

荧光偏振技术在 β -catenin/LEF1 相互作用小分子抑制剂高通量筛选中的应用

Application of A Fluorescence Polarization Screening Assay for the Discovery of β -catenin/LEF1 Interaction Antagonists

闫干干, 戚海燕, 付正豪, 陈云雨*

药物筛选与评价研究所, 皖南医学院, 芜湖, 安徽

*通讯作者邮箱: chenyunyu1984@163.com

引用格式: 闫干干, 戚海燕, 付正豪, 陈云雨. (2021). 荧光偏振技术在 β -catenin/LEF1 相互作用小分子抑制剂高通量筛选中的应用. *Bio-101* e1010828. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010828.

How to cite: Yan, G. G., Qi, H. Y., Fu, Z. H. and Chen, Y. Y. (2021). Application of A Fluorescence Polarization Screening Assay for the Discovery of β -catenin/LEF1 Interaction Antagonists. *Bio-101* e1010828. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010828. (in Chinese)

摘要: 在经典 Wnt 信号通路中, β -catenin/LEF1 (lymphoid enhancer factor 1) 相互作用在恶性肿瘤的生长分化、化疗耐药、转移复发等过程中发挥着重要的促进作用, 已成为新型高选择性抗癌药物开发的理想靶标之一。为了高效筛选抑制 β -catenin/LEF1 相互作用的小分子抑制剂, 本文基于荧光偏振 (fluorescence polarization, FP) 原理, 以异硫氰酸荧光素 (fluorescence isothiocyanate, FITC) 标记的 LEF1 多肽作为荧光探针, 通过优化 FITC-LEF1 与 β -catenin 反应浓度, 成功建立了荧光偏振高通量筛选模型。应用本筛选模型对天然产物化合物库进行高通量筛选, 成功筛选到了血根碱和白屈菜红碱具有良好的抑制活性。本文成功建立了适用于靶向 β -catenin/LEF1 相互作用小分子抑制剂筛选的荧光偏振高通量筛选模型, 为新型 Wnt 抑制剂的高效筛选奠定了基础。

关键词: Wnt 抑制剂, β -catenin/LEF1 相互作用, 荧光偏振, 高通量筛选, 血根碱

研究背景

荧光偏振 (fluorescence polarization, FP) 技术被广泛应用于药物筛选、蛋白质活性鉴定、药物分析与疾病诊断, 具有均相反应、操作简便、检测灵敏、成本低廉等优点。本

文以 β -catenin/LEF1 相互作用为靶标, 将 FITC-LEF1 作为核转录因子 LEF1 的模拟物, 基于偏振荧光强弱与荧光分子大小正相关的原理建立了荧光偏振高通量筛选模型 (Lea and Simeonov, 2011)。如果小分子化合物为非活性化合物, 那么分子量较大的 β -catenin 将与分子量较小的 FITC-LEF1 发生特异性结合反应, 荧光复合物的分子量将增大, 旋转速度较慢, 荧光偏振实验中表现较高的毫偏值 (millipolarization units, mP); 反之, 活性化合物能够特异性阻断 β -catenin 与 FITC-LEF1 的相互作用, 荧光复合物的分子量将明显减小, 旋转速度较快, 荧光偏振实验中则表现较低的 mP 值 (图 1)。

