

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104655737 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201310577902. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 11. 18

G01N 30/02(2006. 01)

G01N 30/08(2006. 01)

(71) 申请人 维亚生物科技(上海)有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区爱迪生路 334 号 5 幢

申请人 中国科学院生物物理研究所

(72) 发明人 代书炎 蔡建华 程学恒 沈坚

姜帆 李娜 陈欣 叶志雄

任德林 张荣光 毛晨

(74) 专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限

公司 31253

代理人 肖爱华

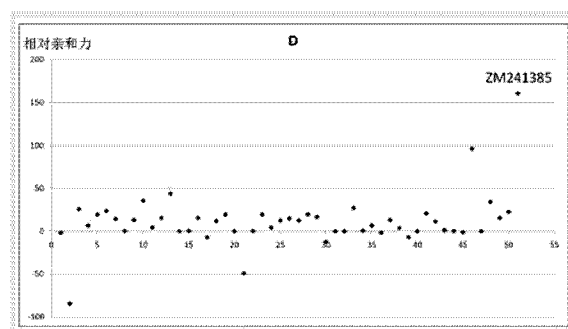
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法。该方法为:a)把纯化的膜蛋白组装到生物膜模拟系统 Nanodisc 中并去除去垢剂;b)将组装有膜蛋白的 Nanodisc 和化合物进行孵育处理;c)用重复超过滤方法将与膜蛋白有非共价结合的化合物富集于过滤膜上部;d)用液质联用仪器检测过滤膜上部化合物浓度来鉴定与膜蛋白有非共价结合的化合物。本发明提供了一种通过将膜蛋白组装到生物膜模拟系统进行样品处理,并利用液质联用技术测定小分子化合物和膜蛋白结合亲和力的方法。该方法具有不依赖任何的标记,不需要经过固定化等步骤,通量高,样品需求量少,可对混合物进行筛选,操作简单,灵敏度高等特点,适用于不同种类的膜蛋白检测,有很好的通用性。



1. 一种基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,其特征在于,按如下步骤进行:

- a) 把纯化的膜蛋白组装到生物膜模拟系统 Nanodisc 中并去除去垢剂;
- b) 将纯化、浓缩处理后的组装有膜蛋白的生物膜模拟系统 Nanodisc 和化合物进行孵育处理;
- c) 用重复超过滤方法将与膜蛋白有非共价结合的化合物富集于过滤膜上部;
- d) 用液质联用仪器检测过滤膜上部化合物浓度来鉴定与膜蛋白有非共价结合的化合物;

其中,生物膜模拟系统是由膜支架蛋白 MSP 和磷脂组成的一个圆盘状结构,膜蛋白能够插入到磷脂双分子层中;其中用于组装生物膜模拟系统的膜支架蛋白 MSP,包括由不同物种来源的脂蛋白改造而来的各种 MSP 蛋白。

2. 如权利要求 1 所述的基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,其特征在于,其中用于组装生物膜模拟系统的膜支架蛋白 MSP,包括 MSP1 和 MSP2,以及在 MSP1 和 MSP2 基础上改造获得的蛋白。

3. 如权利要求 1 所述的基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,其特征在于,其中用于组装生物膜模拟系统的磷脂,包括 POPC, DMPC, DSPG, DPPC;其中膜蛋白包括 G 蛋白偶联受体,离子通道蛋白,转运蛋白;其中化合物包括片断化合物库,天然产物化合物库中的化合物。

4. 如权利要求 3 所述的基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,其特征在于,其中超过滤过程包括一次超过滤,二次超过滤,三次超过滤。

5. 如权利要求 4 所述的基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,其特征在于,具体过程如下:首先,构建可以高表达 A_{2A} 腺苷受体的昆虫表达质粒,并把该质粒在昆虫 SF9 表达系统中进行高效表达,通过提膜、溶膜、过柱纯化制备得到溶于去垢剂的纯度高于 90% 的 A_{2A} 腺苷受体蛋白;随后,将纯的 A_{2A} 腺苷受体蛋白组装到生物膜模拟体系中,并通过疏水柱去除去垢剂,得到的生物膜模拟体系,经浓缩到一定浓度后和待筛选化合物按一定比例进行混合孵育,同时,利用未组装 A_{2A} 腺苷受体的空生物膜模拟体系作为对照;随后,用多次超过滤方法,将与膜蛋白有非共价结合的化合物富集于超过滤管上部,将经超滤管富集后的结合有化合物的蛋白样品经处理后,取上清用液质联用仪器检测其中化合物的相对含量,从而筛选出其中与蛋白有非共价结合的化合物。

6. 如权利要求 3 或 5 所述的基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,其特征在于,其中用液质联用分析样品处理过程包括:用乙腈处理使蛋白变性并与结合的化合物离解,离心使蛋白沉淀。

7. 如权利要求 6 所述的基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,其特征在于,其中超过滤过程包括将超过滤管上部的液体体积减少到起始体积的 1/10,然后再加入等同减少体积的缓冲液。

