

基于表面等离子共振技术垂钓方法发现中草药活性成分

Discovery of Active Ingredients in Chinese Herbal Medicine Based on the Fishing Method of Surface Plasmon Resonance Technology

王静*

天然药物及仿生药物全国重点实验室，药学院，北京大学，北京

*通讯作者邮箱: wangjing1988@bjmu.edu.cn

摘要

中草药活性成分的发现和确认在创新药物研发和中草药药理机制研究中发挥着重要作用。以Biacore为代表的表面等离子共振仪是法规与药典推荐的药物活性评价技术。该仪器是基于表面等离子共振（SPR）原理的生物传感系统，可实时、原位测量各种生物分子的结合与解离过程，给出亲和力、动力学、活性浓度等信息。本研究案例中，以热休克蛋白60（Hsp60）作为蛋白靶点，通过表面等离子共振仪Biacore T200的Inject and recover实验方法对药用植物苏木提取液进行了分子垂钓，以发现其潜在的活性成分。结果发现有16种小分子化合物可能和靶蛋白Hsp60存在特异性结合。接着，对这16种小分子化合物与Hsp60的亲和力和动力学进行了检测和验证。结果显示，这16种小分子化合物与靶蛋白Hsp 60有明显的动力学结合特征以及较强的特异性结合。

关键词：表面等离子共振仪，中药活性成分，药物筛选，Biacore，Inject and recover

研究背景

表面等离子共振法是法规认可的药物活性评价技术，于2016年收录于美国和日本药典，2020年收录于中国药典。该方法是基于SPR原理：光透过棱镜照射到芯片上，光子与芯片表面的自由电子发生表面等离子共振，在反射光接收的某个角度能检测到能量损失，其对应的角度叫SPR角，研究表明SPR角的改变和芯片表面的质量变化成正比。利用表面等离子共振仪可以实时、原位测量各种生物分子的相互作用，得到亲和力、动力学、活性浓度等信息，广泛应用于药物靶点发现、药物筛选、分子垂钓、药物一致性评价、生产质控等，具有高灵敏、非标记、样品用量少、实时监测等优点。利用表面等离子共振仪Biacore T200的Inject and recover方法，可以对中草药提取液进行分子垂钓，以发现其潜在的活性成分，用于进一步的药物研发以及药理机制研究。

Hsp60是一种分子量为60 kDa的热休克蛋白，在神经保护作用方面发挥着重要作用。本实验选择Hsp60作为靶蛋白，通过Inject and recover的实验方法对药用植物苏木提取液的活性成分进行了分子垂钓，并对垂钓出的小分子化合物和Hsp60的结合进行了验证。

材料与试剂

1. 药用植物苏木提取液（北京大学药学院屠鹏飞教授课题组生产制备，产品目录号：PKU-MRCTCM-SC214-2008）
2. LB 培养基（北京百奥莱博科技有限公司，产品目录号：GS5031）
3. 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷（IPTG，生工生物工程上海股份有限公司，产品目录号：A100487）
4. Ni-NTA 纯化树脂试剂盒（CW BIO，产品目录号：CW0894S）
5. 超滤管（Millipore，产品目录号：Amicon Ultra-0.5，截留分子量 10 kDa）
6. S 系列 CM5 芯片（Cytiva，Series S Sensor Chip CM5，产品目录号：29149603）
7. 氨基偶联试剂盒（Cytiva，产品目录号：BR100050）
8. 醋酸钠缓冲液（Cytiva，Acetate 4.5，产品目录号：BR100350；Acetate 4.0，产品目录号：BR100349）
9. 96 孔板（Cytiva，产品目录号：BR100503）
10. 96 孔板封膜（Cytiva，产品目录号：28975816）
11. 10 $\times$ PBS-P 缓冲液（Cytiva，产品目录号：8995084）
12. 50 mM NaOH 溶液（Cytiva，产品目录号：BR100358）
13. 1.5 mL EP 管（KIRGEN，产品目录号：KG2211）
14. 1,000 mL 0.2 μ m NY 过滤器（康宁，产品目录号：430515）

