

基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白 白中药活性成分的筛选

Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Lentiviral Particles immobilized Surface Plasmon Resonance

王冬尧，曹岩*，柴逸峰，洪战英，陈啸飞，吕狄亚，张颖，王晓飞

海军军医大学药学系，上海

*通讯作者邮箱：caoyan@smmu.edu.cn

摘要

膜蛋白是重要的药物靶点，开发针对膜蛋白的药物筛选研究具有重要意义，而具有专属性强、灵敏度高等优势的SPR传感器已成为研究膜蛋白与药物分子之间相互作用的有效工具。但由于膜蛋白的特殊性，膜蛋白离开磷脂双分子层环境会导致其蛋白构象和活性受到不可逆的破坏，因此进行SPR膜蛋白研究时需要对膜蛋白分子进行稳定化。本文以膜蛋白CXCR4（C-X-C chemokine receptor type 4， CXCR4）为例，介绍采用基于慢病毒载体偶联表面等离子体共振（Surface plasmon resonance， SPR）技术筛选中药中膜蛋白靶向活性成分的一般过程。首先，构建CXCR4高/低表达差异的慢病毒颗粒（Lentiviral particles， LVPs），并表征其表达水平；其次，设计了亲和检测模块，将CXCR4⁺-LVPs/CXCR4--LVPs偶联至CM5芯片不同通道上，对芯片的活性和特异性进行评价；再次，设计了配体筛选模块，将CXCR4⁺-LVPs/CXCR4—LVPs偶联至不同CM5芯片上，对3种中药进行初步筛选，鉴定出川芎中存在潜在的结合成分洋川芎内酯I。该方法利用LVPs的特性，设计了一种将膜蛋白稳定偶联在SPR芯片上的新策略，并巧妙利用参比通道/芯片，构建了亲和检测模块和配体筛选模块，两者相辅相成，是从复杂药物体系中筛选作用于膜蛋白的活性化合物的有效方法。

关键词：膜蛋白，慢病毒载体，活性成分，筛选，表面等离子共振

引用格式：王冬尧，曹岩，柴逸峰，洪战英，陈啸飞，吕狄亚，张颖，王晓飞. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011.

1

How to cite: Wang, D. Y., Can, Y., Chai, Y. F., Hong, Z. Y., Chen, X. F., Lu, D. Y., Zhang, Y. and Wang, X. F. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Lentiviral Particles immobilized Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. (in Chinese)

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

研究背景

膜蛋白是重要的药物靶点，在多种生物过程中均起到关键作用。由于膜蛋白离开磷脂双分子层环境会导致其蛋白构象和活性受到不可逆的破坏，目前针对膜蛋白的药物开发是一项具有挑战性的工作，虽然已有生物亲和质谱[1]、细胞膜色谱[2]等多种技术被应用于针对膜蛋白筛选化合物，然而这些技术在专属性、灵敏度、通量和操作的简便性上仍无法完全满足膜蛋白药物筛选的要求。因此，新型膜蛋白药物筛选技术仍然药物开发的技术难点，建立合适的膜模拟系统来维持膜蛋白的活性和构象具有重要意义[3]。

由于具有专属性强、灵敏度高等优势，SPR传感器已成为研究膜蛋白与药物分子之间相互作用的有效工具。但由于膜蛋白的特殊性，在进行SPR膜蛋白研究中需要对膜蛋白分子进行稳定化[4]。目前，通常通过人为构建类似于细胞膜的亲脂环境稳定膜蛋白，并将其偶联于SPR芯片表面[5]。可通过使用去垢剂[6]，脂质体[7]和纳米磷脂盘来人为构建类似生物膜的亲脂环境。这种方法有许多成功的研究案例，但同时也存在一些局限性：首先，在稳定化过程中膜蛋白需要离开其天然脂质环境，这会严重影响膜蛋白的构象和活性；此外，该方法需要对膜蛋白进行标记，这可能会影响膜蛋白的活性甚至与化合物的结合；最后，优化膜蛋白稳定条件是一项费时费力的工程。上述的局限性制约了此类方法的应用。

使用慢病毒颗粒作为膜蛋白的载体，将目的基因插入慢病毒转染所需的质粒中，从而获得细胞膜上的膜蛋白。通过选择质粒并引入内部启动子和增强子元件，调节目标基因的表达水平和稳定性，确保基因表达受控，再通过基因组编辑技术，实现外源基因在宿主基因组中的精确整合，提高安全性。这种策略具有高专属性、高灵敏度和高通量的优点。慢病毒载体稳定技术可用于稳定表达跨膜蛋白等多次跨膜蛋白靶点的研究，以及基因治疗和药物开发。

本试验方案以膜蛋白CXCR4（C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4）为例，采用基于慢病毒载体的膜蛋白稳定策略，将携带膜蛋白的慢病毒偶联在SPR传感芯片表面，构建成基于SPR的活性药物筛选系统，通过Biacore T200系统和高分辨质谱系统，对3种中药进行活性成分筛选、分析与鉴定，最终在川芎中筛选得到活性成分洋川芎内酯I，并确证了其亲和力和生物活性[8,9]。这种基于慢病毒的稳定策略利用了从宿主细胞中产生的慢病毒在离开宿主细胞体内时，会整合宿主细胞的细胞膜片段，并同时携带细胞膜上的蛋白质的原理，具有其独特的优势：（1）高活性，膜蛋白无需离开其天然脂质环境，可以保持结构和活性；（2）无标记，LVPs表面上有多种蛋白，可以利用氨基偶联法直接偶联在芯片上而无需其他标记；（3）操作简便，慢病毒易于制备和纯化，且具有一定刚性、对操作条件要求不高。因此，慢病毒载体结合SPR技术在活性化合物筛选方面展示出巨大的潜力。

