

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.32.043

## MST 技术在生命科学中的应用进展\*

李丽琴 石童 周国超 王陈 陈学军 张瑞华 徐建富

(北京药物化学研究所国民核生化灾害防护国家重点实验室 北京 102205)

**摘要:**在生命科学领域中,生物分子间的相互作用具有非常重要的作用。通过分子间相互作用分析不仅可阐明细胞生物学事件,而且为疾病发生机制和药物发现提供基础。MST 技术是一种基于检测在温度梯度中的生物分子电泳迁移率的变化而检测生物分子间结合、解离过程,获取分子间相互作用的模式和动力学常数等方面信息的新技术,是近年来发展的研究生物分子相互作用的强有力工具,已广泛应用于生命科学领域研究。本文综述了 MST 的技术原理、分析方法及其在生命科学领域的应用进展。

**关键词:**微量热泳动;技术原理;生物分子间相互作用

**中图分类号:**Q-33; Q81; R945 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)32-6393-05

## Progress on the Applications of Microscale Thermophoresis Technology in Life Science\*

LI Li-qin, SHI Tong, ZHOU Guo-chao, WANG Chen, CHEN Xue-jun, ZHANG Rui-hua, XU Jian-fu

(State Key Laboratory of NBC Protection for Civilian, Beijing Research Institute of Pharmaceutical Chemistry, Beijing, 102205, China)

**ABSTRACT:** Binding events of biomolecules play a central role in all fields of life science. Biomolecular interaction analysis does not only give fundamental insights into the molecular biology of the cell but also paves the way of disease occurrence mechanism and discovery of the new drug. The microscale thermophoresis (MST) is a new technology based on the change of thermophoresis motion rate of molecules in temperature gradients, which can detect biomolecules real-time association and dissociation, the information of interactive model, dynamics constant and so on. MST is a power tool of biomolecular interaction analysis and it has been widely applied in life science. This article reviews the principle, analytic method and the further development of MST technology in life science.

**Key words:** Microscale thermophoresis; Technology principle; Biomolecular interaction

**Chinese Library Classification(CLC):** Q-33; Q81; R945 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2017)32-6393-05

### 前言

在生命科学领域中,包括生理学、病理学、诊断学和药理学等领域,生物分子间的相互作用具有非常重要的作用,生物分子间相互作用分析不仅有助于了解细胞生物学事件,而且可为疾病发生机制和治疗药物发现方面提供基础。采用微量热泳动(Microscale thermophoresis, MST) 技术进行分子间相互作用研究是基于携带不同电荷的各种生物分子具有不同的电泳行为的独特的电泳原理<sup>[1]</sup>。分子发生相互作用后的电泳迁移率变化与分子特性相关,例如,分子大小、电荷、水化层和构象等。MST 技术具有如下优点:对相互作用的分子大小或质量无选择性;可以设计为双向试验,即相互作用的两个分子均可设计为荧光标记分子;样品用量少;测量时间短;还可利用蛋白分子的自身荧光进行检测;可在多种复杂缓冲液体系中进行相互作用分析<sup>[2,3]</sup>。因此, MST 已经获得广泛应用,本文对 MST 的技术原理、分析方法及其在生命科学中的应用进展进行综述。

### 1 微量热泳动技术原理

#### 1.1 微量热泳动工作原理

微量热泳动是一种表征生物分子特性的光学方法,是粒子在微观温度梯度中的定向运动。生物分子的质量、电荷、水化层和构象发生改变均可导致分子在温度梯度场中运动速度的变化,这种变化可以用来分析分子间相互作用以及各种化学剂量学参数。微量热泳动仪是由德国 nano temper 公司发明的设备,2011 年左右投入市场,可测定生物分子的标记荧光和内在荧光信号。

MST 工作原理见图 1<sup>[1]</sup>。将波长为 1480 nm 的红外激光照射于荧光激发光路上,通过分色镜照射到毛细管中的样品,样品中的水分子吸收红外光发热而形成温度梯度。MST 仪器通过记录激光器打开前、打开期间和打开后处于温度梯度中的样品内部红外激光照射区域的荧光变化情况,从而实现较短时间的测定。

#### 1.2 MST 信号记录和分析

图 1A 所示,通过荧光通道检测系列毛细管不同浓度样品中的荧光分子受到激发后在温度梯度中的电泳迁移率的变化情况。图 1B 所示,记录检测到的荧光随时间的变化过程,即荧

