

小分子抑制剂作用下蛋白激酶构象变化的实时探测

蛋白激酶构象变化应用案例

2020

目录

小分子抑制剂作用下蛋白激酶构象变化的实时探测	3
光镊探测蛋白构象变化的实验流程	4
蛋白的选择	4
蛋白的拴系	4
拴系蛋白的构象	5
小分子抑制剂AP5A诱使AdK蛋白关闭激活态	5
快速、简单的分析单分子实验	6
试剂及试剂盒-单分子实验伊始	6
实验流程-建立单分子实验	6
Harbor-脚本共享平台，自动化实验	7
总结	9
参考文献	9

小分子抑制剂作用下蛋白激酶构象变化的实时探测

以冷冻电镜为代表的结构生物学技术的迅猛发展，为科学家们理解蛋白质构象奠定了坚实的基础；电子显微技术的天然缺陷导致无法记录蛋白质的动态过程，蛋白质构象变化动力学的相关知识对于识别蛋白质相关功能至关重要，而动态单分子技术的相关应用正成为发现构象变化和蛋白质功能之间关系的关键。光镊依靠其高时间分辨的特性记录单个酶的瞬态变化和离散特性，成为研究单个蛋白质构象变化动力学的最优选择。

在结构生物学领域，传统的技术通过记录结构相关的图样揭示蛋白质过渡态和功能之间的关系，X射线晶体学、核磁共振（NMR）图谱和元二色谱也都为评估蛋白质的结构改变并建立其与功能之间的联系提供值得参考的数据。

然而，虽然了解蛋白构象和功能至关重要，但是这些方法提供的数据不足以了解蛋白质构象间变化的动力学过程，一方面大部分的功能分析依靠在可比较的自由能下过渡态的批量测试，另外一方面，结构分析仅提供不同蛋白质稳定态的图样，有可能没有办法获取非稳定的蛋白构象。通常来说，这两种方法是没有任何关系的，而科学家们通常依靠后期处理，建立两者之间的相关特向来理解结构与功能的关系。

以光镊为代表的单分子技术帮助科学家以纳米级别的分辨率测量蛋白质态间的瞬时变化的特征，解决了这些限制。LUMICKS C-Trap®光镊-荧光和无标记集成系统就是一种可以捕获蛋白，分析与结构功能特性的离散构象变化的仪器。动态单分子实验使您能直接建立蛋白质的功能和结构特性，例如在存在或者不存在酶特异性底物或小分子抑制剂的情况。作为进一步的扩展，与力谱相关联的成像系统可以在目标结构的构象变化时为您提供相关分子内或者分子间相互作用的额外实时信息。

这篇应用报告将向您介绍一种测量蛋白质动态和高度瞬态构象态并实时收集数据的新方法。他展示了如何使用C-Trap®光镊-荧光和无标记显微系统完成整个实验流程，我们还向您介绍支持和简化动态单分子实验已具备的功能，无论你的实验水平如何，都可以简单操作。

C-Trap产品特点

C-Trap是高性能光镊技术，荧光成像技术和高性能层流微流控技术的集成系统，是捕获、操纵和可视化蛋白质构象与功能特性。

光镊通过高度聚焦的激光束形成的光阱捕获束缚单个蛋白质的微米级微球，科学家可以通过移动微球拉伸蛋白或者释放施加的力来操纵束缚蛋白的构象变化。

实时成像技术在科学家进行力学操控时可视化束缚蛋白的结构的变化，例如，您可以在不同的蛋白位点处标记不同的荧光标记来记录蛋白质构象变化的距离（如smFRET显微镜）。

微流控技术可以提高实验流程，帮助您在独立的通道中任意添加试剂，没有物理阻碍并且高度分层的特性，帮助您轻松的控制研究目标在不同体系中移动。



光镊实时监测蛋白质构象变化的实验流程

蛋白的选择

蛋白激酶由于参与了多种慢性病，成为非常有吸引力的药物靶点之一。了解蛋白激酶的结构动力学并且评估结构对催化活性的影响有助于我们对酶转化的理解以及酶特异性抑制剂的开发。

