

编者按: 2012 年, 济宁医学院迎来了建校 60 华诞。为此, 本刊自第 1 期开辟“杰出校友学术论坛”专栏, 特邀有突出贡献的校友撰文, 以展现他们博学至善, 求索进取, 在医学研究领域取得的骄人成绩和丰硕成果, 作为献给学校 60 周年庆典的礼物, 以飨读者。

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.03.001

· 杰出校友医学学术论坛 ·

G 蛋白偶联受体寡聚体的研究方法^{*}

陈 京 蔡 欣 白 波

(济宁医学院神经生物学研究所, 山东 济宁 272067)



陈京, 男, 1978 级校友。1997 年 10 月至 2001 年 1 月就读于英国华威大学 (University of Warwick) 生物系分子医学研究中心, 获得博士学位; 毕业后在英国华威大学生物系分子医学研究中心做博士后、研究员; 2006 年 1 月至今在英国华威大学医学院做研究员、高级研究员、博士生导师, 指导研究生 10 余名。是美国内分泌学会会员、英国内分泌学会会员和欧洲内分泌学会会员。任 Endocrinology, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Molecular endocrinology, Journal of Endocrinology, British Journal of Pharmacology, BBA, Molecular Cell Research 特邀审稿人。2008 年 2 月起, 被聘为济宁医学院基础部生理学研究室教授, 2009 年 2 月起被聘为济宁医学院神经生物学研究所所长, 2009 年 11 月起, 被授予“泰山学者海外特聘专家”称号。主要研究方向: 1) G-蛋白偶联受体 (CRH, Orexin, Apelin, Adiponectin 及 Opioid receptor) 的信号转导通路及其调控机制。近年来, 应用生物发光及荧光共振能量转移新技术开展了对 G-蛋白偶联受体间相互作用的研究; 2) 开展了能量平衡、肥胖和代谢综合征的分子生物学及医学机制的研究; 3) 心脏内分泌和生殖内分泌的研究。在 Diabetes, Diabetes Care, Diabetologia, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Molecular endocrinology, Cardiovascular Research, Biochem J 等国际著名杂志上发表 SCI 论文 40 余篇, 被 SCI 论文引用 740 多次。并且, 9 次在美国内分泌年会 (ENDO)、欧洲内分泌年会 (ECE) 英国内分泌年会 (BES) 及国际内分泌年会 (ICE) 等国际学术会议上做了发言。

摘 要 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptors, GPCRs) 能以同源或异源二聚体, 甚至是高阶寡聚体的形式存在, 这些形式有不同于单体的特异功能特征, 例如生物合成、配体连接、脱敏、内化和降解, 因此成为备受关注的药物设计靶点。而对 GPCRs 这些寡聚体形式进行药物设计首要的任务是要确定这些受体之间能否形成寡聚体。因此, 本文将全面介绍用于研究 GPCRs 寡聚化的生物化学和生物物理方法。

关键词 G-蛋白偶联受体寡聚体; 全内反射荧光显微镜; 荧光漂白恢复技术; 共振能量转移; 交联

中图分类号: Q26. Q27 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)06-154-09

^{*} [基金项目] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30971081; No. 30870932; No. 81070961); 山东省自然科学基金资助项目 (No. ZR2011CM027; No. ZR2009DZ004); 山东省泰山学者建设工程专项经费

Methods of G protein-coupled receptor oligomers^{*}

CHEN Jing, CAI Xin, BAI Bo

(Neurobiology Institute, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: G-protein-coupled receptors (GPCRs) can exist as homo- or hetero-dimers or even high-order oligomers, which exhibit “specific” functional properties distinct from monomeric receptors, involving agonist recognition, signaling, trafficking, and so on. GPCR oligomers open a completely new field in the search for novel drug targets useful to combat a variety of diseases with potentially fewer side effects. But the top priority is the determination that oligomerization takes place between particular receptors. This review aims at presenting biochemical and biophysical methods for GPCR oligomers.

Key words: GPCR oligomers; Total internal reflection fluorescence; Fluorescence recovery after photobleaching; Resonance energy transfer; Cross-linking studies

G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptors, GPCRs) 是与 G 蛋白偶联的最大膜受体家族, 与不同配体如激素和多肽结合后活化, 通过不同的信号途径产生不同的生物学效应, 是目前药物研发中最广泛的药物靶点, 以 GPCR 为靶点的药物在疼痛、高血压和哮喘等各类疾病的治疗中具有良好的作用^[1]。

最近大量实验证实: GPCR 普遍存在寡聚体 (包括同源和异源二聚体), 并且受体二聚化后具有与原受体不同的生化特征, 例如, 两个原受体间的别构调节、配体识别、G 蛋白偶联以及运输等方面均发生变化^[2]。GPCR 除了形成二聚体外, 还能形成高阶多聚体, 不仅为药物开发提供了新的靶点, 而且还提高了药物的特异性, 从而降低了药物的副作用。因此, 控制寡聚体的聚集和解离是一种非常强大的药理学工具, 而要控制寡聚体的聚集和解离的首要条件是确定特定受体之间能够发生寡聚化。开发以检测和分析 GPCRs 寡聚体为目标的新技术和新方法具有重要意义, 将有力促进 GPCRs 的深入研究。本文将全面介绍用于研究 GPCRs 寡聚化的生物化学和生物物理方法, 这些方法不仅能研究 GPCRs 寡聚化, 还可以用于研究 GPCRs 在细胞内信号转导网络, 为探究疾病的发病机制和开发新的药物靶点提供了广阔的前景。