\* 基金项目:国家重大新药创制科技重大专项项目(2009ZX09103-384)

作者简介:李丽琴(1972-),女,博士,研究员,主要研究方向:新药筛选, E-mail: llq969696@163.com,

电话:13439588963, 010-66758642

(收稿日期:2016-12-27 接受日期:2017-01-24)

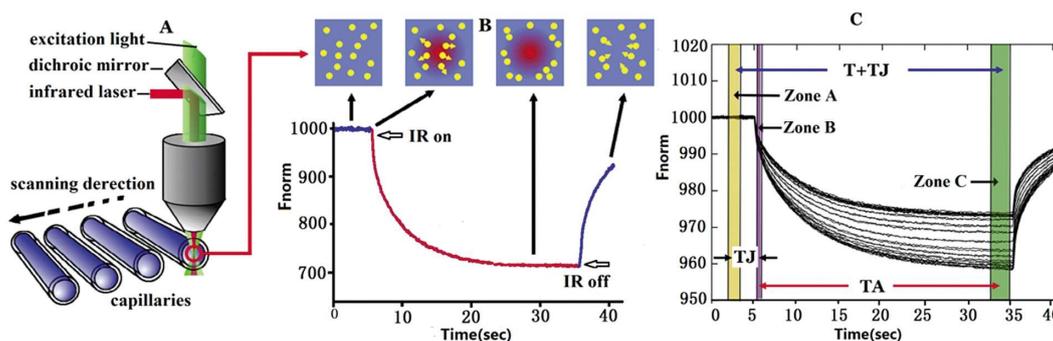


图 1 MST 工作原理图<sup>[1,4]</sup>

Fig.1 Working principle of MST<sup>[1,4]</sup>

光 - 时间轨迹图, 每一段分别代表分子结合过程中的不同信息。第 I 阶段为激光器打开前的初始荧光阶段, 持续时间大约 5 s; 当激光器打开后, 温度升高, 引起荧光值的快速减小, 进入 II 阶段, 即温度下跃 (temperature jump, TJ) 阶段, 大约持续 100 ms ~ 500 ms, 该阶段反映了荧光基团的温度敏感性; 随后进入第 III 阶段, 持续大约几秒, 该阶段为电泳扩散阶段, 通常包括游离荧光分子和复合荧光分子的泳动, 离开监控区域而出现荧光值下降 (正向泳动), 大约在 30 s 左右形成新的荧光稳态。如发生分子间结合作用, 则第 II 和第 III 阶段受到影响; 在第 35 s 关闭激光器后, 出现 T- 降阶段的逆转, 即第 IV 阶段, 荧光分子通过扩散而回到监控区域, 荧光信号又恢复。

图 1C 所示, MST 测定的 3 种信号分析模式<sup>[4]</sup>。自由和结合的荧光分子的热泳动取决于两个参数: 一是早期的平均稳态荧光值 ( $F_{cold}$ , 简称  $F_c$ ), 另一个为后期的平均稳态荧光值 ( $F_{hot}$ , 简称  $F_h$ ), 可根据荧光 - 时间轨迹图中的 3 个时间区分别获得  $F_c$  和  $F_h$ 。A 区为激光器打开前的初始荧光检测区; B 区为红外激光启动后的温度下跃阶段的荧光检测区; C 区为荧光分子经过电泳阶段形成新稳态荧光检测区。

3 种信号分析模式分别为: 温度下跃模式 (T-jump, TJ)、电泳模式 (thermophoresis alone, TA)、电泳和温度下跃复合模式 (thermophoresis+T-jump, T+TJ)。在 TJ 模式下,  $F_c$ 、 $F_h$  分别来自 A 区、B 区, TJ 模式并未检测到热泳动, 主要反映起始阶段荧光信号的消除, 这种变化是基于荧光分子的物理特征发生变化而引起的, 然而, 并不是所有的分子都出现 TJ 信号的改变; 在 TA 模式下,  $F_c$ 、 $F_h$  分别来自 B 区、C 区, 这种分析模式忽略了 TJ 对分子的影响; 在 T+TJ 模式下,  $F_c$ 、 $F_h$  分别来自 A 区、C 区。

