

研究论文

两种微量热技术定量检测蛋白质与化合物相互作用的特色比较及相互验证

吴萌*, 王凯华, 李竑, 高大明, 陈铭

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

摘要: 分子互作技术通过检测蛋白质和其他物质相互作用的特性, 如亲和力常数等探究分子间相互作用的机制。其中, 等温滴定微量热技术(isothermal titration calorimetry, ITC)和微量热泳动技术(micro scale thermophoresis, MST)在分子互作定量检测中广泛应用。本文以一种磷酸甘油酸激酶1(phosphoglycerate kinase 1, P1)和药物分子盐酸特拉唑嗪(terazosin hydrochloride, TZ)之间的相互作用检测为例, 运用ITC和MST技术顺利获得实验结果并可相互验证, 同时对两种检测技术的优势和不足进行了深入探讨, 为不同条件下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

Comparison and mutual verification of two microthermal techniques for quantitative detection of protein-compound interactions

WU Meng*, WANG Kaihua, LI Hong, GAO Daming, CHEN Ming

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

Abstract: The technologies are used to research the mechanism of molecular interaction by detecting the characteristics of the interaction between protein and other substances, such as affinity constant. The isothermal titration calorimetry (ITC) and micro scale thermophoresis (MST) are widely used in the quantitative detection of the interaction between moleculars. In this article, the two techniques are used for the quantitative detection of the interaction between phosphoglycerate kinase (P1) and terazosin hydrochloride (TZ), and the experimental results are successfully obtained and mutually verified. Meanwhile, the pros and cons of the two detection techniques are discussed in depth, which provides new ideas for the selection of detection methods under different conditions.

Key Words: molecular interaction; isothermal titration calorimetry; micro scale thermophoresis

生命系统各个成分之间存在复杂多样的关系^[1], 蛋白质和其他生物分子间的相互作用在调控生物生理过程中发挥重要作用^[2]。深入研究生物分子相互作用, 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^[3]。

目前, 有多种研究生物分子相互作用的实验技术, 如免疫共沉淀、酵母双杂交、融合蛋白沉降等, 但这些传统方法常因蛋白量低、抗体特异性差、操作时间长等原因导致实验结果不确定或重复性差^[1]。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^[4]。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研究领域。

药物分子盐酸特拉唑嗪(terazosin hydrochloride, TZ)是一种选择性 α_1 受体阻滞剂,可用于轻中度高血压或者良性前列腺增生等疾病的治疗。2015年有文献报道, TZ可结合磷酸甘油酸激酶1(phosphoglycerate kinase 1, P1),促进P1释放三磷酸腺苷激活酶活性,并检测到亲和力 K_D 在微摩尔级别^[5]。本文分别用ITC和MST技术验证了蛋白分子P1和药物分子TZ的结合,并深入探讨了两种检测技术的应用和特点。

1 材料与方法

1.1 样品、试剂及测试耗材

P1(蛋白种属:人;表达系统:大肠杆菌;纯度>95%,相对分子质量45 000,与文献中蛋白质相同^[5]), Nanodrop测定蛋白浓度为1.5 mg/mL。

药物分子TZ,纯度>99.7%,购于Tocris Bioscience公司。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)10 $\times$,细胞培养级,购于大连美仑生物技术有限公司。Tween-20购于Thermo Fisher SCIENTIFIC公司。

MonolithTM RED-NHS二代蛋白荧光标记试剂

盒(货号MO-L011)、MST检测用毛细管(货号MO-K022)均购于诺坦普科技有限公司。

1.2 测试技术与方法

1.2.1 ITC技术原理

ITC可直接检测生物分子结合过程中的热量改变^[6],实验时保持仪器样品池和参比池温度始终相同^[6],通过加热补偿原理检测体系热量变化^[7](图1)。向样品池中加入大分子样品,样品针中加入另一个配体,且样品针不断滴加配体并以恒定速度搅拌^[7](图1)。随着配体不断加入,结合过程中的热量变化使样品池和参比池产生温度差异。热敏装置检测到该温度差后,将信号反馈至加热器,对样品池进行热量补偿,使两个池子保持温度一致^[7]。ITC仪器实时记录结合过程中的热量变化,该变化即样品间亲和力强弱。数据分析时,将所有热量峰积分并运用合适的结合模型拟合(图2),即可得到亲和力常数(K_D)、化学计量比(N)和其他热力学信息^[7,8]。

