

生物功能化色谱技术研究胰岛素与其受体间的相互作用

马文^{1,2}, 郭琼¹, 屈锋¹, 黄启斌², 邓玉林¹

1 北京理工大学生命科学与技术学院神经生物学实验室, 北京 100081

2 防化研究院, 北京 102205

摘要: 生物功能化色谱技术是通过模拟细胞膜表面环境, 在色谱系统内实现研究生物分子间相互作用过程的新技术。利用生物功能化色谱方法研究了胰岛素与其受体间的相互作用。将提取出的胰岛素受体混合物固定化在人工膜 (Immobilized artificial membrane, IAM) 的表面, 并确定了固定化的最佳 pH 值为 7.2, 最佳离子强度为 20 mmol, 最佳有机溶剂浓度为 2% (V/V)。通过区带洗脱法确定了胰岛素受体的存在及其与胰岛素间存在相互作用; 通过前沿分析法确定了胰岛素受体与胰岛素间相互作用的结合常数大小约为 0.701 nmol/L。

关键词: 生物功能化色谱, 固定化人工膜, 蛋白质相互作用, 区带洗脱, 前沿分析, 结合常数

Analysis of Interaction Between Insulin and Its Receptor by Biofunctional Chromatography

Wen Ma^{1,2}, Qiong Guo¹, Feng Qu¹, Qibin Huang², Yulin Deng¹

1 Department of Bioscience & Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

2 Institute of Chemical Defence, Beijing 102205, China

Abstract: We used biofunctional chromatography to study the interaction between insulin and immobilized insulin receptor (IR). The heterogeneous insulin receptor extract from Wistar mouse liver was immobilized onto the surface of an immobilized artificial membrane through coating. The detergent was removed by dialysis to reduce its interference with the chromatography. To optimize the protein immobilization, we optimized the coating conditions at: pH 7.2, ion strength 20 mmol, and organic solvent 2% (V/V). The competition and self-displacement interacting study of insulin with IR was conducted by the zonal elution using insulin as the self-competition agent, the result indicated that the insulin receptor was active and interacted with insulin. In addition, relative binding constant was determined by frontal analysis by changing the concentration of insulin in the mobile phase.

Keywords: biofunctional chromatography, immobilized artificial membrane, protein-protein interaction, zonal elution, frontal analysis, binding constants

蛋白质-蛋白质相互作用体现在许多生物过程中, 如 DNA 复制、信号传导、代谢控制等等, 它是蛋白质行使功能的关键。许多有效的方法都可以用来进行蛋白质相互作用的研究, 但都存在一定的

Received: April 3, 2007; Accepted: June 4, 2007

Supported by: the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30170336&20275005).

Corresponding author: Yulin Deng. Tel: 86-10-68914907; Fax: 86-10-68914607; E-mail: deng@bit.edu.cn

国家自然科学基金资助 (Nos. 30170336 和 20275005)。

不足^[1]。

我们发展出的生物功能化色谱(biofunctional chromatography, BFC)技术^[2],通过模拟生物膜的表面性质,并利用色谱技术中研究分子间作用的区带洗脱、前沿分析等方法,来获得生物分子与生物膜的作用的相关信息。以其仿真性、操作连续性可以有效的作为研究蛋白质间相互作用的工具,与多维色谱/质谱联用还可以进行配体筛选、蛋白质组相互作用网络的建立等工作。

本研究中使用的色谱基质是模拟细胞膜表面单层磷脂结构的固定化人工膜(Immobilized artificial membrane, 简称 IAM), (见图 1) IAM 是 Pigeon 等人将卵磷脂结构以共价键键合在硅胶上作为固定相而得到的^[3-4], 目前已工业化生产。与 C18 反相填料不同的是, IAM 固定相上有极性的头部和疏水的尾部与溶质相互作用, 是模拟生物膜与生物分子作用的理想载体。Irving Wainer 等人自上世纪九十年代末以来以 IAM 为基质, 对细胞内酶的作用过程、受体与药物的作用等等进行了一系列的研究^[5-8]。

