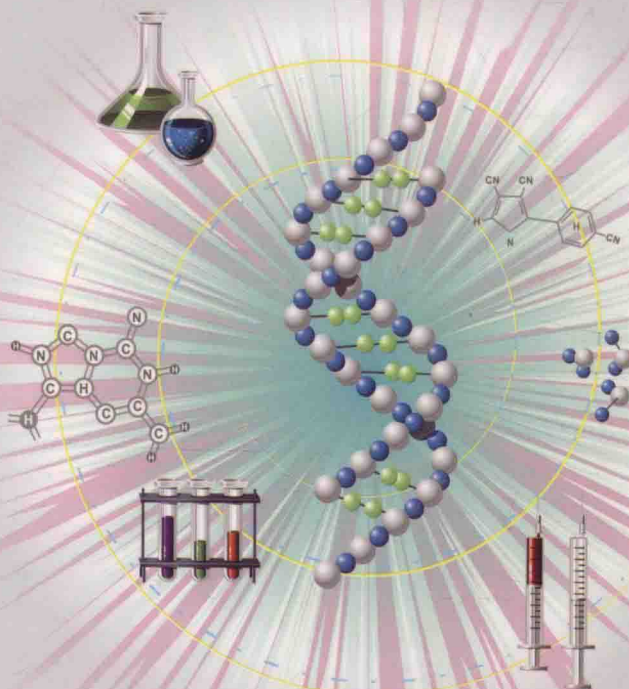


◆ 高校核心实验课程丛书 ◆

化学生物学实验

Chemical Biology Experiments

刘 磊 陈 鹏 李宜明 等 编著



中国科学技术大学出版社

◆ 高校核心实验课程丛书 ◆

化学生物学实验

Chemical Biology Experiments

编 著 者

刘 磊 (清华大学)

陈 鹏 (北京大学)

李宜明 (合肥工业大学)

田长麟 (中国科学技术大学)

赵 劲 (南京大学)

石 景 (中国科学技术大学)

李笑宇 (北京大学)

陈永湘 (清华大学)

向 宇 (清华大学)

刘冬生 (清华大学)



中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

化学生物学 (Chemical Biology) 是近年来国际上兴起的化学与生物学、医学高度交叉结合的新兴研究领域。该学科通过充分发挥三种学科交叉的优势,能够揭示传统生物学所不能发现的新现象与新规律,更加深入和精准地阐明生命体内的分子功能与作用机制,促进新药、新靶标及新的药物作用机制的发现,并在发展生物医学应用的基础上开拓化学研究的视野和内容。

本书主要对化学生物学的一些重要实验技术进行讲解。全书包括 6 个实验,分别介绍化学生物学学科中 6 种重要的实验技术及其涉及的背景知识,包括蛋白质的合成与小分子调控、利用生物分子诱导化学反应、药物靶点的发现与鉴别以及活体标记和荧光成像技术等。

本书适合作为高年级本科生、研究生及相关领域研究人员的教学用书或参考书。

图书在版编目(CIP)数据

化学生物学实验/刘磊,陈鹏,李宜明等编著. —合肥:中国科学技术大学出版社, 2015.8

ISBN 978-7-312-03728-3

I. 化… II. ①刘…②陈…③李… III. 生物化学—实验—高等学校—教材
IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 186880 号

出版 中国科学技术大学出版社
安徽省合肥市金寨路 96 号,230026
网址: <http://press.ustc.edu.cn>
印刷 合肥万银印刷有限公司
发行 中国科学技术大学出版社
经销 全国新华书店
开本 710 mm×960 mm 1/16
印张 9.25
字数 176 千
版次 2015 年 8 月第 1 版
印次 2015 年 8 月第 1 次印刷
定价 32.00 元

前 言

化学生物学是通过化学与生命科学的不断交融,于20世纪90年代中期形成的一门新兴前沿交叉学科。在后基因组时代的过去十多年中,化学生物学在新药创制、基因组学、蛋白质组学以及表观遗传等领域的研究中扮演着举足轻重的角色。1996年,哈佛大学率先成立化学与化学生物学系,从而拉开了化学生物学学科研究与教学体系快速发展的序幕。目前,化学生物学已经成为现代化学课程的必要组成部分。