1 生物物理技术

1.1 SNAP-tag 和 CLIP-tag 技术

蛋白质标记 SNAP-tag 最新技术可以在活细胞及固定细胞中研究蛋白质的功能和定位, 还可以对哺乳动物细胞体内蛋白质进行成像以及体外捕获蛋白质, 为研究蛋白质提供了强有力的工具。

SNAP-tag 来自人烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶, 该酶是一种 DNA 修复蛋白, 它的底物是一类苄基嘌呤和嘧啶的衍生物, 包括苄基鸟嘌呤。标记反应时, 底物的苄基部分被替换, 与 SNAP-tag 形成共价键^[3]。CLIP-tag 是由 SNAP-tag 衍生而来, 经过基因改造, 使其不与苄基鸟嘌呤衍生物结合, 而与苄基胞嘧啶衍生物结合。二者通过各自的荧光标记配体来进行成像, 这些荧光标记配体都是小分子化合物, 它们容易进入细胞, 且对细胞没有毒害, 同时, 带有各种荧光基团的配体非常适用于细胞成像。此外, 两种标签还具有许多相似特性, 可以在融合蛋白比较方面进行应用。不仅如此, 化学标记方法可以用于对那些组织内无法采用自身荧光表达的蛋白质进行直观研究, 并且也适用于那些在显像观察后再采取其它生化特性鉴定的实验。

SNAP-tag 和 CLIP-tag 与目前存在的蛋白标记方法相比, 在对活细胞内的多蛋白研究方面具有明显优势。两种标签都可对任何一种细胞环境内的蛋白质进行标记, 并且对于其相应底物具有高度特异性, 而与其它苯甲基鸟嘌呤或苯甲基胞嘧啶衍生物只有很弱的反应性^[4]。将 SNAP-tag 和 CLIP-tag 联合使用, 可以对活细胞内由不同分子探针标记的蛋白进行同时标记, 从而对活细胞内的细胞功能进行多参数可视化监测。

1.2 以荧光或发光为基础的技术

1.2.1 荧光共振能量转移 荧光共振能量转移 (fluorescent resonance energy transfer, FRET) 技术采用非放射方法, 在供体和受体相互靠得很近 (1~10nm) 时, 将光子能从一激发的荧光团 (供体) 转移到另一个荧光团 (受体)。受激发后的荧光团 (供体) 将受激发的能量转移到一个光吸收分子 (受

体)。这种能的转移是非放射性的,其主要原因是供体和受体之间的偶极-偶极间的相互作用。通过双偶极反应,一个处于激发态的供体以非激发方式将能量传递给旁边的受体。这一理论基于将被激发荧光分子看成振荡偶极子,能够和有同一振荡频率的另一个偶极子发生能量交换^[5]。除了其他必要条件(如偶极子定向、足够的荧光寿命),供体放射光谱必须将受体的激发光谱重叠起来,因此,只有几个荧光团对适合 FRET 实验,已知的 FRET

对是 CFP/YFP、CFP/GFP、GFP/ 罗丹明、FITC/Cy3。采用 FRET,可以解决超过光学镜分辨率限制的分子相对邻近度问题,来显示两个蛋白质间分子相互作用以及一个分子内部(如酶活动能力、DNA\RNA 形态)的结构变化。FRET 具有明显的优势在于在通常情况下,蛋白质复合体处于动态平衡状态的,FRET 能够实时检测复合体的形成和分解。Juan F 等^[6]通过 FRET 证实出 $\alpha 1b$ 肾上腺素受体能够以高阶寡聚体的形式存在。

