,与上述生化反应一样往往伴随着热量的变化,因此将等温滴定量热法作为检测手段进行高通量药物筛选日益受到研究者的重视^[90]。

等温滴定量热法的工作原理与常规差示扫描量热法相似,只是增加了一个配体滴定模板(ligand titrant)(图 5)。应用 ITC 法研究药物分子与受体间相互作用时,常采用一定量的受体分子作为被滴定物,而一定浓度的药物分子作为滴定配体匀速地滴加到受体分子所处的隔热罩中,同时测量滴定过程中样品池(sample cell)和参比池(reference cell)热量差的变化,获得滴定热量差随时间的变化曲线图。结合根据单点结合模型所建立的数学表达式对该变化曲线进行非线性拟合,可求得得到药物分子与受体之间的亲和力常数^[91]。在上述实验和数据处理模型基础上,ITC 法在以核苷酸^[92]、蛋白受体^[93]、酶^[94]为靶点的药物快速筛选中得到了一定应用。由于 ITC 法不仅能够测得体系吉布斯自由能的变化,还能够同时测得体系中焓变和熵变对吉布斯自由能变化的数据,因此在测定亲和力常数之外,ITC 法可以提供更多关于结合反应特征的信息。Carbonell 等^[95]应用 ITC 法研究了他汀类降血脂药物与 HMG-CoA 还原酶受体靶点之间的结合性质,根据不同药物结合反应时焓变和熵变对吉布斯自由能变化的不同贡献,认为结合过

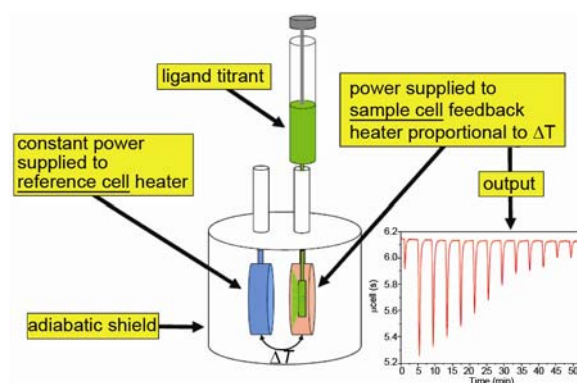


图 5 等温滴定量热仪工作示意图^[91]

程中体系的焓变反映了药物与受体靶点的特异性结合力,与药效相关;而熵变反映了药物的非特异性结合力,与药物的副作用相关。

由于热效应是各种生物化学反应的本质特征之一,因此 ITC 法检测的应用范围较广;而通过 ITC 法检测可以研究药物与受体靶点结合的特异性,这更是其他检测技术较难具备的特殊优势,凸显了 ITC 法在高通量药物筛选中诱人的应用前景^[96]。ITC 法在 HTS 中应用的主要障碍在于筛选通量的不足,即使采用最新商品化的 Micro Cal 微型 ITC 仪进行药物筛选,一天的筛选容量也仅为 384 孔样品,与其他检测技术尚有不小差距^[97]。加上 ITC 法进行药物筛选时所需靶点分子的用量较大,因此目前 ITC 法仅在药物确证筛选方面发挥了一定作用,要作为 HTS 的常规检测技术仍需要在仪器微型化方面取得进一步的突破^[98]。

7 核磁共振检测技术

核磁共振是指一种核磁矩不为零的原子核,在外磁场的作用下,核自旋能级发生塞曼分裂,共振吸收特定频率的射频辐射的物理过程。自上个世纪 50 年代发现这一现象以来,核磁共振技术逐渐成为解析有机化合物结构的有力手段。近年来随着高场核磁共振仪的问世和多维谱技术的成熟,核磁共振技术的应用范围也从有机小分子拓展到了生物大分子领域。作为目前在原子分辨率下测定溶液中生物大分子三维结构的唯一手段,核磁共振技术在研究蛋白质-配基相互作用方面具有特殊优势,是新药研发的重要研究技术之一^[99]。