本篇应用报告中，我们的研究对象为腺苷酸激酶（AdK），这是一种磷酸转移酶，通过腺嘌呤核苷酸之间转移磷酸基团来调节细胞能量稳态（图1）。Adk包含一个盖子结构域，该结构域在底物结合时关闭，使两种底物彼此靠近，随后激活酶。为了理解AdK的构象特性，我们研究了在双底物抑制剂存在的情况下打开和关闭盖子时的构象转变。

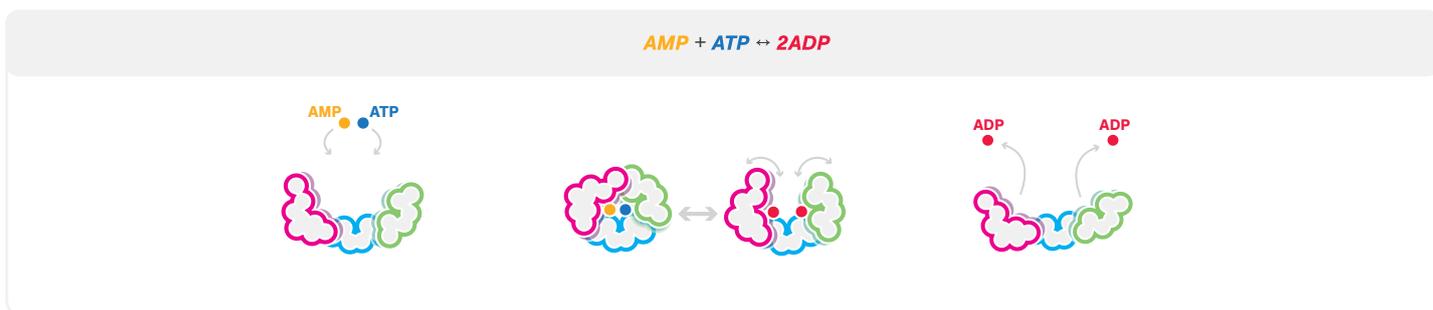


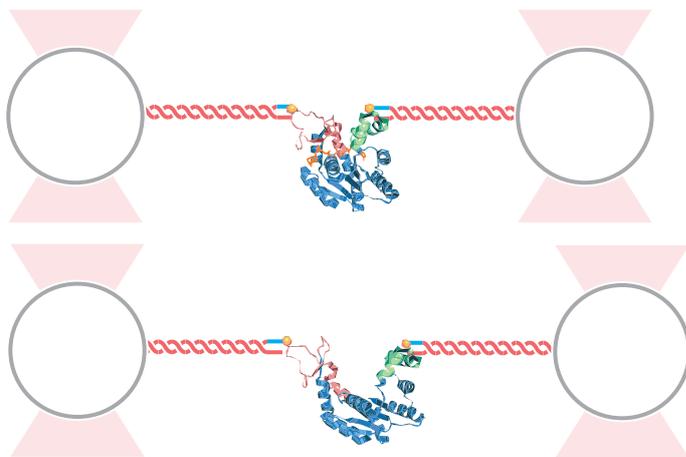
图1 展示了AdK蛋白催化时核苷酸AMP、ADP和ATP的可逆转化示意图，AMP和ATP的结合诱导催化盖子（红色和绿色区域）闭合，启动磷酸基转移，盖子的打开释放最终产物（两个ADP分子）。

束缚蛋白质

我们研究了小分子抑制剂AP5A对激酶构象变化的影响。AP5A将激酶构象向激活态（关闭）的方向推动。在使用光镊研究蛋白质分子的构象转变时，首先将蛋白质系在两个PS微球之间，形成所谓的哑铃型造型（图2），这种形状使得我们能够拉伸（展开）蛋白质并以纳米级别的精度测量蛋白质的构象变化。

为了在微球之间系住AdK，我们首先向蛋白内部引入点突变，在编号为42和144的位置插入半胱氨酸（cyteines）。选择这些整合位点原因是在盖子打开和关闭时测量距离的变化值是最大的。插入的半胱氨酸与马来酰胺功能化的DNA手柄链退火后形成蛋白质-DNA构建体，通过该构建体，复合物链接到C-Trap中两个被捕获的微球（参加下面的文本框）