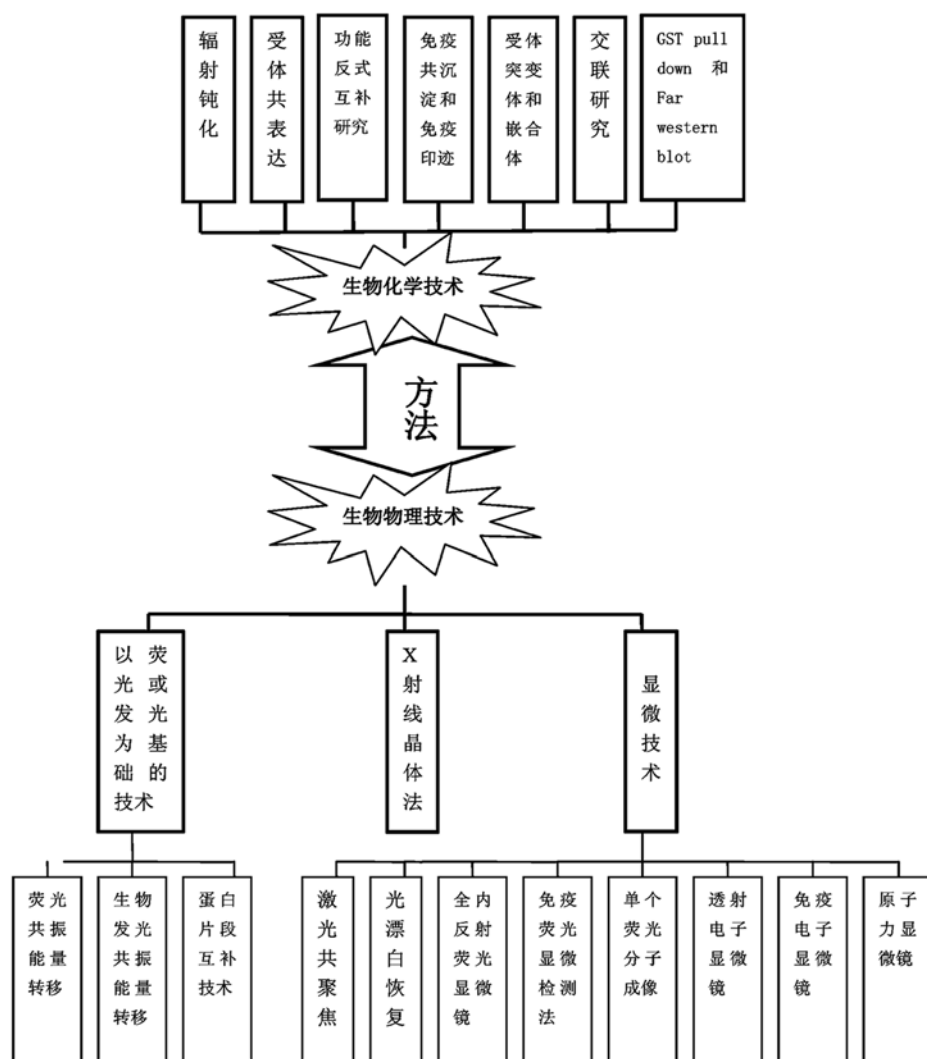


图1 G蛋白偶联受体寡聚体的研究方法

简单的 FRET 是用受体/供体发射比与只表达受体或供体的样品进行比较^[7]。在有受体和无受体的情况下,检测供体荧光的降低、对供体密度成像以及计算效率:

$$E = 1 - (FDA/FD)$$

FDA:在有受体的情况下,供体荧光密度;FD:在没有受体的情况下,供体荧光密度。供体荧光密度需要在供体通道中矫正受体的发射和光漂白供体的数量。另外,无论有没有受体存在,供体的浓度应该是相同的。还可以利用敏化放射法来获得

FRET 图像,敏化放射公式如下:

$$\text{FRET} = \text{RawFRET} - (A \times \text{Acceptor}) - (B \times \text{Donor})$$

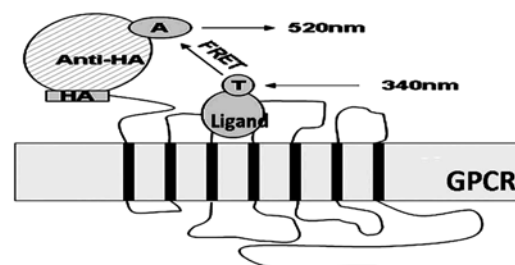
要获得 FRET 图像,首先要先确定系数 A 和系数 B,系数 A 主要指的是受体对 FRET 信号的干扰,系数 B 主要指的是供体对 FRET 信号的干扰^[8]。在敏化放射 FRET 中,激发光通过物镜照射到样品上,样品发射出的光再通过物镜聚焦于检测器上,在物镜与检测器之间还有一个过滤器,能够滤掉剩余的激发光,从而降低信噪比。除此之外,敏化放射 FRET 具有很高的时间分辨率,因此动态监测能力较强,但是轴向分辨能力差,为了克服这一缺陷,现在很多研究人员将 FRET 与全内反射荧光显微镜(详情见下)结合起来动态研究蛋白质之间的相互作用。

在 FRET 的基础上又延伸出另外 3 种方法——光漂白 FRET (Photobleaching FRET, Pb-FRET)、时间分辨 FRET (Time-resolved FRET, TR-FRET) 和均相时间分辨荧光 (Homogeneous Time Resolved Fluorescence, HTRF) 技术。Pb-FRET 的主要原理为当一种荧光长时间受到激发光照射时,会导致该荧光发生不可逆地光化学破坏。因此,当光漂白供体时,供体荧光密度会降低,导致受体的荧光密度也随之降低,那么 FRET 信号将会降低甚至消失。另外,如果光漂白受体的话,受体荧光密度会降低,但供体荧光密度却升高, FRET 信号将会降低甚至消失^[8]。该方法可以反向证实蛋白质之间的相互作用,但缺点是由于荧光受到破坏,所以样本只能使用一次,另外,该方法耗时长,需要固定细胞样本。

TR-FRET 主要是运用到镧系元素独一无二的性质,即能够发出强度较高、寿命较长的光,因而能够检测长时间的发射光。这种特性有效地消除了寿命短的荧光发射背景,提高检测范围,将激发和检测过程分开,从而降低背景荧光和提高信噪比^[9]。其主要原理为一种蛋白在 N-末端标记 HA 抗原,单克隆的抗 HA 抗体(与 Alexa Fluor 488 结合)作为能量的受体,而另一种蛋白用铽螯合物标记后作为荧光供体。在抗 HA 抗体存在的情况下,如果两种蛋白相互接近后就能检测到 FRET 信号(图 4)。以 TR-FRET 为基础的方法是一种非放射性快速检测受体二聚化的方法,在检测配体与 GPCR 的结合力方面,也具有较高的灵敏性,因此,TR-FRET 被广泛应用于高通量的药物筛选。

HTRF 技术是对 TR-FRET 技术的进一步改

良,该技术是利用了具有穴状结构的 Eu 元素标记物作为供体和 AlexaFluor 647 或 XL665 作为一个受体,是基于 Eu 穴状化合物的供体与受体(第二荧光标记物)之间 FRET。在荧光共振能量转移中,受体发射荧光的寿命等同与供体的发射荧光的寿命。因为 Eu 的荧光衰减周期较长,所以含 Eu 的供体会诱导 XL665 受体长时间地发射荧光,受体激发后产生的荧光便能持续较长时间,这样通过时间分辨就可以区分那些短寿命的自身散射的荧光,这样从短寿命荧光背景中就很容易区分出 FRET 信号^[10]。虽然 HTRF 也是基于 TR-FRET 的化学技术,但它的许多特点把它与 TR-FRET 区分开来,这些特点包括镧系元素与络合的穴相结合,这种结合的穴状物与 TR-FRET 使用的螯合物结构相比,显著增加了稳定性(可耐受低 pH 值、金属离子、DMSO、EDTA 等),穴状化合物的形成是将一个阳离子纳入到一个立体笼中。立体笼能收集光然后将能量转移到核心的镧系元素。大环的性质有利于跟镧系元素紧密相连,这种不可破的连接会形成异常稳固的复合体。穴结构能耐受一些特殊的实验条件如大量存在的阳离子(Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 等)、螯合物(EDTA)、溶剂或者温度。穴没有光漂白性,多次读数后信号没有损失,因此能按照需要的次数去读,所以可以进行动力学检测。而螯合物结构的稳定性还未达到这个水平。最近, Tb 复合物和 SNAP 标签引入了 HTRF 技术后使得 HTRF 的应用更加广泛,比如可以研究受体内存、二聚化,以及在完整的活细胞中进行无放射性的配体结合分析,2004 年 Pin 实验室就将 HTRF 应用于谷氨酸受体和 GABA 受体二聚化的研究中^[11]。