在先导化合物确证和优化中,一般对不同药物浓度与蛋白质相互作用后、蛋白质 ^1H - ^{15}N HSQC (heteronuclear single quantum coherence)谱在接近生理条件下鉴定或验证候选药物与靶点亲和力的大小^[100],但对于 HTS 而言,费时、昂贵的二维谱并不适合作为一种常规的检测手段,研究者一般致力于将分析时间较短的一维核磁共振谱应用于高通量筛选^[101, 102]。Robert 等^[103]提出将 ^1H -NMR 应用于药物筛选的方法,其主要原理在于通过滴加受体分子,根据不同受体浓度对于小分子化合物 ^1H 谱吸收峰强弱的变化,结合一定的数学处理模型计算得到亲和力的大小。利用该技术测得了 27 个化合物与人血清白蛋白之间的受体亲和力,并将其与常规手段测定结果

进行了线性回归,回归系数达到 0.81。通过不同浓度样品与检测信号变化的关系来测定受体亲和力的大小是高通量筛选中常用的筛选形式,应用该法时一般测量 6 个浓度点以上样品,以便获得稳定的亲和力和常数。鉴于核磁共振技术分析速度慢,且难以并行检测,无疑应用单点竞争筛选法更为现实。

单点竞争筛选试验需要使用一种参比物作为探针分子,通过研究待测样品对探针分子与受体亲和的竞争程度来推算样品的受体亲和力,应用核磁共振技术时这种竞争程度可通过核磁共振谱中检测信号的变化来反映^[104]。目前研究较多的一种筛选方式是 Dalvit 等^[105]提出的 ^{19}F -NMR 竞争筛选法,该法通过测量待测样品加入前后 ^{19}F -NMR 谱共振信号强度的变化来表征待测样品对探针分子的竞争置换能力,可供检测的靶点包括了丝氨酸/苏氨酸 p21 活化激酶、人血清白蛋白等^[106]。这种技术关键是需要找到与受体有一定亲和力的 ^{19}F 标记探针分子,虽然目前 ACD-SC(available chemicals directory-screening compounds)筛选化合物库中大约 12% 的分子含有氟原子,但是很多情况下仍然需要专门合成这种探针分子^[107, 108]。为提高检测的通用性,最近研究者又转向运用 ^1H -NMR 竞争筛选法^[109],但是这种方式中的探针分子与待测样品之间的谱线往往会发生重叠,实际应用中仍有很大的局限性。

总体来看,与核磁共振技术在解析生物大分子结构和研究其相互间作用的重要性地位相比,核磁共振检测技术在高通量药物筛选中仍未得到广泛应用。这主要是由于核磁共振技术设备要求高,难以并行检测,且筛选所需受体用量大等限制造成的。但是核磁共振技术从原子核维度提供样品与受体作用的信息,其价值又是其他检测技术所不具备的,预期未来会在 HTS 中发挥更为重要的作用。

8 总结与展望

针对 HTS 的特殊要求,一种理想的分析检测技术应具备下列特点:高通量;原位直接检测;检测成本低;靶点无需标记或修饰;精准地反应筛选结果,避免出现假阳性或假阴性结果;适合初次筛选(primary screening)、深入筛选(secondary screening)和确证筛选(confirmatory screening);适合受体、酶、离子通道、细胞等多种筛选模型。应该说,到目前为止

并没有一种检测技术能完全具备上述特征, 仍然需要不断发展各种高通量筛选检测技术。

HTS 中的光学检测技术具有无需分离即可实现原位检测、筛选通量高、检测成本低、检测仪器成熟的突出优势, 只是筛选系统本身就具有理想的光学检测信号的机会并不多, 因此在高通量药物筛选中往往要结合标记技术以扩展光学检测的应用范围。这种光学标记检测技术灵活多样, 已成为高通量药物筛选中应用最为广泛的检测方法之一。随着研究的深入, 发现了生物活性分子键合标记分子后, 可能引起构象变化, 活性结合位点的覆盖和空间阻碍等一系列不利因素, 易造成药物筛选中出现假阳性与假阴性结果。

正是由于标记检测技术中存在诸多不足, 近年来与之相对应的一种称为非标记检测技术(label-free technologies)的概念逐渐兴起与流行, 迅速成为HTS研究领域的新热点^[110, 111]。非标记检测技术所涵盖的并不仅限于光学传感器检测技术, 其他的

