

基于表面等离子共振技术构建色氨酰 tRNA 合成酶的抑制剂筛选和验证体系

Establishment of Inhibitor Screening and Validation System for Tryptophanyl tRNA Synthetase Using Surface Plasmon Resonance

王倩*, 朱贵旺, 刘振明

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: qian.wang@bjmu.edu.cn

摘要

随着检测通量和灵敏度的提高, 生物物理技术已成为早期药物发现阶段的重要组成部分。表面等离子体共振 (SPR) 技术是其中最广泛使用的一种, SPR 的优势包括无需标记、无分子量限制以及能够检测低亲和力相互作用等, 使其成为发现和优化先导化合物的强大平台。在本研究中, 我们以吲哚霉素作为阳性化合物, 通过优化色氨酰 tRNA 合成酶 (TrpRS) 的标签、芯片固定方式和缓冲液条件, 成功建立了可靠且可重复的 TrpRS SPR 高通量筛选和验证体系, Z 因子数值均大于 0.9。与常规 SPR 实验通常仅采用固定的标签、固定方式或缓冲液不同, 本研究实现了各实验参数的系统优化, 使该 SPR 方案在不同实验条件下具备更高的适用性和灵活性。这种多维优化设计不仅提升了 SPR 技术对低亲和力相互作用的检测精度, 还在不牺牲高通量的前提下显著提高了灵敏度和重现性, 确保了数据质量和结果的稳定性。相比之下, 常规 SPR 方案在参数灵活性和实验稳定性上往往受到限制。我们希望, 所提出的研究思路和方法能够为建立其它药物靶点的 SPR 分析提供更多科学依据, 加速先导化合物的发现和优化, 为下一代药物的临床应用奠定更为稳固的技术基础。

关键词: 表面等离子体共振 (SPR) 技术, 吲哚霉素, 色氨酰 tRNA 合成酶 (TrpRS), Z 因子, 药物靶点

引用格式: 王倩, 朱贵旺, 刘振明. (2024). 基于表面等离子共振技术构建色氨酰 tRNA 合成酶的抑制剂筛选和验证体系. *Bio-101* e1011017. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011017.

How to cite: Wang, Q., Zhu, G. W. and Liu, Z. M. (2024). Establishment of Inhibitor Screening and Validation System for Tryptophanyl tRNA Synthetase Using Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011017. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011017. (in Chinese)

Copyright: © 2024 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

材料与试剂

1. His-TrpRS 和 His-avitag (biotin)-TrpRS 委托北京义翘神州科技有限公司合成
2. Surfactant P20 (产品目录号: BR100054)
3. 10× HEPES-P (产品目录号: BR100671) 和 10× PBS-P (产品目录号: 28-9950-84) 缓冲溶液购自于美国 Cytiva 公司
4. 1 M Tris 缓冲溶液 (产品目录号: MC030.1) 购自于中科迈晨 (北京) 商贸有限公司
5. 3 M NaCl 水溶液 (935418) 购自于北京百灵威科技有限公司
6. 腺苷 5'-三磷酸盐 (ATP) (产品目录号: A7699) 和腺苷 3'-单磷酸盐 (AMP) (产品目录号: A9272) 购自于美国 Sigma-Aldrich 公司
7. 1 M PIPES 水溶液 (产品目录号: C4870), 1 M MgCl₂ 水溶液 (产品目录号: R0481) 购买于美国 Amresco 公司
8. 吡啶霉素 (产品目录号: 15385) 购自于美国 Cayman 公司
9. S 系列 SA 芯片 (产品目录号: BR100531)
10. 氨基偶联试剂盒 (产品目录号: BR-1000-50) 和 NTA 捕获试剂盒 (产品目录号: 28995056) 均购置于美国 Cytiva 公司
11. 1.05× PBS-P 缓冲溶液 (见溶液配方)
12. 1.0× 含 5% DMSO 缓冲溶液 (见溶液配方)
13. 1.05× PBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂) (见溶液配方)
14. 1.05× PBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP) (见溶液配方)
15. 1.05× PBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM ATP) (见溶液配方)
16. 1.05× PBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM AMP) (见溶液配方)
17. 1.05× PIPES-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂) (见溶液配方)
18. 1.05× PIPES-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP) (见溶液配方)
19. 1.05× HBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂) (见溶液配方)
20. 1.05× HBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP) (见溶液配方)
21. 1.05× TRIS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂) (见溶液配方)
22. 1.05× TRIS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP) (见溶液配方)

仪器设备

1. 表面等离子共振仪（美国 Cytiva 公司，Biacore T200 & 8K）

实验步骤

一、NTA 芯片捕获 His-TrpRS，表征 TrpRS 与吡咯霉素的结合

1. 实验前的准备

- （1）打开 Biacore T200 系统和电脑的电源开关。Biacore T200 的电源开关位于系统背面的右下角。开机后，需等待检测单元的温度达到预设温度（用户自设，通常为 25 °C）。待温度稳定后，面板上的温度指示灯（黄色）会停止闪烁，该过程可能需要 30~60 分钟。
- （2）打开 Biacore T200 Control Software，将软件程序和主机系统建立连接。
- （3）准备偶联步骤的运行缓冲溶液。量取 20 mL 10× PBS-P 缓冲溶液、180 mL 去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理），混匀后放入缓冲溶液瓶。
- （4）将配制好的缓冲溶液放在 T200 系统左侧的缓冲溶液托架上，换上黑色的单孔盖。
- （5）将缓冲溶液进液管 A（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲溶液瓶底部。其余三根进液管（B、C 和 D）放在左侧的舱门后。
- （6）将 2 L 的废液瓶放置在 T200 系统右侧的缓冲溶液托架上，连接上专用的盖子。
- （7）取 500 mL 去离子水装入 500 mL 缓冲溶液瓶，放置在右侧缓冲溶液托架上用于清洗进样针。
- （8）选择 Tools 菜单中的 Eject Chip 选项，打开芯片舱门进行芯片更换（图 1）。

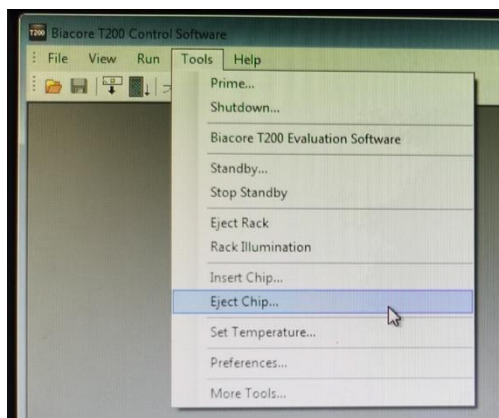


图 1 芯片更换选项所在位置

(9) 若使用的是新芯片，则选择 New chip（图 2）。在 Chip type 的下拉菜单中选择对应的芯片种类(此实验为 NTA 芯片)，在 Chip id 中填入和芯片相关的实验信息，Chip lot no.中可填入芯片批号（选填）。若是已经使用过的芯片，请选择 Reuse Chip，并在 Chip id 下拉菜单中找到与之相对应的芯片信息。对于使用过的芯片，也可以选择 New chip 选项，则之前芯片的使用信息不会被查询到。

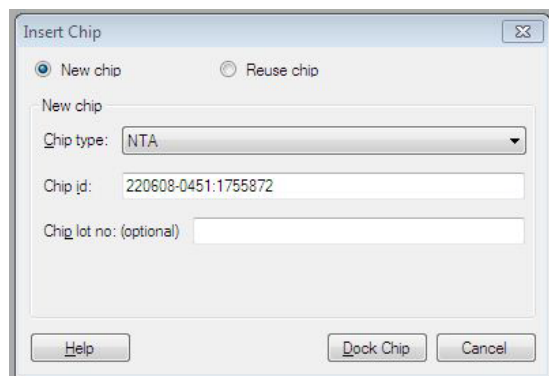


图 2 芯片类型选择窗口

(10) 手持芯片，有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向，将芯片轻轻推入卡槽，合上芯片舱的舱门。

(11) 点击 Dock Chip 按钮，芯片置入后系统将自动转入待机（Standby）状态。

(12) 选择 Tools → Prime 命令，点击 Start。缓冲溶液会以较高的流速冲洗整个内部流路系统，耗时 6~7 分钟。结束后，点击 Close，系统自动转入待机（Standby）状态。

注意：当系统更换缓冲溶液或者芯片后，必须运行 Prime 程序。Prime 时缓冲溶液会冲洗整个流路系统，为下一步的实验做好准备。

2. 配体的偶联

(1) 偶联量计算。根据下式 1 可计算目标偶联量：

$$R_{\max} = \frac{\text{TrpRS}_{\text{MW}}}{\text{吡啶毒素}_{\text{MW}}} \times R_L \times S_L \quad (\text{式 1})$$

其中， $R_{\max}$ 为芯片表面的理论最大结合响应，TrpRS MW 和吡啶毒素 MW 分别为蛋白和小分子的分子量， S_L 为化学计量比，未知时选择 1。 R_L 为小分子偶联水平。实验时实际偶联量为 $1.5 R_L$ 。若固定 R_L 为 10 RU，则经计算， $R_{\max}$ 为 1000 RU，TrpRS 的目标偶联量为 1000 RU。

注意：若已知蛋白和小分子的结合化学计量数，则按照实际情况填写。若未知，考虑绝大多蛋白和小分子结合的化学计量数为 1，可暂且默认为 1。同时，考虑部分蛋白固定于芯片后，由于空间位阻和固定取向的原因，会导致部分蛋白不能结合目标小分子，为了保证小分子的结合响应数值，可以依据式

1 计算数值后，多固定些蛋白，以 1.5 倍为宜。具体调整倍数，可以根据第一次实验结果后自行调整。

(2) 点击 Run 下面的 Manual Run, Flow rate 在本次实验中选择 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 选择 Flow path 2 (Flow path 的选择可以根据芯片的实际使用情况来选择), 右侧下拉菜单中选用 Sample and Reagent Rack 1 (Biacore T200 有三种不同的试管架可根据用户实际情况自行选择使用: Reagent Rack 1、Reagent Rack 2 和 Sample and Reagent Rack1), 点击 Start, 输入文件名称保存 (图 3)。

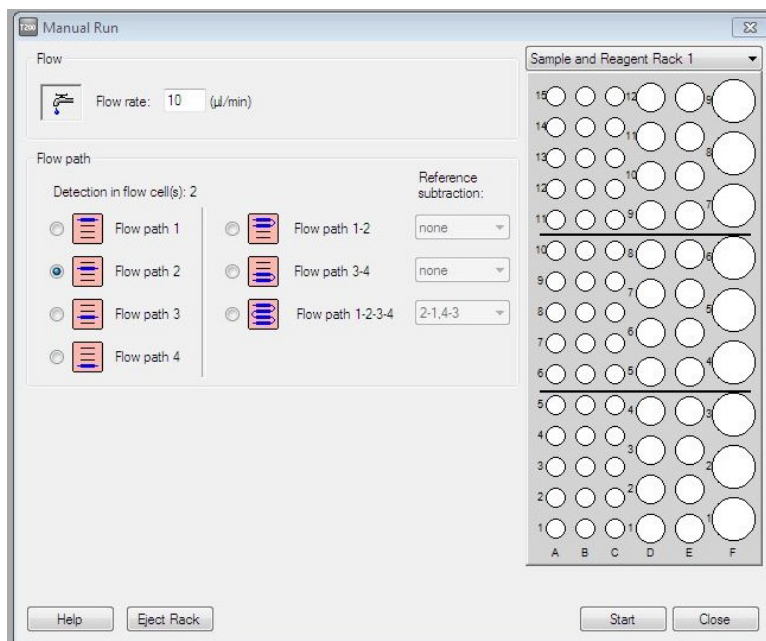


图 3 Manual Run 程序的建立以及流路通道和流速的选择窗口

(3) 点击 Eject rack tray, 弹出试管架, 依次将 100 μL 350 mM EDTA 放入 R1D1, 100 μL 0.5 mM NiCl_2 放入 R1D2 以及 200 μL 30 ng/ μL TrpRS 放入 R1D3 (若使用的是带盖的 EP 管, 所有盖子必须剪去)。盖上试管架盖子, 点击 Eject Rack Tray 对话框中的 OK, 将样品架送回样品舱。

注意: 样品舱舱门打开后会有时间限制, 打开 60 秒后舱门将自动关闭。最后 15 秒时, 对话框中的倒计时会显示为红色字体并闪烁。此时请不要强行将试管架放入, 以免夹到手。可以等待舱门合上后, 重新打开即可。

(4) 点击 inject, Vial/well position 选择 R1D1, Contact time 输入 60 s, 使用 350 mM EDTA 溶液冲洗芯片表面 (图 4); 继续点击 inject, Vial/well position 选择 R1D2, Contact time 输入 60 s, 在 NTA 芯片表面螯合镍离子, 此时基线会上升约 40 RU; 继续点击 inject, Vial/well position 选择 R1D3, Contact time 输入 30 s, 开始固定 TrpRS, 注射 TrpRS 的过程可以以脉冲的方式, 重复操作, 直至达到预计固定量。

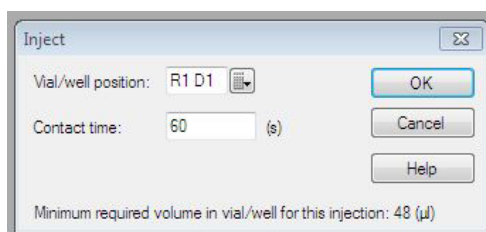


图 4 进样位置 and 时间的填写窗口

二、NTA 芯片联合氨基偶联完成 His-TrpRS 的固定，表征 TrpRS 与吡啶霉素的结合

由于 NTA 传感器芯片带有未修饰的羧甲基基团，可以与 CM 系列传感器芯片采用相同的方式用于共价固定，因此可以在 0.5 mM NiCl₂ 注射之后和 30 ng/μL TrpRS 注射之前用 0.2 M N-乙基-N9-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC) 和 0.05 M N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 的混合溶液活化 NTA 传感器芯片，进而通过共价偶联固定 TrpRS。与单独使用镍离子捕获的固定方法相比，镍离子螯合结合氨基偶联的固定方法可以产生更高的 TrpRS 固定水平和更稳定的基线，并且比单纯的氨基偶联固定方法更容易获得趋向一致的 TrpRS。

1. 配体的偶联

(1) TrpRS 的偶联。由于使用的仍为 NTA 芯片，缓冲溶液仍为 PBS-P 缓冲溶液，因此可以延续第一部分内容，在此基础上直接进行 TrpRS 的偶联。

(2) 点击 Run 下面的 Manual Run，Flow rate 输入 10 μL/min，选择 Flow path 1–2（Flow path 的选择可以根据芯片的实际使用情况来选择），右侧下拉菜单中选用 Sample and Reagent Rack 1，点击 Start，输入文件名称保存。

(3) 点击 Eject rack tray，弹出试管架，依次将 100 μL 350 mM EDTA 放入 R1D1，100 μL 0.5 mM NiCl₂ 放入 R1D2，200 μL 0.2 M EDC/0.05 M NHS 混合液放入 R1D3，200 μL 30 ng/μL TrpRS 放入 R1D4 以及 200 μL 1M 乙醇胺 (EA) 放入 R1D5。盖上试管架盖子，点击 Eject Rack Tray 对话框中的 OK，将样品架送回样品舱。

注意：EDC/NHS 混合液需要在 15 分钟内完成上样。

(4) 点击 Flow path command，选择 Flow path 2，点击 inject，Vial/well position 选择 R1D1，Contact time 输入 60 s，使用 350 mM EDTA 冲洗芯片表面；继续点击 inject，Vial/well position 选择 R1D2，Contact time 输入 60 s，在 NTA 芯片表面螯合镍离子，此时基线会上升约 40 RU；点击 Flow path command，选择 Flow path 1–2，继续点击 inject，Vial/well position 选择 R1D3，Contact time 输入 420 s，开始活化 NTA 芯片表面；点击 Flow path command，选择 Flow path 2，点击 inject，Vial/well position 选择 R1D4，Contact time 输入 30 s，开始固定 TrpRS（重复 R1D4 位置的进样，直至 TrpRS 达到预计固定量）；点击 Flow path command，选择 Flow path 1–2，继续点击 inject，Vial/well position 选择 R1D5，Contact time

引用格式：王倩，朱贵旺，刘振明. (2024). 基于表面等离子共振技术构建色氨酸 tRNA 合成酶的抑制剂筛选和验证体系. *Bio-101* e1011017. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011017.