受体是一个 7 次跨膜蛋白并且其 N-末端被 HA 标记的融合蛋白已被表达出来。在 TR-FRET 连接测定法中,受体用铽标记,而抗-HA 抗体与 Alexa Fluor 488(A) 连接。标记的 apelin 与受体的连接能够使铽螯合物与 Alexa Fluor 488 相互靠近,从而将处于激活状态的铽螯合物的能量转移至受体 Alexa Fluor 488。通过 TECAN 可以检测到 Alexa 488 的发射光。

图 2 TR-FRET 原理示意图

1.2.2 生物发光共振能量转移 生物发光共振能量转移(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)技术是近十年来在 FRET 技术基础上发展起来的一种新的检测蛋白质-蛋白质相互作用的技术。该技术利用生物荧光素酶代替 FRET 中的荧光蛋白,加入底物后经酶催化产生荧光,通过酶反应作为激发受体的能量来源,这样避免了供体光漂白和细胞自发荧光的问题,导致高的信噪比^[12]。

BRET 主要有 4 种类型 BRET¹、BRET²、eBRET 和最新发展的 BRET³,BRET¹ 是最早开展的 BRET 实验,BRET¹ 使用海肾荧光素酶(Renilla luciferase, Rluc)作为能量供体,增强型黄色荧光蛋白(Enhanced yellow fluorescent protein, EYFP)作为能量受体,腔肠荧光素-h 作为荧光素酶的底物。然而,荧光素酶产生的光谱(发射峰 480nm)以及 EYFP(发射峰 530nm)的发射光谱是连续的,造成背景值较高,需要进行严格的空白对照实验。BRET² 优于 BRET¹ 之处是,用深蓝 C 作底物,从而将 Rluc 的最大发射光谱转移到 395 nm,相应的受体是绿色荧光蛋白。这两个受体激发光和发射光的最大值分别是 400 和 510nm。因此,供体和受体的发射峰分离更加明显,因此降低背景。但是底物被 Rluc 氧化后,深蓝 C 与腔肠素相比,量子产率低 100 倍,并且深蓝 C 容易迅速衰变,因此,BRET² 中需要更多的细胞才能达到足够高的光发射来用于检测,并且需要高敏感性的仪器。另外,BRET² 检测要求仪器具备样品注射装置,因为深蓝 C 的迅速衰变要求在短时间内进行加样并检测。eBRET 是基于使用一个荧光素酶底物前体 EnduRen,该底物可以在活细胞内被酯酶代谢成腔肠素 h,这样可以保证发光酶的底物持续存在数小时。所以 eBRET 优于 BRET¹ 和 BRET² 之处是能够连续几个小时实时检测某个特定的相互作用或者高通量筛选多个样品而不需要频繁加入底物。eBRET 唯一的缺点是必须在活细胞内进行检测,它不能用于检测细胞提取物或纯化的蛋白。BRET³ 打破了 BRET 成像的界限,而且设计了新型 BRET 策略,一个红色荧光蛋白突变体(mOrange)和一个海肾荧光素酶突变体(Rluc8)在光强度方面被数倍的改进,它允许可视化小的活体动物内的蛋白质-蛋白质相互作用。BRET³ 显示了改进的空间和时间分辨率,这种改进是为了测量单个细胞的胞内事件^[13]。本实验室运用 BRET 技

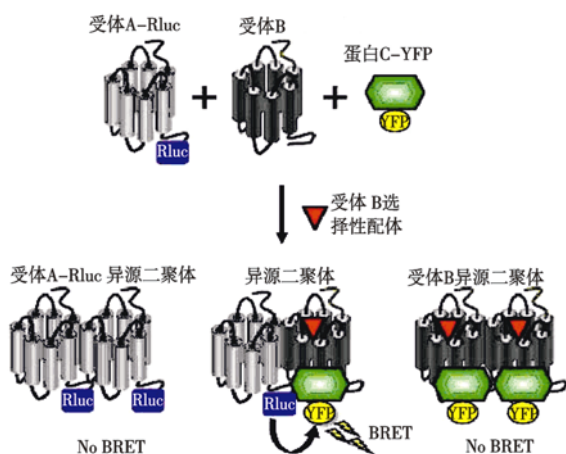
术对 Apelin 受体(APJ)和 κ 型阿片受体(KOR)异源二聚化进行研究,发现 APJ 和 KOR 可以形成异源二聚体^[14]。