图2 AdK蛋白以哑铃结构链接到两个PS微球之间，蛋白质通过链接的寡核苷酸*（蓝色）链接到两个微球上，寡核苷酸随后与DNA手柄上的互补链（红色）杂交，右侧微球的位移导致构象变化（下图）



蛋白标记主要分为三步，我们的最终目的是组装连接到两个529bp DNA手柄（5'端是高辛修饰和5'端生物素修饰）的蛋白质-DNA复合物，为后续C-Trap实验做准备。

- **第一步**，将带有马来酰胺或COA修饰的DNA寡核苷酸链接到目标蛋白质中各自的结合位点（半胱氨酸或者ybbR标签）
- **第二步**，从步骤1中过量的未反应寡核苷酸中纯化与两个寡核苷酸偶联的蛋白质（蛋白质-寡核苷酸复合物）
- **第三步**，各个寡核苷酸与DNA手柄的互补突出端杂交

步骤3的最终产物接下来在C-Trap微流控系统中分别与抗地高辛包被的微球和链霉素亲和素包被的微球连接。

蛋白质拴系结构的验证

在制备好上述的哑铃型结构之后，我们需要进行验证以保证蛋白拴系结构的正确构建。拴系结构的验证是通过将两个光学捕获的微球彼此分开以达到系绳的预期轮廓长度，即其最大延伸长度来实现的。随后使用更大的拉力使蛋白质展开，力谱曲线主要表征为拉力的快速衰减和拴系复合结构延伸结构的增加。图3显示了大约360nm的总轮廓长度，这对应于蛋白质和DNA手柄链的预期组合程度。测量得出的长度证实了蛋白质-DNA构建体和两个微球之间已经产生稳定和适当的拴系结构。

也可以通过相同的设置测量完全延伸后的距离变化来揭示单独拴系蛋白质的轮廓长度，将蛋白质展开到其最大延伸长度后，轮廓长度的差异为21.6nm +1.14nm 图3），这个结果与文献[1]中得到的结果一直。

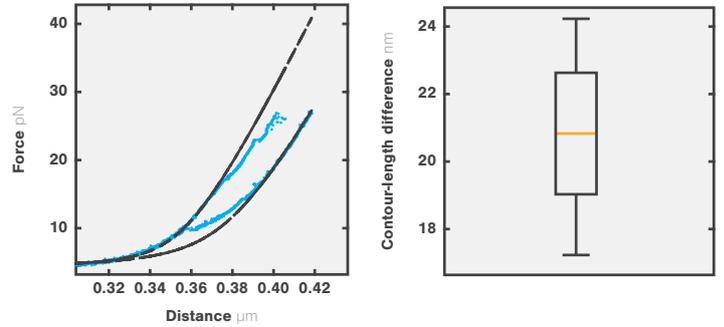


图3左图为增加施加在微球上的拉力时，被捕获蛋白（相关的寡核苷酸和DNA手柄）轮廓长度的变化图；右图为，蛋白质本身轮廓长度变化的箱式线图。

小分子抑制剂AP5A诱导Adk关闭激活态

为了研究AdK的平衡动力学并评估与展开和闭合构象状态相关的特性。我们以较低的恒定拉力（6到10pN）拉伸蛋白质。在这些拉力下，分子处于连续变化的过渡状态，我们能够获得在盖子打开和关闭过程中结构变化相对应的长度。我们还研究了AdK特异性抑制剂AP5A处理后两种态之间的平衡动力学，以了解其作用机制和对激酶构象特性的影响。

与文献1中报道的结果一致，AdK蛋白在没有AP5A时保持着独特的开放态构象，这可能是其固有的蛋白质特性。相比之下，在存在50nM的AP5A的环境中，我们可以随时间测量AdK的双态构象变化动力学，具体来说，我们测量了打开和关闭态之间大约有2nm的距离变化（图4）。这些实验数据证明了C-Trap如何从动态变化的过程中提起数据，从而以纳米级别的精度揭示蛋白质的构象特性，例如双态之间的距离变化。