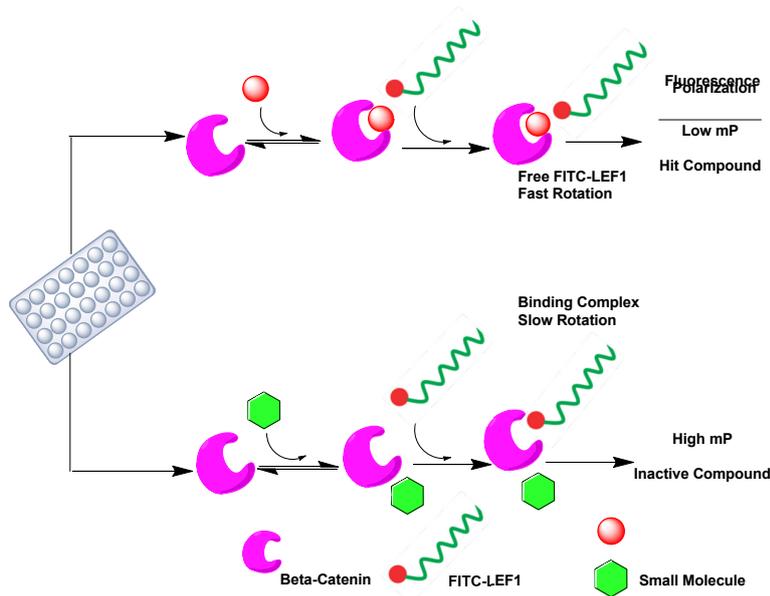


图 1. 荧光偏振高通量筛选方法原理示意图

材料与试剂

1. 384 孔板 (PerkinElmer, catalog number: 6007270)
2. 荧光探针 FITC-LEF1 (FITC-GDPELCATDEMIPFKDE-OH, 纯度大于 97.0%, 由上海强耀生物科技有限公司合成)
3. LEF1 多肽 (GDPELCATDEMIPFKDE-OH, 纯度大于 97.0%, 由上海强耀生物科技有限公司合成)
4. Tris (Sigma, catalog number: V900483)
5. NaCl (Sigma, catalog number: V900058)
6. EDTA (Sigma, catalog number: V900106)
7. DMSO (Sigma, catalog number: V900090)

8. HCl (国药试剂, catalog number: 10011018)
9. 血根碱 (TargetMol 公司, catalog number: 2781)
10. 白屈菜红碱 (TargetMol 公司, catalog number: 3419)
11. H₂O
12. 天然产物化合物库 (TargetMol 公司)
13. 荧光偏振反应液 (见溶液配方)
14. 重组人 β -catenin (见溶液配方)

仪器设备

1. 多功能酶标仪 (BioTek, Cytation™ 5 型)
2. 移液器 (Eppendorf)
3. 微孔板快速振荡器 (Kylin-Bell Lab, QB-9001 型)

实验步骤

1. 将 2 mM FITC-LEF1 以荧光偏振反应液稀释至终浓度分别为 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 nM, 依次加入到 384 孔板中, 每孔 60 μ l, 每组设置 3 组复孔, 室温避光孵育 15 min, 选择荧光偏振检测程序, 设定激发光波长 485 nm, 发射光波长 535 nm, 以多功能酶标仪检测 mP 值。
2. 将 40 nM FITC-LEF1 加入到 384 孔板中, 每孔 30 μ l, 再依次加入 0、10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000 nM β -catenin, 每孔 30 μ l, 每组设置 3 组复孔, 以微孔板快速振荡器缓慢振摇, 室温避光孵育 15 min, 选择荧光偏振检测程序, 设定激发光波长 485 nm, 发射光波长 535 nm, 以多功能酶标仪检测 mP 值。选择 One site-Specific binding, 以 GraphPad Prism 5.0 软件拟合结合曲线, 计算 β -catenin/FITC-LEF1 结合反应的解离平衡常数 (dissociation constant) K_d 值。
3. 将 40 nM FITC-LEF1 加入到 384 孔板中, 每孔 30 μ l, 再将 0、10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000 nM β -catenin 依次加入到 384 孔板中, 每孔 30 μ l。反应体系中含 DMSO 终浓度分别为 0、2%、4%、6%、8%、10%, 每组设置 3 组复孔, 以微孔板快速振荡器缓慢振摇, 室温避光孵育 15 min, 选择荧光偏振检测程序, 设定激发光波长 485 nm, 发射光波长 535 nm, 以多功能

酶标仪检测 mP 值。选择 One site-Specific binding, 以 GraphPad Prism 5.0 软件拟合结合曲线, 计算 β -catenin/FITC-LEF1 结合反应在各 DMSO 浓度中的 K_d 值。

