



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105986001 B

(45)授权公告日 2019.12.03

(21)申请号 201510075993.3

CN 103290034 A,2013.09.11,

(22)申请日 2015.02.12

CN 1221449 A,1999.06.30,

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 102112490 A,2011.06.29,

申请公布号 CN 105986001 A

US 7169567 B1,2007.01.30,

US 7700728 B2,2010.04.20,

(43)申请公布日 2016.10.05

WO 2004092394 A3,2005.03.31,

(73)专利权人 上海交通大学

IGOR STAGLJAR 等.A genetic system

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo.《Proc. Natl. Acad. Sci. USA》

(72)发明人 李京敬

.1998,第95卷

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所(普通

合伙) 31219

代理人 郭婧婧 许亦琳

廖亚金.MEK2与猪瘧病毒E2蛋白的相互作用及其对猪痕病毒ft制的调控作用.《中国畜牧兽医学学会家畜传染学分会第八届全国会员代表大会暨第十五次学术研讨会论文集》.2013,

(51)Int.Cl.

C12Q 1/02(2006.01)

C12N 15/81(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

审查员 李坎

(56)对比文件

CN 1384878 A,2002.12.11,

权利要求书2页 说明书10页

序列表7页 附图5页

(54)发明名称

一种基于膜结合蛋白和荧光互补的高通量猎物拮抗剂筛选方法

(57)摘要

一种基于膜结合蛋白和荧光互补的高通量猎物拮抗剂筛选方法。本发明涉及基因工程领域,具体公开了一种筛选受体拮抗剂的新方法及其应用。所述方法将存在于细胞外的配体和受体通过信号肽融合表达策略表达至细胞膜,并使得与受体发生相互作用的配体结构域保留在细胞膜外侧,所述配体通过跨膜肽与胞内效应蛋白偶联,配体与受体在膜外侧相互作用的发生或拮抗被偶联在细胞内的效应蛋白转化成为宏观生物学效应,从而为那些分泌型配体和受体拮抗剂的筛选提供方法。

1. 一种为存在于细胞外的配体筛选受体拮抗剂的方法,所述方法具体包括如下步骤:

(1) 将配体作为钓饵,构建钓饵表达载体:所述构建方法选自以下之任一:A.将分泌信号肽编码基因序列、跨膜肽编码基因序列与钓饵编码基因序列以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列融合后获得钓饵表达单元序列,并将所述钓饵表达单元克隆至具有编码筛选标签的酵母表达质粒上,构建获得表达钓饵的钓饵表达载体,所述钓饵表达单元序列含有从N端到C端依次排列的分泌信号肽编码基因序列、钓饵编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列;B.将跨膜肽编码基因序列与钓饵编码基因序列以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列融合后获得钓饵表达单元序列,并将所述钓饵表达单元克隆至具有编码筛选标签的酵母表达质粒上,构建获得表达钓饵的钓饵表达载体,所述钓饵表达单元序列含有从N端到C端依次排列的胞内效应蛋白结构域编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、钓饵蛋白编码基因序列;

(2) 将受体作为猎物,构建猎物表达载体:将分泌信号肽编码基因序列、跨膜肽编码基因序列中的至少一种与猎物编码基因序列以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列融合获得猎物表达单元或者所述猎物表达单元序列是将猎物编码基因序列以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列直接融合后获得猎物表达单元序列,并将所述猎物表达单元克隆至具有编码筛选标签的酵母表达质粒上,构建获得表达猎物的猎物表达载体,所述猎物表达单元序列还包括以下特征中的任一项:a)当猎物表达载体用于表达非膜蛋白时,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的分泌信号肽编码基因序列、猎物编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列;b)当猎物表达载体用于表达非膜蛋白时,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的胞内效应蛋白结构域编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、猎物编码基因序列;c)当猎物表达载体用于表达膜结合蛋白时,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的胞内效应蛋白结构域编码基因序列、猎物编码基因序列;d)当猎物表达载体用于表达膜结合蛋白时,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的胞内效应蛋白结构域编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、猎物编码基因序列;e)当猎物表达载体用于表达膜结合蛋白时,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的猎物编码基因序列、胞内效应蛋白结构域编码基因序列;f)当猎物表达载体用于表达膜结合蛋白时,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的猎物蛋白编码基因序列、跨膜肽编码基因序列,胞内效应蛋白N端结构域编码基因序列;

(3) 将步骤(1)中所得钓饵表达载体和步骤(2)中所得猎物表达载体转入酵母菌株中进行共表达,所表达的配体和受体在细胞膜外发生互作,牵引胞内效应蛋白互补;

(4) 通过测定互补效应检测拮抗剂活性:在得到的稳定表达步骤(1)中所得钓饵表达载体和步骤(2)中所得猎物表达载体的阳性酵母中加入拮抗剂候选物,计算候选物的半数抑制量IC₅₀,推测候选物与配体的亲和力K_i或解离系数K_D,筛选出配体的受体拮抗剂。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,还包括以下特征中的任一项或多项:1)所述胞内效应蛋白结构域为荧光蛋白C端与N端结构域、泛素蛋白C端与N端结构域或萤光素酶N端与C端结构域;2)所述分泌信号肽为来自酵母细胞的Wbp1信号肽序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;3)所述跨膜肽为来自酵母细胞的Wbp1跨膜肽序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述酵母菌株为Y2HGold或Y187。

4. 如权利要求1-3任一权利要求所述的方法在为配体筛选受体拮抗剂中的应用。
5. 如权利要求4所述的应用,所述配体存在于细胞外。

一种基于膜结合蛋白和荧光互补的高通量猎物拮抗剂筛选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域,具体公开了筛选受体拮抗剂的新方法及其应用。

背景技术

[0002] 拮抗剂(antagonist)指能与受体结合,但不具备激活受体生物学功能的一类物质,其生物学功能与激动剂(agonist)相反,通过阻断信号的转导,抑制下游生理反应,是一个重要的药物种类。拮抗剂从广义上包括能够拮抗蛋白质相互作用的小分子化合物、重组蛋白质、抗体等,其中小分子化合物拮抗剂应用最广。受体的拮抗剂筛选在药物研发具有重要意义。如CXCR4的拮抗剂AMD3100、ALX40-4C,能够通过拮抗CXCL12和CXCR4相互作用抑制部分CXCR4相关肿瘤的肿瘤生长;内皮生长因子受体EGFR拮抗剂吉非替尼(商品名)用于通过抑制血管生长抑制肿瘤。

[0003] 目前对于受体拮抗剂的高通量筛选技术包括两种策略:第一种,检测化合物对受体下游生理生化反应的策略。这种方法对于不同功能的受体,需要采用不同的检测方法,例如,对于研究钙离子通道受体拮抗剂,采用钙离子荧光探针检测系统;又例如,对于研究GPCR受体拮抗剂,采用cAMP检测系统等,所以应用起来不具有普适性,并且由于受体与下游信号通路的交叉反应,使得这种检测系统的检测特异性存在问题。第二种,直接检测配体—受体结合的策略。这种策略通过放射性标记、酶联标记、细胞膜色谱等方法直接研究配体和受体的相互作用。这类方法需要纯化活性配体蛋白,并且需要对配体蛋白进行标记等操作,活性较难保证,可重复性不强。