一些检测技术, 如质谱检测技术、膜片钳电极阵列技术、热分析检测技术等实际上都具有非标记检测的特征。与光学检测技术相比较而言, 这些检测技术能够提供丰富的样品与靶点作用信息, 准确地反应筛选结果, 避免了假阳性或假阴性结果的出现, 其优势已不仅是非标记这一点。此外, 解析生物大分子结构的重要手段如核磁共振技术、X射线晶体衍射技术^[112]、电子显微镜技术^[113], 在高通量药物筛选中的应用价值也逐渐受到研究者的关注。

非标记检测技术虽然还受到检测成本、检测通量等方面的限制, 目前在高通量药物筛选中应用范围也还没有光学检测技术那么广泛, 但在一些筛选模型应用中已经体现出了诸多优势, 完善、发展这些检测技术已被视为未来高通量药物筛选研究的重要发展方向^[114]。而这些技术的进一步发展与应用, 必将表明合理运用现代药物分析技术的重要性, 在推动高通量药物筛选技术发展乃至创新药物发现中起着关键作用。

致谢 本工作得到国家自然科学基金(30901878)项目资助, 特此致谢。

参考文献

- 1 Carnero A. High throughput screening in drug discovery. *Clin Transl Oncol*, 2006, 8(7): 482—490
- 2 Macarron R. Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discov Today*, 2006, 11(7-8): 277—279
- 3 Snowden M, Green DV. The impact of diversity-based, high-throughput screening on drug discovery: “chance favours the prepared mind”. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2008, 11(4): 553—558
- 4 Fan F, Wood KV. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol*, 2007, 5(1): 127—136
- 5 杜冠华. 高通量药物筛选模型和常用技术方法. 高通量药物筛选, 化学工业出版社, 2002, 66—87
- 6 Pfeifer MJ, Scheel G. Long-term storage of compound solutions for high-throughput screening by using a novel 1536-well microplate. *J Biomol Screen*, 2009, 14(5): 492—498
- 7 von Ahsen O, Bömer U. High-throughput screening for kinase inhibitors. *Chembiochem*, 2005, 6(3): 481—490
- 8 柳军, 牛蓁, 张陆勇. 糖原磷酸化酶抑制剂高通量筛选模型的建立. 中国新药杂志, 2007, 16(6): 447—450
- 9 Jimsheena VK, Gowda LR. Colorimetric, high-throughput assay for screening angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Anal Chem*, 2009, 81(22): 9388—9394
- 10 Guardigli M, Pasini P, Mirasoli M, Leoni A, Andreani A, Roda A. Chemiluminescent high-throughput microassay for evaluation of acetylcholinesterase inhibitors. *Anal Chim Acta*, 2005, 535(1-2): 139—144
- 11 Aljofan M, Porotto M, Moscona A, Mungall BA. Development and validation of a chemiluminescent immunodetection assay amenable to high throughput screening of antiviral drugs for Nipah and Hendra virus. *J Virol Methods*, 2008, 149(1): 12—19
- 12 曹鸿鹏, 陶佩珍, 杜冠华. 流感病毒神经氨酸酶抑制剂筛选模型的建立和应用. 药科学报, 2002, 37(12): 930—933
- 13 Tani H, Akimitsu N, Fujita O, Matsuda Y, Miyata R, Tsuneda S, Igarashi M, Sekiguchi Y, Noda N. High-throughput screening assay of hepatitis C virus helicase inhibitors using fluorescence-quenching phenomenon. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(4): 1054—1059
- 14 Huang XY, Aulabaugh Ann. Application of fluorescence polarization in HTS assays. *High Throughput Screening: Methods and Protocol*, 2nd ed, 2009, 565: 127—143
- 15 Tian H, Luo H, Chang DC, Luo KQ. A high throughput drug screen based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for anticancer activity of compounds from herbal medicine. *Br J Pharmacol*, 2007, 150(3): 321—334