15. 4.0 mL 玻璃瓶 (Cytiva, 产品目录号: BR100209)
16. 橡胶盖 (Cytiva, 产品目录号: BR100411)
17. 0.2 μm 滤膜 (PALL, 产品目录号: FG8114)
18. 2 mL 注射器 (上海治宇医疗器械有限公司, 产品目录号: JQ4150002)
19. 三氟乙酸 (TFA, Alfa, HPLC Grade, 产品目录号: 044630)
20. 碳酸氢铵 (NH_4HCO_3 , Sigma-aldrich, 产品目录号: 09830)
21. 二甲基亚砜 (DMSO, MP, 产品目录号: 196055)
22. 咪唑 (Sigma-aldrich, 产品目录号: 56748)
23. 1 $\times$ PBS-P 缓冲液 (见溶液配方)
24. 中草药提取液 (见溶液配方)
25. 0.5% TFA 水溶液 (见溶液配方)
26. 50 mM 碳酸氢胺水溶液 (见溶液配方)
27. 中药活性小分子化合物母液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 纯水仪 (密理博, model: Milli-Q Integral)
2. 表面等离子共振仪 (Cytiva, model: Biacore T200)
3. 台式离心机 (贝克曼, model: Microfuge 20)
4. 循环水多用真空泵 (郑州特尔仪器设备有限公司, model: SHZ-D(III))
5. 摇床 (Thermo Scientific, model: SHKE8000)
6. 超声破碎仪 (Sonica, model: q700)
7. 制冰机 (雪科电器有限公司, model: CK2021010042)
8. 蛋白定量仪 (Denovix, model: DS-11)

实验步骤

一、目的蛋白Hsp 60的制备

将编码Hsp60的DNA序列克隆到His-tag的pET-28a表达载体, 得到重组质粒。将重组质粒转化到大肠杆菌DE3菌株。挑选重组菌落接种于含有50 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素LB液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养8 h。降温至20 $^{\circ}\text{C}$,

加入0.5 mM IPTG诱导培养10 h。将菌液在4 °C下8,000× g离心10 min，倒掉上清液，收集菌体。用PBS重悬菌体，在冰浴中超声破碎10 min，将裂解液在4 °C下12,000× g离心15 min。上清液用0.2 μm的滤膜过滤后，使用Ni-NTA纯化树脂通过10 mM咪唑洗涤和250 mM咪唑洗脱进行分离纯化。使用超滤管对蛋白进行浓缩。蛋白终浓度调整为2 mg/mL。

二、实验准备

打开Biacore T200仪器和控制软件Biacore T200 Control Software。仪器开机后，等待检测单元的温度达到预设温度（通常为25 °C）。

将仪器左侧的进液管A插入1× PBS-P缓冲液中。仪器右侧的管子插入超纯水中。将2L的废液瓶放置在仪器右侧的托架上，连接上专用的盖子（图1）。

在Biacore T200 Control Software，点击Insert chip，打开芯片舱门，放入一张新的CM5芯片（图2），填写芯片相关信息，点击Dock chip。

在Biacore T200 Control Software的Tools里选择Prime，点击Start。缓冲液会以较高的流速冲洗仪器整个内部流路系统。结束后，点击Close。