1.2.2 ITC实验操作

PBS稀释10倍至100 mL;取200 μ L P1溶液于离心管中;称取23 mg TZ溶于100 μ L PBS, TZ溶液浓度为500 μ mol/L,实验体积为40 μ L。所有样品以13 300 r/min的速度离心15 min。

25 $^{\circ}$ C恒温进行ITC检测TZ对P1和PBS分别滴定。转速750 r/min,共滴定20滴,间隔120 s。除第一滴体积0.4 μ L外,其余19滴体积均为2 μ L。相同条件下,实验重复3次,用ITC Analysis软件处理

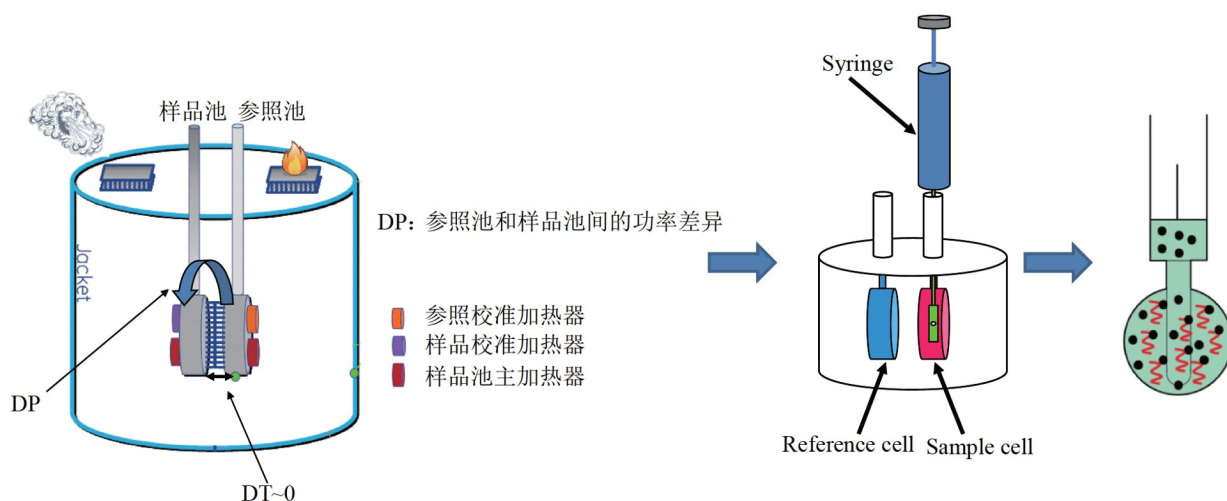


图1 ITC仪器工作原理

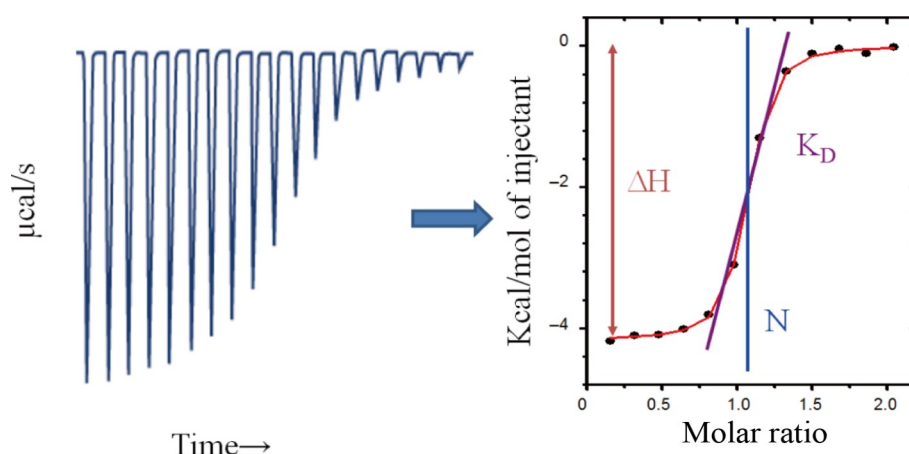


图2 ITC滴定结果及拟合

每次结果, 通过扣减背景信号, 拟合得 K_D 及相关热力学常数。

1.2.3 MST技术原理

温度梯度下溶液分子存在热泳动现象, 即Soret效应^[9,10], 该现象描述了溶液分子在温度梯度内产生的热量和分子流动^[10]。MST技术基于热泳动现象, 通过表征生物分子的相对分子质量、电荷数等特性变化, 检测分子运动速率或轨迹的改变^[10,11], 从而得到生物分子间的相互作用信息。实验时, 先将红外激光照射于光路再通过分色镜照射至毛细管中的样品, 样品中水分子即可吸收红外光发热形成温度梯度^[12](图3)。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^[12], 通过检测该荧光变化得到分子间的相互作用信息(图4)。荧光标记的样品为target, 另一个不含荧光的样品为ligand。ligand浓度做梯度稀释, 并与固定浓度的target事先混匀后即可检测(图4), 对实验结果拟合后即可测得 K_D (图4)。