在我国,北京大学化学与分子工程学院首先成立了化学生物学系,清华大学也于2003年设立了化学生物学基础科学班。此后,我国许多高校相继成立了化学生物学方向的实验室和研究所,并开展了化学生物学专业的教学。为了适应化学生物学的教学要求,笔者所在的院校都开设了相关的理论课程。然而,作为一门强调实验技术的学科,仅有理论课程的教学难以满足现代大学教学的需求,因此有必要开设化学生物学的实验课程。为此,笔者所在单位通过讨论与合作,集体设计了一套适合本科高年级学生及研究生使用的化学生物学实验课程,并编写了本书。

本书介绍了6个化学生物学实验,包括:生物大分子的固相合成与质谱分析,蛋白质连接反应与蛋白质半合成,非天然氨基酸的定点嵌入与标记,DNA模板控制的点击化学反应,蛋白质聚集及小分子对其抑制作用,小分子探针在药物靶点鉴定中的应用。这些实验具有代表性,涵盖了当今化学生物学主流领域的研究前沿和常用的实验室技术,每个实验均经过了教学实践验证,可操作性强,适用于高年级本科生的实验课程。

在每个实验部分,除了翔实的实验操作过程外,还包含了与该实验紧密相关的知识背景及前沿进展。具体来说,“生物大分子的固相合成与质谱分析”实验希望学生能够理解多肽固相合成的原理、多肽/蛋白质药物及生物

目 录

前言	(i)
实验 1 生物大分子的固相合成与质谱分析	(1)
1.1 背景知识	(1)
1.1.1 生物大分子及其获取方法	(1)
1.1.2 多肽固相合成流程	(3)
1.1.3 生物大分子的质谱分析	(4)
1.2 实验设计	(7)
1.3 实验操作	(11)
1.3.1 仪器试剂	(11)
1.3.2 实验步骤	(14)
1.4 分析讨论	(18)
1.4.1 氨基酸偶联时间对产率的影响	(18)
1.4.2 切割时间的影响	(19)
1.4.3 多肽粗产品的分离	(19)
1.4.4 其他方法	(20)
1.5 总结与思考题	(21)
参考文献	(22)
实验 2 蛋白质连接反应与蛋白质半合成	(24)
2.1 知识背景	(24)
2.1.1 蛋白质生物表达的基本原理	(24)
2.1.2 蛋白质半合成基本原理	(26)
2.1.3 Intein 基本原理	(29)
2.2 实验设计	(32)

2.3 实验操作	(34)
2.3.1 仪器试剂	(34)
2.3.2 实验步骤	(37)
2.4 分析讨论	(43)
2.4.1 Intein 融合蛋白的表达效率	(43)
2.4.2 脱盐效率对 Ub-AMC 活性的影响	(43)
2.5 总结与思考题	(43)
参考文献	(44)
实验 3 非天然氨基酸的定点嵌入与标记	(47)
3.1 背景知识	(47)
3.1.1 合成生物学	(47)
3.1.2 天然蛋白质中引入非天然氨基酸的基本原理	(48)
3.1.3 含有非天然氨基酸蛋白质的应用	(50)
3.2 实验设计	(52)
3.3 实验操作	(56)
3.3.1 仪器试剂	(56)
3.3.2 实验步骤	(61)
3.4 分析讨论	(66)
3.4.1 引入非天然氨基酸蛋白质的表达效率	(66)
3.4.2 脱盐对点击化学反应的影响	(66)
3.5 总结与思考题	(67)
参考文献	(68)
实验 4 DNA 模板控制的点击化学反应	(71)
4.1 背景知识	(71)
4.1.1 DNA	(71)
4.1.2 核酸编码文库	(71)
4.1.3 核酸模板控制的化学反应	(76)
4.2 实验设计	(80)
4.3 实验操作	(84)
4.3.1 仪器试剂	(84)
4.3.2 实验步骤	(89)
4.4 分析讨论	(94)