8. 如权利要求 7 所述的基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,其特征在于,将纯的 A_{2A} 腺苷受体蛋白组装到生物膜模拟体系中并去除去垢剂的具体方法如下:选择一个 2ml 的组装体系,取预先溶解在氯仿中浓度为 100mM 的 POPC 液体 110ul 放到 4ml 的 EP 管中,并用氮气缓慢吹干,使得氯仿完全挥发;待 POPC 准备好后,在 EP 管中加入 400ml 浓度为

100mM的胆酸钠,胆酸钠预先溶解于20mMTris,100mMNaCl,pH7.4的缓冲液A中,60°C水浴加热促进溶解;待POPC完全溶解后,放置在冰上冷却,然后加入1ml浓度为4mg/ml的膜支架蛋白,并加入600ml缓冲液A使得总体积为2ml,组装得到不含A_{2A}受体蛋白的Nanodisc作为空白对照;对于含A_{2A}腺苷蛋白的Nanodisc,则加入1mg的A_{2A}腺苷受体蛋白,最后用缓冲液A将总体系体积补充至2ml;将组装混合体系于4°C孵育1小时,按照0.7g/ml湿重的比例加入预先用缓冲液A处理过的纯化珠子,加入纯化珠子后,将EP管放到旋转仪上,4°C下缓慢旋转4小时去除去污剂;组装好后,静置2分钟,吸取上清,并再次加入2ml缓冲液A到纯化珠子中,轻轻混匀,静置后吸取上清,重复上述清洗过程一次,尽可能地回收Nanodisc。

9. 如权利要求8所述的基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,其特征在于,对于含有A_{2A}腺苷受体蛋白的Nanodisc,在组装好并去除去垢剂之后的进一步纯化收集和浓缩过程为:先将组装好的A_{2A}ARNanodisc加入3ml的镍柱,用20mMTris,100mMNaCl,10mM咪唑,pH7.4的缓冲液洗杂蛋白,再用20mMTris,100mMNaCl,300mM咪唑,pH7.4的缓冲液进行洗脱,收集洗脱液后浓缩至0.5ml体积,过Superdex200分子筛柱进行纯化,所用缓冲液为pH7.4,20mMTris,100mMNaCl,收集到的Nanodisc用30Kd的浓缩管浓缩到蛋白浓度为0.1mg/ml,液氮速冻后于-80°C冷冻保存。

10. 如权利要求1-9任一所述方法在发现医药、农药、兽药先导化合物中的应用。

基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,涉及一种基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法。

背景技术

[0002] 膜蛋白是生物膜功能的主要执行者之一,所有的细胞和细胞器都由磷脂双分子层所包裹,膜蛋白就与脂双层结合或镶嵌其中。根据膜蛋白在脂双层膜中的分布位置,可将膜蛋白分为外在膜蛋白(peripheral protein)和内在膜蛋白(integral protein)两大类。外在膜蛋白约占膜蛋白的 20%~30%,分布在膜的内外表面,为水溶性蛋白;内在蛋白约占膜蛋白的 70%~80%,这类蛋白部分或全部嵌入磷脂双层分子中,所以又称跨膜蛋白。内在膜蛋白露出膜外的部分含较多的极性氨基酸,属亲水性,与磷脂分子的亲水头部邻近;内在膜蛋白由于嵌入脂双层内部,主要由一些非极性的氨基酸组成,与脂质分子的疏水尾部相互结合,因此与膜结合非常紧密。据估计,核基因组编码的蛋白质中 30%左右的为膜蛋白。通过膜蛋白介导的细胞生物学反应异常涉及到许多危及人类健康的疾病,如肿瘤、心脑血管疾病以及各种炎症反应等。膜蛋白是药物开发的主要靶点,应用于临床药物中有 50%药物的靶标是膜蛋白。因此,对于膜蛋白的药物筛选研究有着非常重大的意义。在膜蛋白中,离子通道蛋白以及 G 蛋白偶联受体家族是最重要也是研究较多的膜蛋白。离子通道蛋白是细胞膜上具有特殊功能的跨膜蛋白质,由于带电的离子不能自由通过磷脂双分子层,只能通过细胞膜上的离子通道进行转运,因此离子通道蛋白在生物体的生命活动中起着至关重要的作用。离子通道膜蛋白结构异常,与许多疾病的发生和发展都有关系,如心脏病,Andersen' 综合症以及中枢神经相关的疾病等。

[0003] 而 G 蛋白偶联受体则是一类广泛存在真核生物细胞的细胞膜上,体拥有七次跨膜 α 螺旋(seven transmembrane α -helical fold)的受体,目前已经发现的 G 蛋白偶联受体已超过 800 个,不同的 G 蛋白偶联受体(GPCR)通过和相应的 G 蛋白(G protein)偶联可以对细胞外多种刺激信号作出反应,在细胞内产生神经传递、味觉、嗅觉、视觉及细胞的新陈代谢、分化、增殖、分泌等一系列生理效应。G 蛋白偶联受体中 30%是药物靶点,上千种已上市药物中接近一半是针对 G 蛋白偶联受体的,作用于 G 蛋白偶联受体的药物对疼痛、认知障碍、高血压、胃溃疡、鼻炎、哮喘等各类疾病均有良好的治疗作用¹。