1.2.4 MST实验操作

按照试剂盒标记步骤对P1标记荧光, 得到荧光标记的P1 550 μL 。用含有0.05% Tween-20的PBS将P1稀释4倍至20 μL , 与1 mmol/L TZ溶液分别装置于毛细管检测, 后续所有MST检测实验均在含有0.05% Tween-20的PBS中完成。

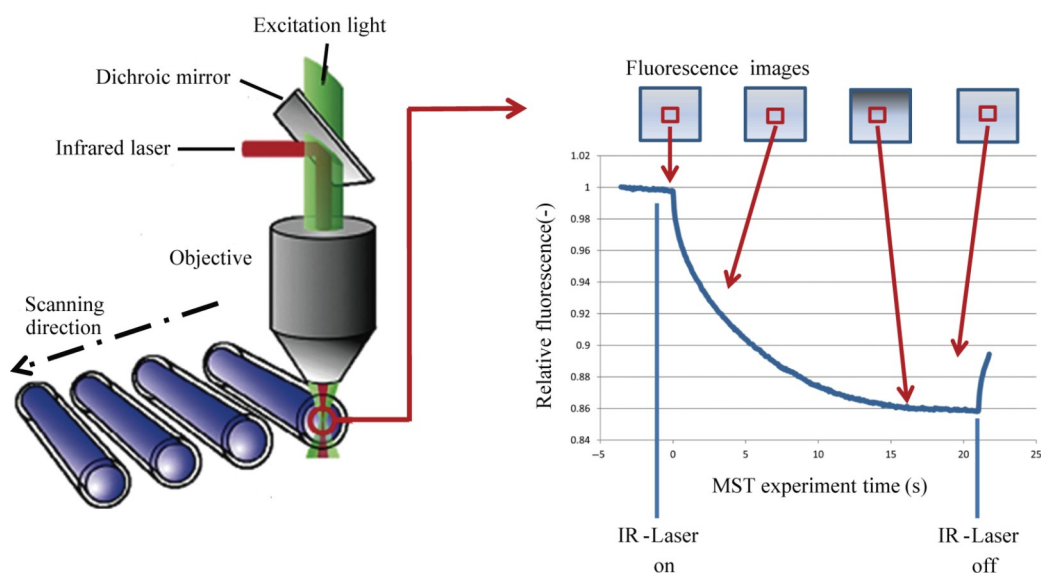


图3 MST仪器工作原理

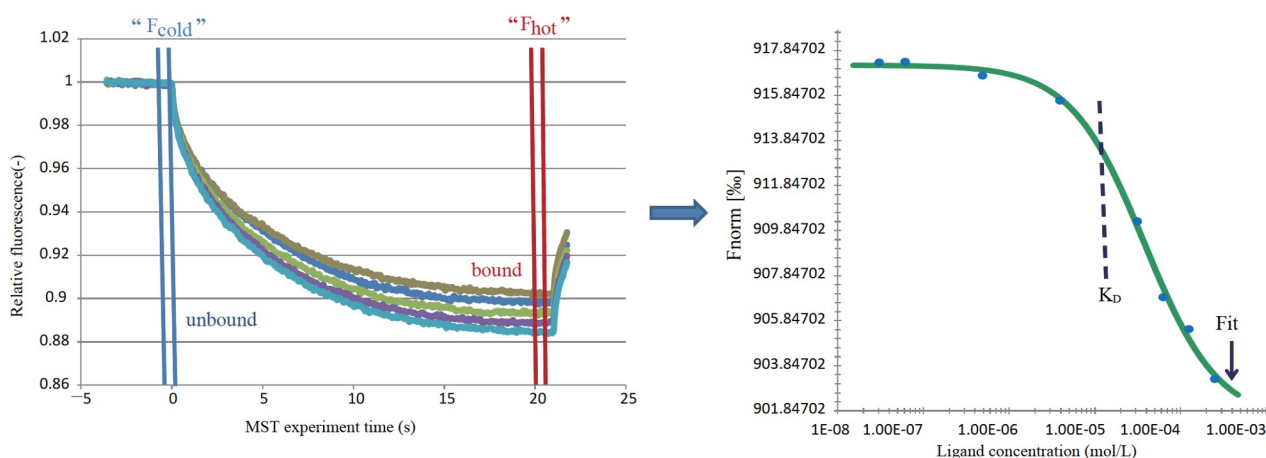


图4 MST测试结果及拟合

将ligand TZ分子从1 mmol/L进行2倍比梯度稀释16次, 最终获得10 μ L但浓度依次降低的ligand溶液。稀释P1至500 nmol/L, 160 μ L, 作为target, 按1:1体积比与每管ligand溶液混合均匀, 依次装载于16根毛细管室温下检测, Excitation Power: 20%, MST Power: 40%。相同实验条件重复3次, 使用Affinity Analysis software分析处理实验结果。

2 结果

2.1 ITC对P1和TZ亲和力测定