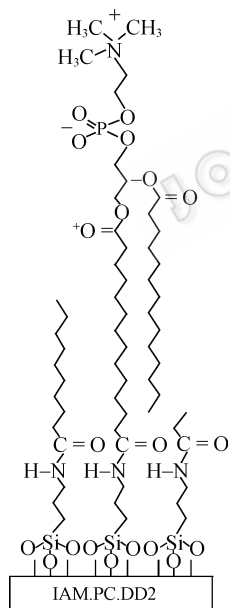


图 1 IAM.PC.DD2 的表面结构

Fig. 1 Surface structure of IAM.PC.DD2

胰岛素受体是糖蛋白, 由 2 个 α 亚基及 2 个 β 亚基即 $\alpha_2\beta_2$ 构成, α 亚基及 β 亚基通过-S-S-键相连。 α 亚基在细胞质膜外表面, 分子量 130 kD, 具有与胰岛素特异结合的部位。 β 亚基跨膜存于胞质, 分子量 95 kD^[9]。胰岛素是最小的蛋白质分子, 它与胰岛素受体间的相互作用是引发葡萄糖转运、细胞增殖、

变化以及蛋白质合成的关键, 是很好的研究蛋白质-蛋白质相互作用的模型。

我们用 IAM 作为固定相, 并构建了模拟细胞膜表面的生理环境体系作为流动相, 将胰岛素受体固定在 IAM 上, 胰岛素作为样品, 利用区带洗脱法和前沿分析方法对二者之间的相互作用进行了初步的研究。

1 实验部分

1.1 实验器材

毛细管电色谱仪(上海通微), 超速冷冻离心机(日本岛津), 紫外分光光度计(日本岛津), IAM.PC.DD2 填料 12 μm , 300 \AA (美国 REGIS 公司), 毛细管柱内径分别为 400 μm 和 50 μm (河北永年)。

1.2 实验药品

人工牛胰岛素(进口分装), 胰岛素受体取自 Wistar 大鼠, 其他药品均为分析纯, 水为去离子水(Millipore)。

1.3 实验过程

1.3.1 胰岛素受体的提取

方法主要见参考文献[10], 略微调整。(以下操作均在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以下进行): 250 g 左右 Wistar 大鼠处死后立即取肝(约 8 g), 以 24 mL 匀浆缓冲液溶解, 高速破碎肝后以 12 000 g 离心 10 min, 取上层液, 以 50 000 g 离心 45 min, 取下部沉淀加 10 mL 溶解缓冲液震荡破膜 30 min, 最后以 120 000 g 离心 30 min, 取上清即可。

其中匀浆缓冲液为: 0.25 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L 的 EDTA, 1 mmol/L 的 PMSF, 2 mmol/L 的 MgCl_2 和 25 mmol/L 的 HEPES 缓冲液(pH 7.6)。

溶解缓冲液为: 1% 的 TritonX-100 匀浆缓冲液, 只是将 25 mmol/L 的 HEPES 缓冲液变成 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 调成 7.6)

1.3.2 蛋白质含量的测定

考马斯亮蓝微量蛋白测定法, 做出一条 BSA 的标准曲线, 再利用此标线进行提取蛋白总量的测定

1.3.3 柱外固定化条件的选择

称取多份 5 mg/mL IAM 填料, 选择不同的 pH 值、离子强度、有机溶剂的浓度和固定化时间, 加入蛋白提取液 1 mL, 震荡吸附, 到指定时间后, 测定溶液内剩余蛋白的含量, 固定吸附量(mg)=蛋白总量(mg)-剩余蛋白量(mg)。

1.3.4 提取蛋白在 IAM 上的固定化方法

称取 10 mg IAM 填料, 与 5 mL 蛋白提取液混合后进行动态透析和固定化。透析液为模拟生物环境的缓冲液, 250 mL 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.6) 缓冲液, 其中含 5 mmol/L 附量(mg)=蛋白总量(mg)-剩余蛋白量(mg)。

1.3.5 提取蛋白在 IAM 上的固定化方法

称取 10 mg IAM 填料, 与 5 mL 蛋白提取液混合后进行动态透析和固定化。透析液为模拟生物环境的缓冲液, 250 mL 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.6) 缓冲液, 其中含 5 mmol/L 的 EDTA, 1 mmol/L 的 PMSF, 2 mmol/L 的 MgCl₂, 所用透析袋可滤过分子量为 8000~14 000 以下, 在 4℃ 的冰箱内以电动搅拌子搅拌进行动态透析, 每 4 h 换透析液。透析 36 h。