[0004] 传统的膜蛋白药物筛选方法大都是通过同位素标记的配体亲和力筛选方法或者通过细胞水平的功能性酶活测试进行。这些方法通常都需要用已知的阳性化合物作为参考。而且,同位素方法使用要求严格,对实验者健康有一定的损害,对环境有一定的污染。对于孤儿受体这些筛选方法都无法应用。另外,功能性酶活检测方法通常需要针对不同的靶标蛋白发展不同的检测方法。

[0005] 利用液质联用技术检测小分子配体(抑制剂)和水溶性蛋白受体(酶)的亲和力技术文献已有报道,一般而言,液质联用技术检测蛋白和配体小分子相互作用亲和力通常具有高通量,高灵敏度,样品需求量低等特点。也有文献 1 (Niels Jonker et al. Recent

developments in protein-ligand affinity mass spectrometry Anal Bioanal Chem 399:2669-2681 (2011)) 报道在去污剂存在下应用分子排阻色谱处理样品, 随后用质谱进行小分子配体和 G 蛋白偶联受体相对亲和力测定, 或者将 G 蛋白偶联受体固定在固体表面处理样品后用质谱测定配体相对亲和力)。虽然溶解在去污剂中或固定在固体表面能达到防止 G 蛋白偶联受体形成聚集体和变性沉淀的目的, 但去污剂或固体表面的环境不能真正反映 G 蛋白偶联受体在生物膜中被磷脂双分子层所包裹的环境, 可能使最终的检测结果呈假阳性。将液质联用技术普遍应用于膜蛋白亲和力测定仍然是个挑战, 其原因还在于 (一) 膜蛋白通常要溶于去垢剂中才能稳定, 而去垢剂对质谱检测影响较大; (二) 对不同的膜蛋白要选择不同的去垢剂, 去垢剂选用不合适对检测结果影响也很大。

[0006] Nanodisc (磷脂纳米盘) 是新近发展起来的一种体外生物膜模拟系统, 这种生物膜模拟系统由膜骨架蛋白 (Membrane Scaffold Protein, MSP) 和磷脂组成一个圆盘状的结构, 膜蛋白能够插入到磷脂双分子层中, 整个生物模拟系统直径是大概在 10nm。MSP 是由人的血清载脂蛋白 A1 (human serum apolipoprotein A1) 衍生而来的。通过将 MSP、目的蛋白、磷脂分子、胆酸 (Cholate) 按照一定比例混合起来后, 再利用透析或者疏水纯化珠子去除胆酸和去垢剂, 在这个过程中, Nanodisc 就能自发的组装而成。磷脂形成脂双层, 将待组装膜蛋白稳定其中, MSP 则会像腰带一样, 缠绕在脂双层周围, 对整个结构起到稳定的作用。不同的 MSP 构建, 使得所形成的 Nanodisc 直径从 9.8-17nm; 不同的磷脂分子, 则能够控制 Nanodisc 厚度以满足不同靶蛋白的需求; 而且通过调整磷脂、MSP 和待组装膜蛋白三者的比例, 可以使得待组装膜蛋白在 NDS 中呈不同聚集状态。正因为 Nanodisc 结构稳定, 与天然的生物膜非常相似, 使得 NDS 能够很好的应用于膜蛋白的研究。此外, Nanodisc 用于膜蛋白的研究还具有其他的优势, 如单分散性, 均一性, 易制备且重复性较好, 可用于制备不同的脂环境, 具有很好的温度稳定性等。据统计, 目前已有 100 多种膜蛋白成功的组装到了 Nanodisc 中, 其中就包括了细胞色素蛋白, G 蛋白偶联受体, 离子通道蛋白和运输蛋白等。

[0007] Nanodisc 提供了一种优越的生物膜模拟系统, 以及用来测定小分子配体与膜蛋白受体亲和力的理想环境。但目前尚未有文献报道将 Nanodisc 与液质联用技术结合应用于小分子化合物配体与膜蛋白受体之间亲和力的测定。要将 Nanodisc 与液质联用结合应用于膜蛋白与配体亲和力的测定, 还存在如何更好地将膜蛋白组装到 Nanodisc 中以使组装效率提高, 以及如何处理组装后的 Nanodisc 以降低其对质谱的信噪影响等问题。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服现有技术的不足, 提供一种基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法。

[0009] 该方法找到了一种可以在蛋白水平直接测定化合物和蛋白结合力的方法, 不需要任何的标记。该方法基于液质联用技术进行检测, 适用于不同种类的膜蛋白检测, 具有很好的通用性。该方法通过利用新近发展起来的一种体外生物膜模拟系统 Nanodisc 处理膜蛋白样品, 达到了既能去除去垢剂, 同时又能保持蛋白质稳定的作用, 因此, 可以普遍应用于膜蛋白与配体分子的亲和力测定。

[0010] 本发明的技术方案如下:

[0011] 一种基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,按如下步骤进行:

[0012] a) 把纯化的膜蛋白组装到生物膜模拟系统 Nanodisc 中并去除去垢剂;

[0013] b) 将纯化、浓缩处理后的组装有膜蛋白的生物膜模拟系统 Nanodisc 和化合物进行孵育处理;

[0014] c) 用重复超过滤方法将与膜蛋白有非共价结合的化合物富集于过滤膜上部;

[0015] d) 用液质联用仪器检测过滤膜上部化合物浓度来鉴定与膜蛋白有非共价结合的化合物;