1.2.3 分子荧光或发光互补技术 蛋白片段互补技术(Protein fragment complementation assays, PCAs)是以一个荧光蛋白(或发光蛋白)的两个非荧光(或非发光)片段之间的关联为基础的,两个非荧光(或非发光)片段被标记于两个不同的蛋白分子上(形成融合蛋白),如果两个蛋白之间存在相互作用,那么这两个非荧光(或非发光)片段会彼此靠近,形成一个有功能的荧光(或发光)复合体,融合蛋白之间的相互作用有助于荧光(或发光)蛋白片段的契合^[15]。该技术包括 BiFC 测定法和 BiLC 测定法。PCAs 已被用于实时检测不同细胞和组织上蛋白质之间的相互作用,如单色 BiFC 测定法已经被用来实时观测腺苷 A1 和 A2A 受体、组胺 H1 受体、多巴胺 D2 受体以及 $\alpha 1b$ 肾上腺素受体的同源二聚体^[16],还可以量化 GPCRs 信号转导过程,即 β -arrestin2 的聚集^[17]。这些方法与传统的方法相比,具有非放射性、更快速并且具有较高的灵敏性,因此这些测定法能够被简单地应用于高通量的药物筛选。

目前,在 PCA 的基础上又延伸出另外的技术,即互补供体-受体共振能量转移(complemented donor-acceptor resonance energy transfer, CODA-RET),这个技术除了能够定量探测非常混杂的 GPCR 的相互作用和构象变化,还能够应用于 GPCRs 寡聚体和 GPCR 效应物蛋白(例如 arrestins)之间的相互作用,也可用于研究其他类型混杂二聚受体(例如,受体酪氨酸激酶或细胞因子受体和他们的效应物蛋白)的信号转导。Eneko Urizar 等^[18]将 Rluc 分裂成两个非活化的 N-和 C-片段,这两个片段被分别融合到 D1 和 D2 受体, mVenus 融合到 G α 蛋白上,由于 GPCR 异源二聚化这两个片段互补从而形成了有功能的 Rluc,从而研究了 D1 和 D2 多巴胺受体二聚体的功能选择性,并证实出 D1-D2 二聚体之间的变构相互作用是造成功能选择性的原因。除此之外,还可以将 CODA-RET 拓展到 FRET 领域中。与 BRET 相比,FRET 的优点是它可以通过荧光显微镜技术直接观测信号复合体,因此它能够用来评估质膜下至各个受体复合体水平的功能不均一性。

1.2.4 GPCR 异源二聚体识别技术 GPCR 异源二聚体识别技术(GPCR heteromer identification

technology, GPCR-HIT) 是一种能够识别和剖析异源二聚体和相应配体特征的新方法, 该技术利用互补的报告基因进行标记, 包括 3 部分: 标记 (Rluc) 的 GPCRA、未标记的 GPCRB 和标记与 GPCRA 相互作用的蛋白 C (黄色荧光蛋白) (如 β -arrestin 或 G 蛋白)。在 GPCRB 选择性配体作用下, 与 GPCRA 形成异源二聚体, 使其和蛋白 C 偶联, 当 GPCRA 与蛋白 C 距离足够近时, 二者发生相互作用, 发出荧光信号, 该信号可以被 BRET 检测^[19]。利用 GPCR-HIT 检测 GPCR 异源二聚体的形成, 筛选新药物和评价的 GPCR 功能研究。由于这种信号只有当是异源二聚体而不是同源二聚体的时候才能被检测到, 因此这种测定法可以避免“干扰”, 因为当要鉴别异源二聚体或同源二聚体的时候, 这种“干扰”会成为一个关键点。



GPCR-HIT 将标记的 GPCRA, 未标记的 GPCRB 和标记的蛋白 C (例如 β -arrestin 或 G 蛋白) 进行共转染, 当一个配体选择性与 GPCRB 或 GPCRA-GPCRB 二聚体连接时, 标记的蛋白 C 能与 GPCRB 或该二聚体相互作用。GPCRA 上的发光蛋白和蛋白 C 上的发光蛋白是报告基因系统的互补成分, 这里用海肾荧光素酶 (Rluc) 和黄色荧光蛋白 (YFP) 进行 BRET 验证。

图 3 GPCR 异源二聚体识别技术的原理示意图

1.3 特定显微镜技术

动态分子间通过相互作用所形成的广泛网络控制着生物学过程。然而, 从时间、空间来对这一网络进行影像仍是一个非常大的挑战。然而一些显微技术的应用为此带来了新的曙光, 例如, 激光共聚焦、免疫荧光显微镜检测法、单个荧光分子成像、透射电子显微镜、免疫电子显微镜检测法和原子力显微镜等。

1.3.1 荧光漂白恢复技术 荧光漂白后的恢复技

术 (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 是将待测细胞用荧光物质标记, 借助高强度脉冲式激光照射细胞的某一区域, 可以造成该区域荧光分子的光淬灭; 通过低强度激光扫描成像, 可以探测到该区域周围的非淬灭荧光分子向受照射区域扩散的速率。由于光淬灭过程是不可逆的, 荧光恢复过程可明显地反映荧光标记物质及其结合物的运动^[20]。

最新研究显示, FRAP 可用来研究 GPCR 寡聚化。在这项技术中, 一个受体的胞外 N-末端携带 YFP, 另一个受体的胞内 C-末端携带 CFP。光漂白细胞膜的一个区域, 并且监测荧光恢复的时程指数。抗体与 YFP-标签的结合显著地降低了受体-YFP 的荧光恢复, 但是不会改变受体-CFP 的荧光恢复, 除非它们之间极为接近。这项技术可以提供有关 GPCR 寡聚体的原聚体间的相互作用的动力学信息。因此, 通过固定同伴受体, 检测在荧光恢复方面的适度的延迟或延迟缺乏, 可以相应的表明它们是瞬间作用, 还是稳定的作用。例如, Dorsch 等^[21]证实肾上腺素 β_1 和 β_2 受体即可形成瞬态二聚体, 亦可形成稳定的同源二聚体。