How to cite: Wang, Q., Zhu, G. W. and Liu, Z. M. (2024). Establishment of Inhibitor Screening and Validation System for Tryptophanyl tRNA Synthetase Using Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011017. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011017. (in Chinese)

输入 420 s, 对于未偶联 TrpRS 的羧基开始进行封闭。

注意: Flow path 的选择可以根据芯片的实际使用情况来选择。若 1 和 2 通道已经被使用, 可以选择 Flow path 3–4; 若同时固定三种蛋白, 则可选择 Flow path 1–2–3–4。

2. 样品制备以及上机检测

(1) 配制运行缓冲溶液和溶剂校正曲线。因为吡啶毒素的储液为 DMSO 溶液, 因此吡啶毒素的运行缓冲溶液选用含 5% DMSO 的 PBS-P 溶液 (视样品溶解性可调整 DMSO 含量, 最高 DMSO 含量不能超过固定蛋白的耐受度)。取 52.5 mL 10× PBS-P 用去离子水 (已完成 0.22 μm 膜过滤处理) 稀释到 500 mL, 配成 1.05× PBS-P。然后, 取出 380 mL 1.05× PBS-P 缓冲溶液和 20 mL DMSO (已完成 0.22 μm 膜过滤处理) 混匀, 制备 1.0× 含 5% DMSO 的 PBS-P 缓冲溶液, 随后按照表 1 所示, 制备 DMSO 含量为 4.5%、4.9%、5.3%以及 5.8%的溶剂校正曲线 (4 点校正)。(表 1)

表 1 DMSO 的 4 点溶剂校正曲线配制方法

	4.5% DMSO	5.8% DMSO		4.9% DMSO	5.3% DMSO
1.05× PBS-P	9.5 mL	9.5 mL	4.5% DMSO	3 mL	1.5 mL
DMSO	0.45 mL	0.58 mL	5.8 % DMSO	1.5 mL	3 mL
最终体积	~10 mL	~10 mL	最终体积	4.5 mL	4.5 mL

(2) 吡啶毒素浓度梯度的配制。首先, 使用 DMSO 将 10 mM 吡啶毒素稀释至 4 mM, 然后, 使用 1.05× PBS-P 溶液稀释 4 mM 小分子母液 20 倍, 得到终浓度为 200 μM 的含有 5% DMSO 的吡啶毒素溶液, 随后, 用配好的 1.0× 含 5% DMSO 的 PBS-P 缓冲溶液 2 倍稀释 11 个浓度梯度, 例如 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12.5 μM, 6.25 μM, 3.125 μM, 1.56 μM, 0.78 μM, 0.39 μM (可根据实际样品的亲和力强弱进行梯度调整)。以 1.0× 含 5% DMSO 的 PBS-P 缓冲溶液作为零浓度。

(3) 多循环动力学/亲和力分析程序设置。本实验选用多循环检测 (multi-cycle kinetic/affinity), 首先, 将缓冲溶液进液管 A 插入的缓冲溶液更换为 1.0× 含 5% DMSO 的 PBS-P 缓冲溶液, 点击 Biacore T200 Control Software 里 Tools 下拉菜单中的 Prime, 然后点开 Run 下面的 Wizard, 选择 Kinetics/affinity, 点击 New。

(4) 在 Injection Sequence 界面, Flow path 选择 2–1, Chip type 选择 Custom (因这里选择 NTA 芯片, 会在每一个浓度梯度之前重复进行镍离子螯合和 TrpRS 固定的步骤, 而在前面的步骤中为了克服单独镍离子螯合 TrpRS 基线不稳定的问题, 我们使用镍离子螯合联合氨基偶联的方式完成了 TrpRS 的固定, 所以这里直接选择 Custom 芯片进行吡啶毒素浓度梯度的上样即可), 勾选 Sample 和 Carry Over, 点击 Next (图 5)。

注意: Carry Over 是使用 50% DMSO 溶液冲洗管路, 目的是为了避免样品上一个浓度在管路里的残留影响下一个样品的浓度。若实验体系不含 DMSO 等有机溶剂, 可以不勾选 Carry Over。Regeneration 根据实验体系的实际情况勾选, 一般蛋白和小分子的互作体系不需要芯片再生。

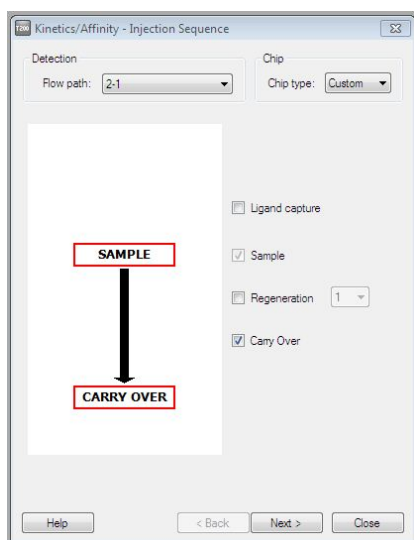


图 5 流路通道、芯片种类和实验流程的参数设置

(5) 在 Setup 界面，勾选 Run startup cycles，Solution 输入 PBS-P, 5% DMSO，Number of cycles 选择 5；勾选 Run solvent correction，Number of injections 选择 4，Repeat after 100 sample cycles，点击 Next（图 6）。

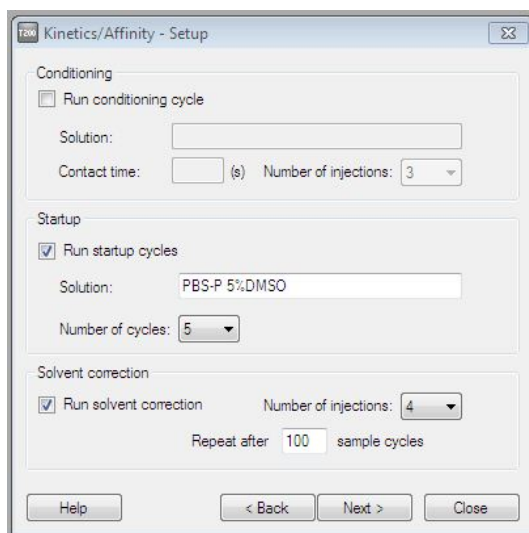


图 6 Conditioning、Startup 和溶剂校正的参数设置

(6) 在 Injection Parameters 界面，Contact time 输入 60 s，Flow rate 输入 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，Dissociation time 输入 120 s，Extra wash after injection with 输入 50% DMSO，Stabilization period 输入 30 s，点击 Next（图 7）。

注意：这里的结合、解离时间可以根据实验体系的实际情况自行设置。Stabilization period 是指两个样

品的进样间隔，通常在 30~60 s 之间。

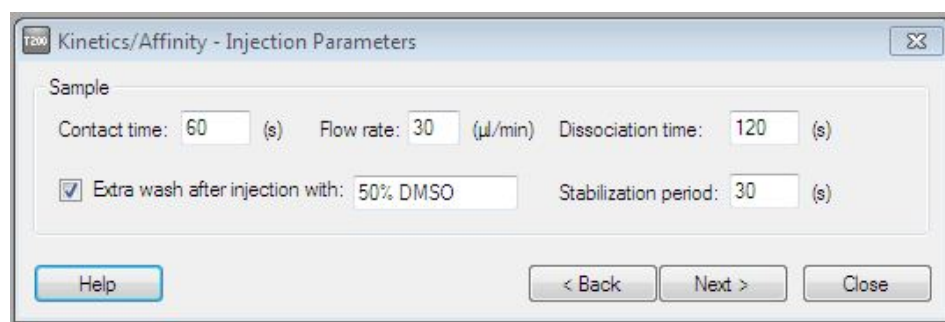


图 7 多循环动力学/亲和力分析程序建立过程中结合解离时间和流速等的设置

(7) 在 Samples 界面，输入吲哚霉素的 Sample id 以及浓度梯度（通常为浓度由低到高输入，8~12 个浓度梯度即可），Run order 选择 As entered，点击 Next（图 8）。

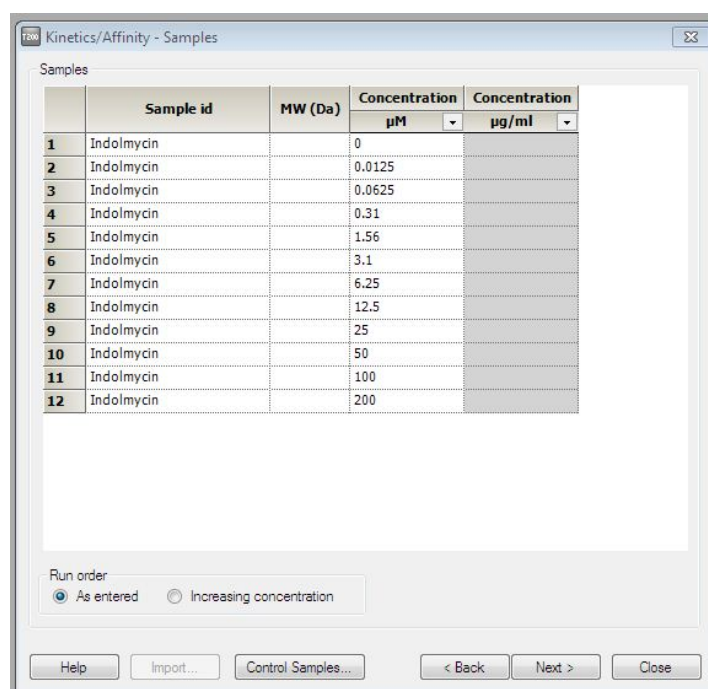


图 8 多循环动力学/亲和力分析程序建立过程中流动相浓度梯度的设置

(8) 点击弹出框中的 Ignore 按钮，在 System Preparation 界面，勾选 Prime before run，实验温度一般为 25 °C，点击 Next。

(9) 在 Rack Positions 界面，将左侧 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1，点开 Menu 后选择 Automatic Positioning 进入下个界面后，将 Pooling 一栏全部改为 Yes，Vial Size 可根据需求进行调整，若使用 1.5 mL EP 管，则选择 medium（图 9 和图 10）。

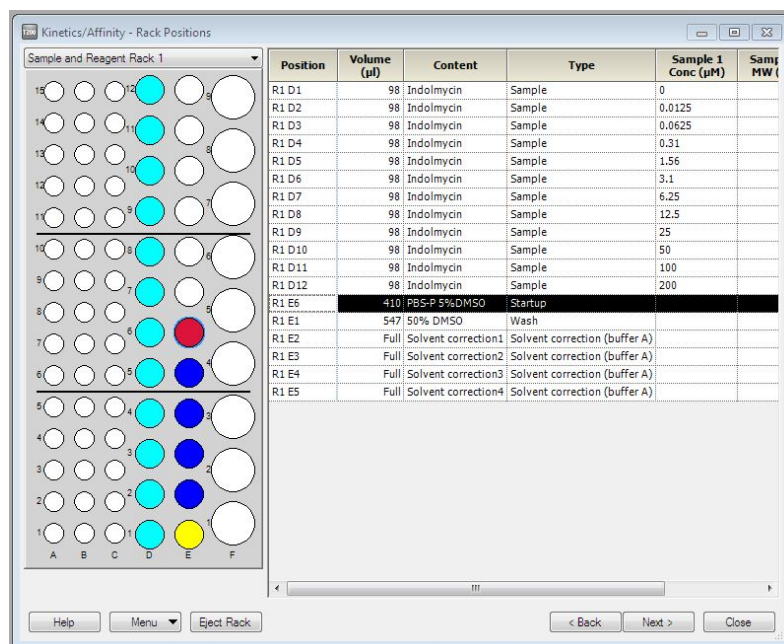


图 9 样品体积的要求以及放置位置的参数设置

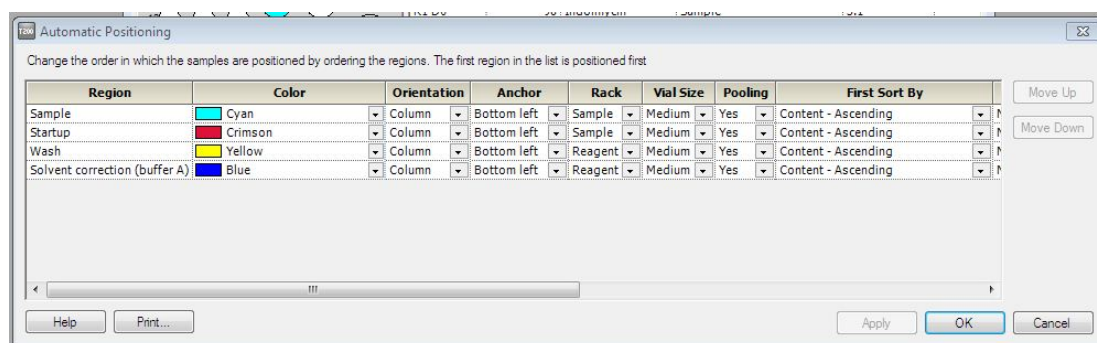


图 10 多循环动力学/亲和力分析程序建立过程中样品管类型的设置

(10) 根据样品所在位置进行样品准备和放置，盖好橡胶瓶盖防止挥发。点 Next 后，对方法和数据结果进行保存，仪器便会开始自动运行。

3. 数据分析与数据解析

(1) 打开数据分析软件 Biacore T200 Evaluation Software，点击 File 中的 open 找到运行文件。

(2) 首先点 Solvent Correction 进行溶剂校正分析（图 11）。溶剂校正曲线一般要求落在-500 到+1,000 RU 之间， χ^2 小于 2。如果超出此范围较多，一般是由于 DMSO 浓度配制不准确造成。