图1 Biacore T200仪器

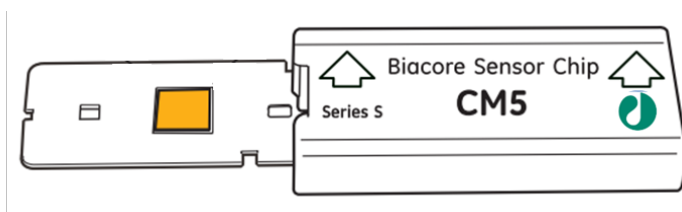


图2 CM5芯片

三、配体偶联

1. 计算配体偶联量

根据以下公式计算配体目标偶联量：

$$R_{\max} = \frac{\text{analyte MW}}{\text{ligand MW}} \times R_L \times S_m$$

其中， $R_{\max}$ 为芯片表面最大结合容量，通常设为100 RU；Analyte MW为小分子分子量，ligand MW为蛋白分子量； S_m 为化学计量比，通常设为1；考虑到配体偶联到芯片上可能存在空间位阻效应，这里将配体目标偶联量设为1.5倍的 R_L 。在本研究案例中，Hsp 60的分子量为61 kDa，假如中草药苏木中的小分子活性成分的分子量按400 Da计算，则Hsp 60目标偶联量~23,000 RU。

2. 配体预富集

通过预富集实验对配体蛋白的偶联条件进行筛选。根据蛋白的等电点，选择pH低于蛋白等电点的醋酸钠pH，使蛋白在偶联时带正电，与带负电的CM5芯片表面存在静电吸附，从而有利于蛋白固定在芯片上。Hsp 60蛋白等电点为5.49，分别使用10 mM pH 4.5和4.0的醋酸钠稀释Hsp 60蛋白至20 µg/mL，100 µL，手动做预富集实验。

具体来说，在Biacore T200 Control Software里，点击Run → Manual Run。在弹出的对话框中，选择Flow cell 1，Flow rate设为10 µL/min。分别进10 mM pH 4.5和4.0的醋酸钠稀释的Hsp 60溶液60 s，每次进样后用50 mM NaOH溶液再生30 s。根据预富集实验结果，选择蛋白富集信号明显上升的醋酸pH作为偶联pH，最终确定Hsp 60蛋白的偶联条件为10 mM pH 4.0的醋酸钠溶液。

3. 配体偶联

在Biacore T200 Control Software里，点击Run → Manual Run。在弹出的对话框中，选择Flow cell 1,2,3,4，Flow rate设为10 µL/min。将氨基偶联试剂盒里的EDC和NHS配成溶液各取100 µL混合均匀，然后进样800 s。用10 mM pH 4.0的醋酸钠溶液稀释Hsp 60蛋白至40 µg/mL，进样600 s。再用氨基偶联试剂盒里的Ethanolamine封闭800 s。运行结束后，结果显示Hsp 60蛋白偶联了~10,000 RU。按照公式计算，Hsp60目标偶联量~23,000 RU。由于芯片本身容量有限，蛋白偶联量会有一定限制，并且蛋白表面赖氨酸的数目和分布、蛋白浓度等因素也会影响蛋白的偶联量，因此蛋白的实际偶联量可能达不到公式计算的目标偶联量。通常蛋白偶联5,000-30,000 RU都可以用于后续蛋白和小分子实验。

四、中草药活性成分的垂钓实验

在Biacore T200 Control Software里点击File中的Open/New Method，在Biacore Methods里选择Inject and recover，点击Open。在Method Builder界面中，点击Assay Steps里的Inject and Recover，修改Number of replicates为24（图3）。在Cycle Types界面里，Inject and Recover，Sample的Contact time为120 s，Flow rate

为5 $\mu\text{L}/\text{min}$, Wash solution和Recovery solution为0.5% TFA, Incubation time为20 s, Deposition solution为50 mM NH_4HCO_3 , Deposition solution volume为10 μL , Number of repetitions为5 (图4)。为了防止中草药提取物堵塞仪器, 每个Cycle后用50% DMSO做一次Extra Wash。点击Setup Run, Flow path选择1,2,3,4, 点Next。勾选prime, 默认实验温度为25 $^{\circ}\text{C}$ 。点Next进入Rack Position界面, Reagent Rack为Sample and Reagent Rack 1。点击Menu里的Automatic Positioning, 将Sample、Regeneration、Wash、Reagents的Vial Size设为Large, 将Sample Deposition的Vial Size设为Medium, 将Pooling设为Yes。根据样品所在位置进行样品溶液配制和放置。

