酶联免疫吸附实验在 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂高通量筛选中的应用

Application of An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Screening of Small-molecule Inhibitors Targeting β -catenin/TCF4 Interaction

付正豪, 戚海燕, 闫干干, 刘晓平, 陈云雨*

¹ 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: 付正豪, 戚海燕, 闫干干, 刘晓平, 陈云雨. (2021). 酶联免疫吸附实验在 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂高通量筛选中的应用. *Bio-101* e1010833. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010833.

How to cite: Fu, Z. H., Qi, H. Y., Yan, G. G., Liu, X. P. and Chen, Y. Y. (2021). Application of An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Screening of Small-molecule Inhibitors Targeting β -catenin/TCF4 Interaction. *Bio-101* e1010833 Doi: 10.21769/BioProtoc.1010833. (in Chinese)

摘要: 在经典 Wnt 信号通路中, β -catenin/TCF4 (T-cell factor 4) 相互作用在肿瘤生长分化、化疗耐药、转移复发等过程中发挥着重要的促进作用, 已成为新型靶向性抗肿瘤药物开发的理想靶标之一。为了高效地筛选抑制 β -catenin/TCF4 相互作用的苗头化合物, 文中基于酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 原理, 通过优化 GST-TCF4 β BD (β -catenin binding domain) 包被浓度和 β -catenin 反应浓度, 建立 ELISA 高通量筛选模型并成功应用于苗头化合物的筛选。应用本筛选模型进行高通量筛选, 成功筛选到白花丹素具有良好的抑制活性。本文成功地建立了适用于药物高通量筛选的 ELISA 筛选模型, 为靶向 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂的高效筛选奠定了基础。

关键词: Wnt 抑制剂, 酶联免疫吸附实验, β -catenin/TCF4 相互作用, 白花丹素

材料与试剂

1. 96 孔酶标板 (Corning, Catalog number: 42592)

2. 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) (Biosharp, Catalog number: 4240GR100)
3. 小鼠抗 His 标签单克隆抗体 (中杉金桥, Catalog number: TA-02)
4. 小鼠抗 GST 标签单克隆抗体 (中杉金桥, Catalog number: TA-03)
5. 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG (Biosharp, Catalog number: BL001A)
6. 可溶型单组分四甲基联苯胺 (Tetramethylbenzidine, TMB) 溶液 (TIANGEN, Catalog number: PA107)
7. H_2SO_4 (国药试剂, Catalog number: 10021608)
8. Tween 20 (Sigma, Catalog number: V900548)
9. DMSO (Sigma, Catalog number: V900090)
10. 血根碱 (TargetMol 公司, Catalog number: 2781)
11. 白花丹素 (TargetMol 公司, Catalog number: 2841)
12. GST-TCF4 β BD (1~53 aa) 与 β -catenin (138~781 aa) 由本室制备和保存
13. 天然产物化合物库 (TargetMol 公司)
14. ELISA 包被液 (见溶液配方)
15. ELISA 终止液 (2 mol/L H_2SO_4) (见溶液配方)
16. PBS (见溶液配方)
17. PBST (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)

软件

1. GraphPad Prism 5.0

实验步骤

1. 将 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 $\mu\text{g/ml}$ GST-TCF4 β BD 以 100 μl /孔包被于 96 孔酶标板中, 设定 3 个复孔, 4 °C 包被过夜。以 PBST 洗板 3 次后, 再将含 5% BSA 的 PBST 溶液以 200 μl /孔加入到酶标板中, 室温封闭 2 h。封闭的酶标板经

PBST 洗板 3 次后,以 100 μ l/孔依次加入小鼠抗 GST 标签单抗 (1:2,000) 和 HRP-羊抗小鼠 IgG (1:4,000), 室温孵育 1 h。以 PBST 充分洗板后,每孔加入 100 μ l TMB 溶液,室温避光 5 min,加入 50 μ l H₂SO₄ (2 mol/L)终止反应,以多功能酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。设定包被 BSA 孔为对照组。