材料与试剂

1. CM5 芯片 (Cytiva, catalog number: 29104988)
2. 氨基偶联试剂盒 (Cytiva, catalog number: BR100633)
3. 10 mM 醋酸钠缓冲液 pH 4.0–5.5 (Cytiva, catalog number: BR100349-52)
4. 50 mM NaOH 溶液 (Cytiva, catalog number: BR100358)
5. 10× HBS-EP+ (Cytiva, catalog number: BR100669)
6. 10× PBS buffer (Cytiva, catalog number: BR100672)
7. 三氟乙酸 (Adamas, catalog number: 81548K)
8. 碳酸氢铵 (Sigma-Aldrich, catalog number: 09830-500G)
9. XBridge BEH C18 色谱柱 (130Å, 2.5 μm, 2.1 mm × 100 mm) (Waters, catalog number: 186006031)
10. 质谱纯甲醇 (Supelco, catalog number: MX0490)
11. 质谱纯乙腈 (Sigma-Aldrich, catalog number: L010100)
12. 质谱纯甲酸 (Supelco, catalog number: FX0450)
13. 川芎药材 (产自四川彭州, 2017 年)、穿心莲药材 (产自广西贵港, 2017 年)、苦棟子药材 (产自河北保定, 2017 年), 均购买于上海长海医院
14. HEK293T 细胞株 (中国科学院上海分院细胞库)
15. 胎牛血清 (Gibco, catalog number: A5256801)
16. 胰酶 (Gibco, catalog number: 25200072)
17. RPMI-1640 培养基 (Gibco, catalog number: 11875101)
18. 青霉素与链霉素 (Gibco, catalog number: 15140148)
19. 质粒设计并合成 (吉玛基因公司)
20. JetPEI 转染试剂 (Polyplus, catalog number: 101000053)
21. 聚乙二醇 8000 (Sigma-Aldrich, catalog number: P2139)
22. CXCR4 一抗 (Abcam, catalog number: ab124824)
23. GAPDH 一抗 (Abcam, catalog number: ab8245)
24. P24 一抗 (Abcam, catalog number: ab65289)
25. 酞/硫酸盐乳胶微珠 (Thermo Scientific, catalog number: A37304)
26. 小鼠二抗 (Licor, catalog number: 926-32210)
27. 兔二抗 (Licor, catalog number: 926-32211)
28. AMD3100 (MCE, catalog number: HY-10046)
29. 吉非替尼 (MCE, catalog number: HY-50895)

引用格式: 王冬尧, 曹岩, 柴逸峰, 洪战英, 陈啸飞, 吕狄亚, 张颖, 王晓飞. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011011. doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. 3

How to cite: Wang, D. Y., Can, Y., Chai, Y. F., Hong, Z. Y., Chen, X. F., Lu, D. Y., Zhang, Y. and Wang, X. F. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Lentiviral Particles immobilized Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011011. doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. (in Chinese)

30. Stattic (MCE, catalog number: HY-13818)
31. 洋川芎内酯 I (美仑生物, catalog number: 94596-28-8)
32. Transwell 聚酯膜小室 (Corning, catalog number: 3470)

仪器设备

1. 生物安全柜 (Thermo, model: 1300 series A2)
2. 生化培养箱 (Thermo, model: HeraCell 150i GP)
3. 蛋白质成像系统 (Licor, model: Odyssey)
4. 流式细胞仪 (Becton Dickinson, model: BD FACS Celesta)
5. 相互作用分析仪 (Cytiva, model: BiacoreT200)
6. 液相色谱系统 (Agilent, model: Agilent 1290 Infinity LC)
7. 飞行时间质谱仪 (Agilent, model: Agilent 6538 UHD Q-TOF MS)
8. 超纯水制备系统 (Millipore, model: Milli-Q A10)

实验步骤

一、实验前准备

1. 细胞培养与传代:

将 HEK293T 细胞使用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养, 孵育箱参数设置为 37 °C, 5% CO₂。当细胞生长至约占满 80% 的视野时, 对细胞进行传代。吸取培养皿中原有的培养基, 加入 PBS 缓冲液, 清洗三次后加入含 0.25% EDTA 的胰酶, 消化至显微镜下观察细胞变为透亮圆形, 加入含 10 % FBS 的 RPMI-1640 培养基终止消化, 将细胞从培养皿上吹打下来, 室温下 400×g 离心 5 min, 弃去上清液体, 加入适量培养基重悬细胞, 将细胞悬液加到新的培养皿中, 放回孵育箱继续培养。

2. 慢病毒包装与纯化:

HEK293T 细胞分为正常组和干扰组。用 JetPEI (shRNA:JetPEI = 3:1) 将 10 μg pGPU6/GFP/Neo-shRNA 载体转染到正常组细胞中, 用 JetPEI 将 10 μg shRNA 质粒转染到干扰组的细胞中。转染质粒 24 h 后, 将 JetPEI 与 pLVTHM, psPAX2 和 pMD2G 质粒以 1:1:1 的比例共转染至两组 HEK293T 细胞内包装 LVPs。

3. 慢病毒纯化:

转染三质粒系统 72 h 后，收集上清液，并通过低速离心和 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤除去细胞碎片。使用聚乙二醇 8000 (Polyethylene Glycol 8000, PEG8000) 溶液纯化 LVPs。将含有上清液的 LVPs 与 PEG-8000 以 4:1 的比例混合。每 30 min 将溶液轻轻混合，重复 5 次。将该溶液在 4°C 下储存过夜，然后在 $8,000\times g$ 条件下离心 30 min。除去上清液，并用 PBS 重悬沉淀将 LVPs 悬液在 $8,000\times g$ 条件下离心 30 min。除去上清液，并用 PBS 重悬沉淀。最后，将 LVPs 溶液分装并保存在 -80°C 。

4. 中药材提取液的制备：

将川芎 (Herba Chuanxiong)，穿心莲 (Herba Andrographitis) 和苦棟子 (Fructus Meliae) 中药材分别处置：首先应用磨粉机将中药材粉碎，通过 40 目筛网。称取 1 g 中药材，加入 10 mL 80% 乙醇溶液，超声 (功率 400 W) 提取 30 min 后通过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，将过滤液按照 $12,000 \text{ r/min}$ 离心 15 min，所得上清液即为中药材提取液，置于 4°C 备用。中药材浓度以生药浓度 (即中药材的质量和提取液的体积比) 表示。

5. 运行缓冲液和其他溶液的制备：

HBS-EP+运行缓冲液：量取 $10\times$ HBS-EP+溶液和 ddH₂O，配制成 200 mL $1\times$ HBS-EP+溶液；

PBS 稀释液：量取 $10\times$ PBS 溶液和 ddH₂O，配制成 1,000 mL $1.05\times$ PBS 溶液；

含 5% DMSO 的 PBS 运行缓冲液：量取 PBS 稀释液和 DMSO，配制 500 mL 含 5% DMSO 的 PBS 溶液作为中药筛选和亲和力测定的运行缓冲液。

溶剂校正溶液：用 PBS 稀释液和 DMSO 配制 4–8 个校正溶液，以获得一组 DMSO 浓度范围为 4.5%–5.8% 的校正溶液。

结合成分洗脱液：量取 ddH₂O 和三氟乙酸 (TFA)，配制 10 mL 0.5% TFA 溶液作为结合成分洗脱液备用，用于回收结合成分；

结合成分溶解液：精密称取碳酸氢铵 (NH_4HCO_3) 粉末，用 ddH₂O 溶解至浓度为 50 mM 作为结合成分溶解液备用，体积不少于 1 mL。

6. 化合物溶液的制备：

精密称取洋川芎内酯 I 的标准品，用 DMSO 溶解至浓度为 10 mM，体积约为 100 μL ，作为化合物储备液，置于 4°C 备用。

二、慢病毒颗粒的偶联

1. 基于蛋白质印迹的慢病毒颗粒表面受体表征：

通过蛋白质印迹实验分析 HEK293T 细胞和 LVPs 上 CXCR4 蛋白的表达。将细胞和 LVPs 裂解，将裂解液在 4°C 下以 $12,000\times g$ 离心 20 min，除去不溶物，并在电泳中用 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白样品。电泳后，将胶上的蛋白通过电转的方法转移到硝酸纤维素膜上，将纤维素膜在室温下封闭 2 h。封

