

Bcl-xl 小分子抑制剂高通量筛选平台的建立

Establishment of a High-throughput Screening Platform for Small Molecule Inhibitors of Bcl-XL

唐庆烜^{1,2}, 张莹^{1,*}

¹药学院, 清华大学, 北京; ²北京大学-清华大学-北京生命科学研究 (PTN) 联合博士生项目, 生命科学学院, 清华大学, 北京

*通讯作者邮箱: z_ying@mail.tsinghua.edu.cn

引用格式: 唐庆烜, 张莹. (2021). Bcl-xl 小分子抑制剂高通量筛选平台的建立. *Bio-101* e1010841.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010841.

How to cite: Tang, Q. X., Zhang, Y. (2021). Establishment of a High-throughput Screening Platform for Small Molecule Inhibitors of Bcl-XL. *Bio-101* e1010841. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010841. (in Chinese)

摘要: BCL-2 家族蛋白是一种具有促凋亡或抗凋亡活性的蛋白, 由于其在调节细胞凋亡、肿瘤发生和抗肿瘤治疗中的重要作用, 近年来人们对其进行了深入研究。Bcl-xl 蛋白是该家族重要的抗凋亡蛋白, 其与同家族促凋亡蛋白 Bak 等异源二聚结合被认为是抑制 Bak 发挥细胞凋亡功能的关键。在之前报道的研究中, Bcl-xl 被认为是癌症治疗领域有效的分子靶标 (Khan *et al.*, 2019), 开发具有特异性的小分子抑制剂来抑制 Bcl-xl 与 Bak 的蛋白结合, 并释放 Bak 促进细胞凋亡是目前具有希望的抗癌药物发展方向。我们通过研究 Bcl-xl 与 Bak 结合的复合晶体来了解异源二聚体形成的分子基础。在此基础之上, 我们通过荧光偏振实验, 建立了验证小分子干扰 Bcl-xl 与 Bak 进行蛋白-蛋白相互作用的高通量筛选模型, 并成功得到在二聚体结合和非结合情况下的荧光偏振实验结果, 为将来基于荧光偏振实验来高通量筛选小分子抑制剂药物建立了实验基础。荧光偏振技术的优势是比其他研究蛋白质与蛋白质结合的传统方法具有检测限低 (亚纳摩尔级别), 均相性等特定, 并且不直接干预结合体系, 允许实时检测。

关键词: 高通量, 荧光偏振, 抑制剂

研究背景

抑制 Bcl-xl 蛋白来释放细胞凋亡压力的方法是一种有吸引力的治疗癌症的策略。在此之前的报道中，有关于 Bcl-xl 蛋白的药物设计。在 2002 年，Hamilton 课题组就以荧光偏振实验结果为评价标准，来理性设计 Bcl-xl 蛋白的小分子抑制剂。数年来，对 Bcl-2 家族蛋白小分子抑制剂的开发一直是科研界的研究重点，而结合高通量筛选的技术手段，使发现更好更优的先导化合物成为可能。艾伯维公司相继研发了 Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w 的共抑制剂 ABT-737，以及 Bcl-2 特异性抑制剂 ABT-199，并在 2016 年 ABT-199 获得 FDA 批准治疗与 17-p 缺失相关的慢性淋巴细胞白血病(CLL)。这显示出了 Bcl-2 家族蛋白抑制剂开发的巨大潜力。目前关于 Bcl-xl 蛋白抑制剂设计的主要问题是缺少特异性靶向 Bcl-xl 的小分子化合物。所以，建立高通量的 Bcl-xl 小分子抑制剂筛选体系，有利于助力 Bcl-xl 特异性小分子抑制剂的发现和设计，并通过靶向 Bcl-xl 蛋白，来实现癌症治疗的突破。

材料与试剂

1. Bcl-xl 重组蛋白 (Proteintech, catalog number: Ag1232)
2. 5-FITC-(Acp)-GQVGRQLAIIGDDINR-NH2 荧光多肽 (苏州强耀生物订制)
3. 384 孔黑聚苯乙烯微孔板 (Corning, catalog number: 4514)
4. PBS 磷酸盐缓冲液 pH 7.4 (1x) (Gibco, catalog number: C10010500BT)
5. 1.5 ml 棕色不透光离心管 (Axygen, catalog number: MCT-150-X)