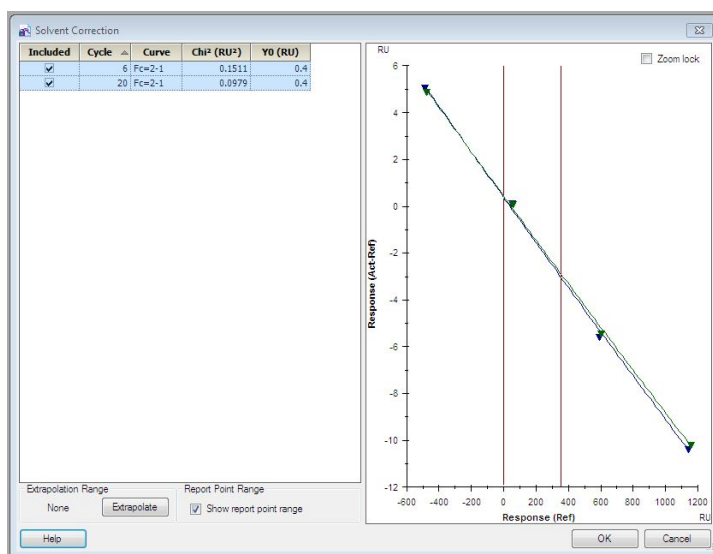


图 11 溶剂校正曲线

(3) 点击 Kinetics/Affinity 下的 Surface bound 进行拟合 (图 12)。小分子因亲和力较弱, 多数没有动力学曲线, 因此常选用 Affinity 拟合。亲和力较强且有动力学曲线的小分子可选用 Kinetics 模型拟合。选择要分析的样品, 在 Included 一栏中可以选择待分析的样品浓度。若样品某个浓度的检测结果不合适, 可以将此浓度前的对号勾掉, 以删除此浓度, 点击 Next, 选择 Affinity, 进行亲和力拟合, 继续点击 Next。

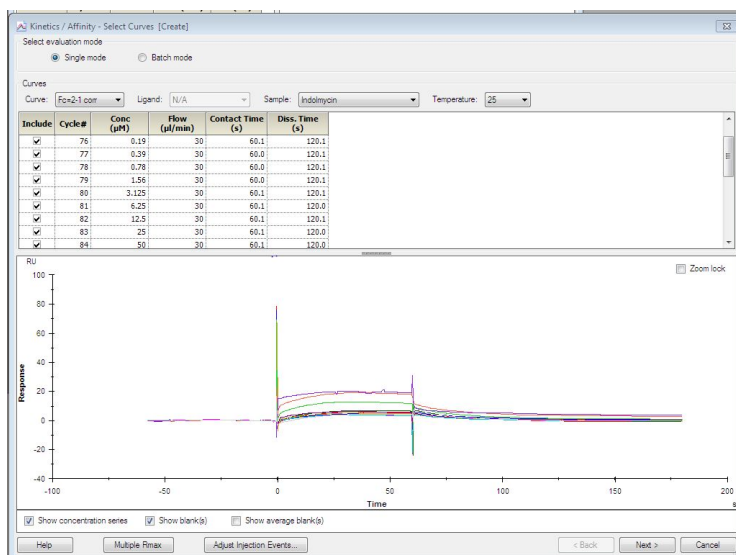


图 12 小分子化合物的结合解离曲线和对应浓度

(4) 接着点左上角的 Fit 即可得到拟合结果 (图 13)。

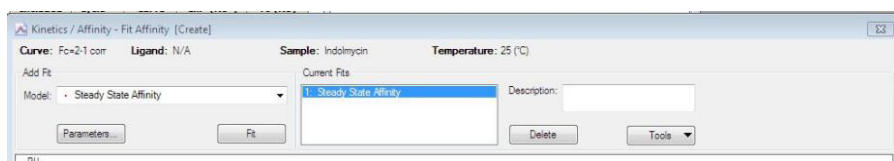


图 13 小分子亲和力拟合实验结果

三、SA 芯片固定 His-avitag (biotin)-TrpRS，表征 TrpRS 与吲哚霉素的结合

1. 实验前的准备

(1) 缓冲溶液的配制和放置。准备偶联步骤的运行缓冲溶液。量取 52.5 mL 10× PBS-P 缓冲溶液，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）定容至 500 mL，配制 1.05× PBS-P 缓冲溶液，混匀后放入缓冲溶液瓶。

(2) 准备亲和力检测过程中的缓冲溶液。量取 285 mL 1.05× PBS-P 缓冲溶液，加入 15 mL DMSO（已完成 0.22 μm 膜过滤处理），混匀，配制 1.0×含 5% DMSO 的 PBS-P 缓冲溶液。

(3) 将已经配制好的 1.05× PBS-P 缓冲溶液放在 T200 系统左侧的缓冲溶液托架上，换上黑色的单孔盖，将缓冲溶液进液管 A（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲溶液瓶底部。其余三根进液管（B、C 和 D）放在左侧的舱门后。废液瓶和去离子水瓶的放置同实验步骤第一部分《1. 实验前的准备》中的内容。

(2) SA 芯片的放置。具体步骤同实验步骤第一部分《1. 实验前的准备》中的内容。

2. 配体的偶联

(1) 点击 Biacore T200 Control Software 菜单栏中的 Run，下拉菜单选择 Wizard，点击 immobilization，点击 New（图 14）。

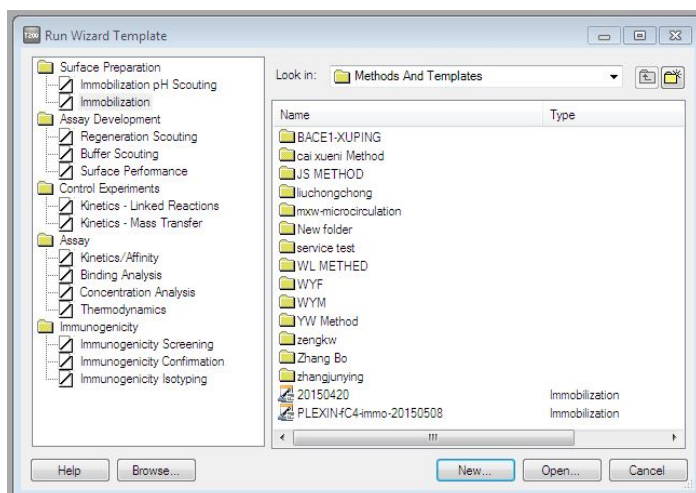


图 14 SA 芯片固定生物素化蛋白时偶联方法的建立

(2) 在 Immobilization Setup 界面, Chip type 中选 SA, Flow cells per cycle 选 1。勾选 Flow cell 2, method 选用 SA-biotin capture, Ligand 输入 TrpRS, 该实验选用 Aim for immobilized level, Target level 输入 1,000 RU (图 15)。接着按 Next, 勾选 prime, 选择实验温度, 一般默认 25 °C。

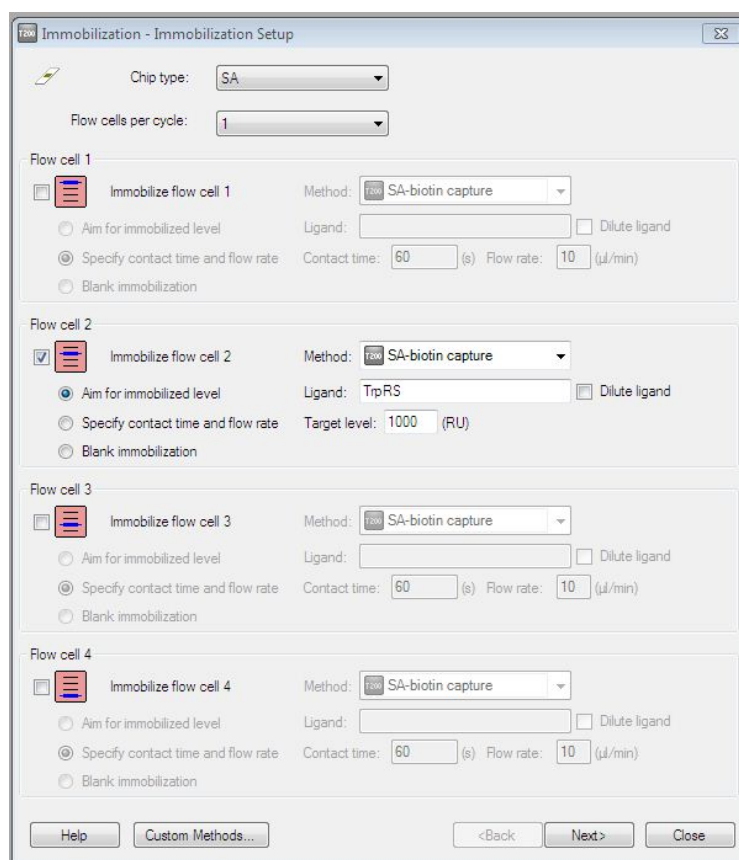


图 15 SA 芯片固定生物素化蛋白时系统方法中各参数的设置界面

(3) 在左侧下拉菜单中选用 Sample and Reagent Rack 1, 系统会自动排好样品放置位置(也可以通过鼠标拖拽重新安排) (图 16)。根据样品架位置表, 准备足够体积的样品(同样, 若使用的是带盖的 EP 管, 所有盖子必须剪去)。114 μ L 的 1 M NaCl, 50 mM NaOH 放入 R1D1, 148 μ L 的 TrpRS 放入 R1D2, 61 μ L 50% Isopropanol/50 mM NaOH/1 M NaCl 放入 R1D3。盖上试管架盖子, 将样品架送回样品舱。
注意: 为防止吸空或者体积不够, 一般会比系统要求体积至少多加 10 μ L。

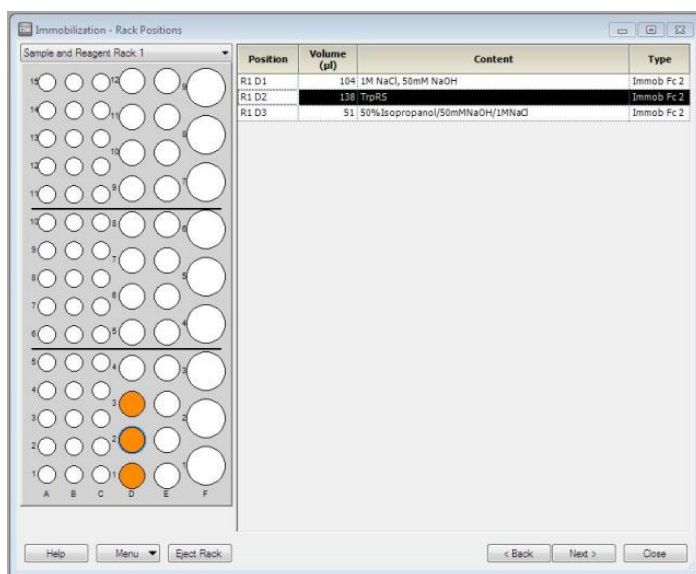


图 16 生物素化蛋白偶联过程中对样品体积的要求以及放置位置的设置

(4) 保存 method 与 result 文件到文件夹。系统正式自动运行偶联程序，整个过程耗时约 30 min。软件自动生成偶联结果。

3. 样品制备以及上机检测

(1) 配制运行缓冲溶液和溶剂校正曲线。运行缓冲溶液和溶剂校正曲线的配制同实验步骤第二部分《2. 样品制备以及上机检测》中的内容。

(2) 吡啶毒素浓度梯度的配制。吡啶毒素浓度梯度的配制同实验步骤第二部分《2. 样品制备以及上机检测》中的内容。

(3) 多循环动力学/亲和力分析程序设置。多循环动力学/亲和力分析程序的设置同实验步骤第二部分《2. 样品制备以及上机检测》中的内容。

4. 数据分析与数据解析

TrpRS 与吡啶毒素亲和力数据结果分析同实验步骤第二部分《3. 数据分析与数据解析》中的内容。

四、SA 芯片固定 His-avitag (biotin)-TrpRS，表征 TrpRS 与吡啶毒素在不同 PBS-P 缓冲溶液条件中的结合，优化结合体系

1. 实验前的准备

(1) 准备偶联步骤的运行缓冲溶液。量取 21 mL 10× PBS-P 缓冲溶液，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，制备 1.05× PBS-P 缓冲溶液，混匀后放入缓冲溶液瓶。

(2) 准备亲和力检测过程中的缓冲溶液。量取 21 mL 10× PBS-P 缓冲溶液以及 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，配制 1.05× PBS-P 缓冲溶液（含 1.05

引用格式：王倩，朱贵旺，刘振明. (2024). 基于表面等离子共振技术构建色氨酸 tRNA 合成酶的抑制剂筛选和验证体系. *Bio-101* e1011017. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011017.