- 16 Patnaik D, Jun X, Glicksman MA, Cuny GD, Stein RL, Higgins JM. Identification of small molecule inhibitors of the mitotic kinase haspin by high-throughput screening using a homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay. *J Biomol Screen*, 2008, 13(10): 1025—1034
- 17 Guang HM, Du GH. High-throughput screening for monoamine oxidase-A and monoamine oxidase-B inhibitors using one-step fluorescence assay. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(6): 760—766
- 18 Mori T, Itami S, Yanagi T, Tatara Y, Takamiya M, Uchida T. Use of a real-time fluorescence monitoring system for high-throughput screening for prolyl isomerase inhibitors. *J Biomol Screen*, 2009, 14(4): 419—424
- 19 Gilchrist MA, Cacace A, Harden DG. Characterization of the 5-HT_{2b} receptor in evaluation of aequorin detection of calcium mobilization for miniaturized GPCR high-throughput screening. *J Biomol Screen*, 2008, 13(6): 486—493
- 20 Shukla SJ, Nguyen DT, MacArthur R, Simeonov A, Frazee WJ, Hallis TM, Marks BD, Singh U, Eliason HC, Printen J, Austin CP, Inglese J, Auld DS. Identification of pregnane X receptor ligands using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and quantitative high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol*, 2009, 7(2): 143—169
- 21 Gonzalez JE, Maher MP. Cellular fluorescent indicators and voltage/ion probe reader (VIPRTM): tools for ion channel and receptor drug discovery. *Receptor Channel*, 2002, 8(5-6): 283—295
- 22 Robers MB, Horton RA, Bercher MR, Vogel KW, Machleidt T. High-throughput cellular assays for regulated posttranslational modifications. *Anal Biochem*, 2008, 372(2): 189—197
- 23 Chan PH, Chan KC, Liu HB, Chung WH, Leung YC, Wong KY. Fluorescein-labeled beta-lactamase mutant for high-throughput screening of bacterial beta-lactamases against beta-lactam antibiotics. *Anal Chem*, 2005, 77(16): 5268—5276
- 24 Richard ME, Roger B, Terry R. Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev Technol*, 2007, 5(3): 425—452
- 25 An WF. Fluorescence-based assays. *Cell-Based Assays for High-Throughput Screening: Method and Protocols*. 2009, 97—107
- 26 我国荧光偏振技术成功应用于药物高通量筛选. *中国药科大学学报*, 2005, 3: 249
- 27 Shiau AK, Massari ME, Ozbal CC. Back to basics: label-free technologies for small molecule screening. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, 11(3): 231—237
- 28 Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 2003, 425(6954): 191—196
- 29 Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, Napper A, Curtis R, Distefano PS, Fields S, Bedalov A, Kennedy BK. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 17038—17045
- 30 Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT₁ activation by resveratrol. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 17187—17195
- 31 Brengdahl J, Fowler CJ. A novel assay for monoacylglycerol hydrolysis suitable for high-throughput screening. *Anal Biochem*, 2006, 359(1): 40—44
- 32 Glickman JF, Schmid A, Ferrand S. Scintillation proximity assays in high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol*, 2008, 6(3): 433—455
- 33 Khawaja X, Dunlop J, Kowal D. Scintillation proximity assay in lead discovery. *Expert Opin Drug Discovery*, 2008, 3(11): 1267—1280
- 34 Xu Z, Nagashima K, Sun D, Rush T, Northrup A, Andersen JN, Kariv I, Bobkova EV. Development of high-throughput TR-FRET and AlphaScreen assays for identification of potent inhibitors of PDK1. *J Biomol Screen*, 2009, 14(10): 1257—1262
- 35 Smotrov N, Mathur A, Kariv I, Moxham CM, Bays N. Development of a cell-based assay for measurement of c-Met phosphorylation using AlphaScreen technology and high-content imaging analysis. *J Biomol Screen*, 2009, 14(4): 404—411
- 36 Mills NL, Shelat AA, Guy RK. Assay optimization and screening of RNA-protein interactions by alpha screen. *J Biomol Screen*, 2007, 12(7): 946—955
- 37 Gauglitz G, Proll G. Strategies for label-free optical detection. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 2008, 109: 395—432
- 38 Fan XD, White IM, Shopova SI, Zhu HY, Suter JD, Sun YZ. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal Chim Acta*, 2008, 620(1-2): 8—26
- 39 Abdulhalim I, Zourob M, Lakhtakia A. Surface plasmon resonance for biosensing: a mini-review. *Electromagnetics*, 2008, 28(3): 214—242
- 40 Gauglitz G. Multiple reflectance interference spectroscopy measurements made in parallel for binding studies. *Rev Sci Instrum*, 2005, 76(6): 22—24
- 41 Rebecca LR, David G, Myszk DG. Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Anal Biochem*, 2007, 361(1): 1—6
- 42 Cunningham BT, Laing GL. Advantages and application of label-free detection assays in drug screening. *Expert Opin Drug Discov*, 2008, 3(8): 891—901
- 43 Bosch ME, Sánchez AJ, Rojas FS, Ojeda CB. Optical chemical biosensors for high-throughput screening of drugs. *Comb Chem High*