闭后用一抗孵育条带 (CXCR4 1:300; GAPDH 1:1,000)，放于摇床上 4 °C过夜。然后用 PBST 清洗膜，用荧光二抗孵育膜 2 h (1:10,000)。孵育后用 PBST 清洗膜，除去多余的抗体。使用 Odyssey 红外成像系统通过扫描和分析印迹。

2. 基于流式细胞术的慢病毒颗粒表面受体表征：

通过流式细胞术对 LVPs 上的 CXCR4 表达水平进行表征。LVPs 与醛/硫酸盐乳胶磁珠偶联。将 20 μL 乳胶磁珠在室温下超声 5 min。然后将 15 μL LVPs 加入 15 μL 超声处理过的磁珠悬液中，并在室温下孵育 15 min。加入 1 mL PBS，并在 4 °C条件下置于摇床（转速为 100 rpm）上孵育 60 min。孵育后加入 100 μL 甘氨酸缓冲液（终浓度 100 mM）以封闭磁珠上游离的反应基团。将混合物在室温下置于摇床上孵育 30 min。在 1,950×g 条件下将样品离心 3 min 后弃去上清，用 1 mL PBS-0.5% BSA 溶液洗涤样品，在 1,950×g 条件下将样品离心 3 min 后弃去上清，加入 1 mL PBS-0.5% BSA 溶液重悬 LVPs-乳胶磁珠样品。

随后对与乳胶磁珠结合的 LVPs 表面的 CXCR4 进行染色，p24 也用抗体标记以供参考。将 CXCR4-APC 抗体添加到 LVPs-乳胶磁珠溶液中，并在 4 °C下孵育 2 h。然后将样品在 4 °C条件下以 1,950×g 离心 5 min 后弃去上清，加入 1 mL PBS-0.5% BSA 溶液重悬慢病毒。该过程重复三遍。洗涤后，加入 300 μL PBS-0.5% BSA 重悬慢病毒样品。然后将重悬样品直接注入流式细胞仪以检测荧光强度，激发通道选择 640 nm，滤光片选择 660/20 BP。

3. 慢病毒颗粒的预富集：

以 HBS-EP+为 BiacoreT200 系统的运行缓冲液。将配体 LVPs 储备液用不同 pH 值 (4.0~5.5) 的 10 mM 醋酸钠缓冲液稀释至终浓度约为 20~100 μg/mL。选择“Immobilization pH Scouting”程序，设置流速 10 μL/min，进样时间 60 秒，用 50 mM NaOH 溶液再生 60 秒。根据响应情况确定最佳偶联条件，包括缓冲液 pH 值和配体终浓度。

4. 慢病毒颗粒的偶联：

采用氨基偶联法将配体偶联在 CM5 芯片表面。根据预富集得到的最佳偶联条件配制配体样品。选择“Immobilization”程序，使用氨基偶联试剂盒，将 LVPs 用 10 mM 乙酸钠 (pH=4.0, 500 μg/mL) 稀释，然后通过 EDC/NHS 交联反应偶联在芯片不同的信号通路 (Flow cell, FC) 上。对于亲和检测模块，FC1 用于偶联低表达 CXCR4 的 LVPs(CXCR4--LVPs), FC2 用于偶联高表达 CXCR4 的 LVPs(CXCR4+-LVPs)。对于配体筛选模块，活性芯片上的所有四个 FC 均偶联 CXCR4+-LVPs，参比芯片上的所有四个 FC 均偶联 CXCR4--LVPs。

三、芯片性能的考察

1. 活性的测定：

引用格式：王冬尧，曹岩，柴逸峰，洪战英，陈啸飞，吕狄亚，张颖，王晓飞.(2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011.

How to cite: Wang, D. Y., Can, Y., Chai, Y. F., Hong, Z. Y., Chen, X. F., Lu, D. Y., Zhang, Y. and Wang, X. F. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Lentiviral Particles immobilized Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. (in Chinese)

将 CXCR4, MAPK14 和 STAT3 抗体溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别以 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速注入亲和检测模块中检测响应信号值。结合时间为 60 s。每次检测后，向 SPR 系统内注入浓度为 10 mM 的甘氨酸溶液 (pH = 1.5)，除去 CM5 芯片上残留的抗体，使芯片再生。将不同浓度 (5、10 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 CXCR4 抗体溶液分别注入到亲和检测模块中检测其响应信号。结合时间为 60 s。由低浓度到高浓度依次进样，观察其响应值以判断芯片上的 CXCR4-LVPs 是否具有活性。

2. 特异性的测定：

将化合物标准品 AMD3100 用 5% DMSO PBS 稀释成一系列浓度梯度。以 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速注入分析样品。结合和解离时间均设定为 120 s。使用 Biacore T200 系统配套的分析软件 Biacore T200 evaluation software 对亲和力分析数据进行处理，计算化合物与 CXCR4 蛋白间的亲和力，所采用的模型为 1:1 稳态亲和力模型 (1:1 steady-state affinity model)，观察其响应值以判断芯片上的 CXCR4-LVPs 是否具有特异性。

四、配体筛选模块的适用性与稳健性

1. 样品回收

采用 Biacore T200 系统的“Inject and recover”程序回收结合成分。根据初筛响应情况调整各参数，结合时间 180 s，流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，结合成分洗脱液 (Recovery solution) 默认为 0.5% TFA (三氟乙酸)，孵育时间 (Incubation time) 为 20 s。结合成分溶解液 (Deposition solution) 为 50 mM NH₄HCO₃，溶解液体积 (Deposition solution volume) 为 10 μL ，重复次数 (Number of repetitions) 为 5，循环回收 10 次，合并回收液。

2. 适用性验证：

将 20 μM AMD3100 标准品溶液、20 μM 吉非替尼标准品溶液和 20 μM static 标准品溶液分别注入 SPR 系统，在活性芯片和参比芯片上分别回收 10 个循环。回收的样品用氮气吹干并加入 100 μL 甲醇复溶。将样品在 5,000×g 条件下离心 3 min，取上清液注入 UPLC-QTOF-MS 系统进行分析。化合物标准品也同样用 UPLC-QTOF-MS 系统进行分析。

3. 稳健性验证：

将 AMD3100 (20 μM)、吉非替尼 (20 μM) 和中药桂皮提取液 (100 ng/mL, 生药浓度) 混合，然后注入 SPR 系统，分别在活性芯片和参比芯片上将样品回收 10 个循环。回收的样品用氮气吹干并用 100 μL 甲醇复溶。将样品在 5,000×g 条件下离心 3 min，取上清液注入 UPLC-QTOF-MS 系统进行分析。

五、中药的筛选和鉴定

1. 样品回收：

引用格式：王冬尧，曹岩，柴逸峰，洪战英，陈啸飞，吕狄亚，张颖，王晓飞. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011.