How to cite: Wang, Q., Zhu, G. W. and Liu, Z. M. (2024). Establishment of Inhibitor Screening and Validation System for Tryptophanyl tRNA Synthetase Using Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011017. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011017. (in Chinese)

mM MgCl₂), 混匀后放入缓冲溶液瓶。量取 21 mL 10× PBS-P 缓冲溶液, 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液以及 420 μL 500 mM ATP, 使用去离子水(已完成 0.22 μm 膜过滤处理)稀释至 200 mL, 配制 1.05× PBS-P 缓冲溶液(含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP), 混匀后放入缓冲溶液瓶。量取 21 mL 10× PBS-P 缓冲溶液以及 420 μL 500 mM ATP, 使用去离子水(已完成 0.22 μm 膜过滤处理)稀释至 200 mL, 配制 1.05× PBS-P 缓冲溶液(含 1.05 mM ATP), 混匀后放入缓冲溶液瓶。量取 21 mL 10× PBS-P 缓冲溶液, 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液以及 420 μL 500 mM AMP, 使用去离子水(已完成 0.22 μm 膜过滤处理)稀释至 200 mL, 配制 1.05× PBS-P 缓冲溶液(含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM AMP), 混匀后放入缓冲溶液瓶。分别量取 152 mL 的上述四种 1.05× 缓冲溶液, 分别加入 8 mL DMSO(已完成 0.22 μm 膜过滤处理), 混匀, 配制 1.0× 含 5% DMSO 的四种缓冲溶液。

(3) 将已经配制好的用于偶联运行步骤的 1.05× PBS-P 缓冲溶液放在 T200 系统左侧的缓冲溶液托架上, 换上黑色的单孔盖, 将缓冲溶液进液管 A(注意软管上的蓝色标签)插入至缓冲溶液瓶底部。其余三根进液管(B、C 和 D)放在左侧的舱门后。废液瓶和去离子水瓶的放置同实验步骤第一部分《1. 实验前的准备》中的内容。

(4) SA 芯片的放置。芯片的放置同实验步骤第一部分《1. 实验前的准备》中的内容。

2. 配体的偶联

His-avitag (biotin)-TrpRS 的偶联同实验步骤第三部分《2. 配体的偶联》中的内容。若使用已经固定了 His-avitag (biotin)-TrpRS 的 SA 芯片, 则可以忽略此步骤。

3. 样品制备以及上机检测

(1) 配制运行缓冲溶液和溶剂校正曲线。运行缓冲溶液和溶剂校正曲线的配制同实验步骤第二部分《2. 样品制备以及上机检测》中的内容。因有四种不同的 PBS-P 缓冲溶液条件, 因此需要配制四组不同的运行缓冲溶液以及缓冲溶液背景下的溶剂校正曲线。

(2) 吡咯霉素浓度梯度的配制。吡咯霉素浓度梯度的配制同实验步骤第二部分《2. 样品制备以及上机检测》中的内容。同样, 因有四种不同的 PBS-P 缓冲溶液条件, 因此需要配制四组不同缓冲溶液背景下的吡咯霉素的相同浓度梯度。

(3) 多循环动力学/亲和力分析程序设置。多循环动力学/亲和力分析程序的设置同实验步骤第二部分《2. 样品制备以及上机检测》中的内容。同样, 因有四种不同的 PBS-P 缓冲溶液条件, 因此需要更换缓冲溶液后, 重复设置四次。

4. 数据分析与数据解析

TrpRS 与吡咯霉素亲和力数据结果分析。TrpRS 与吡咯霉素亲和力数据结果分析同实验步骤第二部分《3. 数据分析与数据解析》中的内容。

五、SA 芯片固定 His-avitag(biotin)-TrpRS，表征 TrpRS 与吡咯霉素在 PIPES-P, TRIS-P 以及 HBS-P 缓冲溶液中的结合，继续优化结合体系

考虑到 ATP 的磷酸基团参与 TrpRS 的催化反应体系，改变缓冲溶液类型可能对 TrpRS 的生物活性有很大影响，因此除了 PBS-P 缓冲溶液，另外选用了三种不同条件的缓冲溶液：PIPES-P（10 mM PIPES, 150 mM NaCl, 0.05% 表面活性剂 P-20, pH 7.4），TRIS-P（10 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0.05% 表面活性剂 P-20, pH 7.5）和 HBS-P（10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% 表面活性剂 P-20, pH 7.4）继续优化 TrpRS 的 SPR 分析系统。参考 PBS-P 的实验条件，主要研究了 MgCl₂、ATP 和 MgCl₂ 对吡咯霉素结合亲和力的影响。

1. 实验前的准备

（1）准备偶联步骤的运行缓冲溶液。量取 21 mL 10× PBS-P 缓冲溶液，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，配制 1.05× PBS-P 缓冲溶液，混匀后放入缓冲溶液瓶。若使用已经固定 His-avitag (biotin)-TrpRS 的 SA 芯片，则可以忽略此步骤。

（2）准备亲和力检测过程中的缓冲溶液。量取 2.1 mL 1 M PIPES 水溶液，10.5 mL 3 M NaCl 水溶液，1.05 mL P20 以及 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，配制 1.05× PIPES-P 缓冲溶液（含 1.05 mM MgCl₂），混匀后放入缓冲溶液瓶。量取 2.1 mL 1 M PIPES 水溶液，10.5 mL 3 M NaCl 水溶液，1.05 mL P20，210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液以及 420 μL 500 mM ATP，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，配制 1.05× PIPES-P 缓冲溶液（含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP），混匀后放入缓冲溶液瓶。量取 21 mL 10× HBS-P 缓冲溶液以及 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，配制 1.05× HBS-P 缓冲溶液（含 1.05 mM MgCl₂），混匀后放入缓冲溶液瓶。量取 21 mL 10× HBS-P 缓冲溶液，210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液以及 420 μL 500 mM ATP，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，配制 1.05× HBS-P 缓冲溶液（含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP），混匀后放入缓冲溶液瓶。量取 2.1 mL 1 M TRIS-P 水溶液，10.5 mL 3 M NaCl 水溶液，1.05 mL P20 以及 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，配制 1.05× TRIS-P 缓冲溶液（含 1.05 mM MgCl₂），混匀后放入缓冲溶液瓶。量取 2.1 mL 1 M TRIS-P 水溶液，10.5 mL 3 M NaCl 水溶液，1.05 mL P20，210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液以及 420 μL 500 mM ATP，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，配制 1.05× TRIS-P 缓冲溶液（含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP），混匀后放入缓冲溶液瓶。分别量取 152 mL 的上述六种 1.05× 缓冲溶液，分别加入 8 mL DMSO（已完成 0.22 μm 膜过滤处理），混匀，配制 1.0× 含 5% DMSO 的六种缓冲溶液。

（3）将已经配制好的用于偶联运行步骤的 1.05× PBS-P 缓冲溶液放在 T200 系统左侧的缓冲溶液托架上，换上黑色的单孔盖，将缓冲溶液进液管 A（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲溶液瓶底部。其

余三根进液管（B、C 和 D）放在左侧的舱门后。废液瓶和去离子水瓶的放置同实验步骤第一部分《1. 实验前的准备》中的内容。

（4）SA 芯片的放置。芯片的放置同实验步骤第一部分《1. 实验前的准备》中的内容。

2. 配体的偶联

His-avitag (biotin)-TrpRS 的偶联实验步骤第三部分《2. 配体的偶联》中的内容。若使用已经固定 His-avitag (biotin)-TrpRS 的 SA 芯片，则可以忽略此步骤。

3. 样品制备以及上机检测

（1）配制运行缓冲溶液和溶剂校正曲线。运行缓冲溶液和溶剂校正曲线的配制同实验步骤第二部分《2. 样品制备以及上机检测》中的内容。因有六种不同条件的缓冲溶液，因此需要配制六组不同的运行缓冲溶液以及缓冲溶液背景下的溶剂校正曲线。

（2）吲哚霉素浓度梯度的配制。吲哚霉素浓度梯度的配制同实验步骤第二部分《2. 样品制备以及上机检测》中的内容。同样，因有六种不同条件的缓冲溶液，因此需要配制六组不同缓冲溶液背景下的相同的浓度梯度。

（3）多循环动力学/亲和力分析程序设置。多循环动力学/亲和力分析程序的设置同实验步骤第二部分《2. 样品制备以及上机检测》中的内容。同样，因有六种不同种类的缓冲溶液条件，因此需要更换缓冲溶液后，重复设置六次。

4. 数据分析与数据解析

TrpRS 与吲哚霉素亲和力数据结果分析同实验步骤第二部分《3. 数据分析与数据解析》中的内容。

六、SA 芯片固定 His-avitag (biotin)-TrpRS，构建 TrpRS 与吲哚霉素在 HBS-P 缓冲溶液条件下的高通量筛选体系

为了测试 TrpRS SPR 分析系统在高通量筛选中的可行性和重复性，我们使用相应的 HBS-P（7.4）缓冲溶液作为阴性对照，吲哚霉素作为阳性对照，Z 因子[2] 作为指标进行评估。使用 Biacore 8K 以 96 孔板的形式进行 TrpRS SPR 的筛选测定。Z 因子是高通量筛选中常用的质量参数，用于确定分析方法是否可靠。Z 因子等于 1 表示完美的分析方法，Z 因子介于 0.5 和 1 之间表示是可靠的分析方法，Z 因子介于 0 和 0.5 之间表示是不好的分析方法。考虑到筛选出的 TrpRS 抑制剂可能是 ATP 竞争性或非竞争性抑制剂，因此，依次研究了单独添加 $MgCl_2$ 和同时添加 ATP 和 $MgCl_2$ 的 Z 因子， $MgCl_2$ 、ATP 和 $MgCl_2$ 缓冲溶液背景中吲哚霉素的浓度分别固定为 20 和 1 μM

1. 实验前的准备

（1）缓冲溶液的配制和放置。准备偶联步骤的运行缓冲溶液。量取 52.5 mL 10× HBS-P 缓冲溶液，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 500 mL，配制 1.05× HBS-P 缓冲溶液，混匀后放入

引用格式：王倩，朱贵旺，刘振明. (2024). 基于表面等离子共振技术构建色氨酸 tRNA 合成酶的抑制剂筛选和验证体系. *Bio-101* e1011017. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011017.

How to cite: Wang, Q., Zhu, G. W. and Liu, Z. M. (2024). Establishment of Inhibitor Screening and Validation System for Tryptophanyl tRNA Synthetase Using Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011017. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011017. (in Chinese)

缓冲溶液瓶。

(2) 准备亲和力检测过程中的缓冲溶液。量取 105 mL 10× HBS-P 缓冲溶液以及 1050 μ L 1 M $MgCl_2$ 水溶液，使用去离子水（已完成 0.22 μ m 膜过滤处理）稀释至 1,000 mL，配制 1.05× 的 HBS-P 缓冲溶液（含 1.05 mM $MgCl_2$ ），混匀后放入缓冲溶液瓶。量取 105 mL 10× HBS-P 缓冲溶液，1050 μ L 1 M $MgCl_2$ 水溶液以及 2.1 mL 500 mM ATP，使用去离子水（已完成 0.22 μ m 膜过滤处理）稀释至 1,000 mL，配制 1.05× HBS-P 缓冲溶液（含 1.05 mM $MgCl_2$ 和 1.05 mM ATP），混匀后放入缓冲溶液瓶。量取 475 mL 的上述两种 1.05× HBS-P 缓冲溶液，加入 25 mL DMSO（已完成 0.22 μ m 膜过滤处理），混匀，配制 1.0× 含 5% DMSO 的两种 HBS-P 缓冲溶液。

(3) 将已经配制好的用于偶联运行步骤的 1.05× HBS-P 缓冲溶液放在 Biacore 8K 系统右侧，换上黑色的单孔盖，将缓冲溶液进液管（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲溶液瓶底部。另取一个 2 L 的玻璃瓶，装满 0.22 μ m 膜过滤的去离子水，换上黑色的三孔盖，将水和再生试剂的进液管（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲溶液瓶底部。

(4) 打开 Biacore 8K Control Software，选择 Instrument control，点击 change chip，打开芯片舱门进行芯片更换（图 17）。

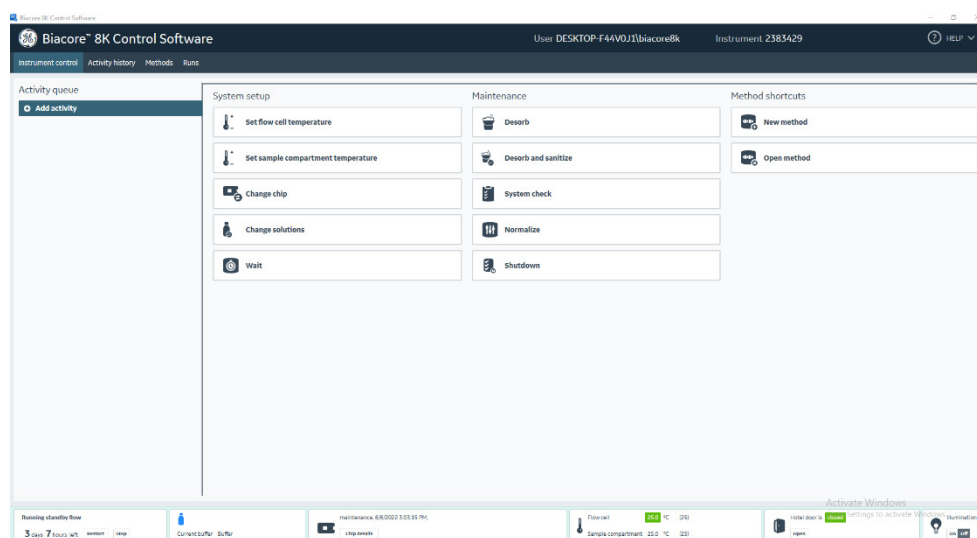


图 17 软件操作界面

若使用的是新芯片，则选择 New Chip（图 18）。在 Chip Type 的下拉菜单中选择对应的芯片种类（此实验为 SA 芯片），在 Id 中填入和芯片相关的实验信息，lot Number 中可填入芯片批号（选填）。若是已经使用过的芯片，请选择 Used chip，并在下拉菜单中找到与之相对应的芯片信息。对于使用过的芯片，也可以选择 New Chip 选项，则之前芯片的使用信息不会被查询到。

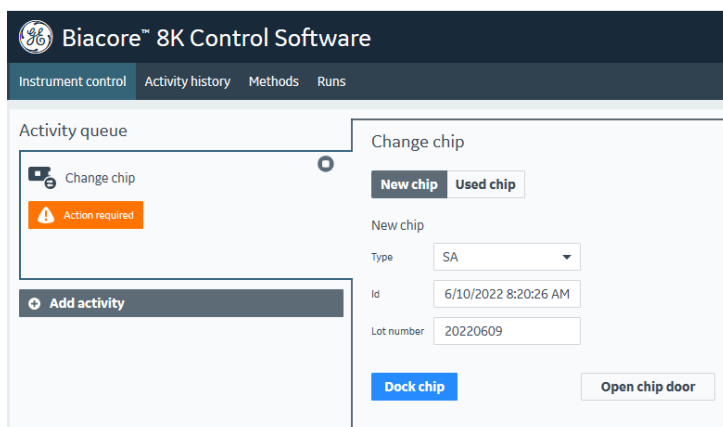


图 18 芯片种类的选择

(5) 手持芯片，有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向，将芯片轻轻推入卡槽，合上芯片舱的舱门。