- Throughput Screen*, 2007, 10(6):413—432
- 44 Ng E, Schriemer DC. Emerging challenges in ligand discovery: new opportunities for chromatographic assay. *Expert Rev Proteomics*, 2005, 2(6): 891—900
 - 45 Wan H, Fredrik B. High throughput screening of drug-protein binding in drug discovery. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2007, 30(5-8): 681—700
 - 46 Stewart BH, Chan OH. Use of immobilized artificial membrane chromatography for drug transport applications. *J Pharm Sci*, 1998, 87(12): 1471—1478
 - 47 Mallik R, Yoo MJ, Chen S, Hage DS. Studies of verapamil binding to human serum albumin by high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 876(1): 69—75
 - 48 Ella SM, Yang F, Kameyama A, Palcic MM, Hindsgaul O, Schriemer DC. High-throughput screening for enzyme inhibitors using frontal affinity chromatography with liquid chromatography and mass spectrometry. *Anal Chem*, 2005, 77: 6125—6133
 - 49 Zeng AG, Yuan BX, Zhu F, Zhao LM, He LC, Yang GD. Cell membrane chromatography correlated with functional assay for ligand- β -adrenergic receptor affinities. *Chromatographia*, 2009, 69(11): 1—5
 - 50 Kitabatake T, Moaddel R, Cole R, Gandhari M, Frazier C, Hartenstein J, Rosenberg A, Bernier M, Wainer IW. Characterization of a multiple ligand-gated ion channel cellular membrane affinity chromatography column and identification of endogenously expressed receptors in astrocytoma cell lines. *Anal Chem*, 2008, 80(22): 8673—8680
 - 51 Calleri E, Temporini C, Caccialanza G, Massolini G. Target-based drug discovery: the emerging success of frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry. *ChemMedChem*, 2009, 4(6): 905—916
 - 52 Schiel JE, Ohnmacht CM, Hage DS. Measurement of drug-protein dissociation rates by high-performance affinity chromatography and peak profiling. *Anal Chem*, 2009, 81(11): 4320—4333
 - 53 邹汉法, 汪海林. 生物色谱技术分离、鉴定和筛选中药活性成分. 世界科学技术-中药现代化, 2000, 2: 9—13
 - 54 Schou C, Heegaard NH. Recent applications of affinity interactions in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2006, 27(1): 44—59
 - 55 Lewis LM, Engle LJ, Pierceall WE, Hughes DE, Shaw KJ. Affinity capillary electrophoresis for the screening of novel antimicrobial targets. *J Biomol Screen*, 2004, 9: 303—308
 - 56 Pascoe RJ, Masucci JA, Foley JP. Investigation of vesicle electrokinetic chromatography as an *in vitro* assay for the estimation of intestinal permeability of pharmaceutical drug candidates. *Electrophoresis*, 2006, 27(4): 793—804
 - 57 Wan H, Ostlund A, Jönsson S, Lindberg W. Single run measurements of drug-protein binding by high-performance frontal analysis capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(12): 1603—1610
 - 58 Martínez-Gómez MA, Carril-Avilés MM, Sagrado S, Villanueva-Camañas RM, Medina-Hernández MJ. Characterization of antihistamine-human serum protein interactions by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 2007, 1147(2): 261—269
 - 59 Nie Z, Fung YS. Microchip capillary electrophoresis for frontal analysis of free bilirubin and study of its interaction with human serum albumin. *Electrophoresis*, 2008, 29(9): 1924—1931
 - 60 Fermas S, Gonnet F, Varenne A, Gareil P, Daniel R. Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex. *Anal Chem*, 2007, 79(13): 4987—4993
 - 61 Schuchardt S, Borlak J. Quantitative mass spectrometry to investigate epidermal growth factor receptor phosphorylation dynamics. *Mass Spectrom Rev*, 2008, 27(1): 51—65
 - 62 Deng GJ, Gu RF, Marmor S, Fisher SL, Jahic H, Sanyal G. Development of an LC-MS based enzyme activity assay for MurC: application to evaluation of inhibitors and kinetic analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 35(4): 817—828
 - 63 Langsdorf EF, Malikzay A, Lamarr WA, Daubaras D, Kravec C, Zhang RM, Hart R, Monsma F, Black T, Ozbal CC, Miesel L, Lunn CA. Screening for antibacterial inhibitors of the UDP-3-O-(R-3-Hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LpxC) using a high-throughput mass spectrometry assay. *J Biomol Screen*, 2010, 15(1): 52—61
 - 64 Sannes-Lowery KA, Drader JJ, Griffey RH, Hofstadler SA. High performance mass spectrometry as a drug discovery tool: A high throughput screening assay to identify RNA-binding ligands. *Genomics And Proteomics Technologies*, 2001, 2(21): 27—36
 - 65 Muckenschnabel I, Falchetto R, Mayr LM, Filipuzzi L. SpeedScreen: label-free liquid chromatography-mass spectrometry-based high-throughput screening for the discovery of orphan protein ligands. *Anal Chem*, 2004, 324(2): 241—249
 - 66 Niessen WMA. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *J Chromatogr A*, 2003, 1000(1-2): 413—436
 - 67 Roddy TP, Horvath CR, Stout SJ, Kenney KL, Ho PL, Zhang JH, Vickers C, Kaushik V, Hubbard B, Wang YK. Mass spectrometric techniques for label-free high throughput screening in drug discovery. *Anal Chem*, 2007, 79(21): 8207—8213