How to cite: Wang, D. Y., Can, Y., Chai, Y. F., Hong, Z. Y., Chen, X. F., Lu, D. Y., Zhang, Y. and Wang, X. F. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Lentiviral Particles immobilized Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. (in Chinese)

采用 Biacore T200 系统的“Inject and recover”程序回收中药提取液中的结合成分。将每种中药提取液与吉非替尼（作为内标，终浓度为 $20 \mu\text{M}$ ）混合，随后在活性芯片和参比芯片上分别回收 10 个循环，按照中药种类合并回收液。回收的样品用氮气吹干并加入 $100 \mu\text{L}$ 甲醇复溶。然后将样品以 $5,000 \times g$ 离心 3 min，然后用 UPLC-QTOF-MS 系统进行分析。

2. 回收成分鉴定：

将中药提取液用甲醇稀释后，采用相同的 UPLC-QTOF-MS 系统进行分析，鉴定其中的化学成分。从中医综合数据库(TCMID) (<http://www.megabionet.org/tcmid/>) 和草药数据库(HERB) (<http://herb.ac.an/>) 中检索被筛选的中药，收集该中药包含的所有已知中药单体的化学信息，分别自建中药成分数据库。对中药回收液和中药提取液的总离子流图谱进行分子式检索，得到一系列化学分子式。从自建数据库中检索与这些分子式对应的中药单体的化学信息。比较候选化合物在活性芯片和参比芯片上回收的量，选择在两个芯片上的回收量有显著差异的化合物为中药提取液中能与 CXCR4 蛋白结合的潜在活性成分。获取该中药单体成分的对照品，按照相同的色谱-质谱条件，对中药单体对照品进行分析，将对照品总离子流图谱与中药回收溶液和中药提取液进行比对，保留时间和离子的质荷比均一致的成分可视为筛选出的目标化合物。

实验注意要点

- 慢病毒的包装：应同时设计对照组与干扰组，或对照组与过表达组，可采用蛋白质免疫印迹法、流式细胞术等多种方法充分考察干扰后或过表达后蛋白的表达情况。
- 慢病毒纯化：转染三质粒系统后，应充分离心并使用微孔滤膜去除细胞碎片，使用足量的 PEG-8000 以纯化慢病毒。LVPs 使用前应再次离心并充分重悬，以减少对芯片偶联的影响。
- 配体筛选中对照的选择：由于 LVPs 成分复杂，利用活性芯片与参比芯片间的回收含量差异进行配体筛选，在筛选过程中加入阳性或阴性对照，可以有效监测配体筛选的有效性，获得更准确的回收结论。

结果与数据分析

一、分析系统构建

本研究建立了基于 SPR 的膜蛋白靶向活性成分筛选系统，该系统的基本原理是将表达 CXCR4 的 LVPs 直接偶联在 SPR 芯片的表面，无需将 CXCR4 蛋白纯化即可实现在 SPR 芯片上的偶联。为了排除 LVPs 表面其他蛋白的干扰，需在 SPR 芯片上使用两种通道，一种是活性通道，另一种是参比通道。活性通道用于偶

引用格式：王冬尧，曹岩，柴逸峰，洪战英，陈啸飞，吕狄亚，张颖，王晓飞. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011.

How to cite: Wang, D. Y., Can, Y., Chai, Y. F., Hong, Z. Y., Chen, X. F., Lu, D. Y., Zhang, Y. and Wang, X. F. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Lentiviral Particles immobilized Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. (in Chinese)

联高表达 CXCR4 的 LVPs (CXCR4⁺-LVPs)，而参比通道用于偶联低表达 CXCR4 的 LVPs (CXCR4⁻-LVPs) (图 1A)。整个系统由亲和检测模块和配体筛选模块组成。亲和力检测模块可以测定 CXCR4 蛋白与化合物间的亲和力。在检测过程中，从活性通道的信号中减去参比通道的信号，即可获得化合物作用于 CXCR4 蛋白的信号，将其他蛋白质的影响排除 (图 1B)。配体筛选模块包括 2 块芯片，一块是活性芯片 (Activity chip)，在其 4 个通道上均偶联 CXCR4⁺-LVPs，另一块是参比芯片 (Reference chip)，在其 4 个通道上均偶联 CXCR4⁻-LVPs (图 1C)。在这两个芯片上分别以相同的循环数回收中药提取物，然后对回收样品进行色谱-质谱分析。通过色谱图的比较，以在两块芯片上回收的量有显著差异的化学成分为鉴定到的活性成分，并进行进一步的验证实验。

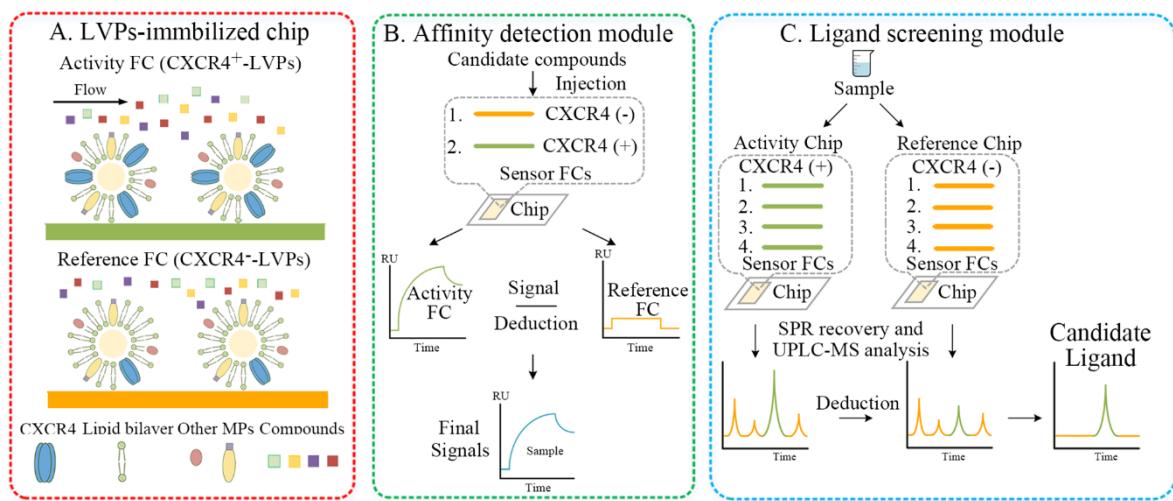


图 1 基于慢病毒偶联 SPR 的膜蛋白靶向活性成分筛选系统示意图。A. 表达 CXCR4 蛋白的 LVPs 偶联至 SPR 芯片；B. 亲和检测模块，可以检测化合物与 CXCR4 的亲和力；C. 配体筛选模块，能筛选出候选化合物并排除假阳性结果。