[0016] 上述方法中,生物膜模拟系统是由膜支架蛋白 MSP 和磷脂组成的一个圆盘状结构,膜蛋白能够插入到磷脂双分子层中;用于组装生物膜模拟系统的膜支架蛋白(membrane scaffold protein, MSP) 包括由来源于不同物种如人、鼠等来源的脂蛋白 A1(ApolipoproteinA1, apoA1) 改造而来的各种 MSP 蛋白,例如文献 2 (Ritchie, T. K. et al. Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs. 464, 211-231, doi:10. 1016/s0076-6879(09)64011-8(2009)) 所报道的 MSP1 和 MSP2 及在 MSP1 和 MSP2 基础上改造获得的蛋白;用于组装生物膜模拟系统的磷脂,包括 POPC, DMPC, DSPG, DPPC;其中膜蛋白包括 G 蛋白偶联受体,离子通道蛋白,转运蛋白(Transporter) 以及其它膜蛋白;其中化合物包括片断化合物库,天然产物化合物库等化合物库中的化合物;其中超过滤过程包括一次超过滤,二次超过滤,三次超过滤。

[0017] 上述基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法在发现医药、农药、兽药等先导化合物中的应用。

[0018] 本发明的有益效果:

[0019] 本发明提供了一种发现与膜蛋白有非共价结合的化合物的筛选方法,本发明方法的一个特点是无需对样品进行任何标记,可直接在蛋白水平进行测定,并可通用于各种膜蛋白配体小分子和受体亲和力测定。

[0020] 本发明提供了一种基于液质联用的膜蛋白与配体亲和力测定方法,从解决膜蛋白溶液中去垢剂对质谱检测的影响入手,通过把膜蛋白组装到生物膜模拟系统中,从而使膜蛋白在去除去垢剂后也能稳定存在,并通过实验证实经过对样品的恰当处理,生物膜模拟系统不会对后续的质谱检测造成影响。

[0021] 本发明提供了一种通过将膜蛋白组装到生物膜模拟系统进行样品处理,并利用液质联用技术测定小分子化合物和膜蛋白结合亲和力的方法。该方法具有不依赖任何的标记,不需要经过固定化等步骤,通量高,样品需求量少,可对混合物进行筛选,操作简单,灵敏度高等特点,适用于不同种类的膜蛋白检测,具有很好的通用性。

[0022] 本发明通过使用优化的组装方法将膜蛋白组装到 Nanodisc,使组装效率得到提高;同时,通过选用合适的缓冲液处理组装后的 Nanodisc,降低了对质谱的信噪影响,使检测结果更准确可信。

附图说明

[0023] 图 1 是实施例 1 中纯化后得到的 A_{2A}AR 蛋白 SDS-PAGE 电泳图(其中左边为分子量标准,右边为 A_{2A}AR);

[0024] 图 2 是实施例 2 中纯化后的膜支架蛋白 SDS-PAGE 电泳图(其中左边为分子量标

准,右边为膜支架蛋白);

[0025] 图 3 是实施例 3 中膜支架蛋白的分子筛色谱图(其中采用的分子筛柱为 24ml Superdex-200 色谱柱);

[0026] 图 4 是实施例 3 中组装好的空 Nanodisc 分子筛色谱过柱图(其中采用的分子筛柱为 24ml Superdex-200 色谱柱);

[0027] 图 5 是实施例 3 中组装好的含 A_{2A}AR 蛋白的 Nanodisc 分子筛色谱纯化图(其中采用的分子筛柱为 24ml Superdex-200 色谱柱);

[0028] 图 6 是实施例 3 中组装好的空 Nanodisc 和含 A_{2A} 腺苷受体的 Nanodisc 的 SDS-PAGE 电泳图(其中左边为组装有 A_{2A}AR 蛋白的 Nanodisc 电泳图,中间为分子量标准,右边为空的 Nanodisc);

[0029] 图 7 是实施例 4 中实验组 2 与对照组 1 的 D 值分布散点图。

具体实施方式

[0030] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步的说明。

[0031] 下列实施例用于阐明本发明的某些优选实施方案和方面,不应该解释为限制了它的范围。

[0032] 本发明的发明人选择了一种 G 蛋白偶联受体 :A_{2A} 腺苷受体进行研究,首先,根据文献构建了可以高表达 A_{2A} 腺苷受体的昆虫表达质粒,并把该质粒在昆虫 SF9 表达系统中进行高效表达,通过提膜,溶膜,过柱纯化等步骤方法制备得到了溶于去垢剂的纯度高于 90% 的 A_{2A} 腺苷受体蛋白;随后,利用优化的组装方法,把纯的 A_{2A} 腺苷受体蛋白组装到生物膜模拟体系中,并通过疏水柱去除去垢剂,得到的生物膜模拟体系,经浓缩到一定浓度后和待筛选化合物按一定比例进行混合孵育,同时,利用未组装 A_{2A} 腺苷受体的空生物膜模拟体系作为对照;随后,用多次超过滤方法,将与膜蛋白有非共价结合的化合物富集于超过滤管上部,将经超滤管富集后的结合有化合物的蛋白样品经处理后,取上清用液质联用仪器检测其中化合物的相对含量,从而筛选出其中与蛋白有非共价结合的化合物。整个筛选过程不需要经过标记、固定化等过程,方法简单方便。A_{2A} 腺苷蛋白筛选实验结果表明,本方法可以直接从化合物库中发现能够和 A_{2A} 腺苷受体进行结合的化合物。