仪器设备

1. 多功能酶标仪 (Perkin Elmer, model: EnVision)
2. 微量离心机 (Thermo Scientific, model: Legend Micro 17R)

实验步骤

在生物体内 Bak 蛋白可以自发形成 α 螺旋并且通过其蛋白上的 BH3 域很好地和同源家族蛋白 Bcl-xl 的结合，并且显示出了比较强的结合能力。我们以此为前提，通过设计并购买了带有荧光基团的荧光多肽和 Bcl-xl 蛋白质来完成体外实验。此次荧光多肽选

取了 Bak 蛋白 BH3 域的 16 个氨基酸序列，并且添加了 FITC 基团作为荧光基团，在荧光基团和多肽序列之间添加烷基间隔器分子 Acp（6-氨基己酸）。

实验原理如图 1，荧光偏振 (Fluorescent Polarization Assay) 技术的测量基础是分子微观状态下的旋转能力，被广泛应用于溶液中分子相互作用的研究。该方法可用于测量两个分子之间的结合和解离。当一个自由状态的小荧光分子在溶液中被平面偏振光激发后，激发态分子快速旋转，导致光在很大程度上去极化。然而，如果荧光分子结合到更大的蛋白质上，旋转作用减弱，极化发射信号增强，并与蛋白结合分数成比例增加，并可以被荧光检测器检测到。

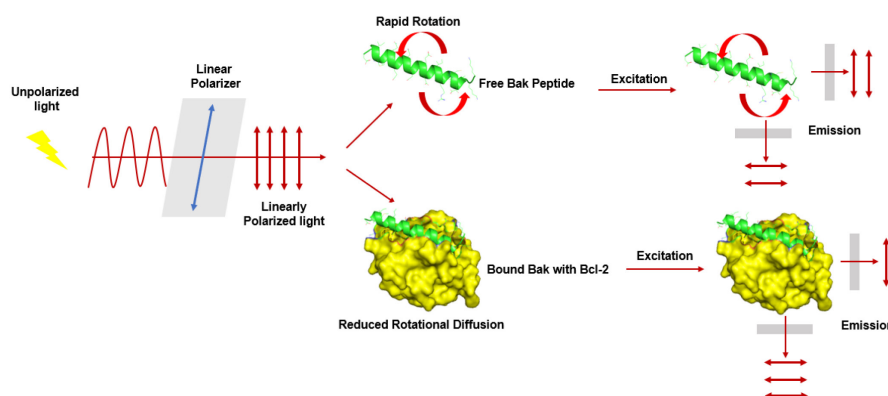


图 1. 实验原理

1. 将 50 μg 的 Bcl-xl 重组蛋白粉末在 4 $^{\circ}\text{C}$ 预约离心，12,000 $\times g$ 离心 10 分钟，目的是将粉末离心到离心管的底部。离心结束后加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 磷酸盐缓冲液，将蛋白震荡，溶解为 14 μM 的溶液，分装到小的离心管中，放到 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用。
2. 取 1 mg 订制的荧光多肽 4 $^{\circ}\text{C}$ 预约离心，12,000 $\times g$ 离心 5 分钟。离心结束后加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 磷酸盐缓冲液，震荡溶解后稀释为 3 μM 的多肽溶液，分装到 1.5 ml 棕色不透光离心管中，放到 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用。
3. 取 3 μM 的荧光多肽储液，用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 磷酸盐缓冲液稀释 300 倍放入不透光离心管中来配置荧光多肽的工作溶液 (Working buffer, WB)，浓度为 10 nM，取 0.5 ml 工作溶液备用。
4. 将稀释后的荧光多肽工作溶液按照图 2 的说明加入到编好序号的不透光离心管中，

编号为 1 的不透光离心管加入 100 μL 的工作溶液，编号 2-8 的不透光离心管中分别放入 50 μL 的工作溶液。操作全程需谨慎避光，离心管放在冰上或者 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下完成。