(6) 点击 Dock Chip 按钮，芯片置入后系统将自动转入待机（Standby）状态。

(7) 选择 instrument control，点击 Change solutions，勾选 Change buffer, water and reagent，点击 Ready to start（图 19）。缓冲溶液会以较高的流速冲洗整个内部流路系统，整个过程耗时 6~7 分钟。结束后，系统自动转入待机（Standby）状态。

注意：当系统更换缓冲溶液或者芯片后，必须运行 Change solutions 程序。Change solutions 时缓冲溶液会冲洗整个流路系统，为下一步的实验做好准备。

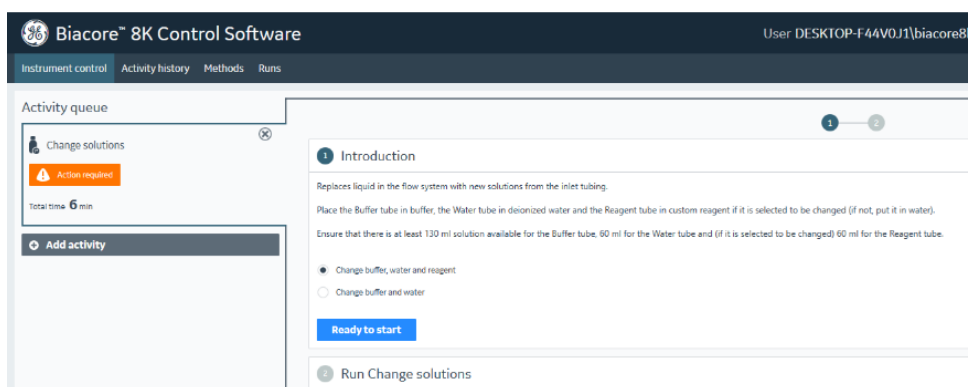


图 19 Change solutions 界面

2. 配体的偶联

(1) 打开 Biacore 8K Control Software，选择 Methods，点击 Surface preparation，选择 immobilization，点击 Open（图 20）。

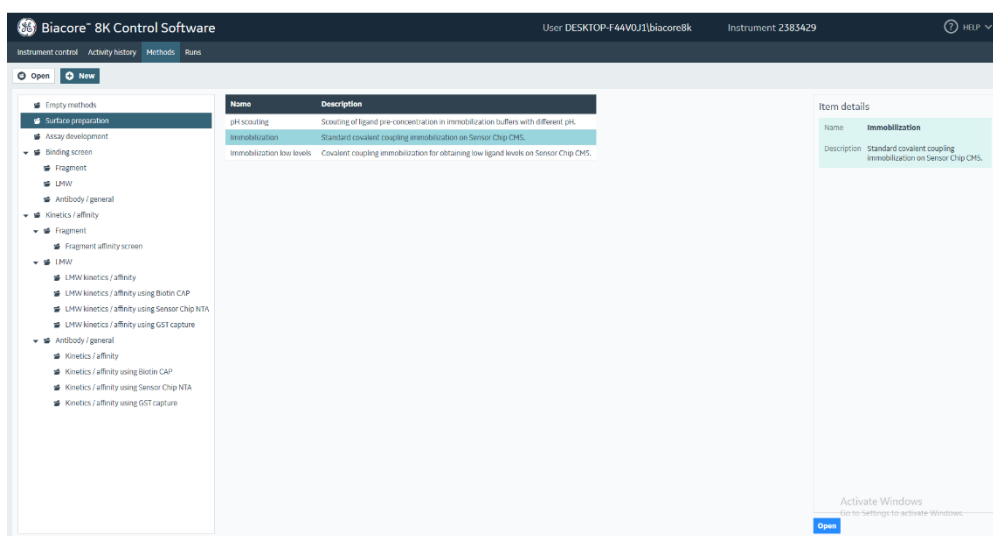


图 20 SA 芯片固定生物素化蛋白时偶联方法的建立

(2) 在 Method definition 界面，Chip type 选择 SA，Running buffer 输入 HBS-P（根据实验体系的实际情况输入），温度一般默认 25 °C（根据实验体系的实际情况输入），Add step 选择 SA-biotin capture，immobilize in 选择 Fc 2, activate/deactivate in 1, Ligand 中 contact time 输入 60 s，Flow rate 10 µl/min，在下方表格中输入固定蛋白的名字和选择需要进行固定的通道(图 21)。在这里在表格中 Flow cell 2 ligand name 中输入 TrpRS，选择同时固定 8 个通道。

注意：根据实际靶标蛋白的情况自行设置偶联实验，若一次达不到预定的偶联量，可以点击 Custom mode 按钮，删除 NaCl/NaOH 和 Wash 步骤，直接重复 Ligand 步骤。

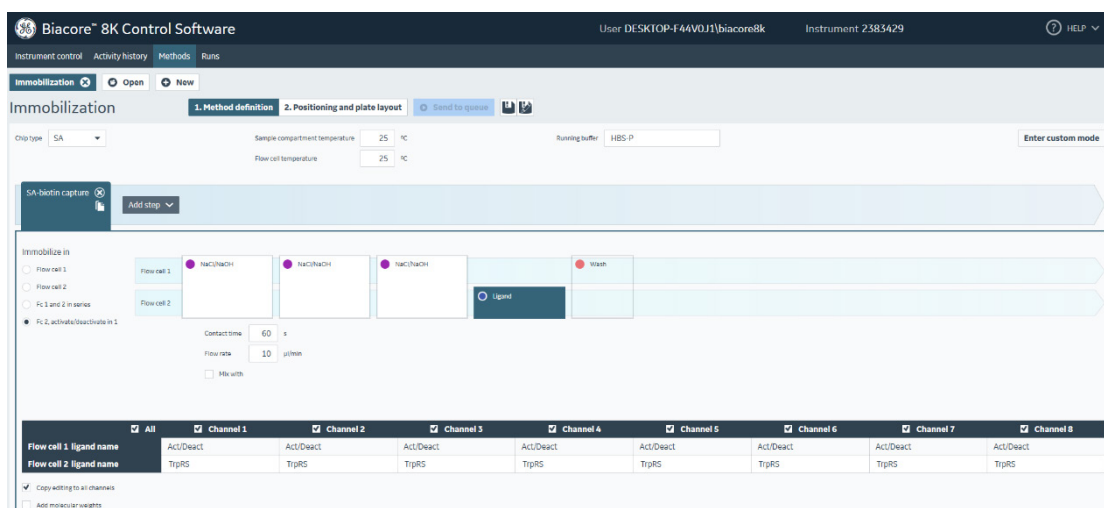


图 21 SA 芯片固定生物素化蛋白时系统方法中各参数的设置界面

(3) 在 Positioning and plate layout 界面，根据仪器系统的要求完成样品在 96 孔板中的加样（图 22）。

20 ng/ μ L TrpRS 放入 96 孔板的第一列，1 M NaCl, 50 mM NaOH 放入 96 孔板的第二列，50% Isopropanol/50 mM NaOH/1M NaCl 放入 96 孔板的第三列。

注意：若在 *Method definition* 界面中选择的蛋白固定通道少于 8 道，由于 *Biacore 8K* 中的 8 根进样针只能同上同下，因此需要在相应未固定蛋白的通道对应的 96 孔板中的位置中加入所需体积的缓冲溶液。

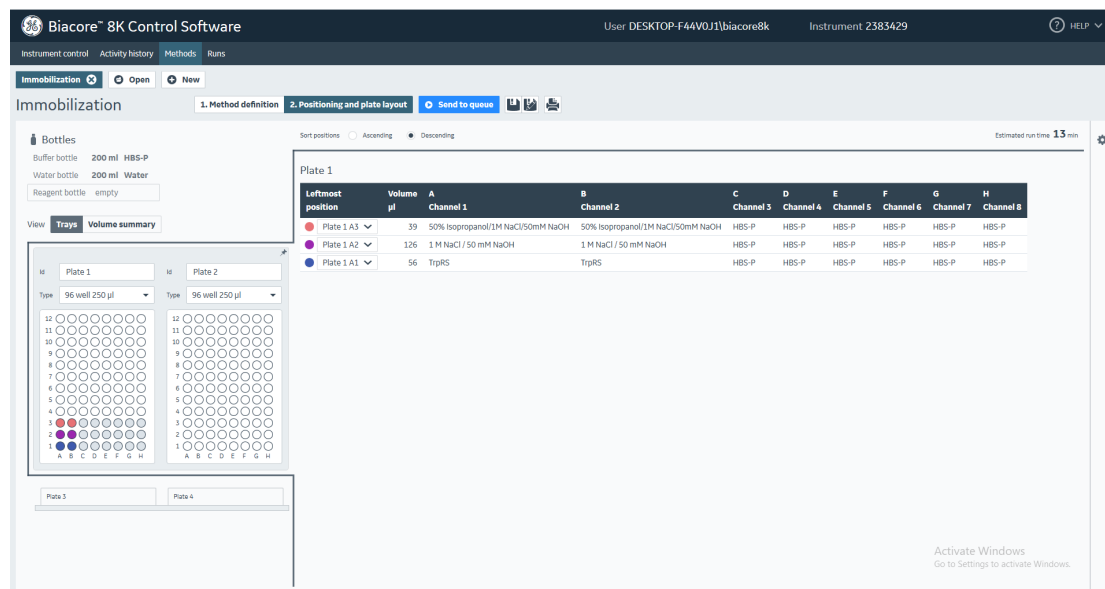


图 22 生物素化蛋白偶联过程中对样品体积的要求以及放置位置的设置

(4) 选择 instrument control, 点击下方的 Hotel door is Open, 将加好样品的 96 孔板放置于样品仓的对应位置中，关上舱门（图 23）。

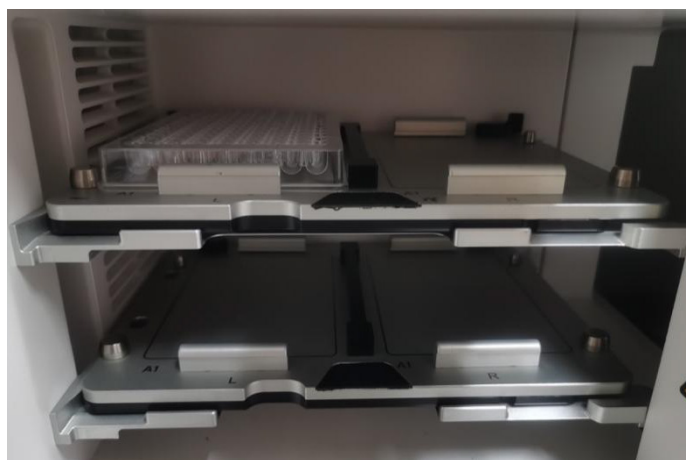


图 23 样品板的放置

(5) 点击 Methods, Send to queue, 开始 His-avitag (biotin)-TrpRS 的固定。

3. 样品制备以及上机检测

(1) 配制运行缓冲溶液和溶剂校正曲线。运行缓冲溶液和溶剂校正曲线的配制同实验步骤第二部分《2. 样品制备以及上机检测》中的内容。因有两种不同条件的缓冲溶液, 因此需要配制两组不同的运行缓冲溶液以及缓冲溶液背景下的溶剂校正曲线。缓冲溶液体积根据设备的具体要求定。

(2) 吡啶霉素浓度的配制。使用 DMSO 将 10 mM 吡啶霉素稀释至 400 μ M, 然后, 使用 1.05 $\times$ 的两种 HBS-P 缓冲溶液分别稀释 400 μ M 小分子母液 20 倍, 得到终浓度为 20 μ M 在 5% DMSO 中的吡啶霉素溶液。以 1.0 $\times$ 含 5% DMSO 的两种 HBS-P 缓冲溶液分别作为相应的零浓度。

(3) 多循环动力学/亲和力和分析程序设。将其中一个已经配制好的 1.0 $\times$ 含 5% DMSO 的 HBS-P 缓冲溶液放在 Biacore 8K 系统右侧, 换上黑色的单孔盖, 将缓冲溶液进液管 (注意软管上的蓝色标签) 插入至缓冲溶液瓶底部, 上述已放置好的水和再生试剂不动。选择 instrument control, 点击 Change solutions, 勾选 Change buffer, water and reagent, 点击 Ready to start。

(4) 点击 Methods, 选择 New, LMW 下拉菜单中的 LMW kinetics/affinity, 继续选择右栏中的 LMW multi-cycle kinetic/affinity, 点击 Open (图 24)。

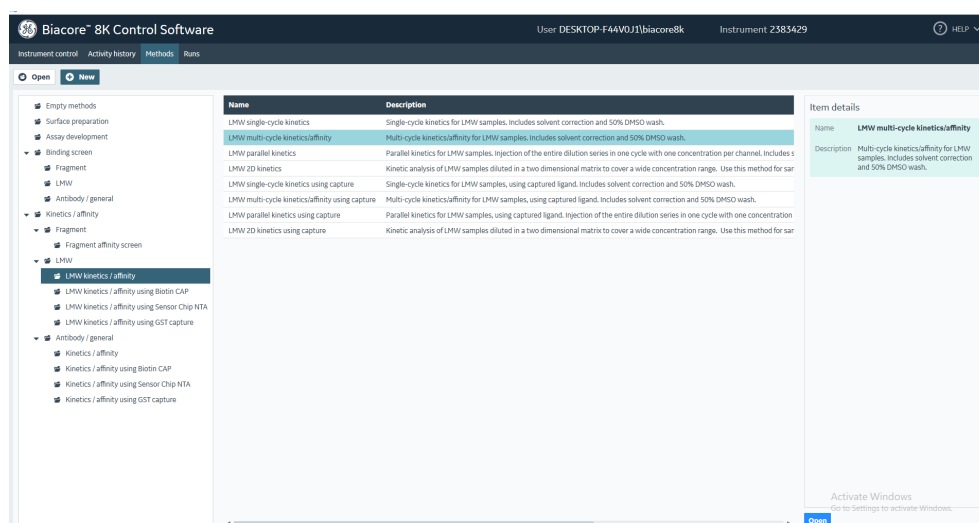


图 24 多循环动力学/亲和力和分析程序的建立

(5) 在 Method definition 界面, 点击 Start up, 选择 Analyte 1, Solution 输入 HBS-P, MgCl₂, Contact time 输入 60 s, Dissociation time 输入 120 s, Flow rate 输入 30 μ l/min, Type 下拉菜单选择 High Performance, Flow path 选择 both flow cells, Wash 1 默认 50% DMSO 溶液, Flow cell temperature 默认 25 $^{\circ}$ C (图 25)。