[0004] 对于胞内可溶性受体拮抗剂的筛选方法有人提出过基于传统酵母双杂交的方法,但传统酵母双杂交方法所研究的受体和配体存在于细胞内部,化合物必须能够有效进入细胞内才能够有机会起阻断作用,但在高通量筛选时该因素却难以控制,因此并不能充分利用整个化合物库。

[0005] 由此可见,一种简便、普适的、高通量的受体拮抗剂检测方法亟待开发。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,提供一种为存在于细胞外的配体筛选受体拮抗剂的方法,所述方法将存在于细胞外的配体和受体通过膜外酵母双杂交系统表达至细胞膜,并使得与受体发生相互作用的配体保留在细胞膜外侧,所述配体通过跨膜肽与胞内效应蛋白偶联,从而为那些N、C端同时在细胞质膜外侧或内质网腔内的配体筛选受体拮抗剂。如图1所示,当无拮抗剂存在时,配体和受体双方发生相互作用,牵引胞内效应蛋白结构域互补,重组成为效应蛋白,产生生理生化效应。当加入拮抗剂时,拮抗剂竞争性地与受体结合,拮抗胞内效应蛋白的互补效应。随着拮抗剂浓度的增加,发生互补的效应蛋白总量随之降低,对拮抗剂浓度作图呈反S曲线,通过公式拟合可获得拮抗剂的半数有效剂量IC50。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的：

[0008] 本发明的第一方面公开了一种为存在于细胞外的配体筛选受体拮抗剂的方法，所述方法具体包括如下步骤：

[0009] (1) 将配体作为钓饵，构建钓饵表达载体：将分泌信号肽编码基因序列、跨膜肽编码基因序列中的至少一种与钓饵编码基因序列以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列融合后获得钓饵表达单元序列，并将所述钓饵表达单元克隆至具有筛选标签的酵母表达质粒上，构建获得表达钓饵的钓饵表达载体；

[0010] (2) 将受体作为猎物，构建猎物表达载体：将分泌信号肽编码基因序列、跨膜肽编码基因序列中的至少一种与猎物编码基因序列以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列融合或者所述猎物表达单元序列是将猎物编码基因序列以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列直接融合后获得猎物表达单元序列，并将所述猎物表达单元克隆至具有可筛选标签的酵母表达质粒上，构建获得表达猎物的猎物表达载体；

[0011] (3) 将步骤(1)中所得钓饵表达载体和步骤(2)中所得猎物表达载体转入酵母中进行共表达，所表达的配体和受体在细胞膜外发生互作，牵引胞内效应蛋白互补；

[0012] (4) 通过测定互补效应检测拮抗剂活性：在得到的稳定表达步骤(1)中所得钓饵表达载体和步骤(2)中所得猎物表达载的阳性酵母中加入拮抗剂候选物，计算候选物的半数抑制量IC₅₀，推测候选物与配体的亲和力K_i或解离系数K_D，筛选出配体的受体拮抗剂。

[0013] 优选的，所述分泌信号肽是指一类能够引导蛋白质进入内质网，并进而分泌至胞外的氨基酸序列。所述分泌信号肽为存在于哺乳动物细胞、植物细胞、酵母细胞的天然序列或人工设计的能够完成蛋白质分泌出胞的序列。

[0014] 更优选的，所述分泌信号肽为来自酵母细胞的Wbp1信号肽序列，其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示，具体为：

[0015] MARVMRTDWNFFFCILLQAI FVVG TQTSRTLVLYSK。

[0016] 优选的，所述跨膜肽是指一类疏水性极强、能够将融合蛋白嵌合至细胞质膜的氨基酸序列。所述跨膜肽为来源于哺乳动物细胞、植物细胞、酵母细胞的天然序列，或人工设计的能够将融合蛋白嵌合至细胞质膜的序列。

[0017] 更优选的，所述跨膜肽为来自酵母细胞的Wbp1跨膜肽序列，其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示，具体为为：

[0018] TGEFILPDRHG VFTFLTDYRKIGLSFTT DKDKVKAIRHLANDEYPR SWEISNSWVYISAICGVIVAWIF FVVSFVTTSSVGKKLET FKKT。

[0019] 优选的，所述胞内效应蛋白结构域是指任何互补后产生功能的蛋白结构域，所产生的效应包括产生发荧光能力、释放转录因子转录报告基因、以及产生化学发光功能。

[0020] 更优选的，所述胞内效应蛋白结构域为荧光蛋白C端与N端结构域、泛素蛋白C端与N端结构域或萤光素酶N端与C端结构域。

[0021] 优选的，所述荧光蛋白为绿色荧光蛋白EGFP、黄色荧光蛋白YFP。

[0022] 所述黄色荧光蛋白YFP的C端结构域CYFP的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示，具体为：Dgsvqladhy qqntp igdgp vllpdnhy ls yqsalskdpn ekr dhmvll e fvtaagitlg mdelyk。

[0023] 所述黄色荧光蛋白YFP的N端结构域NYFP的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示，具体为：Vskgeelftg vvpilv eldg dvnghkfsvs gegedatyg kltlkfictt Gklpvpwptl

vtffgygvqc farypdhmkq hdffksampe gyvqertiff Kddgnyktra evkfegdtlv nriekgidf
kedgnilghk leynynshnv Yimadkqkng ikvnfkirhn iedg。

[0024] 优选的,步骤(1)中,所述钓饵表达单元序列含有从N端到C端依次排列的分泌信号肽编码基因序列、钓饵编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列(如图2A所示)。其中,所述钓饵表达单元所表达的分泌信号肽负责将钓饵表达并分泌至细胞膜外,跨膜肽负责连接胞外的钓饵与胞内效应蛋白结构域(如图2B所示)。含有所述钓饵表达序列的钓饵表达载体适合天然条件下位分泌性或胞内可溶性蛋白质的表达。

[0025] 本发明的实施例中列举的钓饵表达载体中,所述钓饵表达单元序列含有从N端到C端依次排列的分泌信号肽编码基因序列、钓饵蛋白编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列。所述分泌信号肽为来自酵母细胞的Wbp1信号肽序列,其氨基酸序列为

[0026] MARVMRTDWNFFFCILLQAIFVVGTSRTLVLYSK (SEQ ID NO.1所示)。所述跨膜肽序列为来自酵母细胞的Wbp1跨膜肽序列,其氨基酸序列为:

[0027] TGEFILPDRHGVTFLTDYRKIGLSFTTDKDVKAIRHLANDEYPRSWEISNSWVYISAICGVIVAWIF
FVVSFVTTSSVGKLETFKKT (SEQ ID NO.2所示)。所述胞内效应蛋白为荧光蛋白结构域。

[0028] 优选的,所述钓饵表达单元序列含有从N端到C端依次排列的胞内效应蛋白结构域编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、钓饵蛋白编码基因序列。(如图2C所示)。含有所述钓饵表达序列的钓饵表达载体适合天然条件下为分泌性或胞内可溶性蛋白质的表达。

[0029] 上述两种钓饵表达载体均能够将钓饵表达至胞外,但是两者所表达的钓饵的N末端朝向相反。

[0030] 优选的,所述钓饵表达载体是将所述钓饵表达单元克隆至具有可筛选标签的酵母表达质粒上,构建获得。

[0031] 具体的,本发明钓饵表达载体的制备方法为:通过PCR的方法在钓饵表达单元的两端添加酶切位点序列,采用酶切、连接的方法将钓饵表达单元插入具有编码DNA结合功能域基因的酵母双杂交质粒,筛选、鉴定连接正确的连接产物为本发明的钓饵表达载体。所述钓饵表达载体具有可筛选标签的酵母表达质粒。