以第一次滴定实验的数据处理过程为例, TZ滴定P1如图5, TZ滴定PBS(control)如图6。ITC Analysis 软件扣减control后, 通过One Set of Sites 模型拟合(图7)可得到P1-TZ的亲和力常数 K_D 及N值等信息, 将3次拟合的结果合并作图(图8), 得到亲和力常数 K_D 、N值及热力学常数等(表1)。

2.2 MST对P1和TZ亲和力测定

用分析软件分别处理MST pretest实验及ligand

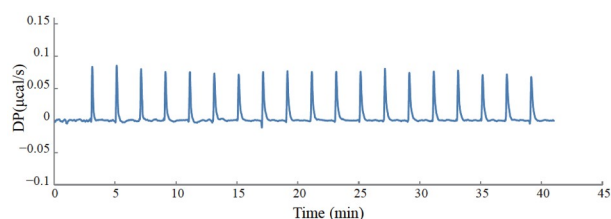


图6 TZ-PBS ITC滴定结果

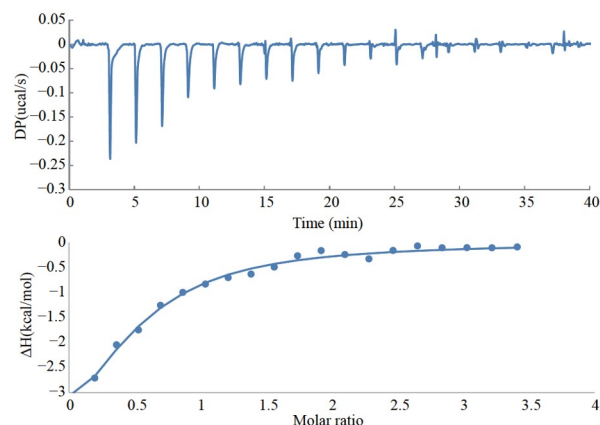


图7 ITC结果及拟合(单次实验拟合)

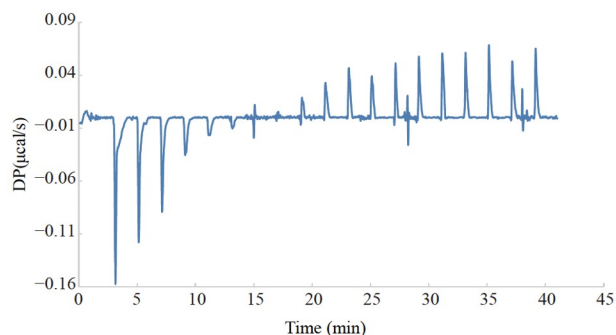


图5 TZ-P1 ITC滴定结果

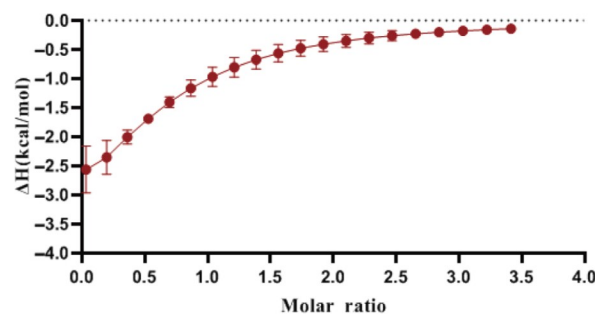


图8 归一化热量拟合

表1 ITC实验拟合结果

K_D (M)	N(sites)	H(kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	-TS(kcal/mol)
$15.30E-06 \pm 3.40E-06$	0.73 ± 0.26	-4.54 ± 1.15	-6.58 ± 0.12	-2.04 ± 1.05