- 将 40 nM FITC-LEF1 和 180 nM β -catenin 加入到 384 孔板中, 每孔各加入 30 μ l, 其中 A 板 1#~50#孔反应体系中含 2% DMSO, B 板 1#~50#孔反应体系中含 10 μ M LEF1 多肽, 以微孔板快速振荡器缓慢振摇, 室温避光孵育 15 min, 选择荧光偏振检测程序, 设定激发光波长 485 nm, 发射光波长 535 nm, 以多功能酶标仪检测 mP 值。设定 A 板 1#~50#孔为阴性对照孔, 其平均值为 μ_N , B 板 1#~50#孔为阳性对照孔, 其平均值为 μ_P , 按照下述公式计算 Z' 因子。

$$Z' = 1 - \frac{3 \times (SD_N + SD_P)}{|\mu_N - \mu_P|}$$

- 天然产物化合物库的次级库浓度为 1.0 mg/ml。将 180 nM β -catenin 加入到 384 孔板中, 每孔 29 μ l, 再依次加入小分子化合物, 每孔 1 μ l, 室温孵育 45 min。再将 40 nM FITC-LEF1 加入到 384 孔板中, 每孔 30 μ l, 室温避光孵育 15 min, 选择荧光偏振检测程序, 设定激发光波长 485 nm, 发射光波长 535 nm, 多功能酶标仪检测 mP 值, 计算小分子化合物的抑制率。阴性对照孔和阳性对照孔的设定如上所述。按照下述公式计算苗头化合物 (Hit) 的抑制率, 其中 μ_{Hit} 为苗头化合物 mP 值的平均值。苗头化合物的初判标准: 抑制率 > 50% 的小分子化合物。

$$\text{Hit inhibition (\%)} = \frac{\mu_N - \mu_{Hit}}{|\mu_N - \mu_P|} \times 100\%$$

- 将 10 mM 血根碱 (sanguinarine, SAN) 和白屈菜红碱 (chelerythrine, CHE) 以 180 nM β -catenin 进行 2 倍倍比稀释 (起始浓度 100 μ M, 共稀释 12 个浓度梯度), 加入到 384 孔板中, 每孔 30 μ l, 每组设置 3 组复孔, 室温孵育 45 min。再将 40 nM FITC-LEF1 依次加入到 384 孔板中, 每孔 30 μ l, 以微孔板快速振荡器缓慢振摇, 室温避光孵育 15 min, 选择荧光偏振检测程序, 设定激发光波长 485 nm, 发射光波长 535 nm, 以多功能酶标仪检测 mP 值。按照上述公式计算各稀释浓度的抑制率, 再以 GraphPad Prism 5.0 软件拟合抑制曲线, 计算 IC₅₀ 值。

结果与分析

- 荧光探针 FITC-LEF1 最佳反应浓度的确定

将不同浓度的 FITC-LEF1 置于 384 孔板中，以多功能酶标仪检测 mP 值。实验结果表明，从 100 nM 开始，不同浓度的 FITC-LEF1 在实验体系中的 mP 值基本保持一致，在 50 至 5 nM 之间，mP 值波动最小，基本保持在 25-30 之间，具有相对较低且平稳的 mP 值 (图 2)。为了保持实验体系的良好灵敏度和较低的本底值，选用 FITC-LEF1 最佳反应浓度为 20 nM。

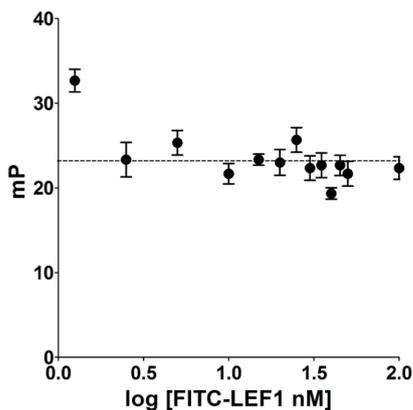


图 2. 荧光探针 FITC-LEF1 最佳反应浓度的确定

2. β -catenin 最佳反应浓度的确定

在荧光偏振实验中，随着 β -catenin 加入浓度的升高，mP 值也逐渐升高。当 β -catenin 浓度达到 350 nM 时，mP 值达到最大并趋于平台期 (图 3)。经 GraphPad Prism 5.0 软件拟合结合曲线，计算其结合反应的 K_d 值为 60 nM。为了使其结合反应在荧光偏振实验中接近饱和状态，并保证较高的灵敏度和信号窗，实际使用的 β -catenin 浓度应达到 K_d 值的 1.5 倍 (Nikolovska-Coleska *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2018)。故此选用 β -catenin 最佳反应浓度为 90 nM。