[0032] 优选的,步骤(2)中,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的分泌信号肽编码基因序列、猎物编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、以及胞内效应蛋白结构域编码基因序列。含有所述所述猎物表达单元序列的猎物表达载体用于表达非膜蛋白。

[0033] 优选的,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的胞内效应蛋白结构域编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、猎物编码基因序列。含有所述所述猎物表达单元序列的猎物表达载体用于表达非膜蛋白。

[0034] 上述两种猎物表达载体所表达的猎物的N末端朝向相反。但是两种猎物表达载体均能够将那些N、C端同时在细胞质膜外侧的蛋白膜蛋白准确表达于细胞膜上。

[0035] 优选的,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的胞内效应蛋白结构域编码基因序列、猎物编码基因序列。所述猎物表达单元所表达的猎物的N端在胞内。(如图3A所示)。含有所述猎物表达单元序列的猎物表达载体用于表达膜结合蛋白。所述猎物表达载体能够将那些N、C端同时在细胞质膜内侧或内质网腔内的蛋白准确表达于细胞膜上。

[0036] 本发明的一个优选实施例中列举的猎物表达载体中,胞内效应蛋白结构域为荧光

蛋白结构域。具体为黄色荧光蛋白结构域。

[0037] 优选的,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的胞内效应蛋白结构域编码基因序列、跨膜肽编码基因序列、猎物编码基因序列。所述猎物表达单元所表达的猎物的N端在胞外。融合一段跨膜肽,能够使得胞内效应蛋白结构域保留在胞内。(如图3B所示)。含有所述猎物表达单元序列的猎物表达载体用于表达膜结合蛋白。

[0038] 本发明的一个优选实施例中列举的猎物表达载体中,胞内效应蛋白结构域为荧光蛋白结构域。具体为黄色荧光蛋白结构域。

[0039] 优选的,所述猎物为膜结合蛋白,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的猎物编码基因序列、胞内效应蛋白结构域编码基因序列。所述猎物表达单元所表达的猎物的C端在胞内。(如图3C所示)。

[0040] 本发明的一个优选实施例中列举的猎物表达载体中,胞内效应蛋白为荧光蛋白。具体为绿色荧光蛋白或黄色荧光蛋白。

[0041] 优选的,所述猎物为膜结合蛋白,所述猎物表达单元序列含有从N端到C端依次排列的猎物蛋白编码基因序列、跨膜肽编码基因序列,胞内效应蛋白N端结构域编码基因序列。所述猎物表达载体所表达的猎物的C端在胞外。融合一段跨膜肽,能够使得胞内效应蛋白N端结构域保留在胞内。(如图3D所示)。

[0042] 本发明的一个优选实施例中列举的猎物表达载体中,胞内效应蛋白结构域为绿色荧光蛋白或黄色荧光蛋白。

[0043] 优选的,所述猎物表达载体将所述猎物表达单元克隆至具有编码筛选标记的酵母表达质粒上,构建获得。

[0044] 具体的,猎物表达载体的制备方法为:通过PCR的方法在猎物表达单元的两端添加酶切位点序列,采用酶切、连接的方法将猎物表达单元插入具有筛选标签的酵母表达质粒,筛选、鉴定连接正确的连接产物为本发明的猎物表达载体。

[0045] 需要说明的是钓饵与猎物为相对称呼,两者在本质上没有区别。

[0046] 优选的,所述钓饵或猎物为细胞因子、病毒外壳蛋白或能够表达为上述物质的遗传物质。

[0047] 优选的,在一些实施方式中,所指的细胞膜包括真核、原核活体细胞的细胞质膜,或细胞破碎后提取的细胞质膜成分。

[0048] 膜蛋白酵母双杂交系统的技术体系和实现步骤相对比较复杂,这主要体现在钓饵蛋白的表达需要在细胞上准确定位。也就是说与钓饵蛋白融合的效应蛋白结构域必须位于在细胞膜内,才能启动下游反应,进而实现胞内效应蛋白转换为宏观的生物学效应。

[0049] 现有的膜蛋白酵母双杂交系统可以用来研究两个膜蛋白的相互作用和一个膜蛋白与一个胞质蛋白的相互作用。任何一种膜蛋白都可以作为钓饵,能使与待测蛋白融合的相互作用模块定位在细胞质内。现有系统所研究的蛋白质融合表达的效应蛋白结构域端必须定位于胞质内,才能激活报告基因的表达。因此,并非所有的膜蛋白都适用该系统,比如那些N、C端同时在细胞质膜外侧或内质网腔内的蛋白质则不适用这种方法。

[0050] 然而,如前所述,采用本发明的膜外酵母双杂交系统,则能够将那些N、C端同时在细胞质膜外侧或内质网腔内的蛋白准确表达于细胞膜上。从而,为存在于细胞外的配体筛选受体拮抗剂。

- [0051] 本发明第二方面公开了前述的方法在为配体筛选受体拮抗剂中的应用。
- [0052] 优选的,所述配体存在于细胞外。
- [0053] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:
- [0054] (1) 本方法所研究的受体和配体蛋白均为在体(in vivo)状态,避免了传统方法中蛋白质纯化和标记步骤所造成的配体蛋白的活性丧失;
- [0055] (2) 本方法所检测信号为配体与受体直接互作信号,避免了现有的一些方法中检测多次信号转导产生的间接信号,提高了数据可靠性;
- [0056] (3) 成功建立系统后,可以通过简单的宿主菌扩大培养获得大量菌体,很容易建立以96孔板或384孔板荧光酶标仪为检测器的高通量筛选平台;
- [0057] (4) 本方法不需考虑宿主细胞膜对拮抗剂的通过性,因此适合各类受试化合物。
- [0058] (5) 本发明能够为存在于细胞外的配体筛选受体拮抗剂,所述受体可以是可溶性受体,也可为跨膜受体。
- [0059] 总之,本方法是一种集稳定性、普适性、高通量于一体的受体拮抗剂检测方法;