- 68 Ozbal CC, LaMarr WA, Linton JR, Green DF, Katz A, Morrison TB, Brennan CJ. High throughput screening via mass spectrometry: a case study using acetylcholinesterase. *Assay Drug Dev Technol*, 2004, 2(4): 373—381
- 69 Forbes CD, Toth JG, Ozbal CC, Lamarr WA, Pendleton JA, Rocks S, Gedrich RW, Osterman DG, Landro JA, Lumb KJ. High throughput mass spectrometry screening for inhibitors of phosphatidylserine decarboxylase. *J Biomol Screen*, 2007, 12(5): 628—634
- 70 Maxine J, LaMarr WA, Can O. Mass spectrometry in high throughput screening: A case study on acetyl-coenzyme a carboxylase using rapidfire® – mass spectrometry (RF-MS). *Comb Chem High Throughput Screen*, 2009, 12(8): 752—759
- 71 Quercia AK, LaMarr WA, Myung J, Ozbal CC, Landro JA, Lumb KJ. High throughput screening by mass spectrometry: comparison with the scintillation proximity assay with a focusedfile screen of AKT1/PKB alpha. *J Biomol Screen*, 2007, 12(4): 473—480
- 72 Mirgorodskaya OA, Kozmin YP, Titov MI, Körner R, Sönksen CP, Roepstorff P. Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using 18O-labeled internal standards. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14(14): 1226—1232
- 73 Jason G, Mark C, John J, Thomas C, Tung C, Peter K, Jay C. Characterization and performance of MALDI on a triple quadrupole mass spectrometer for analysis and quantification of small molecules. *Anal Chem*, 2005, 77(17): 5643—5654
- 74 Hofner G, Merkel D, Wanner KT. MS binding assays-with MALDI toward high throughput. *ChemMedChem*, 2009, 4(9): 1523—1528
- 75 Greis KD, Zhou S, Burt TM, Carr AN, Dolan E, Easwaran V, Evdokimov A, Kawamoto R, Roesgen J, Davis GF. MALDI-TOF MS as a label-free approach to rapid inhibitor screening. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006, 17(6): 815—822
- 76 Albrethsen J. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem*, 2007, 53(5): 852—858
- 77 Asmild M, Oswald N, Krzywkowski KM, Friis S, Jacobsen RB, Reuter D, Taborski R, Kutchinsky J, Vestergaard RK, Schroder RL, Sorensen CB, Bech M. Upscaling and automation of electrophysiology: toward high throughput screening in ion channel drug discovery. *Receptor Channel*, 2003, 9(1): 49—58
- 78 Dunlop J, Bowlby M, Peri R, Vasilyev D, Arias R. High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(4): 358—368
- 79 Hubner CA, Jentsch TJ. Ion channel diseases. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(20): 2435—2445
- 80 Zheng W, Spencer RH, Kiss L. High throughput assay technologies for ion channel drug discovery. *Assay Drug Dev Technol*, 2004, 2(5): 543—552
- 81 Falconer M, Smith F, Surah-Narwal S, Congrave G, Liu Z, Hayter P. High-throughput screening for ion channel modulators. *J Biomol Screen*, 2002, 7(5): 460—465