[0033] 实施例 1 A_{2A} 腺苷受体表达和纯化

[0034] 本发明所采用的 A_{2A} 腺苷受体蛋白表达质粒的构建采用文献 3 (Chun, E. et al. Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. Structure 20, 967-976, doi:10.1016/j.str.2012.04.010(2012).) 所报道的方法,构建好的质粒在 SF9 昆虫细胞(购买自美国 LifeTechnology 公司)中进行蛋白表达。按照 LifeTechnology 公司提供的 SF9 细胞表达蛋白的说明制备 P0, P1 和 P2 代病毒,使用 P2 代病毒按 MOI=1 ~ 2 比感染密度为 2x10⁶/ml 的昆虫细胞 sf9,继续培养 72 小时后,离心收细胞,-80℃冻存备用。

[0035] 按每升细胞使用 200ml 预冷的裂解液(10mMHEPESpH7.5, 10mMMgCl₂, 20mMKCl)的比例重悬细胞,用匀浆器在冰上进行匀浆,匀浆后用超速离心机离心 45 分钟,去掉上清,重复洗涤步骤 3 次,再用高盐溶液(10mMHEPESpH7.5, 10mMMgCl₂, 20mMKCl, 1MNaCl)重复洗涤步骤三次,提取好的细胞膜用加甘油的裂解液溶解并用液氮进行速冻,储存在 -80℃冰箱。

在冰上融化解冻细胞膜, 并加入茶碱和碘乙酰胺分别至终浓度为 4mM, 2mg/ml, 在冰上放置 30 分钟后加入同等体积的溶膜缓冲液 (100mMHEPESpH7.5, 1MNaCl, 1%DDM, 0.2%CHS), 并继续在冰上放置 3 小时溶膜, 用超速离心机在 160,000g 离心力下离心 40 分钟, 弃掉沉淀, 往上清中加入咪唑至终浓度为 20mM, 然后将上清与平衡缓冲液 (25mMHepespH7.5; 500mMNaCl; 0.05%DDM; 0.001%CHS) 1ml 一起孵育过夜, 次日, 弃上清, 加入适量平衡缓冲液重悬填料, 将填料转移到自柱里。依次用 10 倍柱体积的冲洗缓冲液 1 (25mMHepespH7.5; 800mMNaCl; 10%glycerol; 0.05%DDM; 0.001%CHS; 4mM theophylline) 冲洗, 10 倍柱体积的冲洗缓冲液 2 (25mM HepespH7.5; 800mM NaCl; 10%glycerol; 4mM theophylline; 0.05%DDM; 0.001%CHS; 25mM Imid; 10mM MgCl₂; 8mM ATP) 冲洗, 5 倍柱体积的冲洗缓冲液 3 (25mM HepespH7.5; 800mM NaCl; 10%glycerol; 4mM theophylline; 0.05%DDM; 0.001%CHS; 10mM MgCl₂; 10mM ATP) 冲洗, 然后用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液 (冲洗缓冲液 1 加入 300mM 咪唑) 洗脱目的蛋白, 纯化后得到的目的蛋白用 100kDa 分子量的 Vivaspin 浓缩管 (GE Healthcare) 浓缩到 4mg/ml 后保存在 -80°C, 纯化后蛋白纯度达 90% 以上 (见图 1)。

[0036] 实施例 2 膜支架蛋白 (Membrane Scaffold Protein, MSP) 表达纯化

[0037] 本发明所用膜支架蛋白采用如文献 4 (Ritchie, T. K. et al. Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs. 464, 211-231, doi:10.1016/s0076-6879(09)64011-8(2009).) 报导的由人源载脂蛋白改造而来的膜支架蛋白, 其分子量大小为 24.6Kd, 膜支架蛋白的表达采用 Condon plus 菌株作为宿主菌, 利用常规的分子克隆技术, 将目的基因插入到表达载体上, 用 2ul 的重组质粒转化 Condon plus 感受态细胞, 挑选单克隆菌株, 接种到 5ml 培养液中 37°C 过夜培养, 将过夜培养的菌接种到 2.5L 的 LB 培养液, 37°C 培养, 待 OD 值达到 2.5 左右后加入 1mMIPTG, 在 37°C 诱导表达 3 小时。在 8500g 离心 3 分钟收集细菌, 收集到的细菌在 -80°C 冷冻保存。

[0038] 收集的细菌用缓冲液 1 (20mM NaH₂P₄O₄, 1%triton X-100, 1mMPMSF pH8.0) 重悬, 超声破碎后用 16000g 离心 30 分钟, 收集上清, 过 Ni 柱 (Novagen), 分别用 50 倍柱体积的缓冲液 2 (30mM Tris, 0.3M NaCl, 50mM 胆酸钠, 20mM 咪唑 pH8.0) 和 50 倍柱体积的缓冲液 3 (30mM Tris, 0.3M NaCl, 50mM 咪唑 pH8.0) 洗去非特异性结合的杂蛋白, 然后用 10 倍柱体积的缓冲液 4 (30mM Tris, 0.3MNaCl, 400mM 咪唑 pH8.0) 将目的蛋白从柱子上洗脱。