MST 测定的相对荧光信号值用于分子间定量结合分析, 将生物分子的热泳动定义为  $F_n = (F_i/F_c) \times 1000$ 。  $F_n$  表示归一化荧光信号, 以  $F_n$  作为滴定分子浓度的函数进行亲和性的定量分析。因为结合和未结合分子的热泳动状态线性重叠, 结合部分可由公式(1)描述<sup>[5]</sup>:

$$F_n = (1-FB) F_{n, \text{unbound}} + (FB) F_{n, \text{bound}} \quad (1)$$

$FB$ : 结合部分的荧光分子占总荧光分子的比例;  $F_{n, \text{unbound}}$ : 表示游离状态荧光分子的荧光信号;  $F_{n, \text{bound}}$ : 表示结合状态荧光分子的荧光信号。在多数情况下, 可根据质量方程简单描述结合过程。更复杂的结合模式要求不同的方程, 例如, 描述有协同作用的 hill 方程。

基于质量方程的常用模型可描述为:  $A+B \rightleftharpoons AB$ , 表示结合

亲和力的平衡解离常数  $K_d$  表示为公式(2):

$$K_d = \frac{[A]_{\text{free}}[B]_{\text{free}}}{[AB]} \quad (2)$$

$K_d$  表示平衡解离常数;  $[A]_{\text{free}}$  表示滴定分子 A 的游离浓度;  $[B]_{\text{free}}$  表示浓度恒定的荧光分子 B 的游离浓度;  $[AB]$  表示 AB 复合物的浓度。B 分子的结合部分表示为  $FB$ , 见公式(3)。

$$FB = \frac{[AB]}{[B]} = \frac{[A] + [B] + K_d - \sqrt{([A] + [B] + K_d)^2 - 4[AB]}}{2[B]} \quad (3)$$

MST 仪器测定获得的  $F_n$  与  $FB$  线性相关, 可直接应用到上述方程中。以  $F_n$  作为 Y 轴, 滴定分子的浓度的对数作为 x 轴, 进行半对数作图, 获得近似 S 型曲线。也可以将  $\Delta F_n$  作为 Y 轴 (以滴定分子的不同浓度下的  $F_n$  分别减去  $F_{n, \text{unbound}}$  而得) 进行半对数作图。如果采用最小浓度的荧光分子测定可以达到检测灵敏度, 则误差几乎为 0,  $K_d$  更接近于实际值或偏低。

## 2 MST 技术在生命科学中的应用

在生命科学研究中, 通过蛋白 - 小分子、蛋白 - 肽、蛋白 - 蛋白、肽 - 肽、蛋白 - 核酸、核酸 - 小分子等相互作用分析, 可为药物筛选、机制研究、分子检测、诊断技术等提供基础。

### 2.1 蛋白 - 小分子相互作用分析

2.1.1 蛋白酶与抑制剂相互作用分析 蛋白酶抑制剂作为抗肿瘤药物已引起广泛重视。通过蛋白酶与底物、抑制剂相互作用研究, 可为抑制剂的分子设计和改造提供依据<sup>[6-10]</sup>。异柠檬酸脱氢酶 1 (isocitrate dehydrogenase 1, IDH1) 的突变体 (R132H) 与许多癌症, 例如, 胶质母细胞瘤、急性髓样白血病相关, 该突变体可使 2- 羟戊二酸活性增强, 而 2- 羟戊二酸被认为是一种早期肿瘤代谢物, 因此, IDH1 突变体抑制剂有望成为抗肿瘤药物。Davis 等<sup>[7]</sup>采用 MST 方法研究了 IDH1 突变体 R132H 与其抑制剂 ML309 的相互作用, 并进行了在 IDH1 底物  $\alpha$ - 酮戊二酸 ( $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -KG)、NADPH 存在下的竞争性结合作用分析。表明, ML309、 $\alpha$ -KG 与 IDH1 R132H 的结合为竞争性方式结合; ML309、NADPH 与 IDH1 R132H 的结合是以非竞争性方式结合。Syntia 等<sup>[8]</sup>采用 MST 方法研究了人类嗜中性粒细胞弹性蛋白酶 (human neutrophil elastase, HNE) 与天然三萜类 HNE 抑制剂熊果酸的结合作用。测得熊果酸的  $K_i$  值为 2.72  $\mu$ M, 与采用毛细管方法获得的  $K_i$  值 (2.81  $\mu$ M) 有较好的一致性。Winiewska 等<sup>[9]</sup>采用 MST 方法研究了人蛋白激酶 2 $\alpha$  (hCK2 $\alpha$ ) 与其抑制剂 (7 个卤代苯并三唑类化合物及其类似物) 的结合作用。其中 3 个抑制剂的  $K_d$  值在 24 ~ 43 nM 之间, 1 个为 130 nM, 3 个在 1040 ~ 2100 nM 之间, 与采用 DSC 方法对