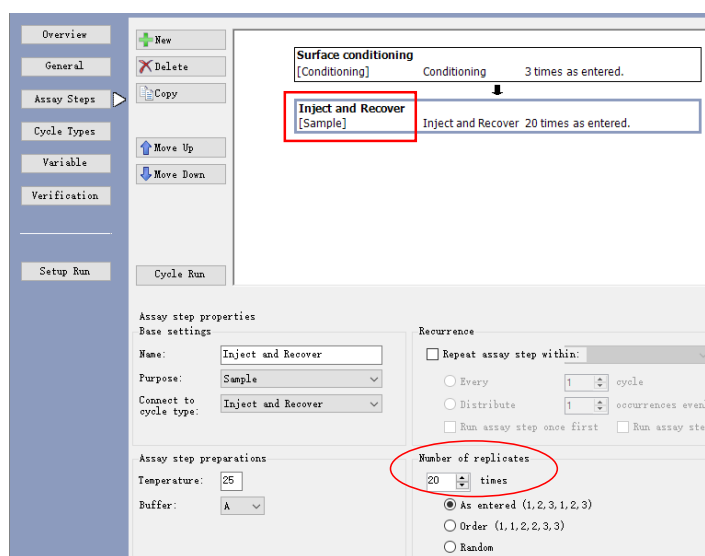


图3 Inject and recover实验方法中设置Number of replicates

如图5所示, D行和E行24个孔均放置空的1.5 mL EP管, F1-F5放置4 mL的玻璃瓶。其中F1为2 mL $1\times$ PBS-P缓冲液; F2为中草药苏木提取液, 用 $1\times$ PBS-P溶解和稀释, 浓度为5 mg/mL, 使用前用0.2 μm 滤膜过滤, 准备3 mL; F3、F4和F5为0.5% TFA, 分别准备4.5 mL、4 mL、4 mL; F6为50% DMSO, 准备1.5 mL; F7为50 mM NH_4HCO_3 , 准备1.5 mL。点击Next后, 对方法和数据结果进行保存, 仪器开始自动运行。

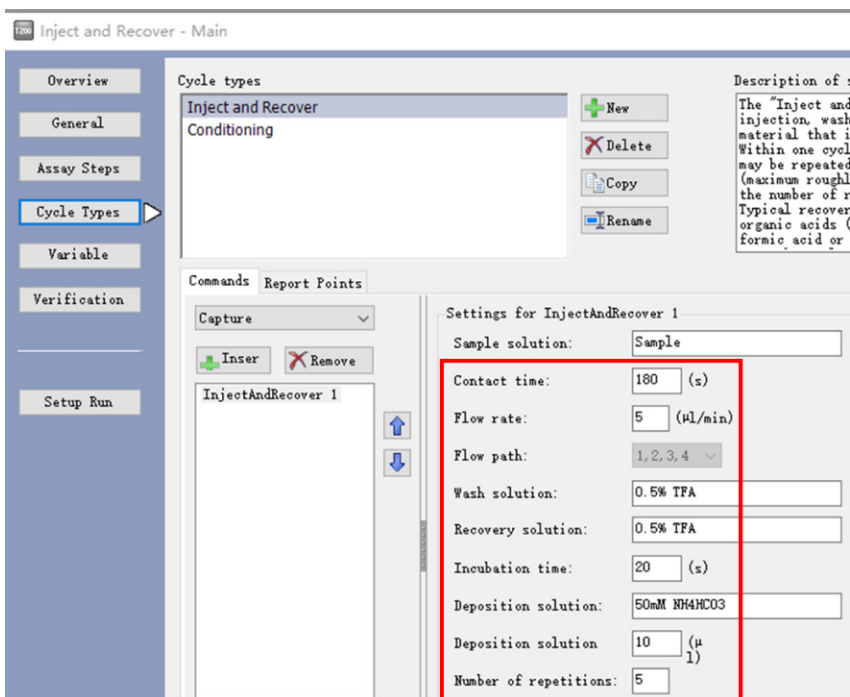


图4 设置样品结合时间、流速、洗脱和回收条件、重复次数等

实验结束后，和靶蛋白Hsp 60结合的中草药活性小分子被回收到空的1.5 mL EP管中，合并所有1.5 mL EP管中的样品，使用超高效液相色谱联用高分辨质谱（UPLC/HRMS, Thermo Electron, Germany）进行检测。结果鉴定出16个中草药活性小分子化合物可能与靶蛋白Hsp 60存在特异性结合。