[0039] 纯化后的膜支架蛋白通过 10KD 浓缩管 (GE Healthcare) 置换为缓冲液 5 (20mMTris, 0.1MNaCl, pH7.4), 然后加入 1mgTEV 蛋白酶, 4°C 酶切过夜。酶切过后的蛋白溶液重新上到 Ni 柱上, 收集流穿, 所获得的膜支架蛋白浓缩到 4mg/ml, 用液氮快速冷冻后 -80 摄氏度保存备用, 纯化后的膜支架蛋白纯度达 90% 以上 (见图 2)。

[0040] 实施例 3Nanodisc 生物膜模拟系统组装

[0041] 选择一个 2ml 的组装体系, 取预先溶解在氯仿中浓度为 100mM 的棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC) 液体 110ul 放到 4ml 的 EP 管中, 并用氮气缓慢吹干, 使得氯仿完全挥发。待 POPC 准备好后, 在 EP 管中加入 400ul 浓度为 100mM 的胆酸钠 (预先溶解于 20mMTris, 100mMNaCl, pH7.4 的缓冲液 A 中), 60°C 水浴加热促进溶解。待 POPC 完全溶解后, 放置在冰上冷却, 然后加入 1ml 实施例 2 中制备的膜支架蛋白 (4mg/ml), 并加入 600ul 缓冲液 A (20mMTris, 100mMNaCl, pH7.4) 使得总体积为 2ml, 组装得到不含 A_{2A} 受体蛋白的 Nanodisc 作为空白对照; 对于含 A_{2A} 腺苷蛋白的 Nanodisc, 则加入实施例 1 中制备的 A_{2A} 腺

昔受体蛋白 1mg 代替缓冲液 A, 最后用缓冲液 A 将总体系体积补充至 2ml。将组装混合体系于 4℃ 孵育 1 小时, 按照 0.7g/ml (湿重) 的比例加入预先用缓冲液 A 处理过的 Bio-Beas SM-2 纯化珠子 (Bio-RAD), 加入纯化珠子后, 将 EP 管放到旋转仪上, 4℃ 下缓慢旋转 4 小时去除去污剂。组装好后, 静置 2 分钟, 吸取上清, 并再次加入 2ml 缓冲液 A 到纯化珠子中, 轻轻混匀, 静置后吸取上清, 重复上述清洗过程一次, 尽可能的回收 Nanodisc。

[0042] 将所获得的对照组 Nanodisc 浓缩至 0.5ml, 过 superdex200 分子筛柱进行纯化 (缓冲液为 pH7.4, 20mM Tris, 500mM NaCl), 收集到的 Nanodisc 用 30Kd 的浓缩管浓缩到蛋白浓度为 0.1mg/ml (此时 Nanodisc 的浓度为 2uM), 液氮速冻后于 -80℃ 冷冻保存。

[0043] 对于含有 A_{2A} 腺苷受体蛋白的 Nanodisc, 则先将组装好的 A_{2A}ARNanodisc 加入 3ml 的镍柱, 用缓冲液 (20mM Tris, 100mM NaCl, 10mM 咪唑 pH7.4) 洗杂蛋白, 再用缓冲液 (20mM Tris, 100mM NaCl, 300mM 咪唑 pH7.4) 进行洗脱, 收集洗脱液后浓缩至 0.5ml 体积, 过 superdex200 分子筛柱进行纯化 (选用的适宜的缓冲液为 pH7.4, 20mM Tris, 50mM NaCl, 此处如缓冲液选用不好, 有可能影响到质谱的背景噪音), 收集到的 Nanodisc 用 30Kd 的浓缩管浓缩到蛋白浓度为 0.1mg/ml (此时 Nanodisc 的浓度为 2uM), 液氮速冻后于 -80℃ 冷冻保存。

[0044] 图 3 是膜支架蛋白的分子筛色谱图。图 4、图 5 所示为组装好的空 Nanodisc 和含 A_{2A} 腺苷受体的 Nanodisc 分子筛纯化图, 从图 4、图 5 中可以看出组装好的 Nanodisc 峰。图 6 是组装好的空 Nanodisc 和含 A_{2A} 腺苷受体的 Nanodisc 的 SDS-PAGE 电泳图, 从图 6 中可以看出, A_{2A} 腺苷受体被成功组装到了 Nanodisc 中。