- 82 汪海. 细胞膜膜片钳位技术与离子通道药理学. 国外医学: 药学分册, 1992, 19(2): 65—68
- 83 Kenneth A J, Nicoletta G, Zhang H, Large CH. Automated patch clamping using the QPatch. *Methods Mol Biol*, 2009, 565: 209—223
- 84 Kiss L, Bennett PB, Uebele VN, Koblan KS, Kane SA, Kirk BN. High throughput ion-channel pharmacology: planar-array-based voltage clamp. *Assay Drug Dev Technol*, 2003, 1(1): 127—135
- 85 Andrea B, Cecilia F, Claudia H, Ali H, Mohamed K, Sonja S, Michael G, Niels F. Planar patch clamp: advances in electrophysiology. *Methods Mol Biol*, 2008, 491: 165—176
- 86 Karczewski J, Kiss L, Kane SA, Koblan KS, Lynch RJ, Spencer RH. High-throughput analysis of drug binding interactions for the human cardiac channel, Kv1. 5. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(2): 177—185
- 87 Farre C, Haythornthwaite A, Haarmann C, Stoelzle S, Kreir M, George M, Brüggemann A, Fertig N. Port-a-patch and patchliner: high fidelity electrophysiology for secondary screening and safety pharmacology. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2009, 12(1): 24—37
- 88 Tao H, Santa Ana D, Guia A, Huang M, Ligutti J, Walker G, Sithipong K, Chan F, Guoliang T, Zozulya Z, Saya S, Phimmachack R, Sie C, Yuan J, Wu L, Xu J, Ghetti A. Automated tight seal electrophysiology for assessing the potential hERG liability of pharmaceutical compounds. *Assay Drug Dev Technol*, 2004, 2(5): 497—506
- 89 Cooper MA. Advances in membrane receptor screening and analysis. *J Mol Recognit*, 2004, 17(4): 286—315
- 90 Renaud JP, Delsuc MA. Biophysical techniques for ligand screening and drug design. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(5): 622—628
- 91 Ladbury JE, Chowdhry BZ. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem Biol*, 1996, 3(10): 791—801
- 92 Pagano B, Mattia CA, Giancola C. Applications of isothermal titration calorimetry in biophysical studies of G-quadruplexes. *Int J Mol Sci*, 2009, 10(7): 2935—2957
- 93 Zhou X, Sun Q, Kini RM, Sivaraman J. A universal method for fishing target proteins from mixtures of biomolecules using isothermal titration calorimetry. *Protein Sci*, 2008, 17(10): 1798—1804
- 94 Ramarao MK, Shen MW, Murphy EA, Duan W, Zhao Y, Mckew J, Lee KL, Thakker P, Behnke ML, Clark JD. Thermodynamic characterization of cytosolic phospholipase A(2) alpha inhibitors. *Anal Biochem*, 2008, 383(2): 217—225
- 95 Carbonell T, Freire E. Binding thermodynamics of statins to HMG-CoA reductase. *Biochemistry*, 2005, 44(35): 11741—11748
- 96 Peters WB, Frasca V, Brown RK. Recent developments in isothermal titration calorimetry label free screening. *Comb Chem High*