7个抑制剂的测定结果基本相当。

**2.1.2 细胞膜蛋白活性分析** 获得具有活性功能的 G 蛋白偶联受体(GPCRs)可为作用于该靶点的药物筛选研究提供基础。梨鼻骨系统是哺乳动物气味探测信号系统其中之一,获得具有活性的人梨鼻骨受体(human vomeronasal receptor, hVNR)分子进行其结构和功能研究,将有助于更好的理解人梨鼻骨系统的作用,了解哺乳动物嗅觉探测的机理,将会促进对其他膜蛋白和智能鼻技术的研究开发<sup>[11]</sup>。Corin 等<sup>[12]</sup>利用 HEK293 细胞系表达了 hVN1R1, 并采用 MST 方法检测了 hVN1R1 和配基桃金娘烯醛的结合亲和力,测得 Kd 为 1  $\mu$ M。表面活性剂对膜蛋白离开其原有细胞膜环境后的溶解和稳定起着至关重要的作用<sup>[13-15]</sup>。Corin 等<sup>[13]</sup>采用无细胞 *E.coli* 系统结合去垢剂 Brij-35 表达纯化了 13 种 GPCRs(9 种嗅觉受体,人痕量胺受体,人甲酰胺受体,2 种人梨鼻骨受体),采用 MST 无标记模式检测了受体活性,表明这些 GPCR 与配基的结合亲和力都在微摩尔范围,从而证明了采用无细胞系统结合最佳去垢剂进行 GPCR 蛋白表达可以获得足够量具有活性的 GPCRs 用于生化、结构和功能分析。

## 2.2 蛋白-肽相互作用分析

为了阐明在肠中蛋白和肽的胞吞内化和转胞作用机制,Langlueddecke 等<sup>[16]</sup>采用表达人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白受体(human neutrophil gelatinase associated lipocalin receptor, hNGAL-R)的结肠样 Caco-2 BBE 细胞质膜进行受体与配基相互作用研究,即采用固定蛋白浓度的质膜与系列浓度植物螯合肽 PC3 进行结合分析,测得的 EC<sub>50</sub> 值为 18.6 nM;在结合反应液中加入受体竞争剂(hNGAL)可降低结合亲和力,从而证明,hNGAL-R 很可能是定位于低段小肠的一种负责内化完整蛋白和多肽的高亲和多配基受体。

## 2.3 蛋白-蛋白相互作用分析

干扰素刺激基因 15 (interferon-stimulated gene 15, ISG15) 编码的蛋白是抗病毒天然免疫通路中的重要调节因子,病毒感染和干扰素刺激均可强烈诱导 ISG15 的表达。ISG15 是最早发现的泛素样蛋白,可对细胞内多种蛋白进行修饰并调节蛋白功能,在机体抗病毒天然免疫反应中发挥重要作用。Basters 等<sup>[17]</sup>采用 MST 方法测定了泛素特异性蛋白酶 18(ubiquitin-specific protease 18, USP18) 与 ISG15 结合的 Kd 值为 1.3  $\mu$ M, 表明 USP18 对 ISG15 具有特异性,ISG15 与胞内蛋白的结合作用可能受到 USP18 的拮抗。

GPCRs 与配基结合后,可激活 G 蛋白  $\alpha$  亚基进而启动信号级联反应。Dijkman 等<sup>[18]</sup>采用 MST 方法研究了处于不同脂质环境中的神经降压肽受体 1 (neurotensin receptor 1, NTS1) 与 G $\alpha$ i1 的亲和力,并检测了在激动剂神经降压肽(NT)和拮抗剂 SR48692 和 SR142948A 存在下 NTS1 与 G $\alpha$ i1 间的亲和力。表明,NTS1 与 G $\alpha$ i1 亚基间的亲和力在富含 PE 的脂质环境中比在无 PE 的脂质环境中亲和力提高 4 倍;在激动剂、拮抗剂分别存在下的脂质微环境中的亲和力相应表现为提高、下降,提示脂质微环境在 GPCRs 信号传导过程中承担重要作用,作者通过 MST 技术表明了配基对 GPCRs-G 蛋白间亲和力的调控与其发挥的药理学作用相一致。