表2 MST实验参数及拟合结果

Target(M, fixed)	Ligand(M)	K_D (M)	Response amplitude	S/N
$2.50E-07$	$0.50E-03 \sim 53E-09$	$43.60E-06 \pm 14.50E-06$	2.78	15.80

浓度梯度检测实验可得二者初始荧光值如图9所示, 样品状态正常且TZ无荧光干扰。亲和力检测标准化的荧光值 ΔF_{norm} (图10), 并利用 ΔF_{norm} 绘制出结合曲线(图11), 从而得到亲合力常数 K_D 等信息(表2)。

3 讨论

3.1 ITC和MST实验结果比较

ITC实验表明TZ滴定P1是放热反应^[7]。随着

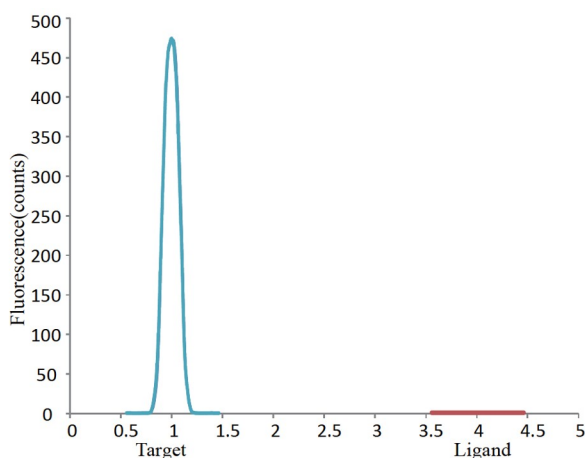


图9 TZ-P1初始荧光检测

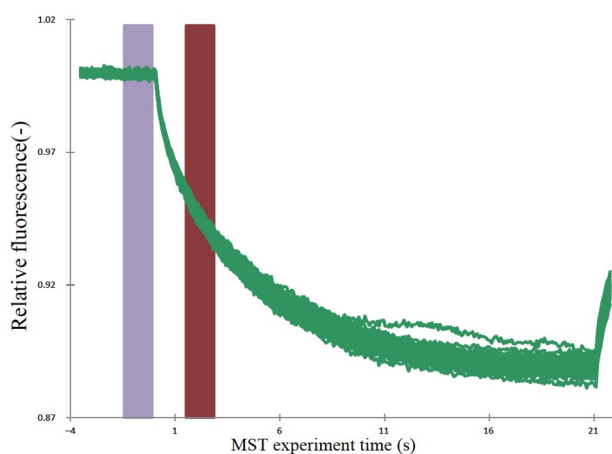


图10 TZ-P1 MST检测结果

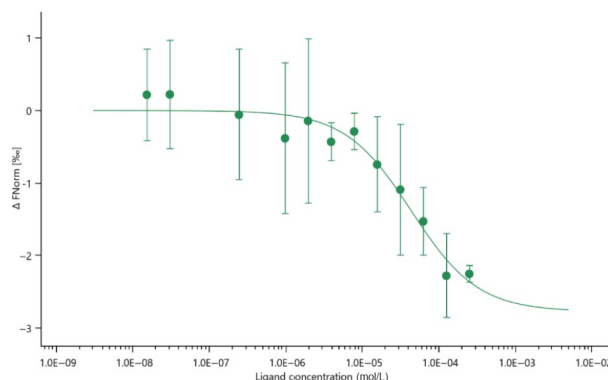


图11 TZ-P1亲和力拟合

TZ滴加, 结合反应趋于饱和, 扣减control后, 得到二者结合的真实热量变化(图7)。MST检测时, P1溶液分子在红外线开启前分布均匀^[10], 红外线开启后, 体系温度随着脉冲升温而改变, 致使荧光基团变化。P1与不同浓度的TZ结合后, 与P1特异性结合的TZ浓度越高, 结合的量越多^[10], 从而产生热泳动轨迹的梯度变化曲线(图10)。运用ITC和MST分别检测P1-TZ的亲和力, K_D 数量级相同, 可相互验证。ITC测得该反应化学计量比为0.73, 为后续样品制备过程中蛋白活性的改善提供了理论依据。MST实验中, P1存在吸附现象, 由此引入的0.05%含量的Tween-20也许是MST测得亲和力较弱的原因。将ITC和MST的各项技术参数及测试结果进行对比, 如表3所示。