[0045] 实施例 4 液质联用仪检测样品处理

[0046] 应用质谱进行样品检测前, 先按下述步骤对样品进行处理。样品分成 1, 2, 两个组, 其中 1 为空白对照管, 2 为实验组。取 2 个 1.5ml 的 EP 管并在管外壁标注 1, 2 作为两组样品编号。1 号空白对照管中加入 500uL 实施例 3 中制备的浓度为 2uM 的空 Nanodisc。2 号管中则加入 500uL 实施例 3 中所制备的含 A_{2A}AR 的 Nanodisc。两个样品中均加入含有 50 个化合物的混合物, 每个化合物的浓度均为 2uM, 此外两管中也同时加入 A_{2A} 腺苷受体的拮抗剂 ZM241385 作为阳性化合物, 终浓度也是 2uM。随后将样品在 4℃ 下缓慢的旋转孵育 30min。孵育过后, 每管各取 50uL 留样作为 R₀ (R₀₁, R₀₂), 剩余部分转移到 30KD 的超过滤管中进行离心超过滤。待滤膜上层液体体积缩小至 50uL 时, 加入 450uL, 20mM Tris, 50mM NaCl pH7.4 的缓冲液并混匀, 取 50uL 留样作为 R₁ (R₁₁, R₁₂), 重复离心超过滤步骤一次, 获得样品 R₂ (R₂₁, R₂₂)。取完 R₂ 后, 剩下的 450uL 样品再离心超过滤到 50uL, 这 50uL 样品做为 R₃ (R₃₁, R₃₂)。所有取出来的样品各加入 150uL 100% 乙腈, 用于蛋白变性。蛋白变性后, 与其相互作用的化合物则被释放到溶液中, 16000*g 离心 15min。变性的蛋白和磷脂一起沉淀下来, 取上清做质谱检测。此处用乙腈作蛋白变性并沉淀蛋白, 沉淀效率更高。

[0047] 实施例 5 液质联用仪检测与数据处理

[0048] 本实验使用的液质联用仪为美国 Waters 公司的 SynaptQ-TOF 质谱仪, 分别取 50uL 实施例 4 中制备得到的样品装入到内衬管后, 放入样品槽, 上样量为 5uL, 采用 Waters 公司的 T3C182.1*50mm 型号的柱子, 流速为 0.3ml/min, 10min。检测样品中各个组分的质核比, 通过对检测到信号的化合物的质谱峰进行积分, 获得分析样品中每个化合物的相对含量 I。

[0049] 对于实施例 4 中所取的样品, 每组样品经过质谱分析都能得到 R₀, R₁, R₂, R₃ 中化合

物的相对含量 I ，以第 1 组样品为例，把超过滤前和每次超过滤后的样品 $R_{01}, R_{11}, R_{21}, R_{31}$ 分别用于质谱检测得到样品中每个化合物的相对含量值 $I_{01}, I_{11}, I_{21}, I_{31}$ 。同样方法，得到第 2 组所取样品中化合物的相对含量值 $I_{02}, I_{12}, I_{22}, I_{32}$ 。随后对数据进行以下处理：首先计算各组样品的 V 值， $V_i = (I_{3i}/I_{0i}) * 100$ ，以第 1 组样品为例其 $V1 = (I_{31}/I_{01}) * 100$ 同样方法可以得到第 2 组的值 $V2$ 。随后用 $V2 - V1$ 得到扣除空白背景后的相对亲和力值 D 。

[0050] 附图 7 为 D 值分布的散点图。从图 7 中可以看出，其中第 51 号化合物 ZM241385 的 D 值明显高于其他化合物，这表明，阳性化合物 ZM241385 的相对亲和力值明显高于其他未知化合物。