附图说明

- [0060] 图1:受体与配体相互作用和拮抗剂的拮抗作用示意图:(A)膜受体拮抗剂筛选示意图;(B)可溶性受体拮抗剂筛选示意图。
- [0061] 图2:钓饵蛋白-跨膜肽-效应蛋白表达模式图
- [0062] 图3:膜蛋白作为猎物蛋白的载体构建模式图
- [0063] 图4:钓饵蛋白与猎物蛋白互作示意图
- [0064] 图5: CXCL12配体蛋白的载体构建与表达定位
- [0065] 图6: CXCR4受体蛋白载体构建和表达定位
- [0066] 图7:趋化因子CXCL12-与受体CXCR4互作系统建立。(A) CXCL12-CYFP载体构建示意图。CXCL12成熟肽编码序列与分泌信号肽、跨膜信号肽、CYFP转录因子融合构成CXCL12-CYFP表达载体;(B) CXCR4-NYFP载体构建示意图。受体基因(7次跨膜受体)C末端融合NYFP,构成CXCR4-NYFP表达载体。(C) 相互作用示意图。CXCL12与CXCR4同时表达定位于细胞膜,其相互作用引导胞内效应蛋白CYPF和NYFP互补,诱发双分子荧光互补(BiFC)效应;(D) CXCL12与OST1无相互作用示意图。CXCL12与OST1基因同时定位于细胞膜表面,但因为CXCL12与OST1不存在相互作用,因此不能诱导BiFC效应。(E-H) 激光共聚焦结果。CXCL12-CXCR4细胞表面存在黄色荧光,说明CXCL12与CXCR4发生了相互作用(E);而CXCL12与OST1不存在相互作用,因此表达菌株表面不存在黄色荧光(F)。单独转染CXCL12-CYFP载体(G)或CXCR4-NYFP载体(H),其菌体表面均无黄色荧光。(I) 荧光强度测定。用分光光度计测定不同转化菌株的黄色荧光强度结果。
- [0067] 图8:化合物拮抗CXCR4和CXCL12反应动力学研究。(A) AMD3100拮抗时效曲线图。不同浓度的AMD3100与CXCL12-CXCR4细胞株孵育,随着孵育时间的演唱,CXCL12-CXCR4复合物浓度逐渐降低,当反应进行至25min时到达平衡。(B) 不同CXCL12-CXCR4拮抗剂的量效曲线。当到达平衡时,反应体系中CXCL12-CXCR4复合物浓度(荧光强度)随拮抗剂浓度升高而降低,其曲线呈“反S”曲线。通过软件计算半数有效剂量各化合物的半数抑制剂量IC₅₀,其结果与已有报道相一致。

具体实施方式

[0068] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0069] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0070] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Second edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989and Third edition,2001;Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley&Sons,New York,1987and periodic updates;the series METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,Third edition,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,Vol.304,Chromatin(P.M.Wassarman and A.P.Wolffe,eds.),Academic Press,San Diego,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Vol.119,Chromatin Protocols(P.B.Becker,ed.)Humana Press,Totowa,1999等。

[0071] 下面通过具体实施例进一步描述本发明的技术方案。

[0072] 实施例1.CXCL12配体蛋白的载体构建与表达定位

[0073] 目的:通过将CXCL12基因与信号肽基因、跨膜肽基因融合表达,达到定位于细胞膜的效果。

[0074] 质粒构建:将小鼠趋化因子CXCL12成熟肽编码序列(SEQ ID NO.5所示,具体为:KPVLSYRC PCRFFESHIA RANVKHLKIL NTPNCALQIV ARLKNNNRQV CIDPKLKWIQ EYLEKALNK)扩增并测序,与分泌信号肽序列(来自酵母Wbp1信号肽序列,SEQ ID NO.1所示,具体为:

[0075] MARVMRTDWNFFFCILLQAI FVVGTQTSRTLVLYSK)跨膜肽(来自酵母Wbp1跨膜肽序列,SEQ ID NO.2所示,具体为:

[0076] TGEFILPDRHG VFTFLTDYRKIGLSFTTDDKDVKAIRHLANDEYPRSWEISNSWVYISAICGVIVAWIF FVVSFVTTSSVGKKLETFKKT)融合,其后连接绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因,整个融合蛋白克隆至酵母表达载体pGAD-T7中,形成如图5A所示结构,记为CXCL12-EGFP质粒。

[0077] 融合蛋白跨膜结构预测:使用TMHMM2.0在线分析软件分析融合蛋白的跨膜拓扑结构。软件计算结果表明,该融合蛋白能够达成将CXCL12蛋白部分表达至细胞膜外侧,并通过跨膜肽与细胞膜内侧EGFP连接的拓扑结构(图5B)。

[0078] 质粒转染:通过LiAc转化方法转化CXCL12-EGFP质粒至GoldY2H细胞株(MAT α , Trp1-901,Leu2-3,112,ura3-52,his3-200,gal4 Δ ,gal80 Δ ,LYS2::GAL1_{UAS}-Gal2_{TATA}-

His3,GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2,URA3::MEL1_{USA}-Mel1_{TATA},AUR1-C,MEL1),转化子在SD Leu⁻营养缺陷型培养基上30摄氏度筛选5天。

[0079] 细胞定位观察:荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的细胞定位。如图5C所示,观察结果显示,细胞膜表面有明显的绿色荧光信号,证明CXCL12钓饵蛋白能够如所预测的正确表达在细胞膜表面。

[0080] 实施例2.CXCR4受体蛋白载体构建与定位

[0081] 目的:明确CXCR4受体在酵母细胞中的表达定位。

[0082] 载体构建:将CXCR4受体基因克隆,并与黄色荧光蛋白(YFP)融合,克隆至酵母表达载体pGBK-T7中(图6A),记为:CXCR4-YFP质粒。其中,CXCR4的相关信息详见:

[0083] CXCR4参考[HTTP://WWW.UNIPROT.ORG/UNIPROT/P70658](http://www.uniprot.org/uniprot/P70658); (NP_034041.2)

[0084] 融合蛋白跨膜结构预测:使用TMHMM2.0在线分析软件分析融合蛋白的跨膜拓扑结构。软件计算结果表明,该融合蛋白能够将受体蛋白正确表达至细胞膜,并将C端所融合的YFP蛋白表达至胞内(图6B)。

[0085] 质粒转染:通过LiAc转化方法转化CXCR4-YFP质粒至Y187细胞株,转化子在SD-Trp⁻营养缺陷型培养基上30摄氏度筛选5天。挑选单克隆菌株用于荧光观察。

[0086] 细胞定位观察:使用激光共聚焦显微镜,以514nm激发光观察YFP的细胞定位。观察结果显示,菌株细胞膜表面有明显的黄色荧光信号,证明CXCR4蛋白能够如所预期地正确表达在细胞膜表面。

[0087] 实施例3.CXCL12与CXCR4相互作用检测平台建立

[0088] 实施例目的:通过双分子荧光互补技术建立CXCL12与CXCR4相互作用检测平台,用于后续受体拮抗剂筛查。

[0089] 原理:配体基因CXCL12(NP_038683.1)通过跨膜肽与黄色荧光蛋白C端结构域(CYFP)融合,受体CXCR4(NP_034041.2)与黄色荧光蛋白N端结构域(NYFP)融合。NYFP和CYFP单独均不能发荧光,只有在CXCL12与CXCR4发生相互作用时,NYFP和CYFP发生双分子荧光互补(BiFC),重建成为具有荧光功能的完整有活性黄色荧光蛋白(YFP)。通过荧光酶标仪检测菌液黄色荧光(波长529纳米)强度。

[0090] 质粒构建:CXCL12-CYFP质粒构建:

[0091] 将小鼠趋化因子CXCL12成熟肽编码序列(SEQ ID NO.5所示,具体为:KPVSLSYRCPCRFFESHIANVKHLKIL NTPNCALQIV ARLKNNNRQVCIDPKLKIWIQ EYLEKALNK)N末端与分泌信号肽序列(来自酵母Wbp1信号肽序列,SEQ ID NO.1所示,具体为:MARVMRTDWNFFFCILLQAIFFVGTQTSRTLVLVYSK),C端与跨膜信号肽序列(来自酵母Wbp1跨膜肽序列,SEQ ID NO.2所示,具体为:

[0092] TGEFILPDRHGVTFTLTDYRKIGLSFTTDDKDVKAIRHLANDEYPRSWEISNSWVYISAICGVIVAWIFFVVSFVTSSVGKKLETFFKKT)融合,其后融合黄色荧光蛋白C端结构域(CYFP),整个融合蛋白基因克隆至酵母表达载体PGAD-T7中,形成如图:7A所示结构,记为CXCL12-CYFP质粒。

