

# 两种微量热技术在蛋白-药物互作检测中的交叉验证

吴萌<sup>1</sup>, 王凯华<sup>1</sup>, 李弘<sup>1</sup>, 高大明<sup>1</sup>, 陈铭<sup>1</sup>

(1.中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

**摘要:** 近年来, 关于生物分子间相互作用的研究在分子机制的探讨等研究领域内有很高的关注度。磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase PGK1, P1)是一种糖酵解酶, 可与药物分子盐酸特拉唑嗪(terazosin hydrochloride, TZ)结合, 释放三磷酸腺苷, 激活酶活性。该案例通过等温滴定微量热技术(ITC)和微量热泳动技术(MST)分别对 P1 和 TZ 之间的亲和力进行了定量检测, 并获得了可相互验证的亲和力数据; 从技术原理、检测特征、实验条件等不同方面对两种技术进行比较, 为分子互作检测方法的选择提供了新的思路。

**关键词:** 分子间相互作用, 等温滴定微量热, 微量热泳动

中图分类号: Q

文献标识码: A

## Mutual verification of two microcalorimetry techniques in protein-drug interaction detection

Wu Meng<sup>1</sup>, Wang Kaihua<sup>1</sup>, Li Hong<sup>1</sup>, Gao Daming<sup>1</sup>, Chen Ming<sup>1</sup>

(1.Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, CAS, Shanghai 200031, China)

**Abstract:** In recent years, the research on the interactions between biomolecules has attracted a lot of attention in many fields such as the exploration of the molecular mechanisms. Phosphoglycerate kinase PGK1 (P1) is a glycolytic enzyme that can bind to the drug terazosin hydrochloride (TZ) to release adenosine triphosphate and active the enzyme activity. In this case, the affinity between P1 and TZ was quantitatively detected by Isothermal Titration Microcalorimetry (ITC) and Micro Thermophoresis Technology (MST). The experimental results were mutually verifiable. This case compares the two technologies with different aspects such as the technical principles, the characteristics of detection, and the experimental conditions, then provides new ideas for the selection of the technologies for the detection of molecular interaction.

**Keywords:** Molecular Interaction, ITC, MST

# 1 引言

生物分子相互作用的深入探究不仅可以从分子水平上揭示生物体各项生理机能,并且对研究生命活动规律有重要意义,为探讨疾病的治疗和预防提供理论依据<sup>[1]</sup>。传统用于分子互作研究的方法,如免疫共沉淀、酵母双杂交、融合蛋白沉降等技术,常因蛋白量低、抗体特异性差、操作时间长等因素导致实验结果的不确定性或重复性差<sup>[2]</sup>。近年来一些用于分子间相互作用定量研究的新兴技术应运而生,如等温滴定微量热(isothermal titration calorimetry, ITC)、表面等离子共振(surface plasmon resonance SPR)、生物膜干涉(bio-layer interferometry, BLI)和微量热泳动(micro scale thermophoresis, MST)等<sup>[3]</sup>。这些技术具有无需标记、实时表征且检测时间快速等特点,已广泛应用于分子相互作用检测领域。

已有文献报道药物分子盐酸特拉唑嗪(terazosin hydrochloride, TZ)与磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase PGK1, P1)之间存在着相互作用, TZ 结合 P1 后可促进 P1 释放三磷酸腺苷激活酶活性,结合常数  $K_D$  在微摩尔级别<sup>[4]</sup>。本案例尝试用 ITC 和 MST 两种技术分别检测 P1 和 TZ 的结合情况,在初步得到实验结果的基础上对测试条件进行优化,得到了可交叉验证的亲和力常数,并在此基础上对两种检测技术的应用和特点进行了深入探讨。

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 实验仪器与材料

等温滴定微量热仪(ITC, 型号: MicroCal PEAQ-ITC, 马尔文帕纳科公司);

微量热泳动仪(MST, 型号: Monolith NT.115, 诺坦普科技有限公司);

微量分光光度计(型号: NanoDrop™ One, 赛默飞世尔科技有限公司);

磷酸盐缓冲液 PBS (10 X) (细胞培养级, 美仑生物);

盐酸特拉唑嗪(Terazosin hydrochloride, TZ) (纯度>99.7%, Tocris Bioscience 公司);

PGK1 蛋白(表达系统: 大肠杆菌, 纯度>95%, 分子量 45 KD), Nanodrop 测定蛋白浓度为 1.5 mg/ml (30  $\mu$ Mol);

Tween-20 (浓度 $\geq$ 40.0%, Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司);

Monolith™ RED-NHS 二代蛋白荧光标记试剂盒(MO-L011, 诺坦普科技有限公司);

MST 检测用毛细管(MO-K022, 诺坦普科技有限公司);

水为实验室自制超纯水。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 ITC 检测