2. 将 2 μ g/ml GST-TCF4 β BD 以上述方法包被 96 孔酶标板后,再以 100 μ l/孔加入 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μ g/ml β -catenin, 室温孵育 1 h。再加入小鼠抗 His 标签单抗 (1:2,000) 和 HRP-羊抗小鼠 IgG (1:4,000), TMB 溶液显色 5 min, 以多功能酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。同法包被 GST 孔设定为对照组。
3. 将 GST-TCF4 β BD (2 μ g/ml) 以 100 μ l/孔包被于 96 孔酶标板中,以 100 μ l/孔加入 0.5 μ g/ml β -catenin, 各反应体系中含 DMSO 终浓度为 0%、1%、2%、3%、4%、5%, 室温孵育 30 min。再加入上述一抗和二抗, 室温孵育 1 h, 多功能酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。
4. 将 GST-TCF4 β BD (2 μ g/ml) 以 100 μ l/孔包被于 96 孔酶标板中,以 100 μ l/孔加入 0.5 μ g/ml β -catenin, 室温孵育 30 min。设定含 30 μ mol/L 血根碱孔为阳性对照孔 (A 板 1#–60#), 含 1% DMSO 孔为阴性对照孔 (B 板 1#–60#)。加入上述一抗和二抗, 室温孵育 1 h, 以多功能酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。设定 A 板 1#~60#孔为阳性对照孔, 其 OD₄₅₀ 平均值为 μ_P , B 板 1#~60#孔为阴性对照孔, 其 OD₄₅₀ 平均值为 μ_N , 按照下述公式计算 Z' 因子。

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

5. 将 GST-TCF4 β BD (2 μ g/ml) 以 100 μ l/孔包被于 96 孔酶标板中, 设定三个复孔, 4 °C 过夜。PBST 洗板 3 次后, 将含 5% BSA 的 PBST 溶液以 200 μ l/孔加入到酶标板中, 室温封闭 2 h。PBST 洗板 3 次后, 将 0.5 μ g/ml β -catenin 以 99 μ l/孔加入到包被 GST-TCF4 β BD (2 μ g/ml) 的 96 孔酶标板中, 再以 1 μ l/孔加入小分子化合物 (10 mg/ml), 室温孵育 30 min。PBST 洗板 3 次后, 加入上述一抗和二抗, 室温孵育 1 h, 以多功能酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。设定含 1% DMSO 孔为阴性对照组, 含 30 μ mol/L 血根碱孔为阳性对照组。在初次筛选中, 判定抑制率大于 50%的小分子化合物为候选苗头化合物。苗头化合物抑制率计算公式如下:

$$\text{苗头化合物抑制率 (\%)} = \frac{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{苗头化合物}}}{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{阳性对照}}} \times 100\%$$

6. 将候选苗头化合物以 $0.5 \mu\text{g/ml}$ β -catenin 进行 2 倍倍比稀释 (起始浓度 $100 \mu\text{mol/L}$, 共稀释 12 个浓度), 再加入到包被 GST-TCF4 β BD ($2 \mu\text{g/ml}$) 的 96 孔酶标板中, 室温反应 30 min。加入上述一抗和二抗, 室温孵育 1 h, 以多功能酶标仪检测 OD_{450} 值, 以 GraphPad Prism 5.0 软件拟合苗头化合物的抑制曲线, 计算 IC_{50} 值。

结果与分析

1. GST-TCF4 β BD 包被浓度与 β -catenin 反应浓度的确定

实验结果显示, 当包被浓度达到 $2 \mu\text{g/ml}$ 时, 其包被反应曲线趋于饱和 (图 1A)。设定 $2 \mu\text{g/ml}$ 作为 GST-TCF4 β BD 最佳包被浓度, ELISA 实验结果显示, 包被的 GST-TCF4 β BD 与 β -catenin 的结合反应具有明显的量效关系, 但 GST 不能与 β -catenin 发生结合反应。当 β -catenin 反应浓度达到 $2 \mu\text{g/ml}$ 时, 其结合反应曲线趋于平台期, OD_{450} 值达 0.66 (图 1B)。为了使高通量筛选模型具有更高的灵敏度和信号窗, 选择 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 作为 β -catenin 最佳反应浓度。