[0093] CXCR4-NYFP质粒构建:在小鼠趋化因子受体CXCR4N末端融合黄色荧光蛋白N端结构域NYFP,融合基因克隆至酵母表达载体pGBK-T7中,命名CXCR4-NYFP。

[0094] 其表达的蛋白结构如图7B所示。

[0095] 对照载体构建:

[0096] 阴性对照:

[0097] 使用无关的酵母膜蛋白质OST1 ([HTTP://WWW.UNIPROT.ORG/UNIPROT/P41543](http://www.uniprot.org/uniprot/P41543)) (NP_012532.3) 融合NYFP构成阴性对照载体,其预期表达结构如图7D中所示。因为OST与CXCL12理论上无相互作用。

[0098] 质粒转染和阳性克隆筛选:通过LiAc转染方法共转染CXCL12-CYFP和CXCR4-NYFP或OST1-NYFP载体至Y187酵母细胞株,菌体在双缺陷培养基SD Leu⁻Trp⁻上30摄氏度培养5d,挑取单克隆菌落,通过PCR鉴定质粒共转染。将CXCL12-CYFP或CXCR4-NYFP单独转染至Y187菌株,作为对照。

[0099] 双分子荧光互补检测:挑取单克隆菌落,使用激光共聚焦显微镜观察细胞膜黄色荧光,使用荧光酶标仪检测菌液黄色荧光强度。

[0100] 结果:

[0101] CXCL12-CYFP与CXCR4-NYFP共表达菌株细胞膜表面出现黄色荧光,CXCL12-CYFP与OST1-NYFP共表达菌株没有黄色荧光,单独转染CXCL12-CYFP或CXCR4-NYFP的菌株均未观察到细胞膜表面荧光。

[0102] 使用荧光酶标仪测定相同菌体密度的菌液中黄色荧光强度,同样发现CXCL12-CYFP与CXCR4-NYFP共表达菌株与对照相比具有高强度的黄色荧光信号,而单一质粒转染菌株与空菌株相比无明显的荧光信号。

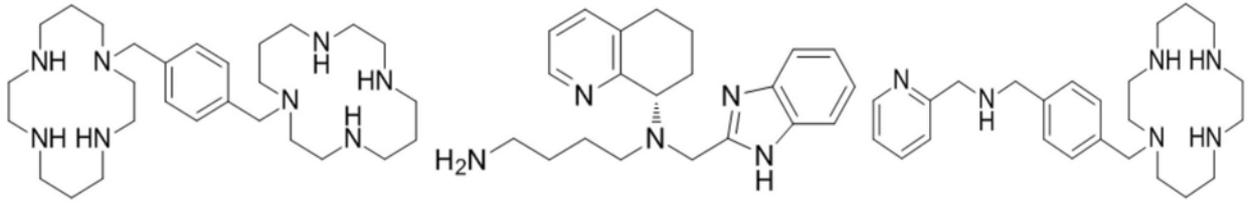
[0103] 说明CXCL12与CXCR4相互作用介导了CYFP和NYFP互补,产生黄色荧光。

[0104] 实施例4.拮抗剂对CXCL12-CXCR4结合的半数抑制剂量(IC₅₀)测定

[0105] 实施例目的:测定CXCR4拮抗剂AMD3100、AMD070和AMD3465对CXCL12和CXCR4相互作用抑制作用的IC₅₀。

[0106] 材料准备:将3种CXCR4拮抗剂(AMD3100、AMD070和AMD3465)和对照化合物NBI-74330,四个化合物的结构式如下图所示:

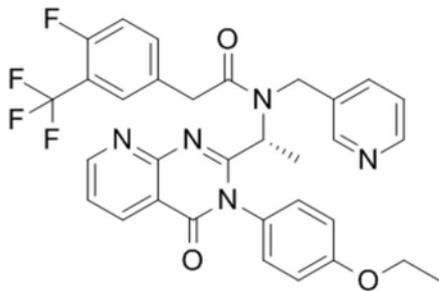
[0107]



AMD3100

AMD-070

AMD3465



NBI74330

[0108] 用PBS缓冲液溶解至不同浓度梯度;将实施例3所建立的CXCL12-CXCR4相互作用系统宿主菌扩大培养,离心收集菌体,用PBS缓冲液重悬,配制成为吸光度 $OD_{600}=0.5$ 的菌悬液。

[0109] 相互作用拮抗:将不同浓度的受试化合物溶液100 μ l,与等体积的菌液混合,加至96孔板。在摇床上37摄氏度振摇,不同时间点取样检测。每个浓度进行3个平行孔实验。

[0110] 结合动力学研究:使用荧光酶标仪测定细胞黄色荧光强度(激发光波长514nm,发生光波长525nm)。首先以反应时间为横坐标,以荧光强度为纵坐标作图,确定反应过程达到平衡所需的时间。其次以化合物浓度为横坐标,以反应平衡后荧光强度为纵坐标作图,获得量效曲线。使用生物学软件计算化合物拮抗CXCL12和CXCR4相互作用的 IC_{50} 。

[0111] 结果:

[0112] 结果显示,不同浓度AMD3100与菌悬液混合孵育后,荧光值均随时间逐渐减小,在25分钟时达到平台期(图8A)。说明当拮抗化合物加入后,竞争性地同CXCR4结合,受体、配体、拮抗剂三者的结合和解离在25min后到达平衡。

[0113] 以受试化合物浓度为横坐标,以相对荧光强度为纵坐标作图(图8B)。从曲线可以看出,三种受试化合物对CXCL12和CXCR4的相互作用都具有拮抗作用,随着药物浓度的增加,黄色荧光强度逐渐下降。而对照化合物无明显的抑制作用。通过软件计算三种抑制剂的 IC_{50} ,结果为AMD3100为 34.5 ± 2.4 nM;AMD3465为 123.8 ± 5.3 nM;AMD070为 14.1 ± 1.9 nM。该结果与已有报道相吻合(参看Fricker,S.P.et al.Biochem Pharmacol.2006 Aug 28;72

(5):588-96;Rosenkilde MM,et al.J Biol Chem.2007.282(37):27354-65;Skerlj,R.et al.Bioorg Med Chem Lett 2011.21(1):262-6)。

[0114] 该结果表明本系统能够用于研究化合物对CXCL12-CXCR4相互作用的拮抗作用研究,可获得拮抗反应平衡时间,拮抗剂的IC50两项重要参数。

序列表

<110> 上海交通大学
 <120> 一种用于膜蛋白和荧光互补的高通量受体拮抗剂筛选方法
 <130> PCNGS
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 分泌信号肽

[0001]

<400> 1
 Met Ala Arg Val Met Arg Thr Asp Trp Asn Phe Phe Phe Cys Ile Leu
 1 5 10 15
 Leu Gln Ala Ile Phe Val Val Gly Thr Gln Thr Ser Arg Thr Leu Val
 20 25 30
 Leu Tyr Ser Lys