病毒疫苗在宿主体内复制需要表达与宿主免疫系统相互作用的病毒蛋白,例如,对炎症转录因子 NF- $\kappa$ B 活化具有拮抗作用的 A46 和 A52 病毒蛋白。由于 A46 以四聚体形式存在易形成沉淀无法采用等温滴定量热法测定相互作用,Fedosyuk 等<sup>[19]</sup>采用 MST 方法研究了 A46 及其系列突变体与细胞内的适配分子髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)和 MAL (MyD88 adapter-like) 的 Toll/IL-1 受体同源结构域(Toll-like receptor/interleukin-1R, TIR)的相互作用。结果表明:A46 及其突变体与细胞内的适配分子结合的 Kd 值均在  $\mu$ mol/L 范围。位点突变对其与两种适配分子的结合作用影响不大,然而,N 端缺失却使得 A46 与两种适配分子结合作用的亲和力下降。

梭状芽孢杆菌毒素 A (Toxin A from *Clostridium difficile*, TcdA)可通过受体介导的内化而进入宿主细胞,该毒素发挥作用的先决条件是在细胞内释放出葡萄糖基转移酶结构域。Olling 等<sup>[20]</sup>推测,TcdA 的 C 端重复序列(C-terminally-located repetitive oligopeptides, CROPs)可能与毒素的 N 端部分发生相互作用,从而阻止毒素的自体酶解,并采用 MST 方法证实了毒素的 CROPs 结构域除了主要作为受体结合域外,还可通过稳定毒素构象而避免葡萄糖基转移酶结构域的过早释放而引起毒素的失活。

过氧化物酶体增殖活化受体  $\gamma$  辅助活化因子 1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated-receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ )是维持细胞代谢和能量稳态的关键调节物,在线粒体合成、调节适应性产热、骨骼肌纤维类型转换等过程中发挥重要作用,与许多疾病包括肥胖、糖尿病、神经退行性病变、心脏病及缺血性疾病等的发生相关,已成为治疗糖尿病、肥胖等代谢疾病的新靶点。Takacs 等<sup>[21]</sup>采用 MST 研究表明,PGC-1 $\alpha$  与  $\alpha$  和  $\gamma$  型雌激素相关受体的结合方式均是以同源二聚体的方式进行结合,并表现为高、低亲和力作用,受体配基间相互作用涉及到变构调节机制而产生负协同效应。

## 2.4 肽-肽相互作用分析

反义肽是由反义 RNA 编码和翻译的肽,可与正义肽发生专一性相互作用,正义肽与反义肽的这种特异性结合研究已应用于活性肽的筛选、生化分离领域以及降低过敏反应的免疫学研究领域等,通过分子相互作用分析筛选获得具有高亲和力和选择性的靶向反义肽,将具有发展成为诊断试剂、生物药物、疫苗,或者开发新分析方法的前景。Štambuk 等<sup>[22]</sup>以人红细胞生成素羧基端的受体结合肽 LKLYTGEACRTGDR 作为正义肽,设计并通过计算机筛选确定了靶向该肽段的反义肽 DFDIW-PLRTAWPLS,采用 MST 方法分析了正义肽与反义肽间结合的 Kd 值为 816  $\mu$ mol/L,与采用 FP 方法测得的 Kd 值 850  $\mu$ mol/L 基本相当。人红细胞生成素反义肽的筛选有望发展一种新的免疫化学方法,该方法可避免糖基化和序列修饰引起的结合问题。

人 SH2 携带蛋白(含有 SH2 结构域的 76kDa 的白细胞蛋白,SLP-76)在 T 细胞免疫活性中发挥重要作用。Liu 等<sup>[23]</sup>通过 MST 技术确定了 SLP-76 依赖于其 N 端的 SAM 结构域而形成寡聚体结构(二聚体或者四聚体)进而激发 T 细胞免疫活性。采

用未标记 SLP-76 SAM 肽对恒定浓度的 SLP-76 SAM 标记肽进行滴定, 获得单体二聚化的  $K_d$  为  $2.5 \mu\text{M}$ , 从而揭示了 SLP-76 的 N 端 SAM 结构域在形成寡聚体进而激发 T 细胞免疫活性方面具有重要作用。