二、慢病毒颗粒的包装与表征

1. 慢病毒颗粒的包装：

将 shRNA 质粒及空载体分别转染到 293T 细胞中 24 h，然后裂解细胞并提取蛋白质，进行蛋白质印迹实验。蛋白质印迹实验结果如图 2A 所示。结果表明，设计的 shRNA 质粒能有效抑制 293T 细胞的 CXCR4 表达水平，而载体本身对 CXCR4 的表达没有影响。转染三质粒系统后每隔 24 h 在荧光显微镜下观测细胞的荧光强度。结果表明，荧光强度随时间的增加而增加 (图 2B)，这表明设计的 shRNA 质粒对 CXCR4 表达的抑制作用，且 LVPs 在两组 293T 细胞中成功包装。

2. 慢病毒颗粒表面受体表征：

通过蛋白质印迹实验表征 LVPs 的 CXCR4 表达水平，CXCR4⁻-LVPs 上的 CXCR4 表达量要显著低于

引用格式：王冬尧，曹岩，柴逸峰，洪战英，陈啸飞，吕狄亚，张颖，王晓飞. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. 9

How to cite: Wang, D. Y., Can, Y., Chai, Y. F., Hong, Z. Y., Chen, X. F., Lu, D. Y., Zhang, Y. and Wang, X. F. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Lentiviral Particles immobilized Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. (in Chinese)

CXCR4⁺-LVPs 上的 CXCR4 表达量 (图 2C)。进一步，使用 p24 衣壳蛋白作为内参蛋白。流式细胞结果显示，p24 在 CXCR4⁺-LVPs 和 CXCR4-LVPs 上的表达处于相同水平，而 CXCR4⁺-LVPs 上 CXCR4 的表达量比 CXCR4-LVPs 上的 CXCR4 表达量高 (图 2D)。这些实验证明已成功构建了 CXCR4 差异表达 LVPs，可将该 LVPs 偶联于 SPR 芯片构建筛选系统。

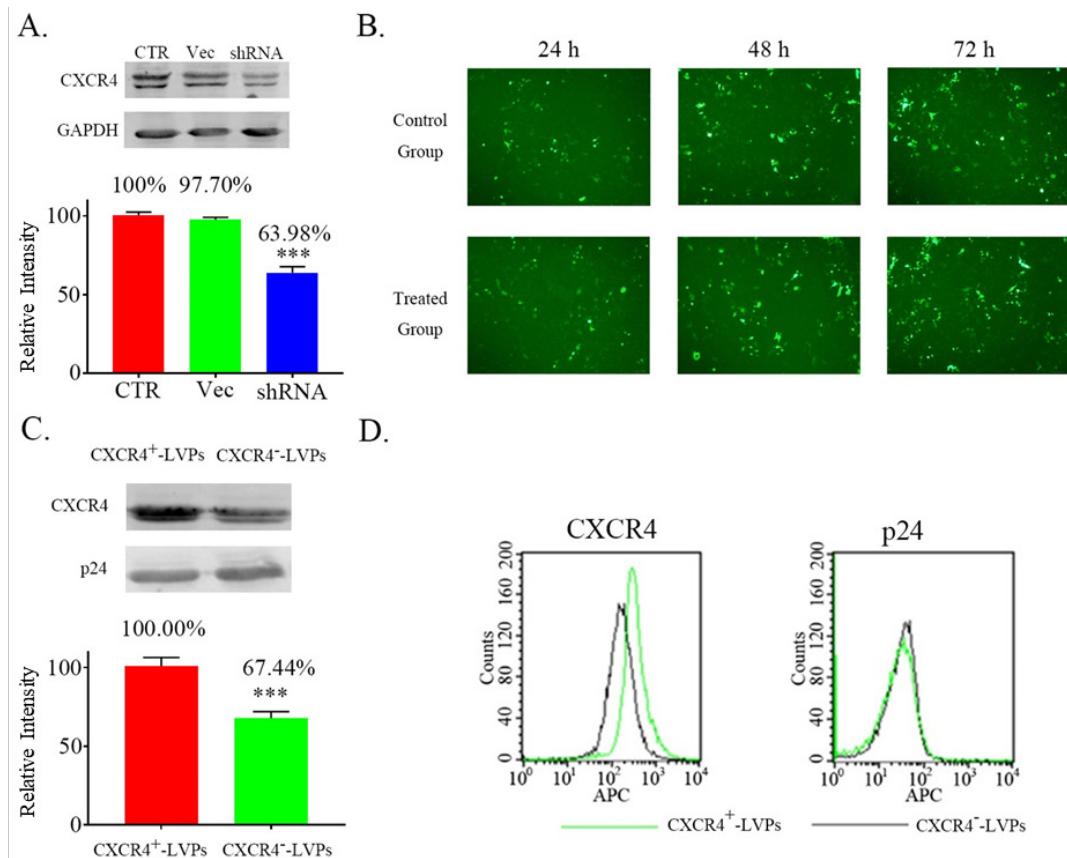


图 2 CXCR4 蛋白表征结果。 A. 293T 细胞的蛋白质印迹实验检测结果 (**p<0.001, 干扰组与正常组和转染空载体组比较); B. 转染三质粒系统 24、48 和 72 h 后荧光显微镜下观察到的细胞荧光强度; C. CXCR4⁺-LVPs 和 CXCR4—LVPs 的蛋白质印迹实验检测结果 (**p<0.001, CXCR4⁺-LVPs 与 CXCR4-LVPs 比较); D. CXCR4⁺-LVPs 和 CXCR4-LVPs 的流式细胞术检测结果。

三、LVPs 的偶联与 CXCR4-LVPs 的 SPR 表征

1. LVPs 的预富集:

为了提高 LVPs 的偶联量，考察了 LVPs 偶联的最佳条件。首先，研究缓冲液 pH 值对 LVPs 偶联的影响。检测了在不同 pH 值的缓冲液 (4.0、4.5、5.0 和 5.5) 条件下，LVPs 悬液在 CM5 芯片上的物理吸附响应信号。结果显示，当缓冲液的 pH 值为 4.0 时，LVPs 悬液在 CM5 芯片上有最高的物理吸附响应

信号（图 3A）。然后在缓冲液 pH 值为 4.0 的条件下，测试四种不同浓度的 LVPs（200、300、400 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LVPs 的总蛋白浓度）在 CM5 芯片上的物理吸附响应信号。结果表明，当浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，LVPs 在 CM5 上吸附的响应值最高（图 3B）。根据上述结果，将 pH 4.0 缓冲液和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LVPs 浓度确定为最佳偶联条件。

2. 芯片特异性和活性的测定（采用抗体）：

为了表征 LVPs 偶联芯片的活性，首先检测了 CXCR4、MAPK14 和 STAT3 抗体在偶联 LVPs 的芯片上的响应信号值（图 3C）。结果表明只有 CXCR4 抗体才能在芯片上产生响应信号，另两种抗体在芯片上的响应信号接近于 0。然后，检测了不同浓度（5、10 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的 CXCR4 抗体在偶联 LVPs 的芯片上的响应信号。每次检测后向 SPR 系统中注入 10 mM 甘氨酸（ $\text{pH}=1.5$ ），以去除 CM5 芯片上残留的抗体，使芯片再生。结果表明，CXCR4 抗体的响应信号随抗体浓度的上升而上升（图 3D）。这些结果证实了 LVPs 偶联芯片具有良好的活性和特异性，亲和力检测模块能够用于 CXCR4 小分子配体的筛选与亲和力分析。