图 1. 最佳包被浓度和反应浓度的确定

2. DMSO 浓度对结合反应的影响

ELISA 实验结果显示, DMSO 浓度在 5% 以内时, 其对 GST-TCF4 β BD/ β -catenin 结合反应未产生显著影响, 其 OD_{450} 值为 0.45 ± 0.01 (图 2)。

图 2. DMSO 浓度对 GST-TCF4 βBD/β-catenin 结合反应的影响

3. ELISA 筛选模型 Z'因子值的确定

建立的 ELISA 筛选模型的 Z'因子值为 0.83, 满足了高通量筛选中 Z'因子值大于 0.5 的基本要求 (图 3)。

图 3. ELISA 筛选模型 Z 因子值的确定

4. 小分子化合物的高通量筛选

应用上述 ELISA 筛选模型对本室天然产物化合物库 (含 500 个天然产物) 进行第一轮筛选, 以初筛抑制率大于 50% 为标准, 共获得 10 个候选苗头化合物 (图 4A)。在第二轮筛选中, 成功筛选到白花丹素 (plumbagin, PLB) 具有良好的抑制活性, 其

IC₅₀ 值为 $4.55 \pm 0.27 \mu\text{M}$ (图 4B)。

图 4. 苗头化合物的筛选. (A)天然产物化合物库的高通量筛选; (B) 白花丹素在 ELISA 筛选模型中的抑制活性

注意事项

1. 封闭液体积要大于包被液体积，以达到充分封闭的效果。
2. 以 PBST 洗板 3~5 次，每次 2~3 min，阴性对照孔 OD₄₅₀ 值不大于 0.06。实验操作中洗板要彻底，残留的抗体会使复孔之间的 OD₄₅₀ 值差异增大。
3. 实验中使用的蛋白质和抗体试剂需要分装，避免反复冻融。
4. 需要定期对 β -catenin 进行生物学活性鉴定，长时间冻存会使其生物学活性下降。
5. β -catenin 最佳工作浓度须同时满足信号窗和灵敏度两个要求，如果其浓度过高将使 ELISA 筛选模型的灵敏度降低，苗头化合物的 IC₅₀ 值偏高。

溶液配方

1. ELISA 包被液

Na₂CO₃ 6.36 g, NaHCO₃ 11.72 g, 溶于 1 L 蒸馏水中，调 pH 为 9.6, 4 °C 保存

2. ELISA 终止液 (2 mol/L H₂SO₄)

将 22.2 ml H₂SO₄ 加入到 177.8 ml 蒸馏水中即可

3. PBS

NaCl 8.01 g, Na₂HPO₄ 1.42 g, KCl 0.201 g, KH₂PO₄ 0.272 g, 溶于 1 L 蒸馏水中, 4 °C 保存

4. PBST

NaCl 8.01 g, Na₂HPO₄ 1.42 g, KCl 0.201 g, KH₂PO₄ 0.272 g, Tween 20 0.5 ml, 溶于 1 L 蒸馏水中, 4 °C 保存

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) 对本项目的资金支持! 应用本实验方案发表的主要论著见付正豪 等, (2021); 陈云雨 等, (2019)。

参考文献

1. 付正豪, 闫干干, 朱小红, 刘晓平, 陈云雨. (2021). [靶向 \$\beta\$ -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂酶联免疫吸附法高通量筛选模型的优化与应用](#). *生物工程学报*, 37(8): 1-12.
2. 陈云雨, 牛夏忆, 李妍, 刘晓平. (2019). [基于 \$\beta\$ -catenin/Lef1 相互作用为靶标的新型抗肿瘤药物高通量筛选模型的建立](#). *生物工程学报*, 35(4): 707-717.