 35
 <210> 2
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 跨膜肽

<400> 2

Thr Gly Glu Phe Ile Leu Pro Asp Arg His Gly Val Phe Thr Phe Leu

1 5 10 15

Thr Asp Tyr Arg Lys Ile Gly Leu Ser Phe Thr Thr Asp Lys Asp Val

20 25 30

Lys Ala Ile Arg His Leu Ala Asn Asp Glu Tyr Pro Arg Ser Trp Glu

35 40 45

Ile Ser Asn Ser Trp Val Tyr Ile Ser Ala Ile Cys Gly Val Ile Val

50 55 60

Ala Trp Ile Phe Phe Val Val Ser Phe Val Thr Thr Ser Ser Val Gly

65 70 75 80

Lys Lys Leu Glu Thr Phe Lys Lys Thr

85

[0002]

<210> 3

<211> 66

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CYFP

<400> 3

Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile

1 5 10 15

Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln

20 25 30

Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu

35 40 45

Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu

50

55

60

Tyr Lys

65

<210> 4

<211> 174

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> NYFP

<400> 4

Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val

[0003]

1

5

10

15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu

20

25

30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys

35

40

45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe

50

55

60

Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln

65

70

75

80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg

85

90

95

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val

100

105

110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile

115

120

125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn

130

135

140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly

145

150

155

160

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly

165

170

<210> 5

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

[0004]

<223> CXCL12 成熟肽编码序列

<400> 5

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser

1

5

10

15

His Ile Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro

20

25

30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln

35

40

45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys

50

55

60

Ala Leu Asn Lys

65

<210> 6

<211> 400

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 人乙肝病毒外壳蛋白基因 preS1/S2/S

<400> 6

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu

1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Gly His Gln Leu Asp Pro

20 25 30

Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn

35 40 45

Lys Asp Gln Trp Pro Ala Ala Asn Gln Val Gly Val Gly Ser Phe Gly

[0005]

50 55 60

Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Asn Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln

65 70 75 80

Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser

85 90 95

Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu

100 105 110

Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Ser Thr Phe His

115 120 125

Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly

130 135 140

Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro

145 150 155 160

Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu			
	165	170	175
Ser Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly			
	180	185	190
Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser			
	195	200	205
Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly			
	210	215	220
Gln Asn Leu Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro			
225	230	235	240
Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile			
	245	250	255
Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu			
[0006]	260	265	270
Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser			
	275	280	285
Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly			
	290	295	300
Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn			
305	310	315	320
Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu			
	325	330	335
Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro			
	340	345	350
Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val			
	355	360	365

	Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Asn			
	370	375	380	
[0007]	Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile			
	385	390	395	400