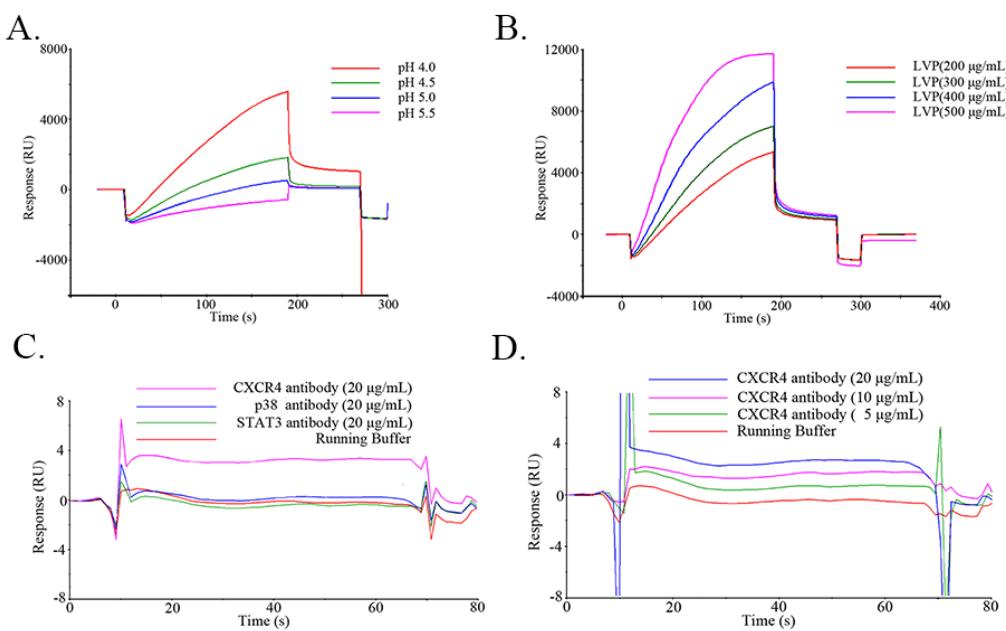


图 3 LVPs 的偶联与 CXCR4-LVPs 的 SPR 表征。 A. 缓冲液 pH 值对 LVPs 偶联的影响；B. LVPs 浓度对 LVPs 偶联的影响；C. 相同浓度（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）不同抗体（CXCR4、MAPK14 和 STAT3）在亲和检测模块上的响应信号；D. 不同浓度（5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的 CXCR4 抗体在亲和力检测模块上的响应信号。

3. 芯片活性的测定（采用小分子化合物）：

由于待筛选的中药混合液主要为小分子化合物体系，因此进一步测试阳性小分子化合物与 CXCR4 蛋

引用格式：王冬尧，曹岩，柴逸峰，洪战英，陈啸飞，吕狄亚，张颖，王晓飞. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011.

How to cite: Wang, D. Y., Can, Y., Chai, Y. F., Hong, Z. Y., Chen, X. F., Lu, D. Y., Zhang, Y. and Wang, X. F. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Lentiviral Particles immobilized Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. (in Chinese)

白间的亲和力，验证检测模块和筛选模块是否能用于检测 CXCR4 小分子配体。选择 CXCR4 拮抗剂 AMD3100 作为阳性小分子考察基于 SPR 的膜蛋白靶向活性成分筛选系统的性能，测得不同浓度下的响应值如图 4A 所示，AMD3100 的 K_D 为 32.48 ± 3.17 nM 如图 4B 所示，均与文献报道结果一致。结果表明，AMD3100 与 CXCR4 具有良好的亲和力，证明了使用该 SPR 系统表征化合物与 CXCR4 蛋白间相互作用的可行性。

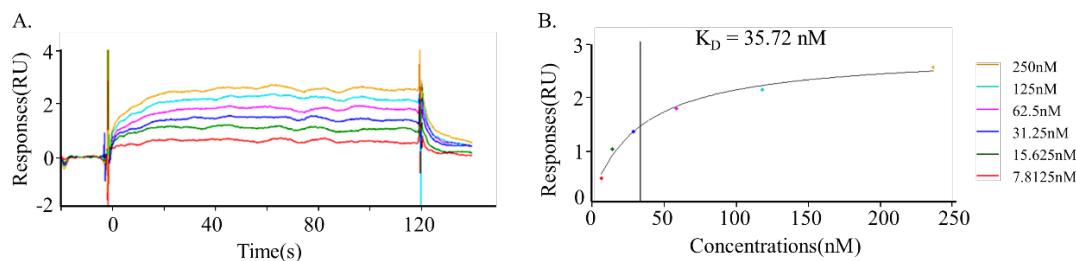


图 4 AMD3100 和 CXCR4 之间的亲和力测试结果。A. 不同浓度下的响应值；B. AMD3100 的 K_D 为 32.48 ± 3.17 nM。

四、配体筛选模块的适用性和稳健性验证

1. 适用性验证：

在活性芯片和参比芯片上分别回收三种化合物（AMD3100、吉非替尼和 static），将回收样品处理后与化合物标准品均用 UPLC-QTOF-MS 进行分析。AMD3100、吉非替尼和 static 的色谱分析结果见图 5。AMD3100 标准品的 R_t 为 10.268 min，母离子的 m/z 值为 503.4541，在活性芯片和参比芯片上的回收的量存在显著性差异（图 5A），证明该系统可以回收并鉴别能与 CXCR4 结合的化合物。吉非替尼标准品的 R_t 为 5.063 min，母离子的 m/z 值为 447.1596，在活性芯片和参比芯片上回收的量没有显著性差异（图 5B）。吉非替尼可以代表非特异性成分，这些成分能与 LVPs 上除 CXCR4 以外的膜蛋白结合，但在两种芯片上的回收量没有差异。static 标准品的 R_t 为 7.265 min，母离子的 m/z 值为 212.0012，无法被系统回收和鉴别（图 5C），因此 static 可代表不能与 LVPs 结合的化合物，配体筛选模块可有效排除此类化合物，这类化合物在样品中的存在不会干扰活性化合物的鉴定。上述结果证明了配体筛选模块的适用性，可以通过配体筛选模块筛选能与 CXCR4 特异性结合的化学成分，并排除非特异性结合成分对筛选结果的干扰。