1.3.2 全内反射荧光显微镜 对于所有分子来说, 细胞膜是“跨栏”, 分子们必须先通过这些“跨栏”才能进出细胞。在细胞膜上或附近发生着许多生物学过程。但是这些过程通过传统的显微镜技术很难成像。然而, 全内反射荧光显微镜 (Total internal reflection fluorescence, TIRF) 能够分析细胞膜附近一些分子的定位情况和动力学过程。

TIRF 的主要原理为当一束光从光密介质进入光疏介质时, 根据斯涅尔定律一部分光会发生折射, 而一部分光会发生反射, 当入射角度不断增大, 折射角也会不断增大, 当折射角刚好达到 90° 时, 就发生了全反射现象。全反射发生后, 光波不是绝对在界面上被反射回第一介质, 由于光的波粒二相性, 其中一部分能量会进入折射率较小的介质, 沿着折射面传播, 这部分光我们称之为隐失波, 其能量在 Z 轴上呈现指数衰减。因此, 隐失波在照明样品时, 仅激发样本表面薄层范围内的荧光基团, 同时减弱来自胞内区域的荧光, 使显微成像在 Z 轴上的空间分辨率得到显著改善, 大大提高了图像的信噪比和对对比度^[22]。

TIRF 具有较高的轴向分辨率, 而 FRET 具有较高的时间分辨力, 因此, 目前很多研究人员将两种技术结合起来。最初的 TIRF-FRET 主要是依

赖于漂白受体荧光或敏化放射分子内 FRET,但是前者不利于长时间观测,后者虽然能够长时间观测,但是只能观察到单个分子构象的变化。

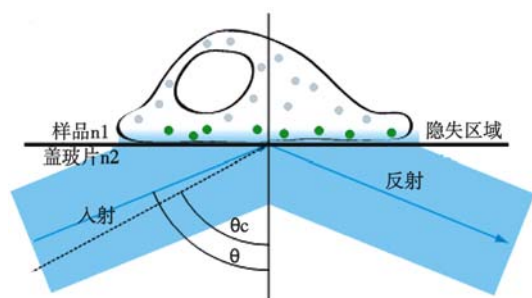


图4 全内反射荧光显微镜原理示意图

1.4 X射线晶体学

X射线晶体学是一门利用X射线来研究晶体中原子排列的学科。该技术利用电子对X射线的散射作用,X射线晶体学可以获得晶体中电子密度的分布情况,再从中分析获得原子的位置信息,即晶体结构。由于所有的原子都含有电子,并且X射线的波长范围为0.001~10nm(即0.01~100埃),而成键原子之间的距离(1~2埃附近)在这个范围之内,因此X射线可用于研究各类分子的结构^[23]。该技术可以更直观地研究GPCRs寡聚体的形成方式,目前已用该技术发现视紫红质受体通过跨膜区1和跨膜区2相互作用形成二聚体,CXCR4通过跨膜区5和跨膜区6相互作用形成二聚体。

2 生物化学技术

2.1 辐射钝化

辐射钝化被广泛地用来测定目标蛋白质的大小。一个分子被破坏(用γ-射线或高能电子来破坏多肽)的可能性与分子质量直接相关,即越大越容易破坏,随着辐射量的增加生化活性呈指数降低。

$$Mr = 6.43105 \times Tf/D37$$

当在-135℃被辐射时 Tf为2.8,D37为降低蛋白活性和数量至37%的辐射剂量。辐射钝化会使较大分子量的蛋白被分裂成分子量较小的蛋白质,但不会完全破坏蛋白质。基于此原理,该技术已被用于蛋白质寡聚体的研究,例如经辐射钝化的蛋白质通过免疫印迹来确定其分子量大小,然后与未辐射钝化的蛋白质进行比较,便可知该蛋白质的寡聚化的形式。该方法能够估计难以溶解或难提

纯的蛋白质以及大量受体膜蛋白的分子大小,例如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、H⁺/K⁺ATPase、Na⁺/K⁺ATPase等,缺点是无法确认受体分子量的增加是由于寡聚体的形成还是与其他蛋白质互作引起的。

目前,许多研究人员在辐射钝化实验中添加自由基捕获剂^[24],通过免疫印迹实验发现在没有自由基捕获剂存在的情况下蛋白质功能单位大小会被明显的高估,另外,自由基捕获剂能与蛋白质相互竞争,从而避免二级辐射产物对蛋白质的损害。

2.2 交联研究

交联是指将两个或者更多的分子分别与交联剂偶联从而使这些分子结合在一起,交联剂是一类分子量在200~600kD之间的小分子化合物,具有两个或者更多的针对特殊基团(氨基、巯基等)的反应性末端。

交联主要分为化学交联和物理交联。其中,化学交联用于蛋白质相互作用的研究已有50多年的历史,是非常普遍和有用的实验技术,该技术最早应用在蛋白质的化学修饰上,这种修饰反应的本质是化学试剂的功能团和氨基酸残基之间的有机反应,在蛋白质中,其亲核侧链和多肽链是交联剂偶联的功能基团。化学交联法适于研究能够形成稳定复合物的蛋白质间的相互作用,通过交联剂将两个邻近的亚基或蛋白质共价偶联形成多聚体,并利用放射自显影等技术鉴定与目的蛋白相互作用的蛋白质。化学交联法的优点在于可以用于检测难溶的蛋白质,比如细胞膜蛋白等,还可以使蛋白复合物锁定在某一特定构象,进而获取相对的和绝对的结构信息。