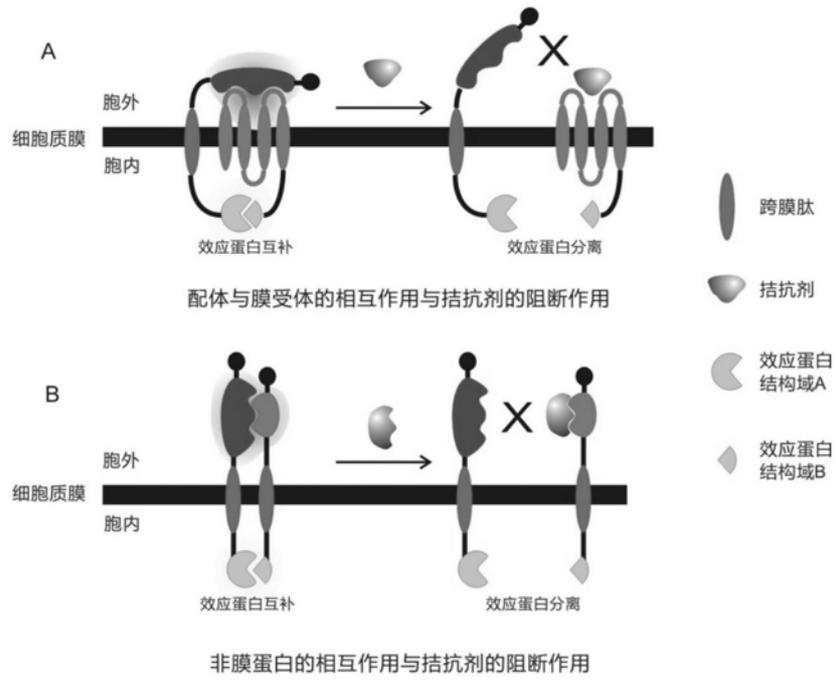


图1

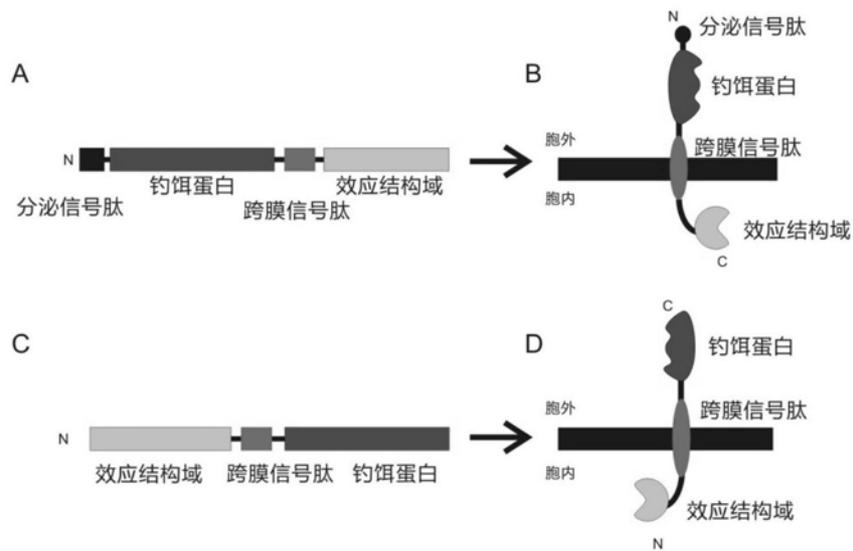


图2

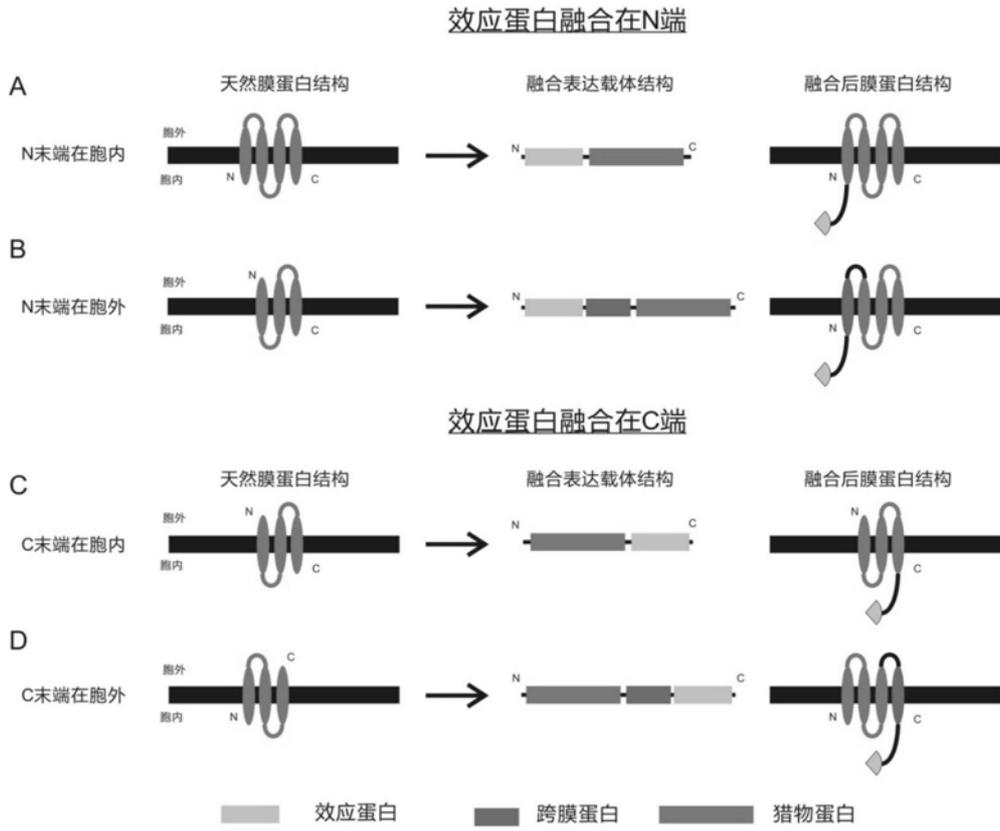


图3

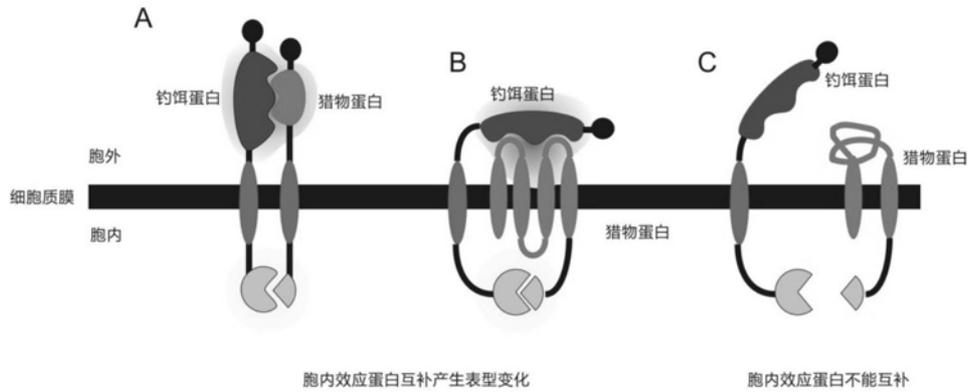


图4