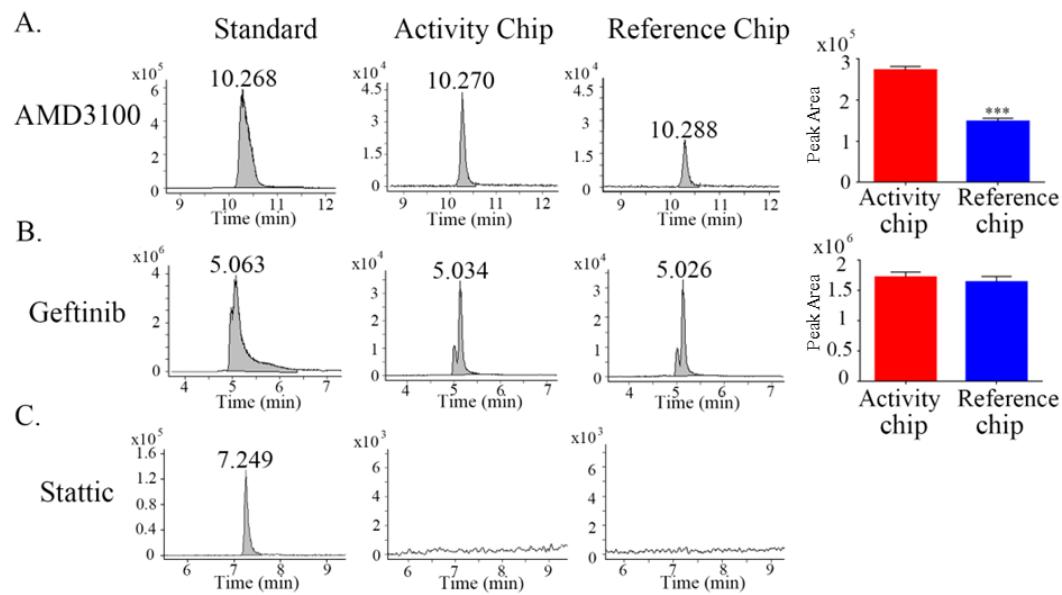


图 5 配体筛选模块的适用性考察结果。A. AMD3100; B. 吉非替尼; C. stattic。(** p<0.001, 活性芯片与参比芯片比较)

2. 稳健性验证:

将 AMD3100、吉非替尼和中药桂皮提取液混合，再将混合后的样品用配体筛选模块进行回收。然后通过 UPLC-QTOF-MS 分析回收的样品。活性芯片回收样品中 AMD3100 的峰面积为 169148.2 (Rt = 10.236 min, m/z = 503.4558)，参比芯片回收样品中 AMD3100 的峰面积为 169148.2 (Rt = 10.286 min, m/z = 503.4542)，AMD3100 在两块芯片上回收的量存在显著性差异（图 6A）。活性芯片回收样品中吉非替尼的峰面积为 23557.5 (Rt = 5.088 min, m/z = 447.1554)，参比芯片回收样品中吉非替尼的峰面积为 23557.5 (Rt = 5.087 min, m/z = 447.1612)，吉非替尼在两块芯片上回收的量没有差异（图 6B）。中药提取物中的非活性化合物不会干扰 AMD3100 的回收和鉴定。以上结果证实了配体筛选模块具有良好的稳健性，该模块能够用于从中药提取液中筛选小分子配体。由于在两块芯片上的回收的量大体相等，且不会干扰活性成分的回收和鉴别，因此吉非替尼可加入到中药提取液中作为内标一起回收，保证回收实验的有效性。

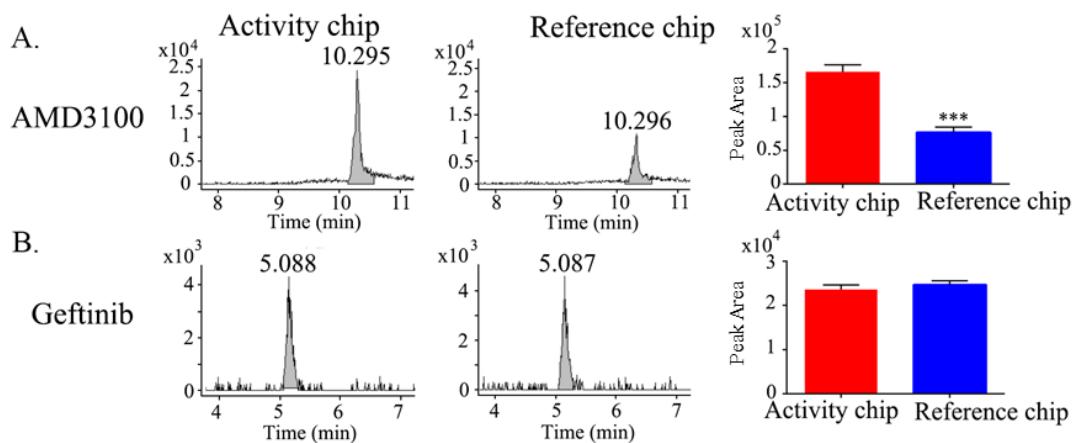


图 6 配体筛选模块的稳健性考察结果。A. AMD3100; B. 吉非替尼。(***)p<0.001, 活性芯片与参比芯片比较)

五、中药提取液回收及配体鉴定

完成方法学考察后，将配体筛选模块应用于从中药提取液中筛选 CXCR4 配体。选择三种文献报道具有 CXCR4 拮抗作用的中药进行回收，包括川芎 (Herba Chuanxiong) [10,11]，穿心莲 (Herba Andrographitis) [12] 和苦棟子 (Fructus Meliae) [13]。此外，将吉非替尼作为内标加入提取物中一起进行回收实验，用于校正参比芯片和活性芯片的响应值。通过色谱图的比较，在川芎提取液中鉴定出一个离子信号 ($R_t = 6.437$ min, $m/z = 247.0946 ([M+H]^+)$ (图 7A)，在活性芯片回收样品 ($R_t = 6.442$ min, $m/z = 247.0944 ([M+H]^+)$) (图 7B) 和参比芯片回收样品 ($R_t = 6.427$ min, $m/z = 247.0941 ([M+H]^+)$ (图 7C) 中也均能鉴定到该离子信号。该化合物的回收量在两块芯片上存在显著性的差异。两个芯片回收样品中的内标吉非替尼的峰面积基本一致，进一步说明了该化合物的差异 (表 1)。数据库中的记录表明该化合物可能是洋川芎内酯 I (Senkyunolide I)。随后，在相同的色谱条件下将洋川芎内酯 I 的标准品溶液注入 UPLC-QTOF-MS 中进行分析以验证筛选结果。洋川芎内酯 I 标准品的 R_t 为 6.429 min, m/z 为 247.0948 ($[M+H]^+$) (图 7D)，与鉴定的成分一致。因此，将洋川芎内酯 I 鉴定为能与 CXCR4 蛋白结合的活性化合物。