上述参数的输入都可以按照实验体系的实际情况进行输入和修改。

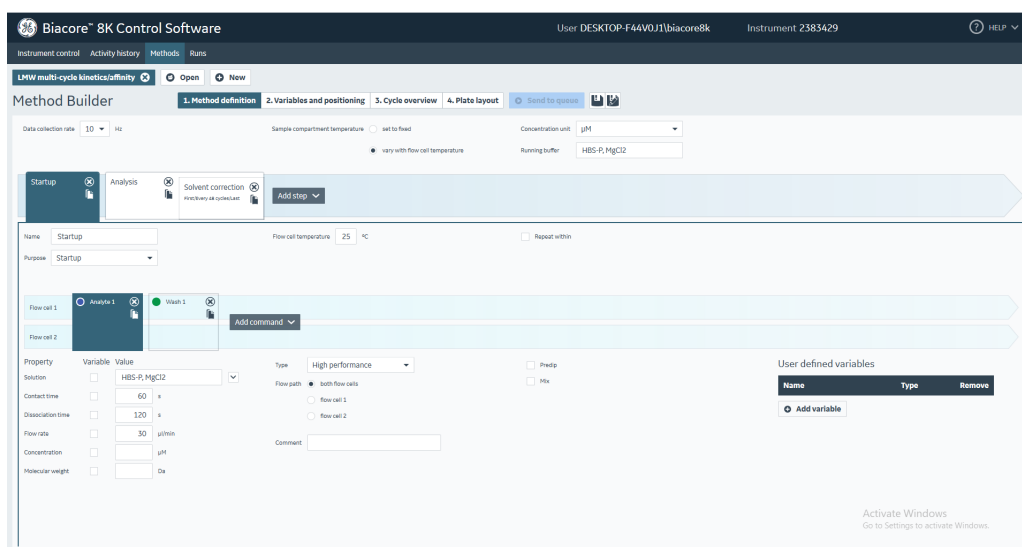


图 25 多循环动力学/亲和力分析程序中 Startup 相关实验参数的设置

(6) 点击 Analysis 选项，在 Analysis 界面，在 Variable 一栏勾选 Solution 和 Concentration，Contact time 输入 60 s，Dissociation time 输入 120 s，Flow rate 输入 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，Type 下拉菜单选择 High Performance，Flow path 选择 both flow cells，Wash 1 默认 50% DMSO，Flow cell temperature 默认 25 $^{\circ}\text{C}$ (图 26)。

注意：一般 Start up 和 Analysis 中 Analyte 1 内设置的结合、解离时间和流速是一致的。为了消除物质迁移效应，Flow rate 一般默认输入 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，若实验体系为亲和力很强的样本，则可以提高流速至 50 或者 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。若参数是变量，则可以在 Variable 一览的方框中进行勾选，变量参数可以在后续的 Variable and positioning 中进行填写。

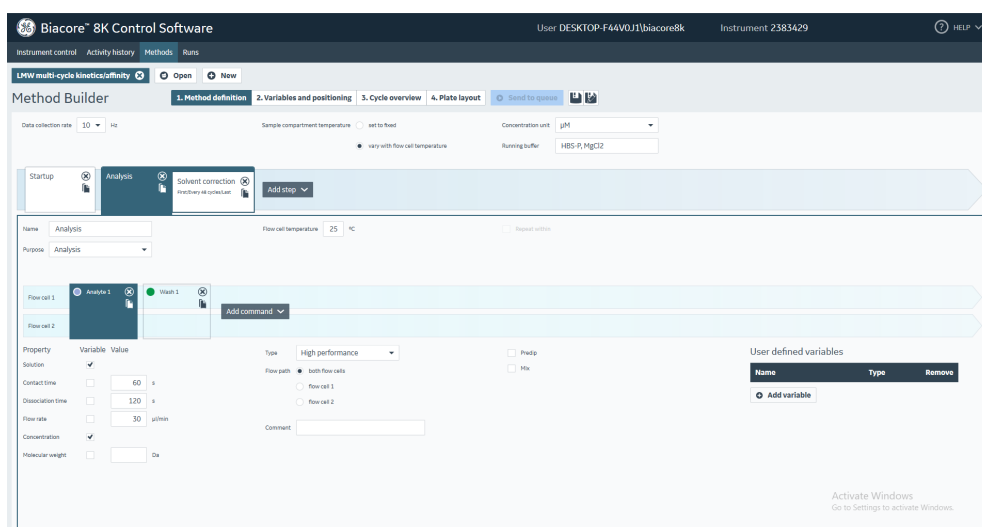


图 26 多循环动力学/亲和力分析程序中流动相相关实验参数的设置

(7) 点击 Solvent correction 选项, Number of solutions per cycle 选择 4, 勾选 Repeat within Analysis every 100 cycles, 勾选 Run once first, Flow cell temperature 默认 25 °C (图 27)。

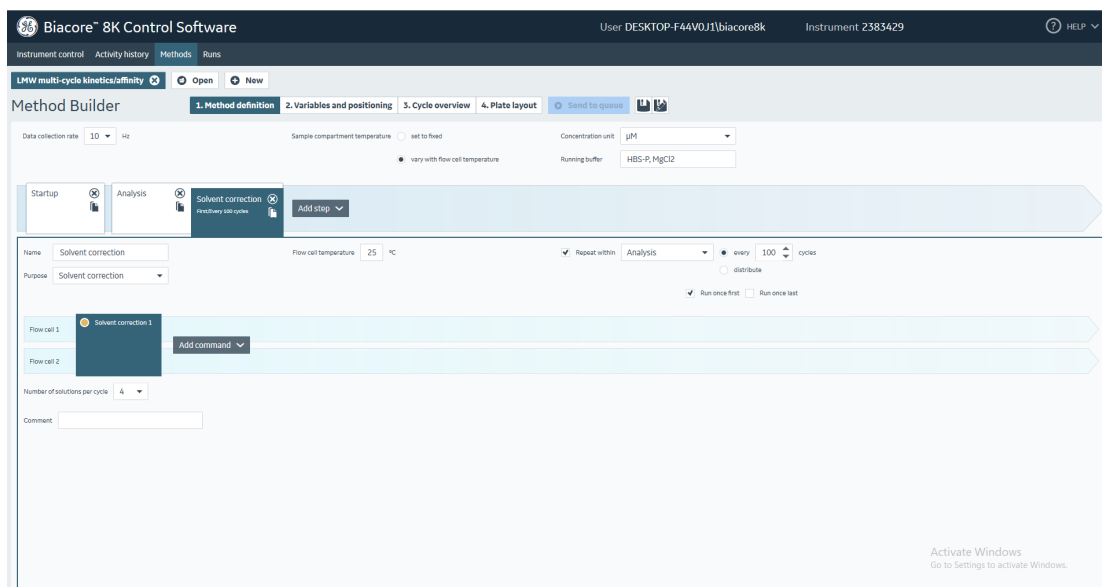


图 27 多循环动力学/亲和力分析程序中溶剂校正相关实验参数的设置

(8) 在 Variable and positioning 界面, 勾选进行实验的通道, 选择 Startup, 点击 Add cycle, 将 startup 增加为三个 (图 28)。

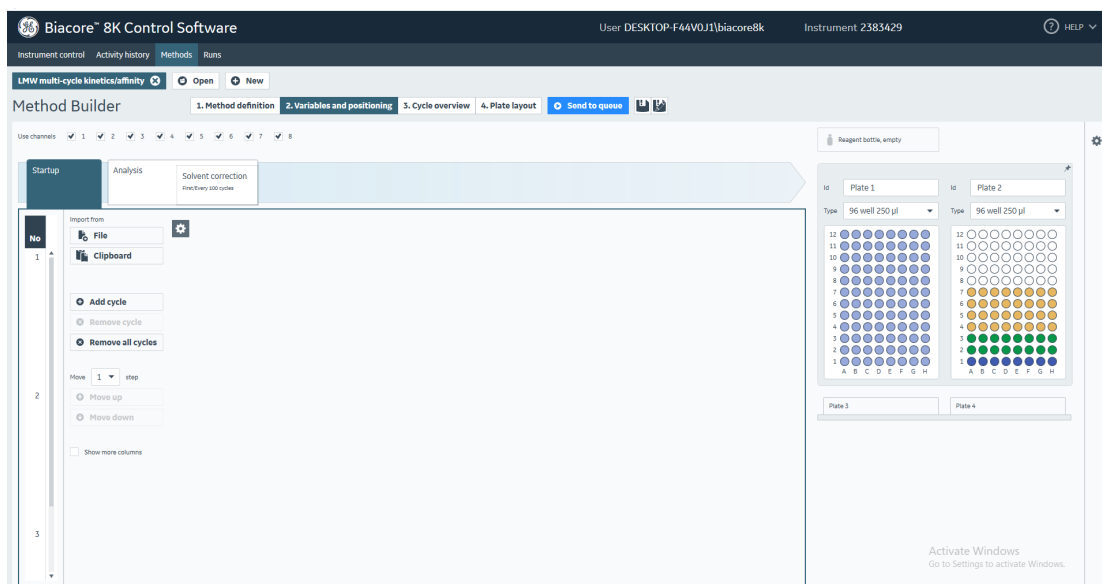


图 28 多循环动力学/亲和力分析程序中 Startup 重复次数的设置

(9) 在 Variable and positioning 界面，选择 Analysis, Analyte 1 Solution 输入吲哚霉素的名称，Concentration 输入吲哚霉素的浓度（图 29）。同时，可以通过拖拽对右侧默认的孔板放置位置以及孔板中样品的放置位置进行调整。

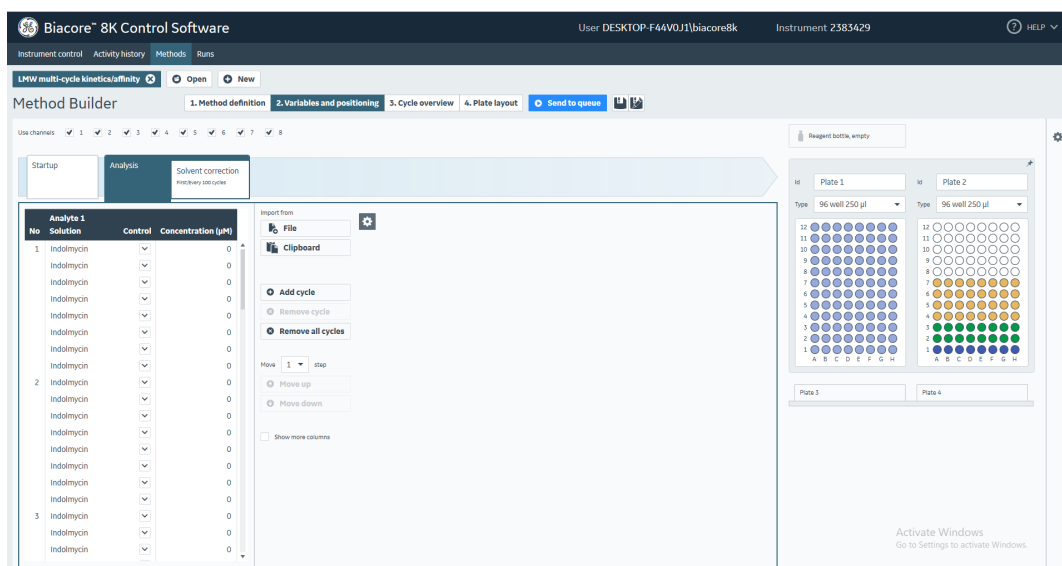


图 29 多循环动力学/亲和力分析程序中流动相检测通道、浓度梯度和放置位置的设置

(10) 在 Cycle overview 界面，可以看到整个实验的上样流程（图 30）。

Biacore™ 8K Control Software				
User DESKTOP-				
Instrument control Activity history Methods Runs				
LMW multi-cycle kinetics/affinity				
Method Builder				
1. Method definition 2. Variables and positioning 3. Cycle overview 4. Plate layout				
Estimated run time 1 h 43 min				
Cycle	Step name	Analyte 1 Position	Solution	Concentration (µM)
1	Startup	Plate 2 A1	HBS-P, MgCl ₂	
2	Startup	Plate 2 A1	HBS-P, MgCl ₂	
3	Startup	Plate 2 A1	HBS-P, MgCl ₂	
4	Solvent correction			
5	Analysis	Plate 1 A1	Indolmycin	0
6	Analysis	Plate 1 A2	Indolmycin	0
7	Analysis	Plate 1 A3	Indolmycin	0
8	Analysis	Plate 1 A4	Indolmycin	0
9	Analysis	Plate 1 A5	Indolmycin	0
10	Analysis	Plate 1 A6	Indolmycin	0
11	Analysis	Plate 1 A7	Indolmycin	20
12	Analysis	Plate 1 A8	Indolmycin	20
13	Analysis	Plate 1 A9	Indolmycin	20
14	Analysis	Plate 1 A10	Indolmycin	20
15	Analysis	Plate 1 A11	Indolmycin	20
16	Analysis	Plate 1 A12	Indolmycin	20

图 30 实验进样流程

(11) 在 Plate layout 界面, 根据仪器系统的要求完成样品在 96 孔板中的加样(所加样品体积一般比系统要求至少多 10 μL) (图 31)。同样, 若在 Variable and positioning 界面中选择的检测通道少于 8 道时, 需要在未检测通道对应的 96 孔板中加入对应体积的缓冲溶液。正式实验中, 为防止样品挥发, 需要对加好样品的 96 孔板封膜。