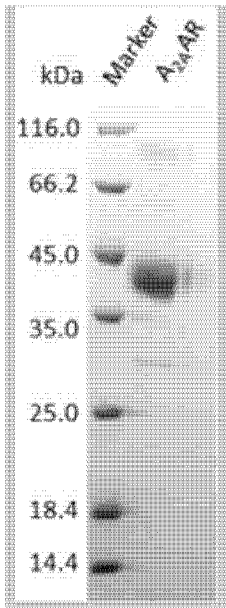


图 1

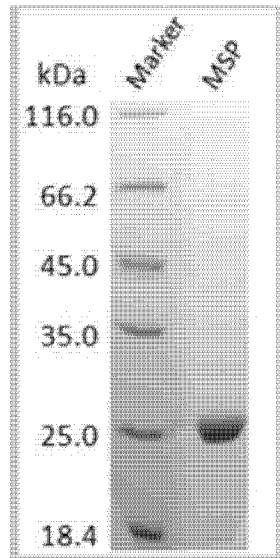


图 2

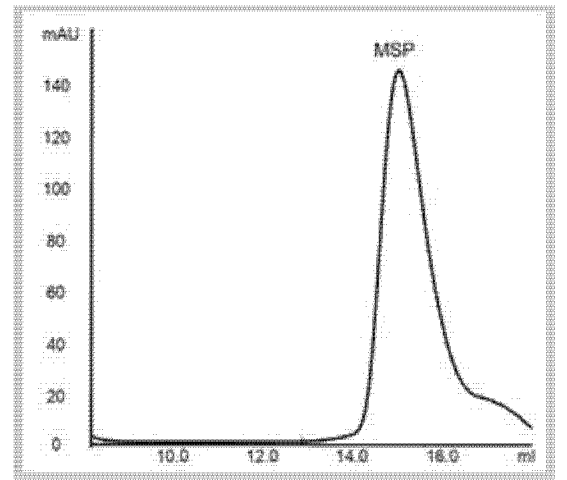


图 3

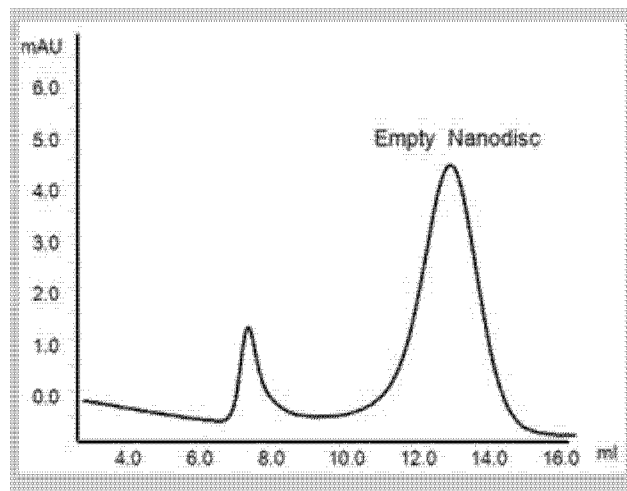


图 4

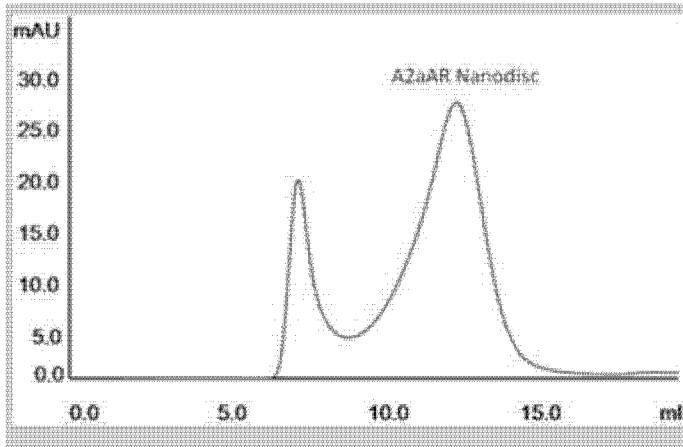


图 5

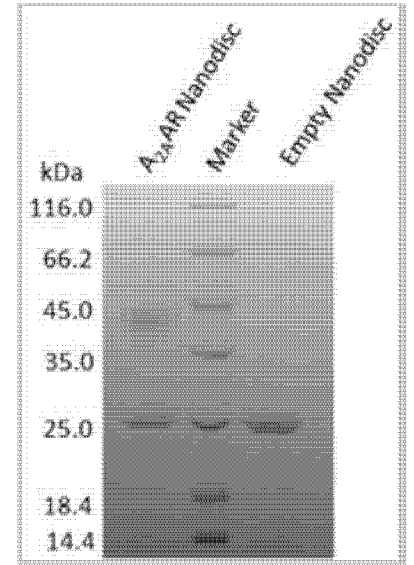


图 6

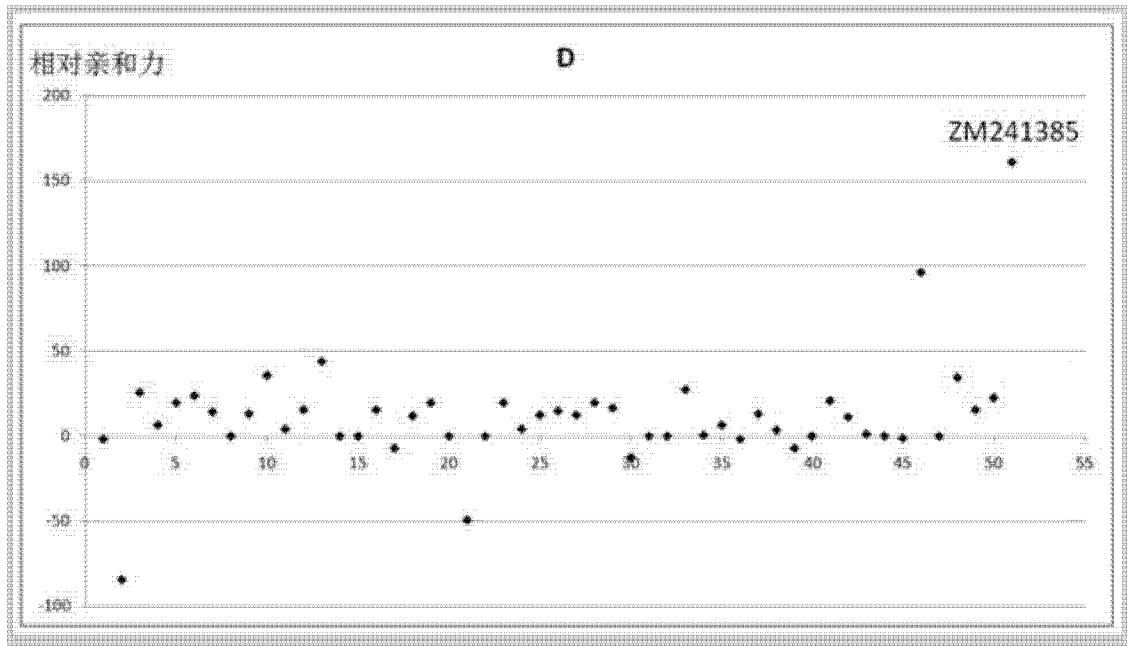


图 7