1.3.6 微柱的制作

湿法填充的 IAM 小柱为 400 μm×1.5 cm 柱两端分别连接上长度为 10 cm 和 25 cm 的内径为 50 μm 的毛细管柱(见图 2), 以胶密封, 使其耐压大于 15 MPa。柱子在纯乙腈条件下保存。使用前安装在通微的毛细管电色谱仪上进行加压流动相平衡, 使用后也应及时以水、乙腈冲洗平衡保存。

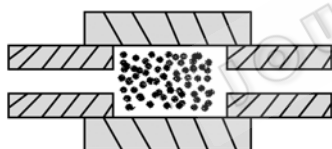


图 2 微柱示意图

Fig. 2 The column using in this study

1.3.7 区带洗脱法研究胰岛素-胰岛素受体的相互作用

流动相为 20 mmol Tris-HCl (pH 7.4), 含 5 mmol/L EDTA, 2 mmol MgCl₂, 进样流速 0.005 mL/min, 进样时间: 10s, 样品 2 μg/mL 胰岛素, 检测波长: 278 nm。在受体固定化前, 做胰岛素在 IAM 柱上的保留特征分析, 固定化受体之后, 同样将胰岛素作为样品过柱, 观察保留时间的变化。最后在流动相中加入自竞争配体也就是一定浓度的胰岛素, 平衡 30 min 后再进胰岛素样观察保留时间的变化。

1.3.8 前沿色谱方法对胰岛素与胰岛素受体作用结合常数的计算

将系列浓度的胰岛素样品 打入 2 mL 样品环内,

在 5 μL/min 的流速下, 连续进样至出平台峰并继续进样 10min。以半峰高处的时间为准, 记录下不同浓度的样品出峰的时间, 代入公式计算, 计算方法如下^[11,12]:

在假定 A 与 I 在 L 上竞争的作用点只有一个的情况下, 可由下面的公式来描述 A 在柱上的保留与平衡常数之间的关系:

$$(1)$$

其中[A]-流动相中配体 A 的浓度/μmol/L

[I]-竞争配体 I 的浓度

K_A -A 在柱上的平衡常数

V_0 -柱上死体积

X-与竞争配体有关的校正因子

m_L -受体在柱上的数量/μmol

k' -样品 A 的保留因子

$$k' = (t_R - t_0)/t_R$$

t_R -样品的保留时间

t_0 -柱上无保留样品的死时间

当竞争配体和进样的样品为同种物质时(也即 A=I 时), 公式可以变成下面的形式

$$(2)$$

以[A]为 X, $1/k'$ 为 Y 做直线, 得到的截距为 $C = V_0/K_A m_L$, 斜率 $D = V_0/m_L$, 则 $D/C = K_A$ 。因此通过此公式作图可以求出结合常数的大小。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质的提取与固定化

依照离心方法提取出的胰岛素受体, 是包含胰岛素受体及与其分子量类似的一定范围之内多种蛋白的混合物, 利用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度为 (16±5) mg/mL。通过一维凝胶电泳在 130 kD 和 95 kD 附近均有条带可以初步判断胰岛素受体的存在。蛋白不必进一步纯化, 一是有利于保持受体的活性环境, 二是受体-配体作用的特异性。受体活性可以通过区带洗脱、前沿分析等方法来确定。

IAM 的表面由于模拟的是卵磷脂的表面, 因此性质上与其有类似之处, 作为固定相时有极性的头部和疏水的尾部与溶质相互作用, 在固定化受体蛋

白时,受体与IAM结合的方式主要是通过疏水键、氢键、静电引力等作用,改变pH值、离子强度等会引起固定化程度的改变。

在极端pH的情况下,蛋白会产生沉淀,离子强度大于500 mmol/L的情况下,也会产生大量沉淀,这些都会造成固定化程度较高的假象。因此综合考虑固定化的程度、受体蛋白的活性保持的范围以及避免沉淀等因素,在如下的pH值范围和离子强度范围内测试,选定了进行固定化的最佳pH值7.2、离子强度20 mmol、有机溶剂浓度低时对固定化影响不大,高时有沉淀的可能,操作过程加入少量有机溶剂可改善色谱峰形,因此在柱上固定化时添加有机溶剂2% (V/V)。见图3。