4.5 总结与思考题	(95)
参考文献	(96)
实验 5 蛋白质聚集及小分子对其抑制作用	(98)
5.1 背景知识	(98)
5.1.1 蛋白质的结构生物学	(98)
5.1.2 蛋白质结构与重要人类疾病的关系	(101)
5.1.3 Tau 蛋白介导阿尔兹海默症的机理及相关药物	(102)
5.2 实验设计	(103)
5.3 实验操作	(106)
5.3.1 仪器试剂	(106)
5.3.2 实验步骤	(108)
5.4 分析讨论	(111)
5.5 总结与思考题	(112)
参考文献	(113)
实验 6 小分子探针在药物靶点鉴定中的应用	(117)
6.1 背景知识	(117)
6.1.1 基于活性的蛋白质谱学方法	(117)
6.1.2 小分子调控蛋白活性	(119)
6.2 实验设计	(126)
6.3 实验操作	(128)
6.3.1 仪器试剂	(128)
6.3.2 实验步骤	(131)
6.4 分析讨论	(134)
6.4.1 实验设计及教学安排	(134)
6.4.2 荧光基团性质对实验结果的影响	(134)
6.5 总结与思考题	(135)
参考文献	(136)

实验 1 生物大分子的固相合成与质谱分析

1.1 背景知识

1.1.1 生物大分子及其获取方法

生物大分子是指生物体内分子量较大的有机分子,它是生命运动所依赖的重要化学物质。常见的生物大分子包括多肽与蛋白质、核酸、糖类、脂类。首先,生物体内氨基酸在核糖体中经过脱水缩合形成多肽,一些多肽在体内发挥信号分子的作用。多肽链经过折叠及翻译后修饰形成蛋白质,蛋白质是生物体功能的主要实现者,涵盖了生命活动的各个方面。其次,核酸是由核苷酸脱水缩合形成的磷酸二酯聚合物,用于生物遗传信息的储存与传递,主要分为脱氧核糖核酸和核糖核酸。再次,生物体内一些单糖分子通过化学键结合在一起形成寡聚糖,通常作为细胞表面标记或者信号分子。大量的单糖连接在一起形成多聚糖(糖原、淀粉、纤维素),是生物体主要的能量储存物质与结构成分。此外,生物体内的脂类包括蜡、磷脂(细胞膜的主要组成成分)、鞘脂、糖脂、萜类化合物等。生物体内的生物大分子密切配合,共同参与各种生命过程,因此研究生物大分子的结构和功能对于了解生命现象、阐明生命的分子机制、研究疾病的化学起因与调控等至关重要。针对生物大分子研究的一个关键步骤就是获得高纯度的生物大分子。这里以蛋白质为例介绍生物大分子的获取方法。

蛋白质的主要获取途径可以大致分为内源提取、重组表达和化学合成三类。内源提取是最为古老的方法,直截了当。然而有些蛋白质在生物体中含量很低,或内源生物物种珍贵,这些蛋白质用内源提取无法获取足够的量。因此,基因重组表达是目前获取生物大分子的主要途径,本书将在后续的实验中予以介绍。从生物体中获得的大部分蛋白质可以溶解在水、稀盐、稀酸或稀碱溶液中,少数脂蛋白可以溶于乙醇、丙酮或丁醇等有机溶剂。因此,可采用不同溶剂提取、分离及纯化某

方法中,C 端多肽硫酯与 N 端半胱氨酸肽在中性水溶液条件下实现了高效、高选择性的连接反应。为了拓展该技术的实用范围,人们尝试发展了很多新的策略以满足其对于多肽硫酯和半胱氨酸的需求,近期的一个进展是利用 C 端酰肼代替硫酯进行酰肼-半胱氨酸连接的技术^[3]。在弱酸的条件下,多肽酰肼被亚硝酸盐氧化为酰基叠氮,然后在芳基硫醇的催化作用下原位转化为硫酯,并与 N 端半胱氨酸反应进行片段连接。

将分别通过化学合成与生物重组表达的多肽或蛋白质片段进行连接形成目标蛋白质的方法称为蛋白质的半合成^[4]。蛋白质半合成最常用的技术是表达蛋白质连接。表达蛋白质连接利用蛋白质剪切技术,通过硫醇解离适当的突变蛋白质-内含肽融合体,生成蛋白质硫酯片段,进一步用于自然化学连接。蛋白表达连接方法可以在蛋白质中引入多个非天然氨基酸,并且可以进行特定多位点的修饰(图 1-1)。