### 2.5 蛋白-核酸相互作用分析

核酸适配子作为抗病毒药物具有良好的应用前景。Varizhuk 等<sup>[24]</sup>将凝血酶适配子(thrombin binding aptamer, TBA) TBA15 和 TBA31 进行三氮杂茂键修饰, 合成了系列类似物 A1~A8。三氮杂茂键修饰的适配子可对抗核酸酶降解, 具有类似于反义核苷酸药物的作用。作者采用 MST 方法测定了适配子与凝血酶的结合亲和力, 从中筛选获得亲和力较高的 A4 适配子, 有望发展为抗病毒药物。

具有高亲和力的核酸适配子也可作为检测试剂。Liu 等<sup>[25]</sup>设计了一种可以灵敏特异和快速检测人  $\alpha$ - 凝血酶的适配子悬浮阵列检测平台。用 MST 技术分析了两种适配子 TBA1、TBA2 与凝血酶结合的  $K_d$  分别为  $44.2 \text{ nM}$ 、 $15.5 \text{ nM}$ , 该研究基于 TBA 与凝血酶间的高亲和力原理而建立的适配子悬浮阵列检测平台在临床领域将具有广泛的应用前景。

Stoltenburg 等<sup>[26]</sup>采用 FluMag-SELEX 技术获得一种靶向蛋白 A 的 DNA 适配子。采用 MST 技术研究了 DNA 适配子与蛋白 A 的结合作用, 表明了蛋白 A 上只有一个适配子结合位点, 并可能与免疫球蛋白的结合位点重合。通过对不同核苷酸长度的适配子片段与蛋白 A 的亲和力筛选, 获得与重组蛋白 A 和天然蛋白 A 亲和力均较高的适配子, 该适配子可应用于蛋白 A 检测和亲和纯化实践中。

在真核细胞转录起始步骤中, 转录因子 II D(TF II D)可结合到基因启动子的 TATA 框, 引起 RNA 聚合酶 II 起始复合物的形成。TATA 结合蛋白(TATA binding protein, TBP)是 TF II D 的核心蛋白, 可直接结合于 TATA 框, 因此在真核细胞转录过程中具有重要作用。Silvers 等<sup>[27]</sup>采用 MST 方法测定 TBP 与 DNA 的结合能力来检测大肠杆菌表达纯化 TBP 的活性, 测得  $K_d$  为  $5.98 \text{ nM}$ , 与人和酵母 TBP 与 DNA 结合的  $K_d$  值( $2\sim5 \text{ nM}$ )相当。

### 2.6 核酸适配子-小分子相互作用分析

适配子是一种可识别多种靶分子的重要的多功能生物分子。采用其他方法研究适配子与代谢物、小分子药物间的相互作用研究还存在一定困难, 而 MST 方法可微量快速地在溶液中分析小分子与适配子的结合参数。Entzian 等<sup>[28]</sup>采用 MST 技术进行了 ATP 适配子 DH25.42 (5-Cy5-CCTGGGGGAG-TATTGCGGAGGAAGG-3') 与 ATP 分子腺嘌呤的结合研究。测得 ATP、ADP、AMP、SAM、dATP、腺嘌呤与适配子结合的  $EC_{50}$  值介于  $34.4\sim68.4 \mu\text{M}$  之间。Martin 等<sup>[29]</sup>采用 SELEX 技术获得一种靶向应力生物标志物皮质醇的 DNA 适配子, 测得的  $K_d$  为  $16.1 \mu\text{M}$ , 与平衡透析法测得的  $K_d$  ( $6.9 \mu\text{M}$ ) 值较为接近。

## 3 小结与展望

在现代药物发现过程中, 合理优化的分子间作用非常重要。但是采用目前的生物物理学方法测定低至  $\text{nM}$  甚至  $\text{pM}$  级别的  $K_d$  值仍然存在较大困难<sup>[30]</sup>。表面等离子偏振(surface