实际固定操作中透析的目的是去掉蛋白提取液中的破膜剂,同时通过搅拌子的搅拌使填料与蛋白提取液充分接触。

进行固定化的结合力并非共价键力,操作时间长会有蛋白流失的现象,同时由于活性保持的问题,每根柱子的使用周期约为两周。

2.2 区带洗脱法研究胰岛素与其受体间的相互作用

区带洗脱法主要就是通过观察少量样品进样后的保留情况,来判断样品与固定相之间的相互作用,进而获得所需要的信息,比如通过在流动相中加入抑制剂观察样品保留的变化可以得到二者与固定化的分子之间相互作用的关系。

本文对受体固定化前后的胰岛素在相同长度IAM柱上的保留情况进行了初步的对比,并比较了在流动相中加入自竞争配体的情况(见图4)。我们

选择的测定 t_0 的物质是BSA,由图四也可以看出三种条件下胰岛素与固定相相互作用的趋势。B条件固定化受体后胰岛素的保留因子与A条件未固定化受体时胰岛素的保留因子相比有明显的增加,充分说明受体溶液中有物质固定到IAM担体上并与胰岛素发生了作用。

对照组C的方法是在流动相中加入10 nmol/L的胰岛素,充分饱和以后再讲胰岛素作为样品打入,由于柱上活性位点被流动相中的胰岛素占据,因此样品胰岛素的保留时间缩短。这也可以从另一个侧面证明了柱上胰岛素受体的存在及其活性。

此外,胰岛素与受体的特异性作用的大小需要系统的实验来验证,这就是我们下面的工作了.利用激动剂竞争法可以判断作用特征性,利用系列浓度对比可以计算出作用力也即结合常数的大小。

2.3 前沿分析法确定结合作用的大小

前沿分析方法同样可以得到样品与固定相间相互作用关系的信息。

胰岛素与胰岛素受体的结合,包含一个高亲和度和一个低亲和度的位点,我们考虑高亲和度的位点^[13],并且二者是1:1的方式结合。

当胰岛素受体混合蛋白溶液固定在IAM柱上后,可以通过在大容量的进样环内分别加入系列浓度的胰岛素样品溶液,观察其在柱上保留变化的趋势。

随着进样环内胰岛素样品的不断进入,可以由图5上所示得到类似于突破曲线的平台峰,我们将保留时间定在其拐点处,可以看出随着胰岛素浓度的增加,保留时间不断的缩短。从另一个侧面说明高浓度胰岛素饱和胰岛素受体作用位点的速度不断加快。

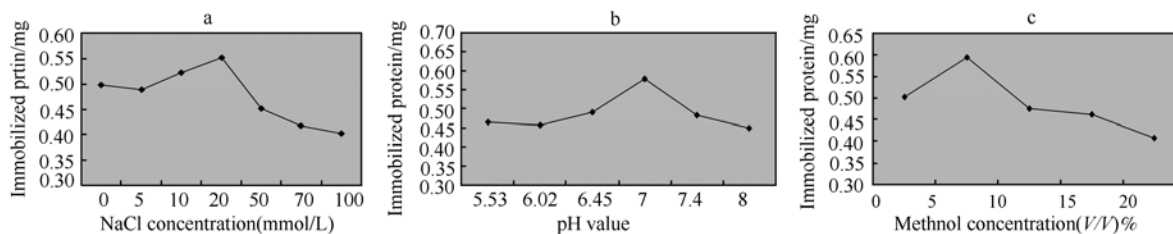


图3 盐浓度(a)、pH值(b)和有机溶剂(c)对蛋白固定化程度的影响

Fig. 3 Effects of ionic strength (a), pH (b) and organic solvent (c) on the protein immobilization onto the IAM

a: pH 7.5, organic solvent 5%, coating time 3 h; b: NaCl 20 mmol/L, organic solvent 5%, coating time 3 h; c: pH 7.5, NaCl 20 mmol/L, coating time 3 h