离心管 1 100 μL WB	离心管 2 50 μL WB	离心管 3 50 μL WB	离心管 4 50 μL WB	离心管 5 50 μL WB	离心管 6 50 μL WB	离心管 7 50 μL WB	离心管 8 50 μL WB
-------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------

图 2. 离心管编号示意图

- 首先在第一个不透光离心管中稀释溶解 bcl-xl 蛋白，将事先配置好的 bcl-xl 蛋白储液在第一个不透光离心管中稀释为 1.4 μM 的浓度，移液枪吹打混匀。然后按照二倍稀释法 (见图 3)，取第一个离心管中的半倍体积的溶液放在第二个不透光离心管中，移液枪吹打混匀，这里对溶液混匀有助于蛋白浓度稀释的准确性。依次进行半倍稀释，最后将第七个离心管中的半倍体积储液混匀后吸弃，留存最后一管荧光多肽溶液不与 bcl-xl 混合，作为参照溶液。

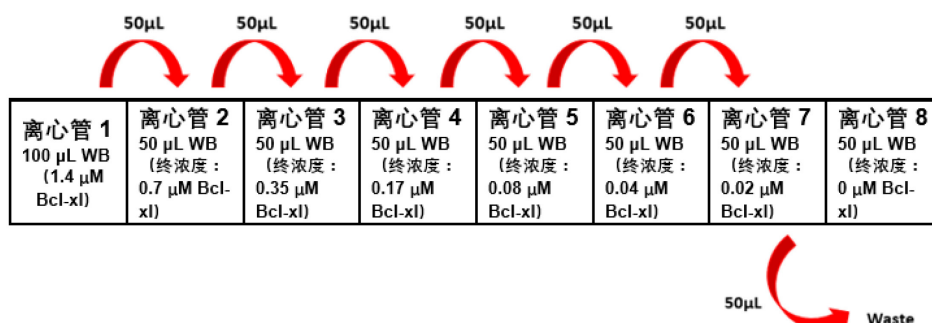


图 3. 二倍稀释法示意图

- 在将实验体系配制好了以后，将不透光离心管放到室温静置孵育 2 个小时，目的是将混合好的 bcl-xl 和 bak 多肽充分作用。静置孵育期间注意避光，避免过分的震荡和干扰。
- 在实验体系孵育完成后，将不透光离心管中的混合液转移到 Corning 384 孔板中，每孔体系为 15 μL ，每个浓度设三个平行对照板孔 (图 4)。

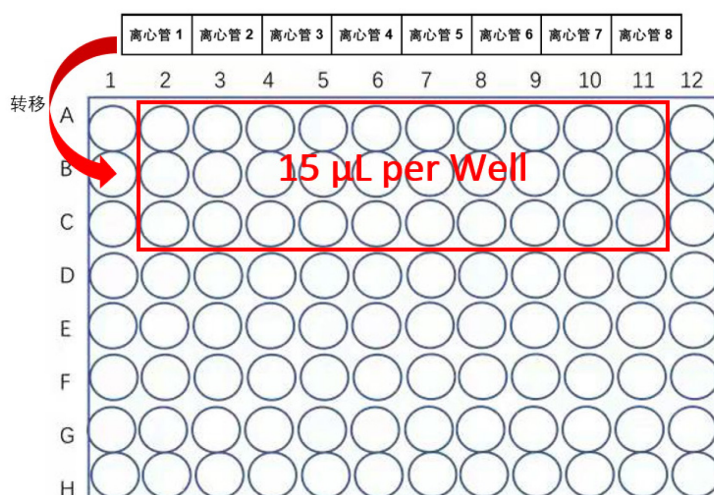


图 4. 孔板转移示意图

8. 在 Perkin Elmer 的多功能酶标仪 EnVision 上面进行参数设置。将 Corning 384 孔板放在酶标仪中。利用 EnVision Workstation 选择荧光偏振测量方法。设置相关参数，如微孔板的型号，荧光团的类型和激发和发射波长 (表格 1)。然后，选择任意孔来优化测量的高度 (measurement height)，选择只有荧光多肽的孔来优化 G 值 (G-factor)。
9. 在 Perkin Elmer 的多功能酶标仪 EnVision 上面进行荧光偏振数值检测，使用 EnVision Workstation 进行数据处理，具体参数设置请参照表格 1。