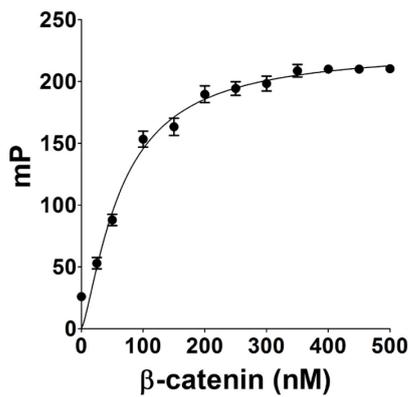


图 3. β -catenin 最佳反应浓度的确定

3. 实验体系对 DMSO 的耐受性

通过 DMSO 对 β -catenin/FITC-LEF1 结合反应饱和曲线 K_d 值的影响，判断荧光偏振实验体系对 DMSO 的耐受性。当 DMSO 浓度在 0-10% 时，饱和曲线的 K_d 值为 62.36 ± 0.68 nM，波动极小 (图 4)。实验结果表明，当 DMSO 浓度在 10% 以内时，其对 β -catenin/FITC-LEF1 结合反应没有显著影响，实验体系对 DMSO 具有良好的耐受性。

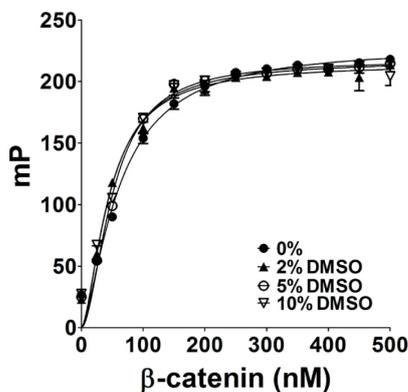


图 4. DMSO 对 β -catenin/FITC-LEF1 结合反应的影响

4. Z'因子值的测定

Z'因子是评价药物高通量筛选体系稳定性的核心参数。通过综合分析和计算，本筛选模型 Z'因子值为 0.77 (图 5)，满足高通量筛选中 Z'因子值大于 0.5 的基本要求 (Zhang *et al.*, 1999)。

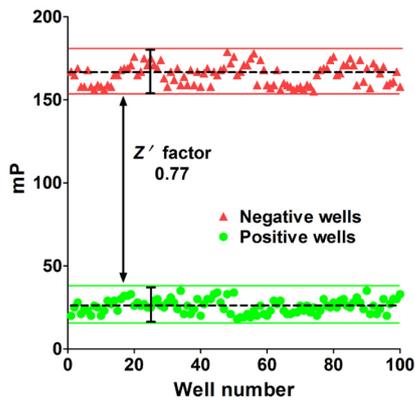


图 5. 荧光偏振筛选模型 Z 因子值的确定

5. 苗头化合物的筛选

应用上述已建立的荧光偏振高通量筛选模型，对本室天然产物化合物库进行了高通量筛选，成功筛选到血根碱 (sanguinarine, SAN) 和白屈菜红碱 (chelerythrine, CHE) 具有良好的抑制活性，其 IC_{50} 值分别为 1.44 ± 0.08 、 $3.55 \pm 0.25 \mu\text{M}$ (图 6)。