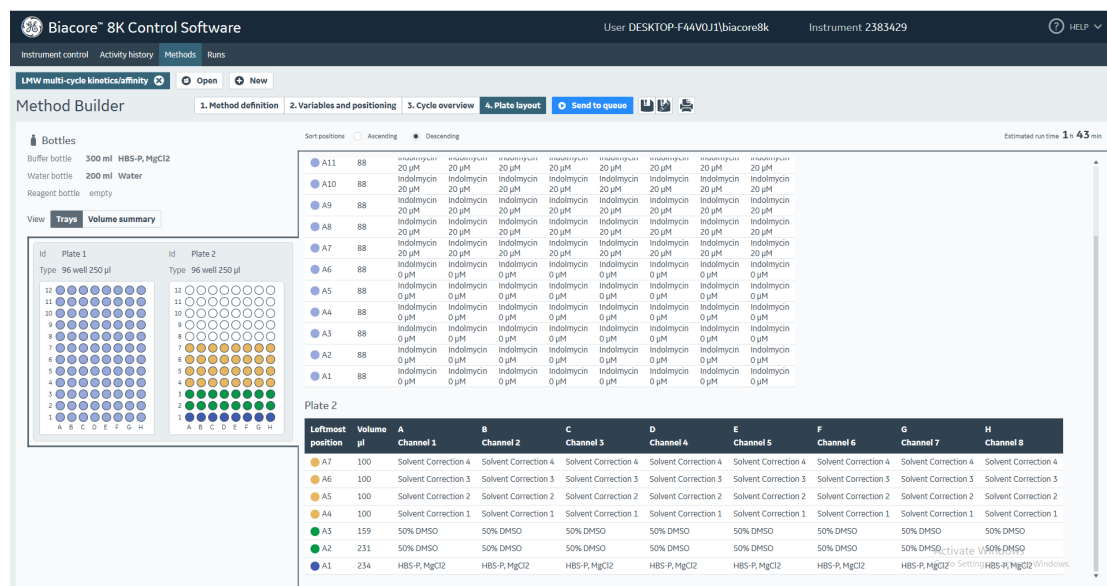


图 31 多循环动力学/亲和力和分析程序检测过程中对样品体积和放置位置的要求

(12) 选择 instrument control, 点击下方的 Hotel door is Open, 将加好样品的 96 孔板放置于样品仓的对应位置中, 关上舱门。点击 Methods, Send to queue, 开始正式的互作实验。

4. 数据分析与数据解析

(1) 打开数据分析软件 Biacore Insight Evaluation Software, 在 Create new evaluation 界面, 选择 select run, 找到运行的程序, 点击右下方的 select evaluation method。

(2) 在 Select evaluation method 界面, 选择 Kinetic/affinity 选项中的 LMW, 点击 LMW multi-cycle affinity-Evaluation method, 点击 Open (图 32)。

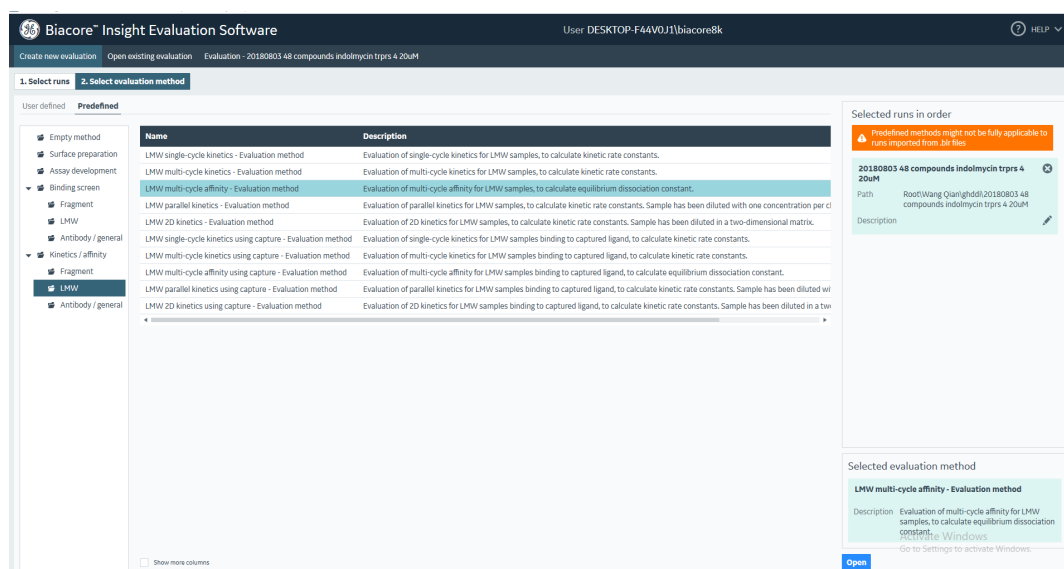


图 32 多循环亲和分析程序的建立

(3) 首先弹出 Solvent Correction 界面进行溶剂校正分析 (图 33)。若结果正常, 点击 Apply and close。溶剂校正曲线一般要求落在-500 到+1,000 RU 之间, χ^2 小于 2。如果超出此范围较多, 一般是由于 DMSO 浓度配制不准确造成。

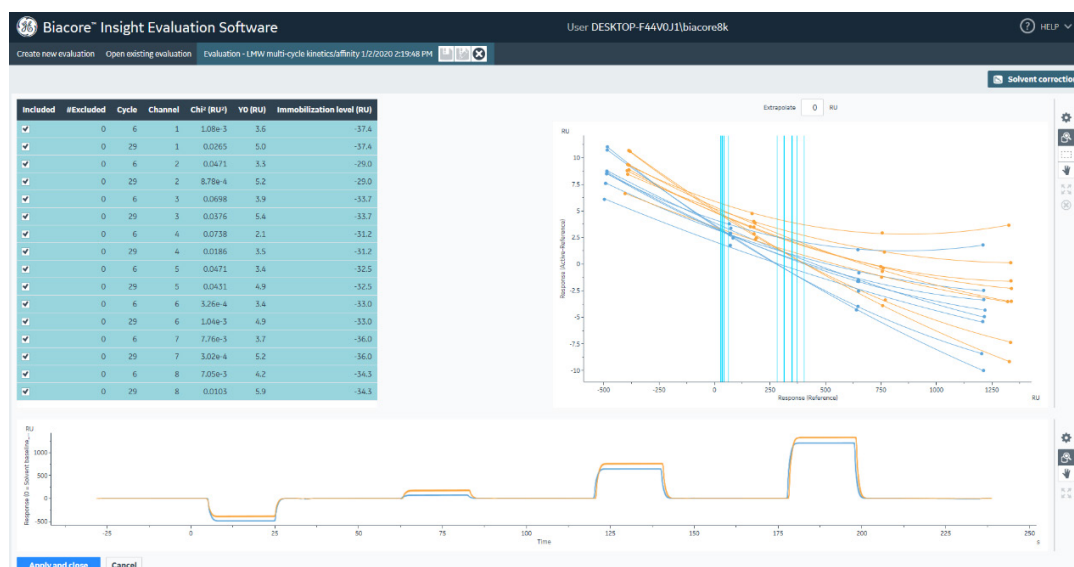


图 33 溶剂校正曲线

(4) 在 Home 界面, 点击 plot, 即可得此条件下吡咯霉素的响应值, 返回 Home 界面, 点击 presentation, 勾选需要导出的结果内容, 点击 Export to presentation (图 34)。

注意: 因有两种不同种类的缓冲溶液条件, 因此需要再更换缓冲溶液后, 重复实验内容。

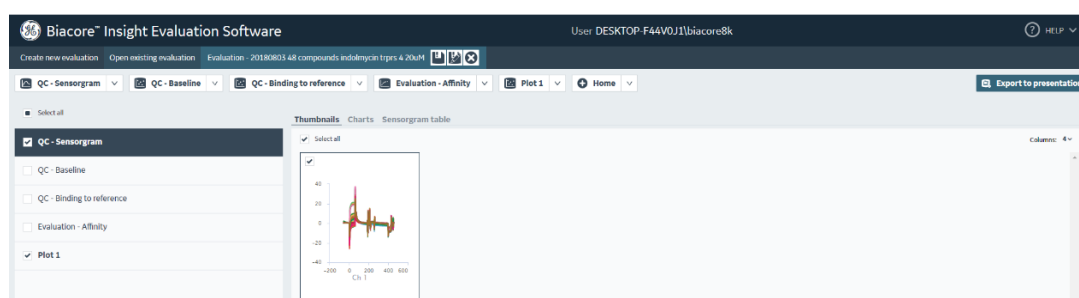


图 34 数据的导出

实验注意要点

1. 成功经验

(1) 标签和固定方式的优化：本次研究通过多次实验优化了 TrpRS 的标签和芯片固定方式，使 SPR 体系在高通量筛选中的适应性和灵敏度显著提高，Z 因子数值稳定在 0.9 以上。这表明多维度优化策略能够提升实验的重现性和数据质量。

(2) 缓冲溶液条件的改进：针对 TrpRS 蛋白的特殊性，逐步调整缓冲液的成分，提升了实验的稳定性与信号强度。

2. 遇到的问题及解决方案

(1) 初期固定方式效果不佳：初期实验选择的固定方式未能达到预期的稳定性、结合强度和重现性，改用多种固定方式实验对比，最终找到最佳固定条件。

在 NTA 捕获固定过程中，需要考虑捕获后基线的稳定性，若后续结合过程中基线发生漂移，会影响互作结合结果。改善的实验方法包括：重新构建目的蛋白的质粒，增加组氨酸标签的长度；更改标签类型；更改固定方式；降低捕获量等。

(2) 缓冲液适配问题：在某些缓冲液条件下信号弱或噪声高，通过逐步调整缓冲盐类型、离子浓度等参数并更换试剂，最终得到适合 TrpRS 的特定缓冲液组合，提升了检测的灵敏度和数据质量。

(3) 蛋白质量的问题：实验过程中，有很多目的蛋白购买于公司，但时常会出现固定不上或者固定上没有结合活性的现象，因此这时建议使用差示扫描量热（DSF）或者圆二色谱（CD）技术等对购买蛋白的质量进行表征分析。

(4) 建议：在类似实验中，若结果不稳定，应尝试对蛋白质量、标签、固定方式及缓冲溶液进行逐一排查和调整，以实现参数的最佳组合。

3. 常见错误或失败经验

(1) 结合条件错误：曾尝试在标准缓冲液条件下进行实验，但未能获得阳性结果。调整缓冲液类型和

成分后改善了信号强度和亲和力，表明反应条件对 TrpRS 的结合效率影响显著。

(2) 试剂纯度及批次问题：发现某些批次的缓冲试剂纯度不足，影响信号的稳定性，因此严格筛选高纯度的试剂是成功的关键。

(3) 固定方式单一：直接选择一种固定方式可能导致结合效率偏低或检测不灵敏，多种固定方式的对比有助于找到最佳的结合效果。

(4) 溶剂校正的配制：溶剂校正的配制是日常实验中比较容易出错的点，配制过程需要充分涡旋混匀。若溶剂校正和含 DMSO 的缓冲溶液不能正确对应，则可以以 0.1% DMSO 对应的 SPR 响应值为 120 RU 进行缓冲溶液中 DMSO 量的调整。

4. 补救措施

(1) 缓冲溶液优化：若实验信号低或背景噪声过高，可适当调整缓冲液的 pH 值、离子强度，或更换试剂以减少非特异性结合。

(2) 重新固定与清洗：若固定过程导致结合不理想，可在清洗芯片后重新固定目标蛋白（限非共价的固定方式），调整固定方式和试剂浓度，尝试得到更好的结合效果。

(3) 样品浓度调整：若样品或阳性化合物浓度不足导致信号不明显，可浓缩样品或增大阳性化合物的初始浓度，确保信号强度。

结果与数据分析

一、NTA 芯片捕获 His-TrpRS

本次实验偶联量约为 1000 RU，但由于固定 TrpRS 后的基线不断下降，无法正常进行后续的实验检测[1]

（图 35），因此改用 Ni^{2+} 螯合联合氨基偶联的方法固定 TrpRS。TrpRS 固定后基线不稳定可能是由于 TrpRS 在氨基末端只有 6 个组氨酸引起的。

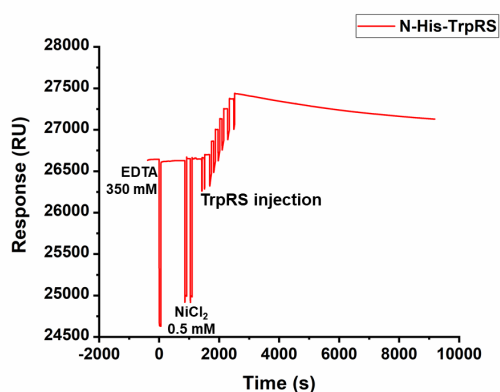


图 35 NTA 芯片固定 TrpRS 的实验结果图

引用格式：王倩，朱贵旺，刘振明. (2024). 基于表面等离子共振技术构建色氨酸 tRNA 合成酶的抑制剂筛选和验证体系. *Bio-101* e1011017. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011017.