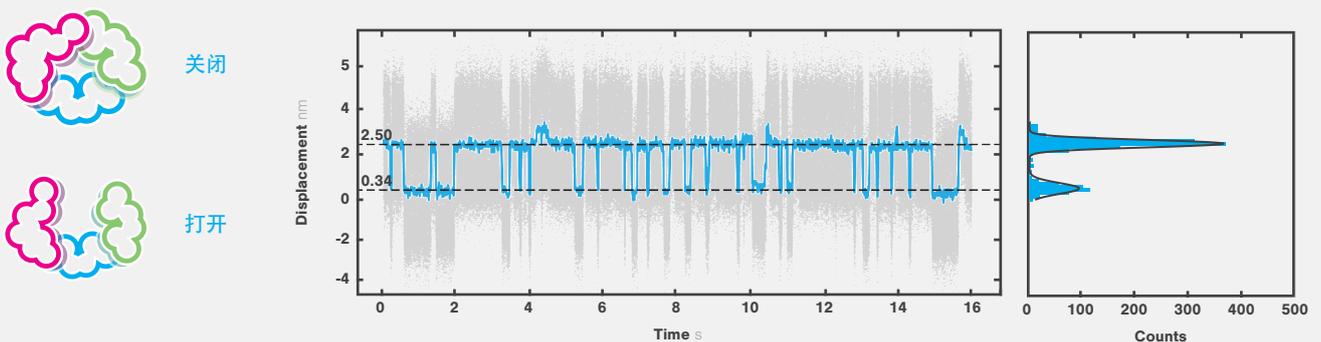


图4 在50nM的AP5A的环境中，在使用较低拉力拉动蛋白拴系结构时打开态和闭合态之间的距离位移，虚线表示在打开态和闭合态下的微球平均位移。

简单、快速的分析单分子实验数据

LUMICKS公司提供实验所需的试剂盒、试剂、软件和自动化脚本支持本报告中提到的完整工作流程，加速您的实验进程和更快的获得实验结果。我们研发的C-Trap系统及基于其的完整工作流程，保证任何的实验操作人员都能在半小时内设置实验流程并且成功执行。以下描述的功能优化了动态单分子实验操作流程，即使您没有任何的单分子相关经验，也可以完整的完成整个实验流程。

■ 试剂和试剂盒- 开启您的实验

LUMICKS提供多种试剂盒，确保您可以轻松的制备样品和执行实验；并且需要说明的是，这些试剂以及针对基于C-Trap相关的实验进行专门优化，您无需专门调配试剂的浓度。本报告提到的这项研究中，我们使用蛋白质控系试剂盒（半胱氨酸）连接DNA手柄和AdK，然后将复合物与两个被捕获的微球相连。请访问www.store.lumicks.com了解更多实验信息。

■ 实验流程-设计您的单分子实验

微流控系统内的流通池中有五个独立的层流通道——其中没有任何物理阻隔——您可以自由选择通道注入您的试剂。您可以轻松在通道之间移动光镊，组装实验结构并在不同的实验体系中执行实验。