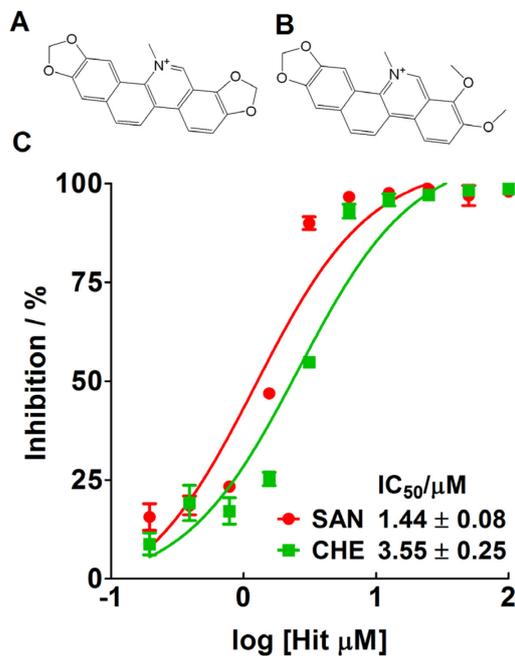


图 6. 苗头化合物的筛选与发现 A) 血根碱的分子结构; B) 白屈菜红碱的分子结构; C) SAN 和 CHE 在荧光偏振筛选模型中的抑制活性

失败经验

1. 荧光偏振实验中，溶液黏度是影响 mP 值检测的重要因素。因此，荧光偏振反应体系中应尽可能减少甘油含量，尽量保持低盐。
2. 反应温度对荧光偏振实验略有一定影响，但通常情况下，室温反应即可满足高通量筛选的基本需求。实验中所用溶液需要提前预热至室温备用。
3. β -catenin 最佳工作浓度确定是高通量筛选模型建立的关键要素。通常认为参与反应的 β -catenin 浓度为 K_d 值的 1.5 倍才能满足高通量筛选需求。在 β -catenin 使用中，尽量避免反复冻融。
4. 化合物库中小分子化合物的溶解度较低时，由于悬浮颗粒的影响和干扰，可能导致荧光偏振筛选模型表现为假性结果。在实验设计中，应尽量选择溶解度高的化合物用于高通量筛选。
5. 实验操作中，每一步需小心谨慎，务必防止检测孔中出现气泡。如果出现气泡，将影响 mP 值的检测，导致较大的波动值。
6. 为了在荧光偏振实验中保持较大的信号窗，荧光探针与配体结合蛋白需要亲和力较高，且分子量差异保持在 20 至 30 倍。
7. 在以蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interactions, PPIs) 为靶标的药物筛选中，荧光偏振技术具有良好的适用性与推广性。荧光偏振实验方案对探针的荧光分子标记无苛刻要求，只需按照探针标记的荧光分子，设定既定的激发光与发射光波长，开始荧光偏振检测即可。

溶液配方

1. 重组人 β -catenin

重组人 β -catenin 由大肠杆菌原核表达，经分离纯化后制备，用于荧光偏振筛选模型的建立。重组人 β -catenin 的制备方法如参考文献 (牛夏忆等, 2019 和 2020) 所述。

2. 荧光偏振反应液

10 mM Tris, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

致谢

衷心感谢国家自然科学基金 (81703546)、安徽省自然科学基金 (1808085QH265) 和安徽省高校自然科学研究重大项目 (KJ2019ZD30) 对本研究的资金支持! 应用本实验

方案发表的主要论著如下:

1. Chen, Y., Fu, Z., Li, D., Yue, Y. and Liu, X. (2021). [Optimizations of a novel fluorescence polarization-based high-throughput screening assay for \$\beta\$ -catenin/LEF1 interaction inhibitors](#). *Anal Biochem* 612: 113966.
2. 陈云雨, 胡克, 付正豪, 牛夏忆, 张晶, 刘晓平. (2020). [靶向 \$\beta\$ -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂荧光偏振高通量筛选模型的建立与应用](#). *药学学报* 55(5): 884-891.

参考文献

1. Lea, W. A. and Simeonov, A. (2011). [Fluorescence polarization assays in small molecule screening](#). *Expert Opin Drug Discov* 6: 17-32.
2. Nikolovska-Coleska, Z., Wang, R., Fang, X., Pan, H., Tomita, Y., Li, P., Roller, P. P., Krajewski, K., Saito, N. G., Stuckey, J. A. and Wang, S. (2004). [Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization](#). *Anal Biochem* 332: 261-273.
3. Zhu, M. R., Du, D. H., Hu, J. C., Li, L. C., Liu, J. Q., Ding, H., Kong, X. Q., Jiang, H. L., Chen, K. X. and Luo, C. (2018). [Development of a high-throughput fluorescence polarization assay for the discovery of EZH2-EED interaction inhibitors](#). *Acta Pharmacol Sin* 39: 302-310.
4. 牛夏忆, 李淼, 张倩, 陈云雨, 刘晓平. (2019). [大鼠抗人 \$\beta\$ -catenin多克隆抗体的制备与鉴定](#). *中国免疫学杂志* 35: 1992-1998.
5. 牛夏忆, 韩茂椿, 李淼, 陈云雨, 刘晓平. (2020). [重组人 \$\beta\$ -catenin原核表达条件的优化及生物学活性鉴定](#). *微生物学杂志* 40: 58-66.
6. Zhang, J. H., Chung, T. D. and Oldenburg, K. R. (1999). [A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays](#). *J Biomol Screen* 4: 67-73.