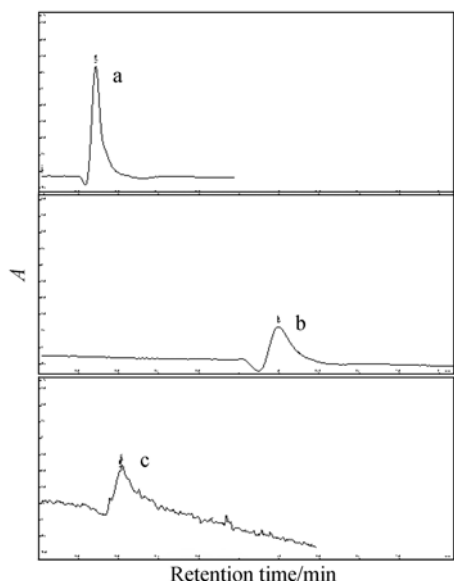


图 4 区带洗脱法图

Fig. 4 Zonal elution profile

a: IAM column (1.5 cm) without IR receptor; b: IAM column (1.5 cm) with IR receptor; c: IAM column (1.5 cm) with IR receptor at the same time adding 1 μM insulin in the mobile phase. Eluent condition: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 2 mmol/L MgCl₂, flow rate 0.005 mL/min, sample 2 μg/mL insulin, λ=278 nm

由公式(2)可以推导出胰岛素与其受体在柱上作用的结合常数。将实验的结果汇集成本表 1, 根据胰岛素浓度 [A] 与相应容量因子的倒数 1/k' 所做的直线

(见图 6), 得到直线 $y=0.167x+0.238$, 斜率/截距求得结合常数为 0.702 nmol/L, 与用放射结合方法求出的结合常数在同一数量级^[13]。

在前沿分析中, 胰岛素系列浓度的选择很重要, 如果浓度选择的过大, 会因为饱和速度过快而看不出不同胰岛素浓度保留值之间的差别, 如果过小, 会对检测造成困难。本文选择的是单点作用的模型, 在其它相互作用中还存在多点作用的情况, 那样公式考虑的情况就更复杂一些。

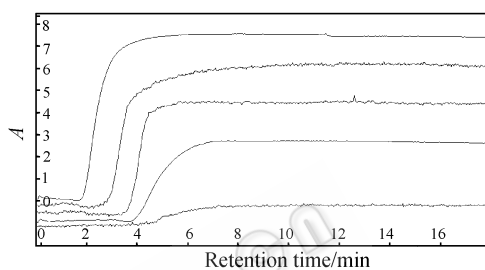


图 5 前沿分析法图

Fig. 5 Chromatograms obtained in the frontal analysis study

The mobile phase concentrations of insulin (from left to right) were 10, 7, 5, 3, and 1 μmol/L. All of these studies were performed in 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), including 2 mmol/L MgCl₂, flow rate 0.005 ml/min, injection loop is 2 mL. t_0 was detected by BSA. λ = 278 nm

表 1 利用前沿分析法得到的胰岛素浓度与保留因子的对应表

Table 1 Insulin concentrations and related retention factors by frontal analysis method

[A]/(nmol/L)	t_0	t_R	k'	$1/k'$
10	1.68	2.51	0.494048	2.024096
7	1.68	3.14	0.869048	1.150685
5	1.68	3	0.785714	1.272727
3	1.68	4.46	1.654762	0.604317
1	1.68	5.13	2.053571	0.486957

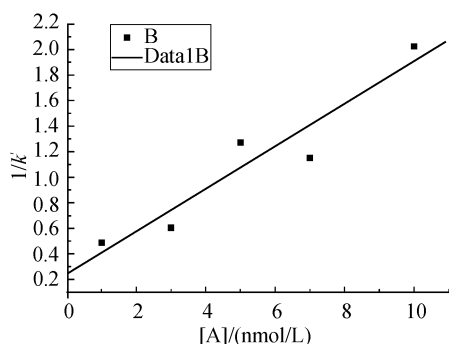


图 6 前沿分析求胰岛素与其受体结合常数图

Fig. 6 Frontal analysis plots for insulin on an immobilized IR column systems with single site binding ($D/C = K_A$)

前沿分析方法不仅可以求出结合常数, 也可以求出相互作用的点数, 这是我们下一步的工作。

3 结论

本实验中, 我们在色谱环境下构建了模拟细胞膜表面胰岛素与其受体相互作用的体系。再将提取的受体溶液固定化人工膜 IAM 担体的表面, 通过区带洗脱的研究, 确定了胰岛素与其受体在柱上作用的特异性; 通过前沿分析方法, 得到了二者相互作用的相对大小。今后我们还会在固定化的条件、进一步利用此方法进行药物筛选以及配体筛选方面作