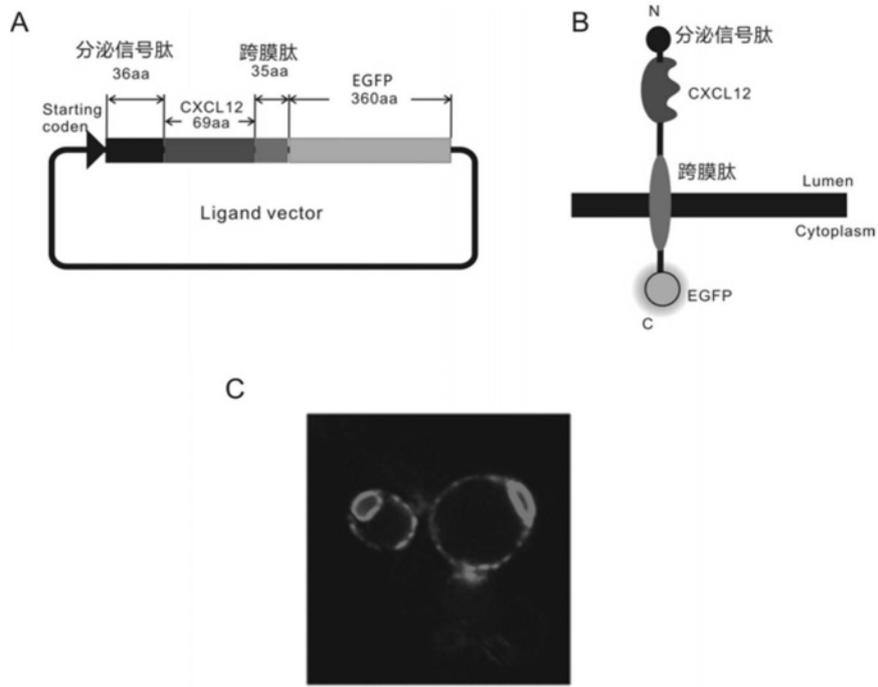


图5

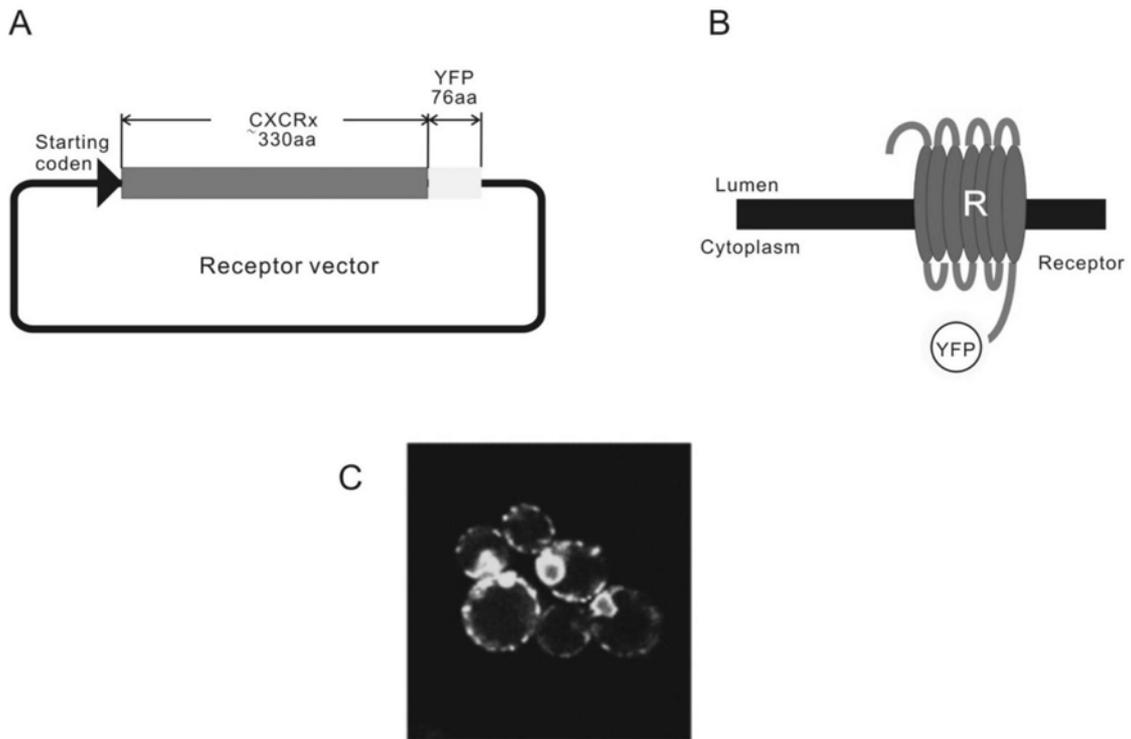


图6

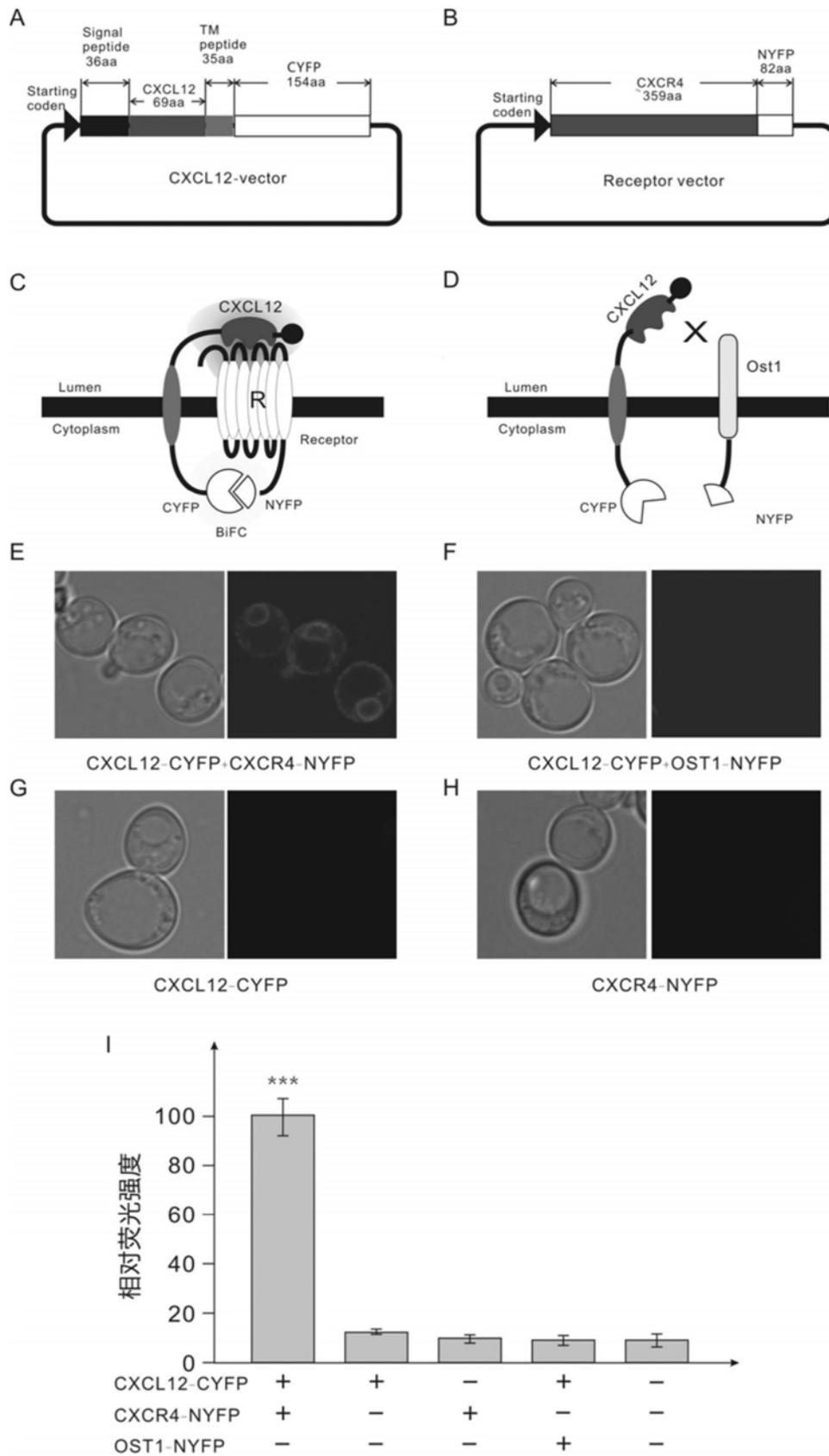


图7

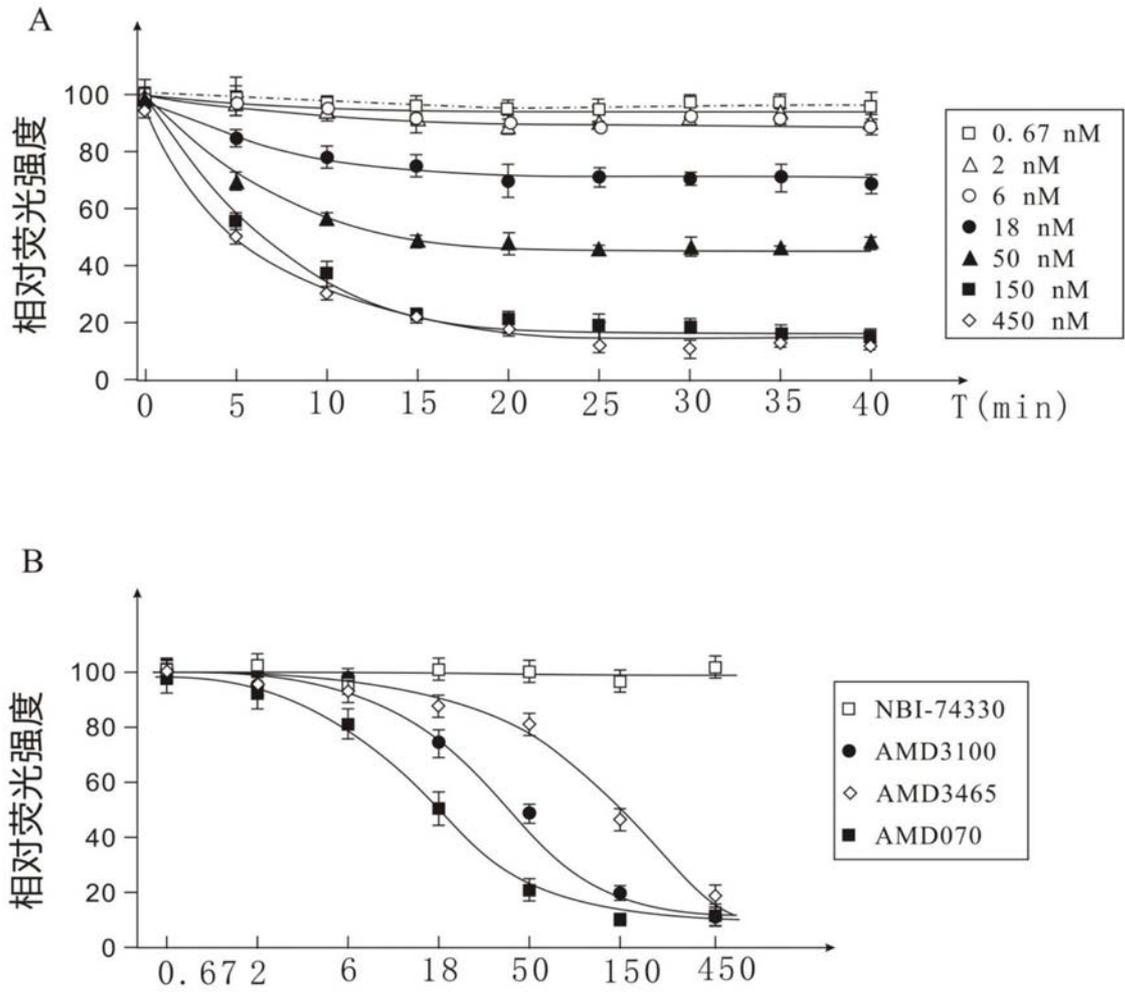


图8