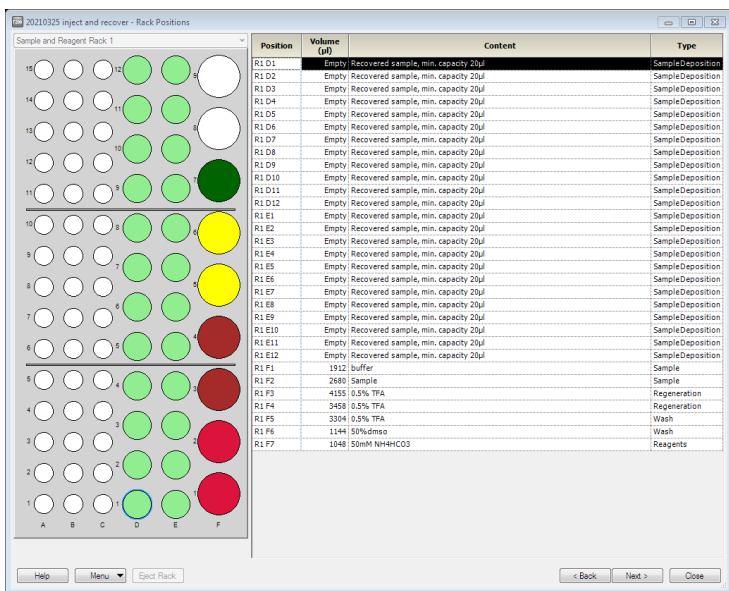


图5 样品名称、用量和放置位置示意图

五、中草药活性小分子和靶蛋白Hsp 60的亲力和动力学检测

接下来，使用Biacore T200对这16个中草药活性小分子化合物与靶蛋白Hsp 60的亲力和动力学进行了检测。

用一张新的CM5芯片，按照上述配体偶联方法在Flow cell 2固定Hsp 60，偶连量为~10,000 RU。Flow cell 1做活化和封闭处理。

配制中药活性小分子化合物浓度梯度为0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100 μ M，共九个浓度梯度。

在Biacore T200 Control Software，点击File中的Open/New Method，选择LMW kinetics，点击Open。将Assay Steps界面的Startup，改成5 times。在Cycle Types界面里，Contact time设置成60 s，Dissociation time设置成60 s，Flow rate为30 μ L/min，Flow path为2-1。在Variable Settings界面，输入小分子化合物的名称和浓度，浓度设置为0、0.195、0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50 μ M。点击Setup Run，Flow path选择2-1，点击Next。勾选prime，默认实验温度为25 $^{\circ}$ C。点击Next进入Rack Position界面，Reagent Rack选择Sample and Reagent Rack 1。将Sample的Rack设为Sample，将Startup的Rack设为Reagent。将Pooling改为Yes。根据样品所在位置和需要体积进行样品准备和放置。点击Eject Rack，将样品板放入仪器里。点击Next和Save，开始运行。

实验注意要点

1. 配体偶联：

对于中草药活性成分的垂钓实验，为了收集到更多的活性组分，通常对 CM5 芯片的全部通道都进行配体偶联。每个通道的配体偶联量通常大于 5,000 RU。

2. 中草药提取液配制：

如果中草药提取物是水溶性的，可以直接用 PBS-P 溶解。为了防止中草药提取物堵塞仪器，可以在实验前用 0.2 μ m 滤膜过滤。

如果中草药提取物需要 DMSO 助溶，可以配成含 2~10% DMSO 的 PBS-P 溶液。实验前需要用 0.2 μ m 的有机滤膜过滤。中草药提取物中各活性成分的实验浓度受限于它在中草药中的含量以及在 DMSO 溶液中的溶解性。为了防止中草药提取物堵塞仪器，每个 Cycle 后可以用 50% DMSO 做一次 Extra Wash。