plasmon resonance, SPR) 技术被广泛用于检测高亲和力结合, 然而, 该方法需要将分子固定, 在结合动力学过程中出现表面依赖性改变, 以及大多数高亲和结合中速率极端变慢, 常导致亲和力的高估<sup>[31]</sup>。等温滴定量热(isothermal titration calorimetry, ITC)方法通常依赖于结合反应中释放的热量, 生物分子的浓度至少应达到  $10 \text{ nM}$ , 因而很难准确检测  $\text{nM}$  级别的  $K_d$  值<sup>[32]</sup>。SPR 和 ITC 技术也不能用来研究复杂液体中的相互作用。另外, 一些传统的检测荧光分子的方法, 例如荧光偏振(fluorescence polarization, FP)技术需要标记分子发生结合反应后具有较大的尺寸变化, 以及测定时间较长。动态光散射(dynamic light scattering, DLS)技术要求游离与结合后的分子之间具有显著的水合半径差异, 因而对于两个蛋白质间的结合作用检测较两个小分子间的结合作用检测的灵敏度要低。MST 技术可实现在溶液中进行相互作用检测, 不需要分子固定, 可避免结合假阳性; 不需要对 FP、SPR 技术所要求的相互作用分子大小或者质量方面进行选择; 也没有类似于 DLS 技术所涉及的针对两个相互作用分子的质量要求。在标准 MST 检测流程中, 其中 1 个分子为荧光标记分子, 另外, 也可以采用无标记模式, 利用相互作用的蛋白分子内在的紫外-荧光特性进行检测。

MST 技术将荧光检测的精确性和热泳动的差异性及灵敏性结合起来, 提供了一种灵活、稳定和快速检测分子间相互作用的方法, 在分析分子相互作用中有独特的优势, 不依赖于分子大小、种类的影响, 甚至水化层的微小变化也可检测到; 可检测溶液中低至  $\text{pM}$  浓度的分子间相互作用; 样品消耗量在  $\mu\text{L}$  级; 可以在复杂缓冲液中包含血浆和细胞裂解液中进行结合分析; 还可以分析结合模式和位点数、蛋白解聚、热力学和酶反应动力学等, 是一种强大的详细研究生物分子特征的强有力工具。

在生命科学的众多领域已经成功使用 MST 技术进行了不同生物分子间的相互作用定量分析研究。通过探讨分子间有无结合、结合位点数量、分子间相互作用亲和力等, 可为配体、底物、疾病靶点的确定和靶物筛选、浓度分析等提供基础, 因此, MST 技术在药物筛选、信号转导、分子检测和医学诊断等生命科学领域的应用发展迅速, 对推动基础生物医学研究和更好的药物开发将产生重要作用。随着该技术的不断完善, MST 技术在生命科学研究领域将具有广阔的应用前景。

### 参考文献(References)

- [1] Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, et al. Microscale thermophoresis: interaction analysis and beyond [J]. J Mol Struct, 2014, 1077: 101-113
- [2] Mao YX, Yu LL, Yang R. A novel method for the study of molecular interaction by using microscale thermophoresis [J]. Talanta, 2015, 132: 894-901
- [3] Zillner K. In: Kaufmann M, Klinger C eds. Functional genomics: methods and protocols, methods in molecular biology [M]. Berlin: Springer Science+Business Media LLC, 2012, 815: 241-252
- [4] Scheuermann TH, Padrick SB, Gardner KH, et al. On the acquisition and analysis of microscale thermophoresis data [J]. Anal Biochem, 2016, 496: 79-93
- [5] Seidel SAI, Dijkman PM, Lea WA, et al. Microscale thermophoresis

- quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions[J]. *Methods*, 2013, 59: 301-315
- [6] Zhang XP, Zhang L, Zhang J, et al. Design, synthesis and preliminary activity evaluation of novel 3-amino-2-hydroxyl-3-phenylpropanoic acid derivatives as aminopeptidase N/CD13 inhibitors [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2013, 28(3): 545-551
- [7] Davis MI, Gross S, Shen M, et al. Biochemical, cellular, and biophysical characterization of a potent inhibitor of mutant isocitrate dehydrogenase IDH1[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(20): 13717-13725
- [8] Syntia F, Nehmé R, Claude B, et al. Human neutrophil elastase inhibition studied by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection and microscale thermophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1431: 215-223
- [9] Winiewska M, Kucińska K, Makowska M, et al. Thermodynamics parameters for binding of halogenated benzotriazole inhibitors of human protein kinase CK2 $\alpha$  [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1854 (10 Pt B): 1708-1717
- [10] Wasik R, Winska P, Poznański J, et al. Isomeric mono-, di-, and tribromobenzo-1H-triazoles as inhibitors of human protein kinase CK2  $\alpha$ [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48898
- [11] Shirokova E, Raguse JD, Meyerhof W, et al. The human vomeronasal type-1 receptor family- detection of volatiles and cAMP signaling in HeLa/Olf cells[J]. *FASEB J*, 2008, 22: 1416-1425
- [12] Corin K, Baaske P, Geissler S, et al. Structure and function analyses of the purified GPCR human vomeronasal type 1 receptor 1 [J]. *Sci Rep*, 2011, 1: 172; doi: 10.1038/srep00172
- [13] Corin K, Baaske P, Ravel DB, et al. A robust and rapid method of producing soluble, stable, and functional G-protein coupled receptors [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e23036
- [14] Corin K, Baaske P, Ravel DB, et al. Designer lipid-like peptides: A class of detergents for studying functional olfactory receptors using commercial cell-free systems[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e25067
- [15] Wang XQ, Corin K, Baaske P, et al. Peptide surfactants for cell-free production of functional G protein-coupled receptors[J]. *PNAS*, 2011, 108(22): 9049-9054
- [16] Langelueddecke C, Roussa E, Fenton RA, et al. Expression and function of the lipocalin-2 (24p3/NGAL) receptor in rodent and human intestinal epithelia[J]. *PLoS one*, 2013, 8(8): e71586
- [17] Basters A, Geurink PP, Oualid FE, et al. Molecular characterization of ubiquitin-specific protease 18 reveals substrate specificity for interferon-stimulated gene 15[J]. *FEBS J*, 2014, 281: 1918-1928
- [18] Dijkman PM, Watts A. Lipid modulation of early G protein-coupled receptor signalling events [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848: 2889-2897
- [19] Fedosyuk S, Grishkovskaya I, de Almeida Ribeiro E Jr, et al. Characterization and structure of the vaccinia virus NF- $\kappa$ B antagonist A46[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(6): 3749-3762
- [20] Olling A, Hüls C, Goy S et al. The combined repetitive oligopeptides of clostridium difficile toxin A counteract premature cleavage of the glucosyl-transferase domain by stabilizing protein conformation [J]. *Toxins*, 2014, 6: 2162-2176
- [21] Takacs M, Petoukhov MV, Atkinson RA, et al. The asymmetric binding of PGC-1 $\alpha$  to the ERR $\alpha$  and ERR $\gamma$  nuclear receptor homodimers involves a similar recognition mechanism[J]. *PLoS one*, 2013, 8(7): e67810
- [22] Štambuk N, Manojlović Z, Turčić P, et al. A simple three-step method for design and affinity testing of new antisense peptides: an example of erythropoietin[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 9209-9223
- [23] Liu H, Thaker YR, Stagg L, et al. SLP-76 sterile motif (SAM) and individual H5 helix mediate oligomer formation for microclusters and T-cell activation[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 29539-29549
- [24] Varizhuk AM, Tsvetkov VB, Tatarinova ON, et al. Synthesis, characterization and in vitro activity of thrombin-binding DNA aptamers with triazole internucleotide linkages [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 67: 90-97
- [25] Liu YN, Liu N, Ma XH, et al. Highly specific detection of thrombin using an aptamer-based suspension array and the interaction analysis via microscale thermophoresis[J]. *Analyst*, 2015, 140: 2762-2770
- [26] Stoltenburg R, Schubert T, Strehlitz B. In vitro selection and interaction studies of a DNA aptamer targeting protein A [J]. *PLoS one*, 2015, 10(7): e0134403
- [27] Silvers R, Saxena K, Kudlinzki D, et al. Recombinant expression and purification of human TATA binding protein using a chimeric fusion [J]. *Protein Express Purif*, 2012, 85: 142-147
- [28] Entzian C, Schubert T. Studying small molecule-aptamer interactions using microscale thermophoresis (MST) [J]. *Methods*, 2016, 97: 27-34
- [29] Martín JA, Chávez JL, Chushak Y, et al. Tunable stringency aptamer selection and gold nanoparticle assay for detection of cortisol[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406: 4637-4647
- [30] Yamniuk AP, Newitt JA, Doyle ML et al. Development of a model protein interaction pair as a benchmarking tool for the quantitative analysis of 2-Site protein-protein interactions [J]. *J Biomol Tech*, 2015, 26: 125-141
- [31] Puiui M, Bala C. SPR and SPR Imaging: Recent trends in developing nanodevices for detection and real-Time monitoring of biomolecular events[J]. *Sensors*, 2016, 16: 870; doi:10.3390/s16060870
- [32] Makowska J, Wyrzykowski D, Hirniak P, et al. Investigations of copper (II) complexation by fragments of the FBP28 protein using isothermal titration (ITC) and differential scanning calorimetry (DSC) [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2015, 121: 263-268