- Throughput Screen*, 2009, 12(8): 772—790
- 97 Frasca V, Plotnikov V, Rochalski A. A new automated isothermal titration calorimetry system for increased throughput. 18th Symposium of the Protein-Society. *Protein Sci*, 2004, 13: 92—93
- 98 Roselin LS, Lin MS, Lin PH, Chang Y, Chen WY. Recent trends and some applications of isothermal titration calorimetry in biotechnology. *Biotechnol J*, 2010, 5(1): 85—98
- 99 Zartler ER, Shapiro MJ. Protein NMR-based screening in drug discovery. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(31): 3963—3972
- 100 Ludwig C, Guenther UL. Ligand based NMR methods for drug discovery. *Front Biosci*, 2009, 14: 4565—4574
- 101 Peng JW, Moore J, Abdul-Manan N. NMR experiments for lead generation in drug discovery. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2004, 44(3-4): 225—256
- 102 Mercier KA, Germer K, Powers R. Design and characterization of a functional library for NMR screening against novel protein targets. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2006, 9(7): 515—534
- 103 Shortridge MD, Hage DS, Harbison GS, Powers R. Estimating protein-ligand binding affinity using high-throughput screening by NMR. *J Comb Chem*, 2008, 10(6): 948—958
- 104 Dalvit C, Ardini E, Flocco M, Fogliatto GP, Mongelli N, Veronesi M. A general NMR method for rapid, efficient, and reliable biochemical screening. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(47): 14620—14625
- 105 Dalvit C. Ligand- and substrate-based ^{19}F -NMR screening: principles and applications to drug discovery. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2007, 51(4): 243—271
- 106 Dalvit C, Ardini E, Flocco MM, Fogliatto G, Mongelli N, Veronesi M. Fluorine NMR spectroscopy for biochemical screening. US 07255985
- 107 Malgesini B, Felder E, Mongelli N, Papeo G. Improved synthesis of polyfluorinated L-lysine for ^{19}F NMR-based screening. *Mol Divers*, 2009, 13(1): 53—56
- 108 Stockman BJ. 2-fluoro-ATP as a versatile tool for ^{19}F NMR-based activity screening. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(18): 5870—5871
- 109 Dalvit C, Stockman B J. Methods for identifying ligands using competitive binding ^1H NMR experiments. US 07470543
- 110 Proll G, Steinle L, Pröll F, Kumpf M, Moehrle B, Mehlmann M, Gauglitz G. Potential of label-free detection in high-content-screening applications. *J Chromatogr A*, 2007, 1161(1-2): 2—8
- 111 Verkleeren R, Marala R. Meeting review: a summary of the label-free summit. *J Recept Signal Transduct Res*, 2009, 29(3-4): 128—131
- 112 Podust LM, von Kries JP, Eddine AN, Kim Y, Yermalitskaya LV, Kuehne R, Ouellet H, Warrier T, Alteköster M, Lee JS, Rademann J, Oschkinat H, Kaufmann SH, Waterman MR. Small-molecule scaffolds for CYP51 inhibitors identified by high-throughput screening and defined by X-ray crystallography. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(11): 3915—3923
- 113 Paran Y, Ilan M, Kashman Y, Goldstein S, Liron Y, Geiger B, Kam Z. High-throughput screening of cellular features using high-resolution light-microscopy; Application for profiling drug effects on cell adhesion. *J Struct Biol*, 2007, 158(2): 233—243
- 114 Mayr LM, Fuerst P. The future of high-throughput screening. *J Biomol Screen*, 2008, 13(6): 443—448

Development of modern detection technology for high-throughput screening

ZHENG Feng, LIU WenYing & WU Zheng

Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education; Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: High-throughput screening (HTS) is an important strategy for drug discovery. Because high-throughput screening results may be presented only by suitable detection methods, detection technology for high-throughput screening is necessary for the realization of HTS. In this paper, the development of detection technology for high-throughput screening is summarized, including optical analysis, chromatographic analysis, thermal analysis, electrochemical analysis, mass spectrum analysis, NMR analysis, etc.

Keywords: high-throughput screening, modern detection technology