些工作。

该方法操作简便、结果直观,在蛋白筛选、致病基因诊断方面有巨大的潜力,是蛋白质相互作用研究的一个新的探索。

REFERENCES

- [1] Golmis E. Protein-Protein Interactions. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [2] Deng YL, Liu YQ, Ma W, *et al.* The concept and methodology of biologically functionalized chromatography, *Life science instrument*, 2004, 5(2): 9-11
邓玉林, 刘艳清, 马文, 等. 生物功能化色谱新概念及其方法学研究. *生命科学仪器*, 2004, 5(2): 9-11.
- [3] Cheng Y, Charles Pidgeon, *et al.* Immobilization artificial membrane:screens for drug-membrane interactions. *Advanced Drug Delivery Review*, 1996, 23(1~3): 229-256
- [4] Shaowei Ong, Charles Pidgeon, *et al.* IAM chromatography—measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *J Chromatography A*, 1996, 728(1~2): 113-128.
- [5] Zhang YX, Xiao YX, Kenneth J Kellar, *et al.* Immobilized nicotinic receptor stationary phase for on-line liquid chromatographic determination of drug-receptor affinities. *Anal Biochem*, 1998, 264: 22-25.
- [6] Nektaria Markoglou A, Ruth Hsuesh A, Irving W Wainer. Immobilized enzyme reactors based upon the flavoenzymes monoamine oxidase A and B. *Journal of Chromatography B*, 2004, 804(2): 295-302.
- [7] Nektaria Markoglou, Irving W Wainer. Synthesis and characterization of immobilized dopamine b-hydroxylase in membrane-solubilized formats. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, 48(1): 61-75.
- [8] Krzysztof Jozwiak, Sarangan Ravichandran, Jack R Collins, Irving W Wainer. Interaction of noncompetitive inhibitors with an immobilized r3â4 nicotinic acetylcholine receptor investigated by affinity chromatography, quantitative-structure activity relationship analysis, and molecular docking. *J Med Chem*, 2004, 47: 4008-4021.
- [9] Liu R, Bai H, Liu BW. Signal transduction of insulin receptor. *Progress in Physiological Sciences*, 2001, 32(3): 254-256.
刘瑞, 白怀, 刘秉文. 中国人内源性高甘油三酯血症患者胰岛素受体底物 1 基因的多态性. *生理科学进展*, 2001, 32(3): 254-256.
- [10] Freidenberg GR, Klein HH, CordEra R, *et al.* Insulin receptor kinase activity in rat liver. *J Biol Chem*, 1985, 260(23): 12444.
- [11] David S Hage. High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding. *Journal of Chromatography B*, 2002, 768(1): 3-30.
- [12] Hage DS, Terance AGN, Irving WW. Characteration of protein binding of chirak drug by HPAC interaction of R- and S-ibuprofen with human serum albumin. *J Chromatogr A*, 1995, 693(1): 23-32.
- [13] Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR, Knuth MW, Brennan Jr WA, Lin SH. Strategies for Protein Purification and Characterization: a laboratory course manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, 202-203.

东胜创新成功融资千万美金

2007年11月30日,东胜创新生物科技公司(下称“东胜创新”)发布消息,公司成功引入兰馨亚洲投资集团的1000万美元资金,此次融资获得的资金将主要用于加强渠道建设和产业链的完善。东胜创新生物科技公司是一家专注于生命科学领域的技术服务商,2002年4月成立于北京。公司目前在全国拥有1个研发中心、1个工程研究中心、3个维修中心、14个维修联络站、22个分支机构、40多名技术支持和维修工程师以及250多名专业人才。五年来,公司与几十家国际一流厂商建立了合作关系,共同致力于为生命科学研究提供完善的渠道支撑、先进的技术和设备并充分享受最前沿的科研信息。其产品线包括:PCR仪、酶标系统、工作站等。

东胜创新董事长申跃华先生在新闻发布会上表示,东胜创新凭借五年辉煌的发展历程和广大客户、厂家、同行的信任,成熟的管理团队,覆盖全国的服务网络,国际顶尖品牌与自有民族品牌的互补,强大的技术力量,丰富的行业经验、卓越的服务理念和能力,加之充足资金的支持,将能够更好地履行“服务并推动生命科学产业发展”的使命!