表 1. 仪器设置参数表

SETTING	PARAMETER
Mirror	FITC FP Dual Enh
Exc. filter	FITC FP 480
Ems. filter	FITC FP P-pol 535
2nd ems. filter	FITC FP S-pol 535
Measurement height	9.5 mm
Number of flashes	30
G-factor	0.87

结果与分析

按照表格 2 中的浓度进行梯度测试，得到了图 5 的实验结果。

表 2. 梯度实验浓度表

	Bcl-xl protein concentration gradient (μM)	Bak peptide concentration (nM)	Total solution (μl)
1	1.4	10	15
2	0.7	10	15
3	0.35	10	15
4	0.175	10	15
5	0.0875	10	15
6	0.04375	10	15
7	0.021875	10	15
8	0	10	15

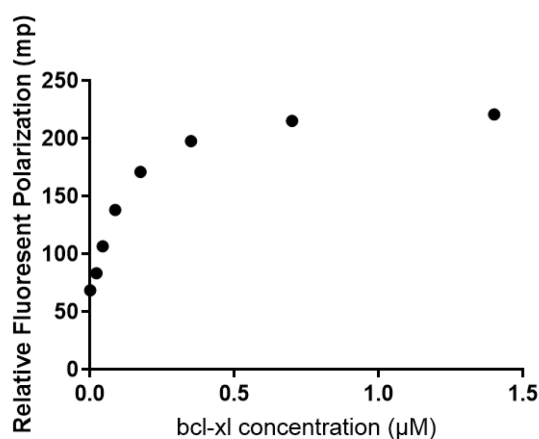


图 5. 浓度梯度测试实验结果

分析：我们得到数据后进行了初步的分析，实验结果证明，在 bcl-xl 与 bak 荧光多肽结合后，荧光偏振的数值可以达到 220 mp，并且与 bcl-xl 与荧光多肽不结合状态的 68 mp 有明显的差距。有效区间足够大，可以应用于检验小分子打断蛋白-多肽相互作用

用的效果。通过计算得到，该模型 kd 值在 97.78 nM，和文献所报道的数据接近 (Kutzki *et al.*, 2002)，具备可信度。

注意事项

关于参数设置：

1. 参数定义：Measurement height，指的是测量高度，该参数帮助确定仪器的最佳焦点位置。G-factor，用于校正滤光片、偏振器和单色器等光学元件，来帮助检测器确定最佳增益，该参数用于计算荧光偏振强度 (图 6)，其中 $I_{||}$ 和 $I_{\perp}$ 分别表示平行于入射光和垂直于入射光的发射光光强。

$$P = \frac{I_{||} - G * I_{\perp}}{I_{||} + G * I_{\perp}}$$

图 6. 偏振公式

关于溶液配方：

1. 此次实验所用溶液为 PBS 磷酸盐缓冲液，为商业化生物溶液，储存温度为室温。
2. 实验所配制蛋白储液，荧光多肽储液，荧光多肽工作溶液，需储存在 -80 °C 冰箱中，并且实验最好在 1 个月内使用。

致谢

感谢国家自然科学基金面上基金 (项目编号 21977061) 和科技部项目 (项目编号 2021YFE0109300) 提供的经费支持。感谢清华大学尹航教授课题组提供的支持。感谢清华大学药学技术中心活性筛选平台 (High Throughput Screening Core Facility, Center of Pharmaceutical Technology, Tsinghua University) 提供的仪器支持。感谢清华大学药学技术中心王婷老师和商世瑛老师的帮助和建议。

参考文献

1. Kutzki, O., Park, H. S., Ernst, J. T., Orner, B. P., Yin, H. and Hamilton, A. D. (2002). [Development of a potent Bcl-x\(L\) antagonist based on alpha-helix mimicry.](#) *J Am Chem Soc* 124(40): 11838-11839.
2. Khan, S., Zhang, X., Lv, D., Zhang, Q., He, Y., Zhang, P., Liu, X., Thummuri, D., Yuan, Y., Wiegand, J. S., *et al.* (2019). [A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity.](#) *Nat Med* 25(12): 1938-1947.