3. 洗脱液条件优化：

在实验中，可以根据样品结合情况调整洗脱液的成分和浓度，比如可以用一定浓度的甲酸、乙酸、三氟乙酸、十二烷基硫酸钠（SDS）等。

4. 对照组实验：

引用格式：王静. (2024). 基于表面等离子共振技术垂钓方法发现中草药活性成分. *Bio-101* e1011014. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011014.

How to cite: Wang, J. (2024). Discovery of Active Ingredients in Chinese Herbal Medicine Based on the Fishing Method of Surface Plasmon Resonance Technology. *Bio-101* e1011014. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011014. (in Chinese)

在本实验案例中，由于垂钓出的小分子化合物只有 16 种，数量不太多，因此直接通过 Biacore 仪器检测这 16 个小分子化合物与靶蛋白的亲和力来对垂钓出的小分子化合物进行验证。

本实验案例的垂钓方法也可应用于药物靶标的发现。把药物固定在芯片上（如果药物是小分子，通常给小分子药物做生物素标记，然后固定在链霉亲和素包被的芯片上），细胞/组织裂解液等作为分析物。由于垂钓出的蛋白比较多，因此需要用空芯片做对照组实验。

1. 中草药活性成分的垂钓:

2. 中草药活性小分子和靶蛋白 Hsp 60 的亲和力和动力学检测:

使用分析软件 Biacore T200 Evaluation software 对结果进行分析。点击 Kinetics/Affinity, 选择 Surface bound, 在 Sample 里选择对应的小分子化合物, 扣减零浓度后, 点击 Kinetics, 选择 1:1 binding 模型, 点击 Parameter, 将 Rmax 改成 Fit local, 点击 Fit, 即得到拟合结果, 包括结合速率 k_a , 解离速率 k_d , Rmax 和亲和力 K_D 。

如图 7, 结果显示这 16 个小分子化合物与靶蛋白 Hsp 60 有明显的动力学结合特征以及较强的特异性结合, 亲和力范围是 $0.14 \mu\text{M}$ 到 $6.10 \mu\text{M}$ 。其中, Compound 14 显示了更快的结合和解离速率, 说明与靶蛋白具有更快的识别能力, 但和靶蛋白形成的复合物没有其他小分子化合物稳定, 和靶蛋白解离较快; Compound 7、10、15 与靶蛋白的解离更慢, 说明 Compound 7、10、15 与靶蛋白形成的复合物比其他小分子化合物更稳定, 滞靶时间更长, 提示如果作为药物, 给药间隔可以更长。