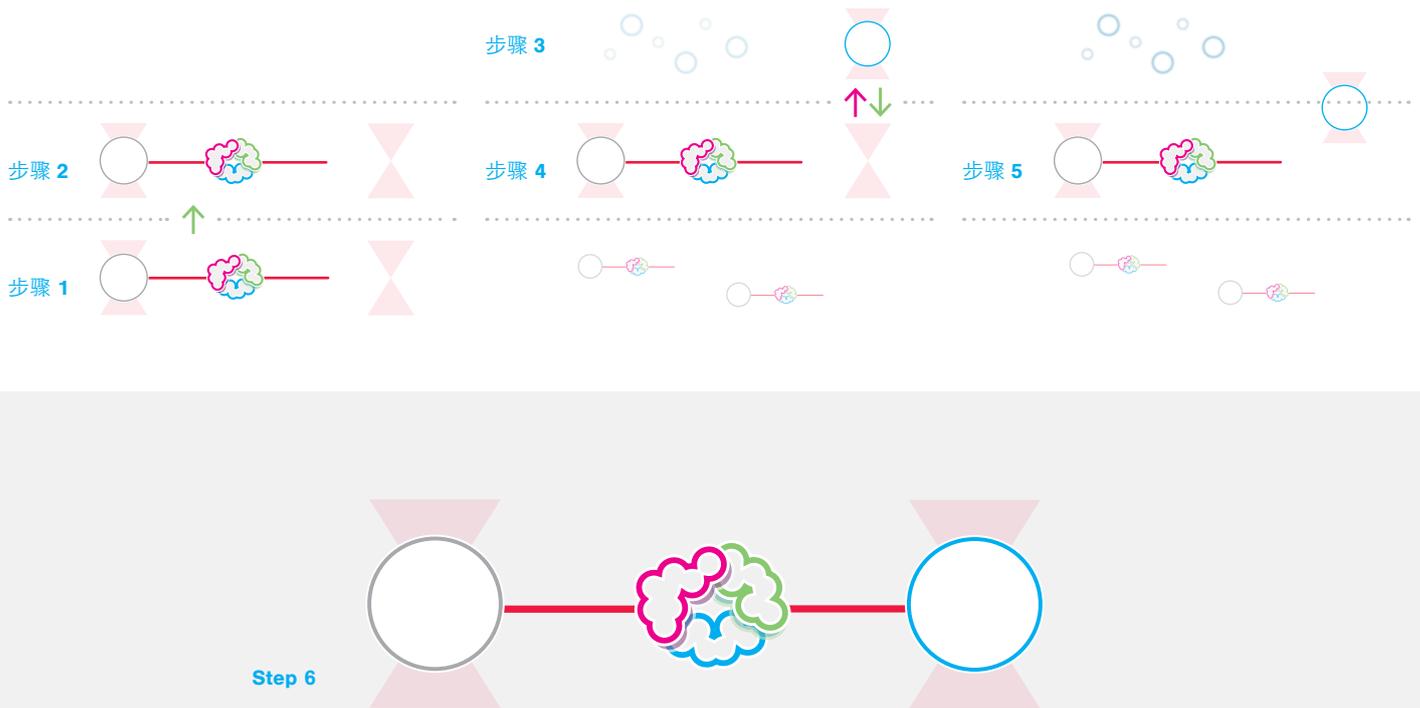


图4 C-Trap微流控系统中蛋白质控系结构制备流程示意图，整个流程有自动化脚本操控允许。步骤1，在一定的流速下捕获和定位携带蛋白质的微球，步骤2，将被捕获的微球重新移动到流动池的新（缓冲液）通道中，步骤3和4，从上通道捕获功能化微球并将此微球移动到缓冲通道中，步骤5，停止流动，将两个微球相互靠近以进行控系，步骤6，最终的哑铃型结构。

Harbor——脚本共享社区，自动化您的实验流程

LUMICKS的脚本平台是一个共享社区平台，任何的用户都可以在其中发布、下载、查看和引用脚本，从而实现自动化蛋白测量实验和分析实验数据。初学者和专家都可以加入C-Trap用户的脚本社区，下载和上传经过LUMICKS应用科学家和社区用户审查的脚本。这些脚本可以直接用于Bluelake软件，自动化您的实验流程和轻松分析您的实验数据。请访问www.harbor.lumicks.com了解更多有关该平台的相关信息。