1.1.2 多肽固相合成流程

1963 年,美国洛克菲勒大学的 Merrifield 教授发展出了多肽固相合成技术,并因此于 1984 年获得诺贝尔化学奖。多肽固相合成,即将氨基酸的 C 末端固定在固相载体(如不溶性树脂)上,然后依次缩合氨基酸,延长肽链,合成蛋白质。较常使用的树脂有氯树脂、Wang 树脂、Rink Amide 树脂等,在使用时一般需用 DMF 和 DCM 1 : 1 浸泡 30 min,然后添加第一个氨基酸。Wang 树脂、Rink Amide 树脂在添加第一个氨基酸时用 HCTU/HBTU 等缩合剂活化 1 min 后加进反应体系中,而氯树脂的第一个氨基酸则不需用 HCTU/HBTU 缩合剂活化,直接添加少量 DIEA 反应 1 h,之后的每次添加均正常。在固相合成中,每步反应后只需通过简单的固液分离手段,就能实现在液相中的反应原料与固定在固相载体上的产物的分离,从而达到纯化目的。与传统液相方法相比,固相合成由于操作简单、效率较高,在多肽合成中被广泛应用。

在固相合成中,根据氨基酸氨基临时保护基的不同,主要有 Boc 法和 Fmoc 法。早期,Merrifield 用 Boc 暂时保护 α -氨基,随后使用三氟乙酸(TFA)脱除保护基,随后进行缩合,而当肽链合成完毕后,需要用高腐蚀、高危险性的溶剂 HF(氟化氢)进行裂解处理。1972 年,Carpino 首次将 Fmoc 用于 α -氨基的保护,在合成肽链过程中使用 20%的哌啶溶液脱除 Fmoc 保护基,最后使用 TFA 进行裂解^[5]。

两种方法相比,Boc 方法中因反复使用 TFA 可以破坏多肽链间的氢键所以能有效避免在合成过程中多肽间形成 β 折叠结构,因而对于长肽的合成比较有利。

但是,也由于其裂解条件苛刻,故对 HF 不稳定的多肽(糖肽、磷酸化肽和硫酸化肽)不能采用 Boc 方法合成。

Fmoc 法由于相对 Boc 法具有操作较为简单便捷的优势,已经得到广泛应用,其固相合成原理示意图见图 1-2。Fmoc 法基本原理是首先将 α -氨基被 Fmoc 保护的氨基酸通过其 C 端缩合到树脂上,洗涤树脂纯化反应后使用 20% 的哌啶溶液脱除 Fmoc 保护基,暴露出 N 端的 α -氨基,再与下一个 Fmoc 保护的氨基酸的 C 端进行缩合,如此重复以延长肽链。当所有氨基酸缩合完毕,用哌啶脱除最后一个氨基酸的 Fmoc 保护基,溶剂洗涤树脂,最后用含 TFA 的切割试剂将完整的多肽链从树脂上切下来,同时脱除氨基酸侧链上的所有保护基,得到目标多肽(图 1-3)。

Fmoc 法的优点是反应条件温和,副反应少并且可以得到侧链暂时保护的多肽。但是,Fmoc 法由于合成过程中易形成 β 折叠结构,所以对长肽或者某些含有较多疏水性侧链的序列的合成效率较低,这些序列也因此被称为“困难序列”^[6]。由于 Fmoc 法只适合合成短肽,对于氨基酸数较多的蛋白质无法通过固相一次进行合成,因此不同片段的连接显得至关重要。多肽片段的主要连接方法有:疏脂氨解反应^[7]、无痕 Staudinger 连接反应^[8]、酮酸羟胺缩合反应^[9]和自然化学连接(Native Chemical Ligation)。自然化学连接是目前最有效的蛋白质合成技术,已被广泛应用于蛋白质的化学合成。

1.1.3 生物大分子的质谱分析

核酸、蛋白质、多糖等生物大分子是生物体的重要组成部分,它们构成了自然界生物体纷繁的多样性,同样也与各类重大疾病有着重要的关联,因此在分子水平上解析这些生物大分子是十分必要的。通过发展分析和鉴定生物大分子的方法来对其结构和功能进行研究,进而了解其结构特征、性质差异以及它们之间的相互作用,已经成为生物大分子研究的关键技术。而在生物大分子鉴定方法中,质谱技术以其高灵敏度、高准确性、易于高通量大规模操作的优点,已经成为分析鉴定生物大分子的常用方法^[10]。