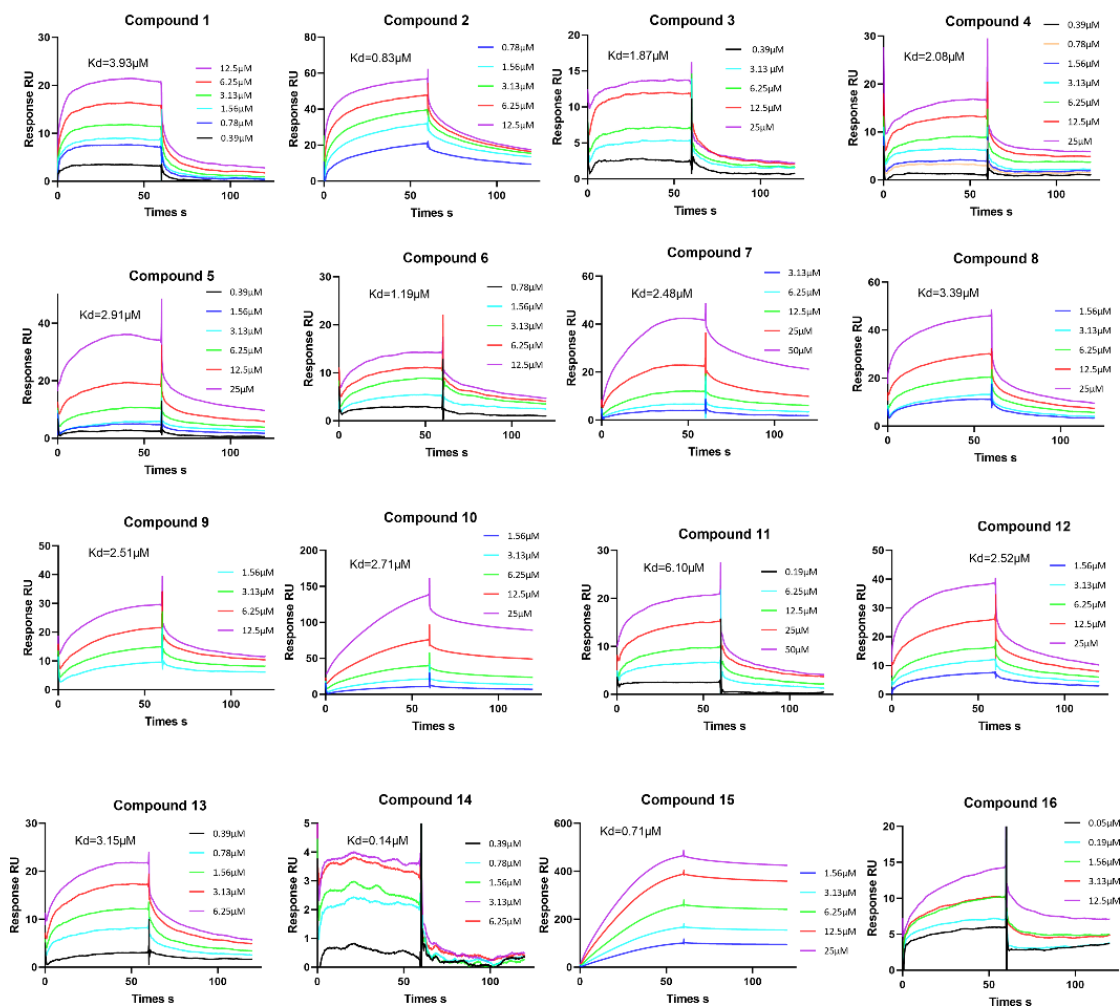


图 7 Biacore T200 检测中草药活性小分子化合物与靶蛋白 Hsp 60 的亲和力和动力学

溶液配方

1. 1× PBS-P 缓冲液

量取 50 mL 10× PBS-P 缓冲液，加 450 mL 超纯水，使用 0.2 μm 过滤器和循环水多用真空泵过滤到装缓冲液的瓶子里。

2. 中草药提取液

用 PBS-P 溶解并配成 5 mg/mL 溶液。

3. 0.5% TFA 水溶液

取 10 mL 超纯水，加入 50 μL TFA，混合均匀。用 0.2 μm 滤膜过滤后备用。

4. 50 mM 碳酸氢胺水溶液

称取 39.5 mg 碳酸氢胺（分子量是 79 g/mol）粉末，加入 10 mL 超纯水，混合均匀。用 0.2 μm 滤膜过滤后备用。

5. 中药活性小分子化合物母液

用 1× PBS-P 溶解中药活性小分子化合物至 10 mM。

致谢

感谢北京大学药学院天然药物及仿生药物全国重点实验室提供仪器技术支撑。感谢北京大学药学院屠鹏飞教授和曾克武教授课题组提供实验数据。感谢研究生姚璐提供帮助。

参考文献

1. Yao, L., Liao, M., Wang, J. K., Wang, J., Liu, D., Tu, P. F. and Zeng, K. W. (2022). Gold Nanoparticle-Based Photo-Cross-Linking Strategy for Cellular Target Identification of Supercomplex Molecular Systems. *Anal Chem.* 94(7): 3180–3187. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04652>