化学交联剂是能够和蛋白质反应的带有双功能团的化学试剂。通过功能团和氨基酸残基反应,偶联两个蛋白质或者更多的蛋白质形成网状交联。功能团决定了交联剂的反应特异性。因为交联剂分子大小有限,所以,只有近距离的蛋白质分子间才能够发生交联,距离与交联剂相差太大就会影响反应的进行,这就为研究蛋白质间的空间位置提供了信息。在过去20几年里,化学交联剂种类增长十分迅速,出现了大量具有不同臂长、不同反应活性的化学交联剂。大致可分为胺类交联剂、巯基交联剂和光敏交联剂3种类型。如N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、顺丁烯二酸亚胺、叠氮等。化学交联试剂捕获发生了相对作用的蛋白质对,结合生物质谱的高解析能力,快速、高通量地获取蛋白质高级结构信息,逐渐成为研究蛋白质相互作用的一种很有

前途的方法。该方法显著优点是它能够“捕捉”到某个状态下的微弱的、瞬时的相互作用。此外,若采用膜透性的交联剂时,也可以进行体内的分析。

交联技术可用于研究稳定复合体内的蛋白质相互作用^[25],或用于研究可逆相互作用蛋白质间的作用,在异源寡聚复合体中,交联技术可确定蛋白质的相邻亚基及相互作用蛋白质间最大间距,甚至可以确定相互作用蛋白质间特异的相邻残基。交联技术还可以应用于确定复合物中的最小亚基数量,还可以使寡聚体锁定在某一特定构象状态,至于可逆相互作用蛋白,交联技术可以确定配体分子。因此,交联技术的应用非常广泛。

2.3 免疫共沉淀和 GST 沉淀技术

免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation, Co-IP)是确定两种蛋白质在完整细胞内生理性相互作用的比较经典有效方法,是利用抗原和抗体的特异性结合以及细菌的 Protein A 或 G 特异性地结合到免疫球蛋白的 Fc 片段的现象开发出来的方法。其原理是当细胞在非变性条件下被裂解时,完整细胞内存在的许多蛋白质—蛋白质间的相互作用被保留了下来。如果用蛋白质 X 的抗体免疫沉淀 X,再加入与抗体特异结合的结合于 Agarose 珠上的 Protein A 或 G,那么与 X 在体内结合的蛋白质 Y 也能沉淀下来,形成这样一种复合物:“Y-X-抗 X 抗体-Protein A 或 G”,然后经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,复合物又被分开。然后经免疫印迹或质谱检测目的蛋白。这种方法得到的目的蛋白是在细胞内与兴趣蛋白天然结合的,符合体内实际情况,得到的结果可信度高,常用于测定两种目标蛋白质是否在体内结合,也可用于确定一种特定蛋白质的新的作用搭档。优点为相互作用的蛋白质都是经翻译后修饰的,处于天然状态;蛋白的相互作用是在自然状态下进行的,可以避免人为的影响;可以分离得到天然状态的相互作用蛋白复合物。缺点为可能检测不到低亲和力和瞬间的蛋白质—蛋白质相互作用;两种蛋白质的结合可能不是直接结合,而可能有第三者在中间起桥梁作用。本实验室也用该技术对 Apelin 受体(APJ)和 κ 型阿片受体(KOR)异源二聚化进行研究,进一步确定 APJ 和 KOR 可以形成异源二聚体^[14]。

GST 沉淀(GST pull-down)体外检测蛋白质与蛋白质之间相互作用。用于验证两个已知蛋白的相互作用,或者筛选与已知蛋白相互作用的未知蛋白。其基本原理是将靶蛋白-GST 融合蛋白亲

和固化在谷胱甘肽亲和树脂上,作为与目的蛋白亲和的支撑物,充当一种“诱饵蛋白”,目的蛋白溶液过柱,可从中捕获与之相互作用的“捕获蛋白”(目的蛋白),洗脱结合物后通过 SDS-PAGE 电泳分析,从而证实两种蛋白间的相互作用或筛选相应的目的蛋白,“诱饵蛋白”和“捕获蛋白”均可通过细胞裂解物、纯化的蛋白、表达系统以及体外转录翻译系统等方法获得。此方法简单易行,操作方便。

此外,生物化学还包括受体共表达、功能反式互补研究以及受体突变体和嵌合体等。受体共表达认为只有当两个原体时空地共表达于同一个细胞内才有可能发生寡聚化,通过测定特定同一细胞内两个原体的 mRNA 来判定寡聚体的发生,测定 mRNA 的方法有很多,包括 Northern blot、核酸酶保护测定法、原位杂交和 RT-PCR 等。功能反式互补虽不能提供直接的证据来证实受体间的相互作用,但是受体功能的恢复也是一种证据。

3 展望

用于研究 GPCRs 寡聚化的生物化学和生物物理方法有很多,这些方法各有优缺点,因此我们可以扬长避短,将这些技术结合起来,从横向,可以用来研究细胞膜上 3 种甚至更多蛋白质的高阶寡聚化;从纵向,可以对细胞膜—细胞质—细胞核中所发生的信号转导网络进行研究,多种技术结合所发挥作用将是无法企及的,从“时间、空间、动态、连续”检测更多蛋白质之间的相互作用的研究拉开新的帷幕,这对于疾病发病机制的研究及新的药物靶点的发现具有深远意义。

参考文献:

- [1] Millar RP, Newton CL. The year in G protein-coupled receptor research[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(1): 261-274.
- [2] Cai X, Chen J, Bai B. Exploring the specific role of GPCRs dimerization in drug discovery[J]. J Chin Pharmaceutical Sci, 2011, 20(6): 535-541.
- [3] Cole NB, Donaldson JG. Releasable SNAP-tag probes for studying endocytosis and recycling[J]. ACS Chem Biol, 2012, 7(3): 464-469.
- [4] Gautier A, Juillerat A, Heinis C, et al. An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells[J]. Chem Biol, 2008, 15(2): 128-136.
- [5] 蔡欣,陈京,白波. G 蛋白偶联受体高阶聚化和信号转导中蛋白复合体的时空动态检测[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(1): 8-12.