20 世纪 80 年代,由于当时的离子化方法容易将大极性和热不稳定性的生物大分子破坏,因此当时的质谱还仅限于检测分子量在 2 000 Da(道尔顿)以内的物质,对分子量在 10 000 Da 以上的生物大分子的鉴定较为困难。此后,由于 Fenn 发明了电喷雾电离技术^[11](Electrospray Ionization, ESI)和 Tanaka 发明了软激光解析电离技术^[12](Soft Laser Desorption Ionization),使可鉴定的生物大分子的分子量测定上限超过 10^5 Da。上述技术的发展使得质谱在生物大分子中的应

用取得重大突破,为了表彰他们的杰出贡献,他们二人被授予 2002 年的诺贝尔化学奖。

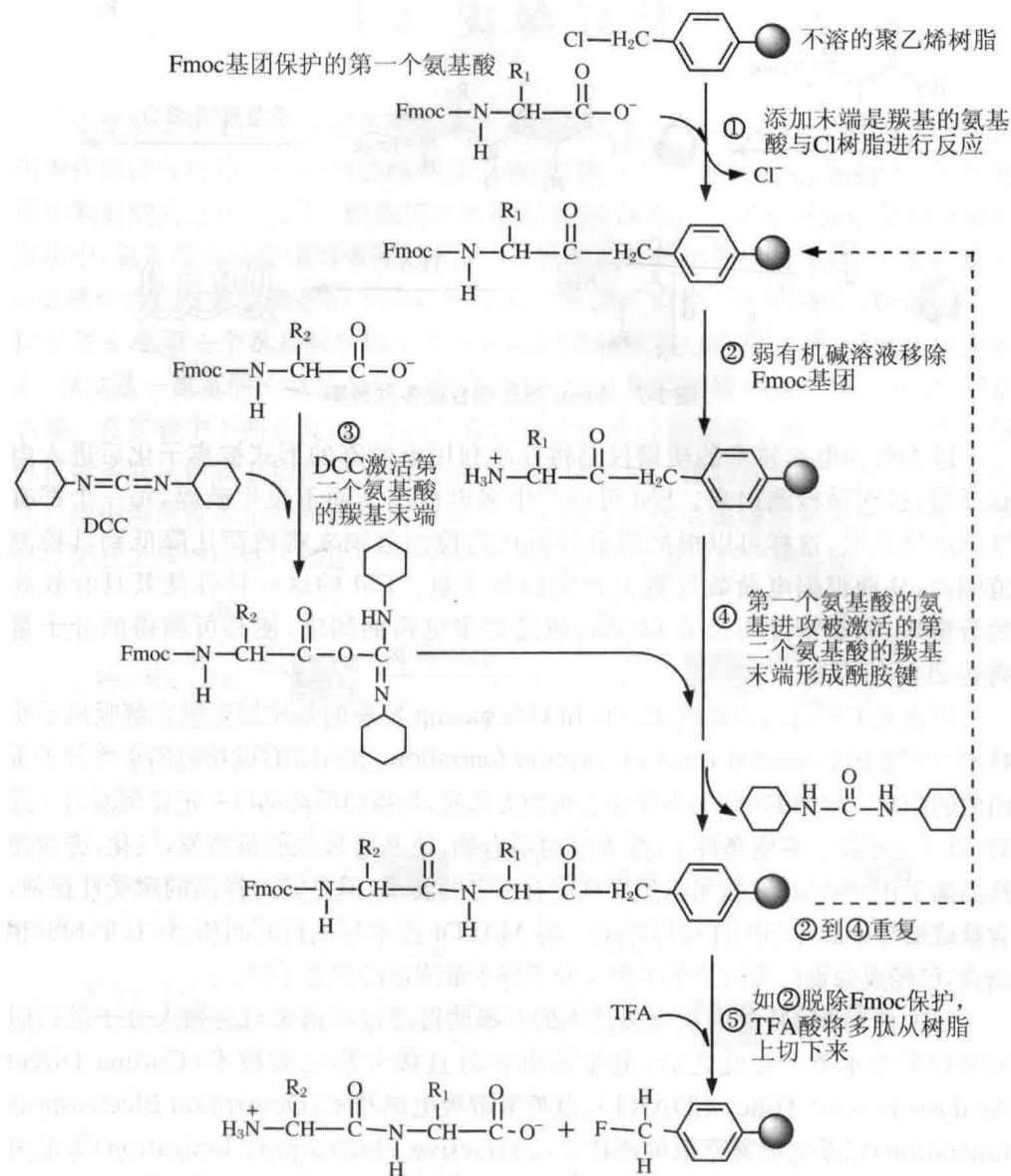


图 1-2 Fmoc 固相合成原理示意图

1.2 实验设计

本实验采用 Fmoc 固相合成技术合成胸腺五肽(Arg-Lys-Asp-Val-Tyr),并运用现代质谱分析技术对产物的结构进行鉴定(图 1-4)。多肽固相合成是一个反复添加氨基酸的过程,顺序一般为从多肽的 C 端到 N 端。在基于 Fmoc 保护基团的方法中,氨基酸侧链使用对哌啶稳定,但对三氟乙酸敏感的保护基团,而氨基酸的 α -氨基则选择对哌啶敏感的 Fmoc 作为保护基团。实验过程具体如下:首先将目标多肽 C 端第一个氨基酸的羧基共价连接到固相载体(树脂)上,使用哌啶脱保护后,再以这一氨基酸的氨基为合成起点,与相邻氨基酸的羧基发生酰化反应,形成肽键。在实验中不断重复这一过程,直到目标多肽合成完毕。随后使用三氟乙酸将目标多肽从树脂上切割下来同时脱去侧链保护基。最后加入冰乙醚,利用多肽在乙醚中溶解度很小的特性沉淀出粗肽。粗肽通常借助高效液相色谱,在烷基键合反相柱上按照极性区别进行分离纯化,然后使用质谱进行产物鉴定。