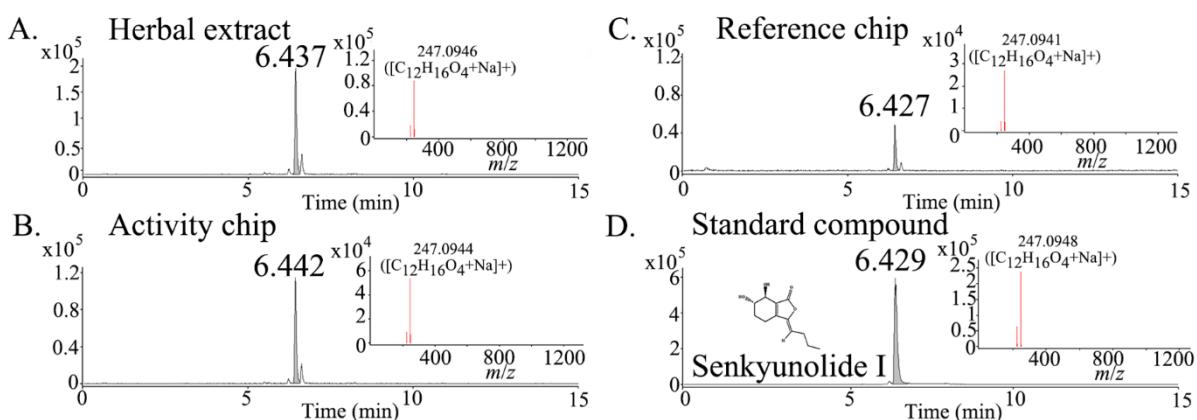


图 7 洋川芎内酯 I 的鉴定结果。A. 川芎中药提取液；B. 活性芯片回收样品；C. 参比芯片回收样品；D. 洋川芎内酯 I 标准品的 EIC 图。

表 1 洋川芎内酯 I 和吉非替尼在两块芯片回收样品中的色谱-质谱信息

序号	化合物名称	活性芯片回收样品			参比芯片回收样品		
		保留时间 (min)	离子质荷比 (m/z)	峰面积	保留时间 (min)	离子质荷比 (m/z)	峰面积
1	洋川芎内酯 I	6.442	247.0944	63405.87	6.447	247.0941	28418.47
2	吉非替尼	5.056	447.1589	14660.23	5.033	447.1592	14367.68

致谢

国家自然科学基金（81573396、81603067、82174092），上海市自然科学基金（21ZR1483000、22ZR1476900），上海市浦江人才计划（21PJD083）。

参考文献

- Lu, Y., Qin, S., Zhang, B., Dai, A., Cai, X., Ma, M., Gao, Z. G., Yang, D., Stevens, R. C., Jacobson, K. A., et al. (2019). Accelerating the Throughput of Affinity Mass Spectrometry-Based Ligand Screening toward a G Protein-Coupled Receptor. *Anal Chem.* 91(13): 8162–8169. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00477>
- Chen, X., Cao, Y., Zhang, H., Zhu, Z., Liu, M., Liu, H., Ding, X., Hong, Z., Li, W., Lv, D., et al. (2014). Comparative Normal/Failing Rat Myocardium Cell Membrane Chromatographic Analysis System for Screening Specific Components That Counteract Doxorubicin-Induced Heart Failure from *Aconitum carmichaeli*. *Anal Chem.* 86(10): 4748–4757. <https://doi.org/10.1021/ac500287e>
- Kermani, A. A. (2023). Applications of fluorescent protein tagging in structural studies of membrane proteins. *FEBS J.* 291(13): 2719–2732. <https://doi.org/10.1111/febs.16910>

引用格式：王冬尧，曹岩，柴逸峰，洪战英，陈啸飞，吕狄亚，张颖，王晓飞. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. 15

How to cite: Wang, D. Y., Can, Y., Chai, Y. F., Hong, Z. Y., Chen, X. F., Lu, D. Y., Zhang, Y. and Wang, X. F. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Lentiviral Particles immobilized Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011011. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011011. (in Chinese)

4. Zhang, F., Wang, S., Yin, L., Yang, Y., Guan, Y., Wang, W., Xu, H. and Tao, N. (2015). Quantification of Epidermal Growth Factor Receptor Expression Level and Binding Kinetics on Cell Surfaces by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Anal Chem.* 87(19): 9960–9965. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02572>
5. Stenlund, P., Babcock, G. J., Sodroski, J. and Myszka, D. G. (2003). Capture and reconstitution of G protein-coupled receptors on a biosensor surface. *Anal Biochem.* 316(2): 243–250. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(03\)00046-0](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(03)00046-0)
6. Navratilova, I., Besnard, J. and Hopkins, A. L. (2011). Screening for GPCR Ligands Using Surface Plasmon Resonance. *ACS Med Chem Lett.* 2(7): 549–554. <https://doi.org/10.1021/ml2000017>
7. Chadli, M., Rebaud, S., Maniti, O., Tillier, B., Cortès, S. and Girard-Egrot, A. (2017). New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G-Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. *Langmuir.* 33(39): 10385–10401. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01636>
8. Cao, Y., Cao, Y., Shi, Y., Cai, Y., Chen, L., Wang, D., Liu, Y., Chen, X., Zhu, Z., Hong, Z., et al. (2021). Surface plasmon resonance biosensor combined with lentiviral particle stabilization strategy for rapid and specific screening of P-Glycoprotein ligands. *Anal Bioanal Chem.* 413(7): 2021–2031. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03170-5>
9. Chen, L., Lv, D., Wang, S., Wang, D., Chen, X., Liu, Y., Hong, Z., Zhu, Z., Cao, Y., Chai, Y., et al. (2020). Surface Plasmon Resonance-Based Membrane Protein-Targeted Active Ingredients Recognition Strategy: Construction and Implementation in Ligand Screening from Herbal Medicines. *Anal Chem.* 92(5): 3972–3980. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05479>
10. Tang, M., Yang, Y., Yu, J., Qiu, J., Chen, P., Wu, Y., Wang, Q., Xu, Z., Ge, J., Yu, K., et al. (2018). Tetramethylpyrazine in a Murine Alkali-Burn Model Blocks NFκB/NRF-1/CXCR4-Signaling-Induced Corneal Neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59(5): 2133. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23712>
11. Yu, N., Zhang, Z., Chen, P., Zhong, Y., Cai, X., Hu, H., Yang, Y., Zhang, J., Li, K., Ge, J., et al. (2015). Tetramethylpyrazine (TMP), an Active Ingredient of Chinese Herb Medicine Chuanxiong, Attenuates the Degeneration of Trabecular Meshwork through SDF-1/CXCR4 Axis. *PLoS One.* 10(8): e0133055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133055>
12. Feng, L., Wang, L., Ma, Y., Li, M. and Zhao, G. (2011). A Potential *In Vitro* and *In Vivo* anti-HIV Drug Screening System for Chinese Herbal Medicines. *Phytother Res.* 26(6): 899–907. <https://doi.org/10.1002/ptr.3658>
13. Shi, Y. L. and Li, M. F. (2007). Biological effects of toosendanin, a triterpenoid extracted from Chinese traditional medicine. *Prog Neurobiol.* 82(1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.002>