How to cite: Wang, Q., Zhu, G. W. and Liu, Z. M. (2024). Establishment of Inhibitor Screening and Validation System for Tryptophanyl tRNA Synthetase Using Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011017. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011017. (in Chinese)

二、NTA 芯片联合氨基偶联完成 TrpRS 的固定，表征 TrpRS 与吲哚霉素的结合

本次实验偶联量约为 1000 RU，固定的 TrpRS 基线稳定，可以进行后续实验（图 36）。经拟合，在此条件下，吲哚霉素与 TrpRS 的亲和力 K_D 为 $29 \pm 19 \mu\text{M}$ （图 37）。但吲哚霉素结合信号较低且实验结果重复性略差。

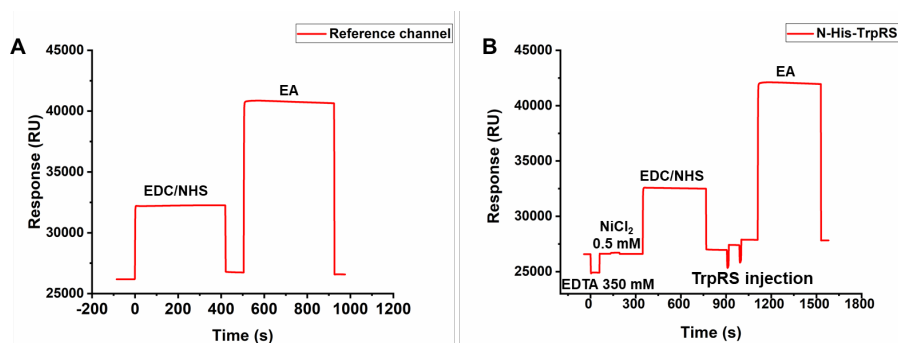


图 36 NTA 芯片联合氨基偶联固定 TrpRS 的实验结果图

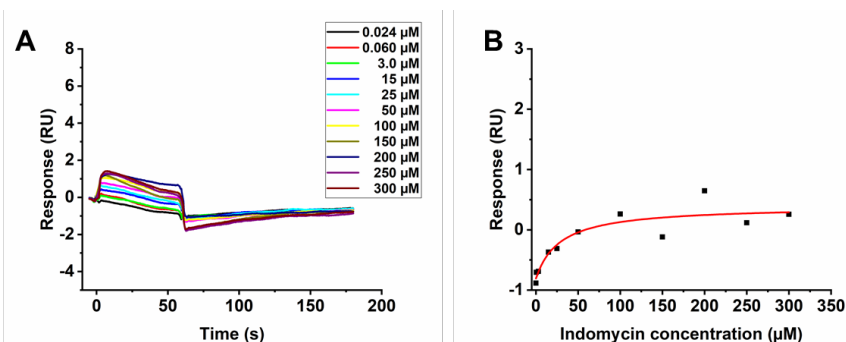


图 37 吲哚霉素在 PBS-P 实验条件中，对 TrpRS 的亲和力结果图。A. 吲哚霉素与 TrpRS 的结合解离传感图；B. 吲哚霉素与 TrpRS 的亲和力模型拟合结果。

三、SA 芯片固定 His-avitag (biotin)-TrpRS，表征 TrpRS 与吲哚霉素的结合

本次实验偶联量约为 1,010 RU（图 38）。经拟合，在此条件下，吲哚霉素与 TrpRS 的亲和力 K_D 为 $16.7 \pm 3.6 \mu\text{M}$ （图 39）。

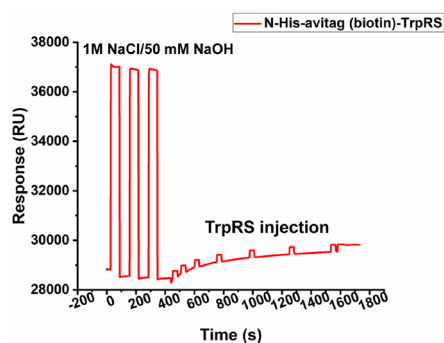


图 38 His-avitag (biotin)-TrpRS 的偶联结果图

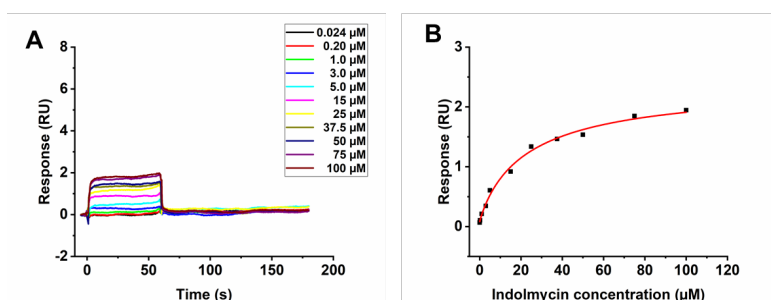


图 39 吡喹酮在 PBS-P 实验条件中, 对 TrpRS 的亲合力结果图。A. 吡喹酮与 TrpRS 的结合解离传感图; B. 吡喹酮与 TrpRS 的亲合力模型拟合结果。

四、SA 芯片固定 His-avitag (biotin)-TrpRS, 表征 TrpRS 与吡喹酮在不同 PBS-P 缓冲溶液条件中的结合, 优化结合体系

经拟合, 吡喹酮与 TrpRS 在 PBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂), PBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM ATP), PBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM AMP) 以及 PBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM ATP) 中的亲合力 K_D 数值分别为 16.7 ± 3.4 , 16.2 ± 2.3 , 18.8 ± 2.6 μM 以及 1.5 ± 0.2 μM (图 40)。

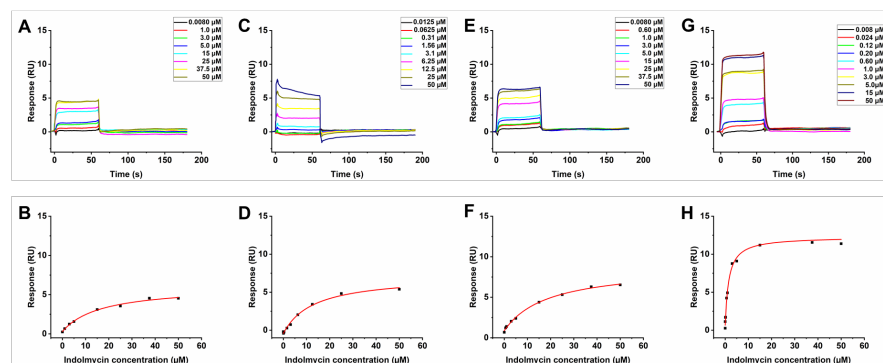


图 40 吡喹酮在 PBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂)。A~B. PBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM ATP); C~D. PBS-

P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM AMP); E~F. 以及 PBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM ATP); G~H. 实验条件中, 对 TrpRS 的亲合力结果图。

五、SA 芯片固定 His-avitag (biotin)-TrpRS, 表征 TrpRS 与吲哚霉素在 PIPES-P, TRIS-P 以及 HBS-P 缓冲溶液中的结合, 继续优化结合体系

经拟合, 吲哚霉素与 TrpRS 在 HBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂), HBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM ATP), PIPES-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂), PIPES-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM ATP), TRIS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂), TRIS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM ATP) 中的亲合力 K_D 值分别为 13 ± 2 (A~B), 0.6 ± 0.1 (C~D), 14.3 ± 0.6 (E~F)、3.5 ± 0.2 (G~H), 14.7 ± 3.0 (I~J) 和 4.7 ± 0.5 μM (K~L) (图 41)。

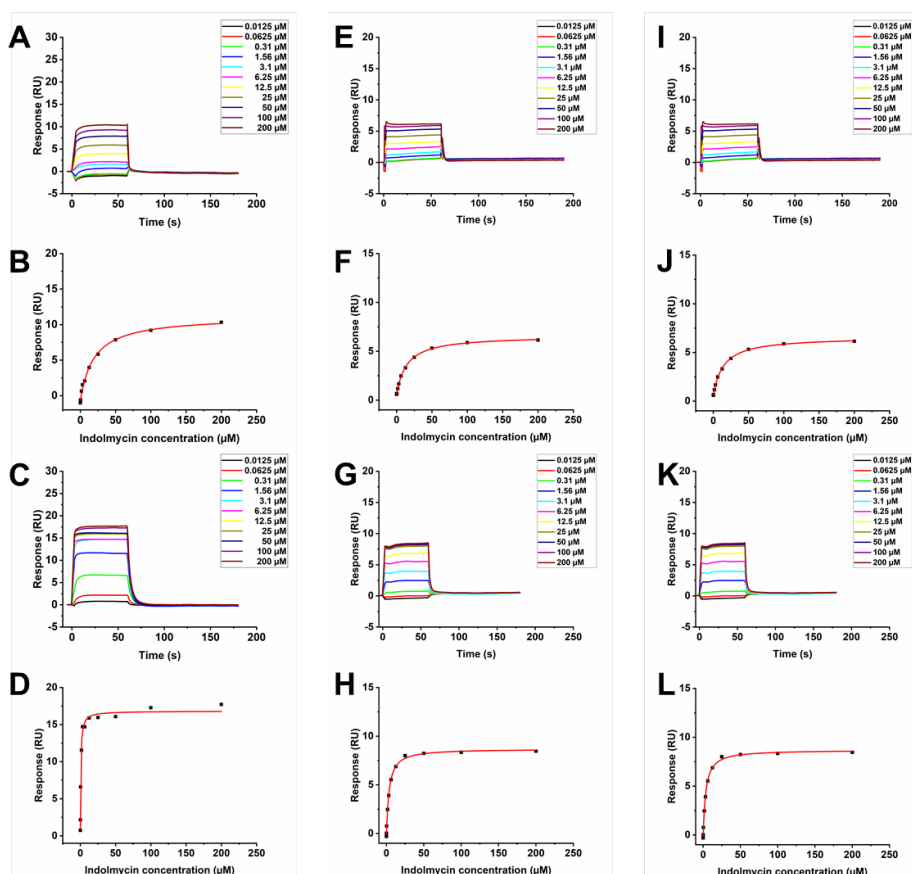


图 41 吲哚霉素在在 HBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂)。A~B. HBS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM ATP); C~D. PIPES-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂); E~F. PIPES-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM ATP); G~H. TRIS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂); I~J. TRIS-P 缓冲溶液 (含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM ATP); K~L. 实验条件中, 对 TrpRS 的亲合力结果图。

六、SA 芯片固定 His-avitag (biotin)-TrpRS，构建 TrpRS 与吲哚霉素在 HBS-P 缓冲溶液条件下的高通量筛选体系

经计算，HBS-P 缓冲溶液（含 1.0 mM MgCl₂）缓冲溶液条件下的 Z 因子为 0.91（A），而 HBS-P 缓冲溶液（含 1.0 mM MgCl₂ 和 1.0 mM ATP）缓冲溶液条件下的 Z 因子为 0.93（B）（图 42）。

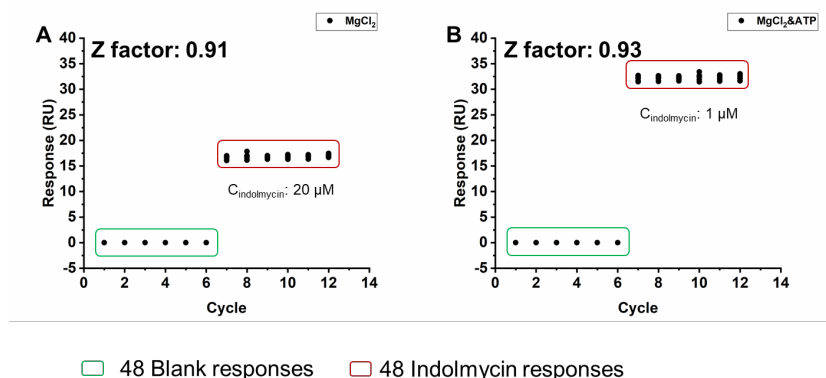


图 42 TrpRS SPR 高通量筛选系统的可靠性测试

溶液配方

缓冲液最终体积需根据实验要求确定

1. 1.05× PBS-P 缓冲溶液

量取 52.5 mL 10× PBS-P 用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释到 500 mL，混匀，配成 1.05× PBS-P。

2. 1.0× 含 5% DMSO 缓冲溶液

量取 152 mL 的 1.05× 缓冲溶液，加入 8 mL DMSO（已完成 0.22 μm 膜过滤处理），混匀，配制 1.0× 含 5% DMSO 的缓冲溶液。

3. 1.05× PBS-P 缓冲溶液（含 1.05 mM MgCl₂）

量取 21 mL 10× PBS-P 缓冲溶液以及 210 μL 1M MgCl₂ 水溶液，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，配制 1.05× PBS-P 缓冲溶液（含 1.05 mM MgCl₂），混匀后放入缓冲溶液瓶。

4. 1.05× PBS-P 缓冲溶液（含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP）

量取 21 mL 10× PBS-P 缓冲溶液，210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液以及 420 μL 500 mM ATP，使用去离子水（已完成 0.22 μm 膜过滤处理）稀释至 200 mL，配制 1.05× PBS-P 缓冲溶液（含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP），混匀后放入缓冲溶液瓶。

5. 1.05× PBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM ATP)

量取 21 mL 10× PBS-P 缓冲溶液以及 420 μL 500 mM ATP, 使用去离子水 (已完成 0.22 μm 膜过滤处理) 稀释至 200 mL, 配制 1.05× PBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM ATP), 混匀后放入缓冲溶液瓶。

6. 1.05× PBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM AMP)

量取 21 mL 10× PBS-P 缓冲溶液, 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液以及 420 μL 500 mM AMP, 使用去离子水 (已完成 0.22 μm 膜过滤处理) 稀释至 200 mL, 配制 1.05× PBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM AMP), 混匀后放入缓冲溶液瓶。

7. 1.05× PIPES-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂)

量取 2.1 mL 1 M PIPES 水溶液, 10.5 mL 3 M NaCl 水溶液, 1.05 mL P20 以及 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液, 使用去离子水 (已完成 0.22 μm 膜过滤处理) 稀释至 200 mL, 配制 1.05× PIPES-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂), 混匀后放入缓冲溶液瓶。

8. 1.05× PIPES-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP)

量取 2.1 mL 1 M PIPES 水溶液, 10.5 mL 3 M NaCl 水溶液, 1.05 mL P20, 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液以及 420 μL 500 mM ATP, 使用去离子水 (已完成 0.22 μm 膜过滤处理) 稀释至 200 mL, 配制 1.05× PIPES-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP), 混匀后放入缓冲溶液瓶。

9. 1.05× HBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂)

量取 21 mL 10× HBS-P 缓冲溶液以及 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液, 使用去离子水 (已完成 0.22 μm 膜过滤处理) 稀释至 200 mL, 配制 1.05× HBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂), 混匀后放入缓冲溶液瓶。

10. 1.05× HBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP)

量取 21 mL 10× HBS-P 缓冲溶液, 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液以及 420 μL 500 mM ATP, 使用去离子水 (已完成 0.22 μm 膜过滤处理) 稀释至 200 mL, 配制 1.05× HBS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP), 混匀后放入缓冲溶液瓶。

11. 1.05× TRIS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂)

量取 2.1 mL 1 M TRIS 水溶液, 10.5 mL 3 M NaCl 水溶液, 1.05 mL P20 以及 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液, 使用去离子水 (已完成 0.22 μm 膜过滤处理) 稀释至 200 mL, 配制 1.05× TRIS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂), 混匀后放入缓冲溶液瓶。

12. 1.05× TRIS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP)

量取 2.1 mL 1 M TRIS 水溶液, 10.5 mL 3M NaCl 水溶液, 1.05 mL P20, 210 μL 1 M MgCl₂ 水溶液以及 420 μL 500 mM ATP, 使用去离子水 (已完成 0.22 μm 膜过滤处理) 稀释至 200 mL, 配制 1.05× TRIS-P 缓冲溶液 (含 1.05 mM MgCl₂ 和 1.05 mM ATP), 混匀后放入缓冲溶液瓶。

致谢

感谢 Cytiva Biacore 大中华区产品经理吴嘉伟提供的技术支持。本项目得到了国家自然科学基金(资助号: 22107004, 21772005)和北京自然科学基金(资助号: 7202088)的支持。

参考文献

1. Wang, Q., Zhu, G. and Liu, Z. (2021). Establishment of inhibitor screening and validation system for tryptophanyl tRNA synthetase using surface plasmon resonance. *Anal Biochem.* 623: 114183. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114183>
2. 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. *SLAS Discovery.* 4(2): 67–73. <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>