生物体系内一般有两类不同的作用力: 第一类是指生物元素通过共价键结合成生物分子, 如蛋白质一级结构的形成, 各种氨基酸之间强共价键为蛋白质空间构象提供了稳定的基础^[1]。第二类作用力是非共价键结合力, 包括离子键、氢键、疏水键和范德华力等, 即通常所指的分子间相互作用力, 决定了生物分子高层次结构及生物分子之间相互识别、结合等功能^[13]。ITC和MST对于亲和力的检测范围, 均在毫摩尔到纳摩尔级。ITC检

表3 ITC和MST技术各项参数对比

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)	1E-02~1E-09	1E-03~1E-09
样品状态	溶液	溶液
缓冲液成分	PBS	PBS+0.05% Tween-20
样品量	P130 $\mu\text{mol/L}$, 200 μL	P1500 nmol/L, 180 μL
	TZ500 $\mu\text{mol/L}$, 40 μL	TZ1 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 (mol)	15.30E-6	43.60E-6
K_D 是否一致	是	是

测均相体系内可逆非共价结合,这是由于共价结合力过强导致热量太大,超出仪器检测量程所致^[7]。MST检测中,分析软件提供了 K_D 和hill两种模型对实验数据进行处理,一般的共价结合不可逆且作用力强,hill模型可描述共价结合的整体机制,获得 EC_{50} 值^[11]。本文中两种技术检测所测得的分子间相互作用力均是非共价结合力。

3.2 ITC和MST的技术特点

ITC和MST虽原理不同且各有利弊,但检测结果可相互验证。ITC还可提供热力学参数信息,为后续研究提供更多的实验数据^[1]。ITC检测的样品无需标记但缓冲液要求严格且所需样品量大。MST对样品溶解性、缓冲液等较为友好,所需样品量少,但需要做荧光标记,该标记过程也许对实验体系有所干扰。实验时,需针对不同需求和检测条件,根据具体信息如样品性质、缓冲液成分等选择适合的技术。仅需得到亲和力常数或者检测样品量较少、样品缓冲液不一致、缓冲液成分复杂等条件下,可选择MST检测;当要得到热力学常数等信息时,可选择ITC。

目前,分子间相互作用定量检测技术呈现多元化发展趋势^[14]。本文通过ITC和MST两种技术检测P1-TZ的结合且结果互为验证。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,可准确测定 K_D 、 N 、焓(H)和熵(ΔS)等热

力学信息^[7],为阐明潜在分子相互作用的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^[15]。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^[16]。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^[15]。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^[3],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。

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] 甄朱. 蛋白质组学进展. 生物工程学报, 2001, 9: 491-495
- [3] 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(2): 251-253
- [4] 吴萌,李斌,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
- [5] Chen X, Zhao C, Li X, et al. Terazosin activates pgk1 and Hsp90 to promote stress resistance. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(1): 19-25
- [6] 余丹丹, 邬瑞光. 等温微量热技术在药物研究中的应用. 中草药, 2018, 49(22): 5463-5467
- [7] Draczkowski P, Matosiuk D, Jozwiak K. Isothermal titration calorimetry in membrane protein research. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87: 313-325
- [8] Saboury AA. A review on the ligand binding studies by isothermal titration calorimetry. *J Iran Chem Soc*, 2006, 3(1): 1-21
- [9] 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
- [10] Duhr S, Braun D. Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(52): 19678-19682
- [11] Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, et al. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun*, 2010, 1(1): 100
- [12] Moran JW, Timon A, Randy W, et al. Micro Scale

- Thermophoresis: interaction analysis and beyond. [J Mol Structure](#), 2014, 1077: 101-113
- [13] Slawomir JG. Hydrogen Bonding—New Insights[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006: 51-107
- [14] Vikis HG, Guan KL. Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*, 2004, 261: 175-186
- [15] Falconer RJ, Penkova A, Jelesarov I, et al. Survey of the year 2008: applications of isothermal titration calorimetry. [J Mol Recognit](#), 2010, 23(5): 395-413
- [16] Seidel SAI, Wienken CJ, Geissler S, et al. Label-free microscale thermophoresis discriminates sites and affinity of protein-ligand binding. [Angew Chem Int Ed](#), 2012, 51(42): 10656-10659