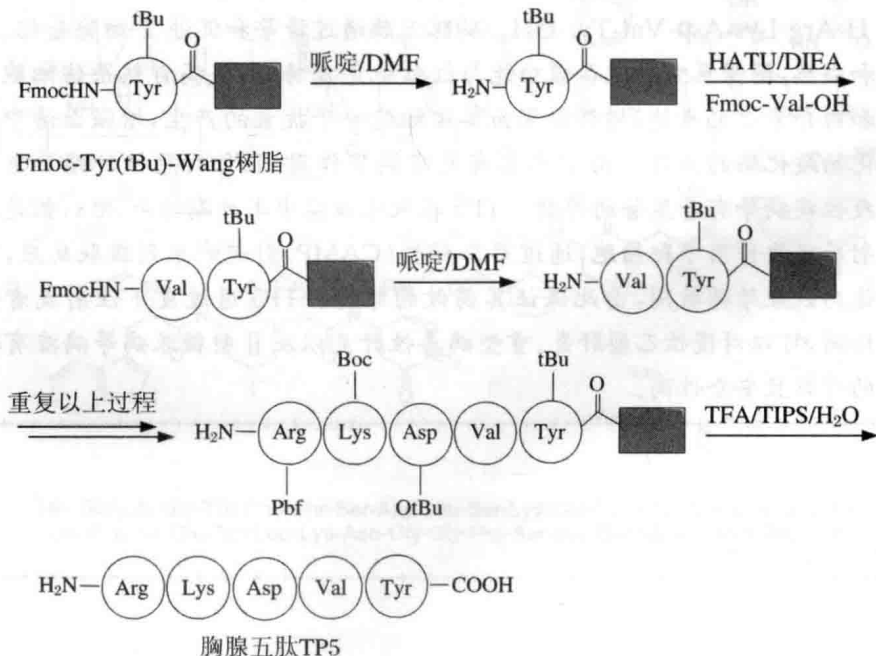


图 1-4 胸腺五肽的合成步骤

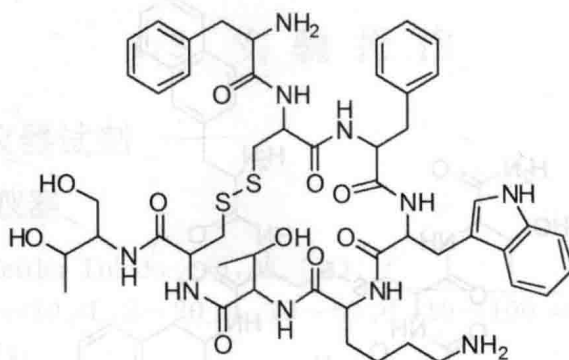
多肽药物

多肽通常是指 10~50 个氨基酸以肽键相连所形成的生物大分子。多肽通过调节蛋白质-蛋白质相互作用,或者直接与其受体相互作用而参与和调节人体中许多重要的生理过程。近年来多肽药物不断涌现,例如,醋酸艾塞那肽(Exenatideacetate)可以控制Ⅱ型糖尿病患者的血糖浓度,奥曲肽(Octreotide)可以降低胃运动和抑制胆囊排空,兰瑞肽(Lanreotide)可以治疗肢端肥大症以及神经内分泌肿瘤引发的综合征,还有醋酸格拉默(Glatiramer acetate)能缓解多发性硬化患者损害中的组织破坏。多肽的分子量介于小分子和抗体之间,多肽药物相比小分子药物有更高的特异性,相比抗体药物则更易于获得且价格便宜。但是,多肽药物容易被人体内的蛋白酶降解。近年来科学家们发展了多种方法克服这个问题,如利用镜像噬菌体筛选技术获得具有抗酶解功能的 D 型多肽,或者通过化学修饰锁定多肽二级结构,达到抵抗蛋白酶降解的目的。