(下转第 181 页)

- [2] 谭孝华. 肝中静脉及主要属支的临床应用解剖[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2006.
- [3] 张琳. 肝中静脉解剖与影像三维重建[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2008.
- [4] 丁家明, 李惠君, 刘群辉. 肝静脉的应用解剖学研究[J]. 肝胆外科杂志, 2003, 11(4): 308-310.
- [5] 杨世忠, 董家鸿. 肝中静脉解剖及其临床意义[J]. 中国实用外科杂志, 2011, 31(1): 100-102.
- [6] 王海全, 邢雪, 孙国锋. 主肝静脉和肝短静脉的解剖学研究及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 8(16): 767-769.
- [7] 李海芳, 张燕. 肝中静脉解剖在活体肝移植中的应用[J]. 中外医疗, 2010, 29(2): 79.
- [8] Chan SC, Lo C, Liu CL, et al. Tailoring donor hepatectomy persegment 4 venous drainage in right lobe live donor liver transplantation[J]. Liver Transpl, 2004, 10: 755-762.
- [9] 彭民浩, 杨定华, 黄源, 等. 肝静脉在背驮式肝移植术中的局部解剖学研究及应用[J]. 中国普外基础与临床杂志, 1998, 5(4): 217-219.
- [10] 许本柯, 蒲森水, 舒先涛. 肝左静脉解剖观察及其临床意义[J]. 长江大学学报(自科版), 2005, 2(12).
- [11] ST, F. Precise hepatectomy guided by the middle hepatic vein[J]. Hepat Pan Dis Int, 2007, 6(4): 430-434.

(收稿日期 2012-04-11)

(上接第 161 页)

- [6] Lopez-Gimenez JF, Canals M, Pediani JD, et al. The $\alpha 1b$ -adrenoceptor exists as a higher-order oligomer; effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function[J]. Mol Pharmacol, 2007, 71(4): 1015-1029.
- [7] Gandia J, Lluís C, Ferré S, et al. Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization[J]. Bioessays, 2008, 30(1): 82-89.
- [8] Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GP. Advanced fluorescence microscopy techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM[J]. Molecules, 2012, 17(4): 4047-4132.
- [9] Hu LA, Zhou T, Hamman BD, et al. A homogeneous G protein-coupled receptor ligand binding assay based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer[J]. Assay Drug Dev Technol, 2008, 6(4): 543-550.
- [10] Degorce F, Card A, Soh S, et al. HTRF: a technology tailored for drug discovery-a review of theoretical aspects and recent applications[J]. Curr Chem Genomics, 2009, 28(3): 22-32.
- [11] Liu J, Maurel D, Etzol S, et al. Molecular determinants involved in the allosteric control of agonist affinity in the GABA_B receptor by the GABA_{B2} subunit[J]. J Biol Chem, 2004, 279(16): 15824-15830.
- [12] Pflieger KD, Seeber RM, Eidne KA. Bioluminescence resonance energy transfer(BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions[J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 337-345.
- [13] De A, Ray P, Loening AM, et al. BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals[J]. FASEB J, 2009, 23(8): 2702-2709.
- [14] Li YL, Chen J, Bai B, et al. Heterodimerization of human apelin and kappa opioid receptors: roles in signal transduction[J]. Cell Signal, 2012, 24(5): 991-1001.
- [15] Kerppola TK. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells[J]. Annu Rev Biophys, 2008, 37: 465-487.
- [16] Vidi PA, Chemel BR, Hu CD, et al. Ligand-dependent oligomerization of dopamine D(2) and adenosine a(2a) receptors in living neuronal cells[J]. Mol Pharmacol, 2008, 74(3): 544-551.
- [17] Rose RH, Briddon SJ, Holliday ND. Bimolecular fluorescence complementation: lighting up seven transmembrane domain receptor signalling networks[J]. Br J Pharmacol, 2009, 159(4): 738-750.
- [18] Urizar E, Yano H, Kolster R, et al. CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization[J]. Nat Chem Biol, 2012, 7(9): 624-630.
- [19] Porrello ER, Pflieger KD, Seeber RM, et al. Heteromerization of angiotensin receptors changes trafficking and arrestin recruitment profiles[J]. Cell Signal, 2011, 23(11): 1767-1776.
- [20] Kraft LJ, Kenworthy AK. Imaging protein complex formation in the autophagy pathway: analysis of the interaction of LC3 and Atg4BCT4A in live cells using Förster resonance energy transfer and fluorescence recovery after photobleaching[J]. J Biomed Opt, 2012, 17(1): 011008.
- [21] Dorsch S, Klotz KN, Engelhardt S, et al. Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy[J]. Nat Methods, 2009, 6(3): 225-230.
- [22] Mattheyses AL, Simon SM, Rappoport JZ, et al. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist[J]. J Cell Sci, 2010, 123(21): 3621-3628.
- [23] Pacholarz KJ, Garlish RA, Taylor RJ, et al. Mass spectrometry based tools to investigate protein-ligand interactions for drug discovery[J]. Chem Soc Rev, 2012, 41(11): 4335-4355.
- [24] Ness GC, Pendleton LC, McCreery MJ. Target size analysis by radiation inactivation: the use of free radical scavengers[J]. Exp Biol Med, 2005, 230(7): 455-463.
- [25] Tang X, Bruce JE. A new cross-linking strategy: protein interaction reporter(PIR) technology for protein-protein interaction studies[J]. Mol Biosyst, 2010, 6(6): 939-947.

(收稿日期 2012-05-10)