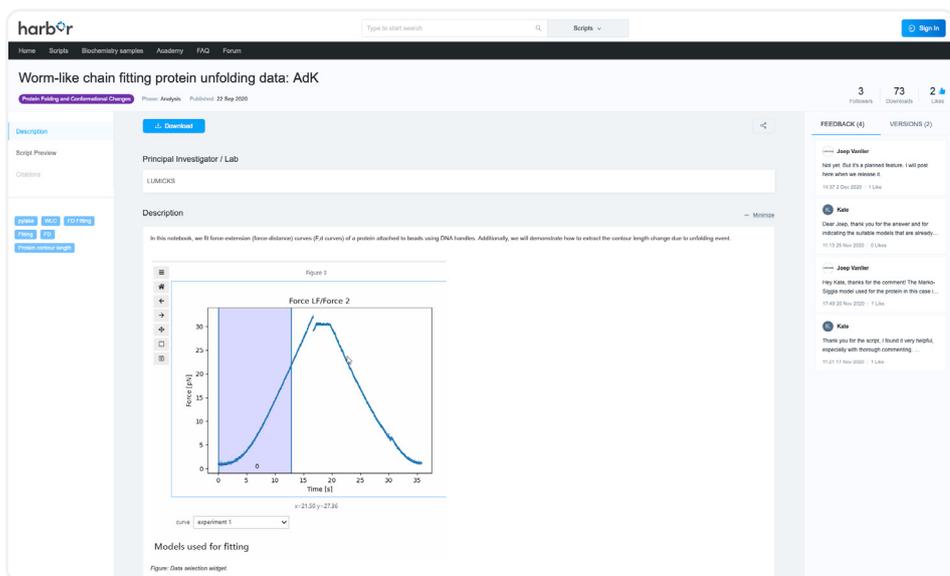


图6 Harbor网页截图，其中包括了已上传的脚本。此脚本用来实现C-Trap平台动态单分子实验的自动操作。您可以到我们的网站www.harbor.lumicks.com获得更多的脚本。

结论

单分子技术过去仅限于物理学家领域，但他们现在是可以提高我们对分子生物学知识的强大工具，LUMICKS公司设计了基于C-Trap的工作流程，使所有背景的用户都能从第一天开始演示并获取实验结果。

这篇报告旨在评估功能化激酶的构象变化，并展示该方法如何帮助我们更好的了解构象与功能之间的关系。上述的结果已经证实，C-Trap的高分辨率测量可以记录瞬态和微小的构象动力学变化，解析与酶活性相关的能力景观。

C-Trap系统与突出特定蛋白结构域的结构和动力学方法的结合进一步扩展和提升构象分析的结果，其中最为突出的方法为单分子荧光共振能量转移（smFRET）显微成像技术依靠相邻荧光分子的能量转移，评估构象间的距离变化，其有效范围在1-10nm²，这两种技术的集成为我们提供对特定域分子内部和分子间动力学的的数据信息，与传统结构生物学技术互为补充，让实验数据更完整。

通过C-Trap®光镊等动态单分子方法获得的结果将有助于我们理解蛋白质力学的复杂性，还可能最终用作开发针对疾病的高度特异性和有效治疗药物的筛选工具。

相关文献

1. Pelz B, Žoldák G, Zeller F, Zacharias M, Rief M. Subnanometre enzyme mechanics probed by single-molecule force spectroscopy. Nat Commun. 2016.
2. Holden SJ, Uphoff S, Hohlbein J, Yadin D, Le Reste L, Britton OJ, et al. Defining the limits of single-molecule FRET resolution in TIRF microscopy. Biophys J. 2010.

info@lumicks.com

www.lumicks.com

Or find us on:



LUMICKS HQ

Pilotenstraat 41
1059 CH Amsterdam, The Netherlands
+31 (0)20 220 0817



LUMICKS Americas

800 South Street, Suite 100
Waltham, MA 02453, USA
+1 781 366 0380



LUMICKS 亚太

中国北京市朝阳区东三环中路20号 乐成
中心A座 577房间
电话: +86 (0)10 58783028

All content and images used in this document are owned or licensed by LUMICKS Technologies B.V and/or its subsidiaries (LUMICKS)!. Unauthorized use is prohibited. Any information provided herein by LUMICKS is made available "as is" and [you] understand and agree that such information is made available without any representation or warranty, express or implied, including any implied warranty of merchantability, satisfactory quality or fitness for any particular purpose or any warranty that the use of such information will not infringe or violate any patent or other proprietary rights of any third party.

For the latest product information please consult us directly. C-Trap®, m-Trap®, AFS®, u-Flux™, Bluelake™, z-Movi®, LUMICKS and the LUMICKS logo are registered trademarks of LUMICKS.

© LUMICKS. Amsterdam, The Netherlands.

LUMICKS