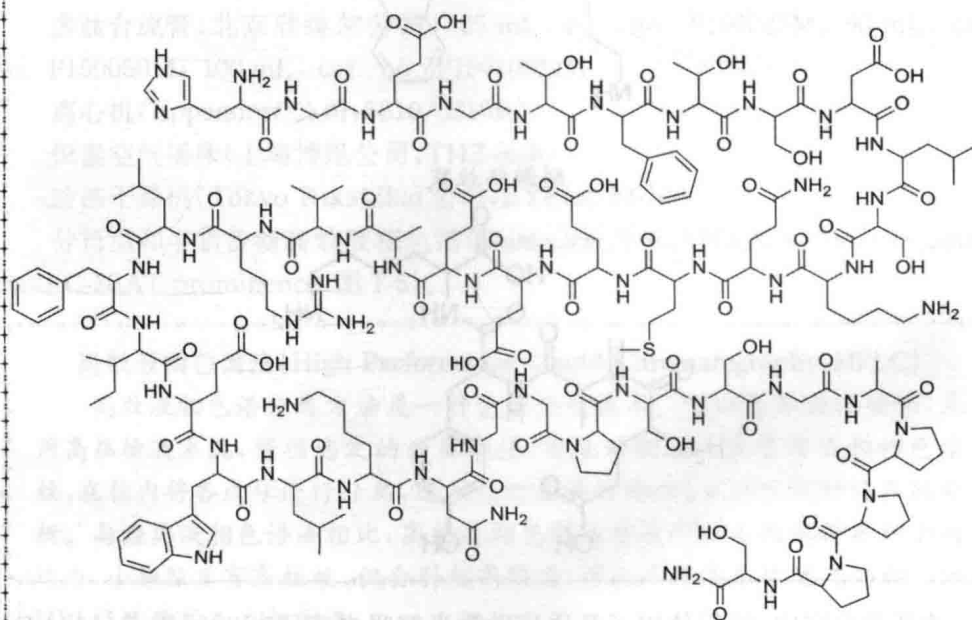
胸腺五肽

胸腺五肽(TP5)是胸腺生成素Ⅱ第 32~36 位的氨基酸片段,基本序列为 H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH。胸腺五肽通过诱导和促进 T 细胞分化、增殖和成熟,增强巨噬细胞吞噬功能与红细胞免疫功能,提高自然杀伤细胞活性和白介素-2 的表达,增强外周血单核细胞 γ 干扰素的产生,增强血清中超氧化物歧化酶的活性。由于其具有免疫调节作用,TP5 对恶性肿瘤和自身免疫性疾病等有着显著的疗效。TP5 在人体血浆中半衰期约为 30 s,但是在注射后很快作用于靶细胞,通过第二信使(CAMP)引起一系列级联反应,可使体内效应维持数周,由此保证其药效的维持。TP5 通过皮下注射或者静脉给药,可以对慢性乙型肝炎、重型病毒性肝炎以及Ⅱ型糖尿病等病症有较好的疗效且安全性高。

奥曲肽



醋酸艾塞那肽



His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg
-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser