

Receptor Signal
Transduction
Protocols

受体信号转导
研究方法

(第2版)

原著 Gary B. Willars
R. A. John Challiss

主译 张幼怡

主审 韩启德



北京大学医学出版社

受体信号转导研究方法

(第2版)

主 编 Gary B. Willars R. A. John Challiss

主 译 张幼怡

主 审 韩启德

副主译 李子健 徐 明

译 者 (按姓氏笔画排序)

万志超 马晓伟 冯 伟 刘 飞

宋 峤 肖 晗 张 惠 李子健

杜建海 袁 飞 徐 宁 徐 进

徐 明 秦 雷 龚开政

北京大學醫學出版社

Peking University Medical Press

图书在版编目 (CIP) 数据

受体信号转导研究方法/ (英) 维拉斯 (Willars, G. B.),
(英) 查理斯 (Challiss, R. A. J) 原著: 张幼怡主译. —北
京: 北京大学医学出版社, 2008. 3

书名原文: Receptor Signal Transduction Protocols
ISBN 978-7-81071-637-6

I. 受… II. ①维…②查…③张… III. ①R749.055②H
018.4 IV. R749.05 H018.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 190638 号

北京市版权局著作权合同登记号: 图字: 01-2007-1078

Receptor Signal Transduction Protocols, 2nd Edition

Gary B. Willars, R. A. John Challiss

The original English language work has been published by HUMANA PRESS
Totowa, New Jersey, U. S. A.

© 2004 by Humana Press.

All rights reserved.

Simplified Chinese translation Copyright © 2008 by Peking University Medical
Press.

All rights reserved.

受体信号转导研究方法

主 译: 张幼怡

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumppress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 莱芜市圣龙印务有限责任公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 陈 然 责任校对: 杜 悦 责任印制: 郭桂兰

开 本: 880mm×1230mm 1/32 印张: 15.5 字数: 436 千字

版 次: 2008 年 3 月第 1 版 2008 年 3 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 978-7-81071-637-6

定 价: 59.00 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

本书由

北京大学医学部科学出版基金

资助出版

原 著 者 名 单

- ATSU AIBA • *Department of Molecular and Cellular Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan*
- JÜRGEN E. BADER • *Institute of Biochemistry, University of Leipzig, Leipzig, Germany*
- ANNETTE G. BECK-SICKINGER • *Institute of Biochemistry, University of Leipzig, Leipzig, Germany*
- JEFFREY L. BENOVIC • *Department of Microbiology and Immunology, Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA*
- ANDREE BLAUKAT • *Oncology Research Darmstadt, Merck KGaA, Darmstadt, Germany*
- MARION BLOMENRÖHR • *Physiological Chemistry, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands*
- JAN BOGERD • *Department of Endocrinology, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands*
- ASHLEY E. BRADY • *Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN*
- DAVID B. BYLUND • *Department of Pharmacology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE*
- R. A. JOHN CHALLISS • *Department of Cell Physiology and Pharmacology, University of Leicester, Leicester, United Kingdom*
- ANTONIO DE BLASI • *Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology, I.N.M. Neuromed, I.R.C.C.S., Pozzilli, Italy*
- JEAN D. DEUPREE • *Department of Pharmacology, University Nebraska Medical Center, Omaha, NE*
- LUCY F. DONALDSON • *Department of Physiology, University of Bristol School of Medical Sciences, Bristol, United Kingdom*
- MARK R. DOWLING • *Novartis Horsham Research Center, Horsham, West Sussex, United Kingdom*
- KARIN A. EIDNE • *Molecular Endocrinology Group/7TM Receptor Laboratory, Western Australian Institute for Medical Research, Centre for Medical Research, The University of Western Australia, Perth, Australia*
- PAT FREEMAN • *School of Health and Bioscience, University of East London, London, United Kingdom*

- MICHAEL FREISSMUTH • *Institute of Pharmacology, Vienna University, Vienna, Austria*
- BLAIR D. GRUBB • *Department of Cell Physiology and Pharmacology, University of Leicester, Leicester, United Kingdom*
- EMMANUEL HERMANS • *Laboratory of Experimental Pharmacology, Catholic University of Louvain, Brussels, Belgium*
- MARTIN HOHENEGGER • *Institute of Pharmacology, Vienna University, Vienna, Austria*
- STEPHEN R. IKEDA • *Laboratory of Molecular Physiology, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes of Health, Bethesda, MD*
- JENNIFER A. KOENIG • *Department of Pharmacology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom*
- KAREN M. KROEGER • *Molecular Endocrinology Group/7TM Receptor Laboratory, Western Australian Institute for Medical Research, Centre for Medical Research, The University of Western Australia, Perth, Australia*
- SEBASTIAN LAZARENO • *MRC Technology, London, United Kingdom*
- LEE E. LIMBIRD • *Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN*
- RAFAEL LUJÁN • *Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain*
- JOHN J. MACKRILL • *Department of Biochemistry, University College Cork, Cork, Ireland*
- ADRIANO MARCHESI • *Department of Microbiology and Immunology, Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA*
- IKUO MATSUDA • *Department of Molecular and Cellular Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan*
- R. A. JEFFREY MCILHINNEY • *Medical Research Council Anatomical Neuropharmacology Unit, Oxford, United Kingdom*
- GRAEME MILLIGAN • *Molecular Pharmacology Group, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, United Kingdom*
- LAURA C. MONGAN • *Department of Cell Physiology and Pharmacology, University of Leicester, Leicester, United Kingdom*
- IAN MULLANEY • *Molecular Pharmacology Group, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, United Kingdom*
- STEFAN R. NAHORSKI • *Department of Cell Physiology and Pharmacology, University of Leicester, Leicester, United Kingdom*
- CHRISTIAN NANOFF • *Institute of Pharmacology, Vienna University, Austria*

- ANTONIO PORCELLINI • *Department of Molecular Pathology, I.N.M. Neuromed, I.R.C.C.S., Pozzilli, Italy; Department of Experimental Medicine and Pathology, University of Rome, Rome, Italy*
- DOMENICO SPINA • *The Sackler Institute of Pulmonary Pharmacology, King's College London, London, United Kingdom*
- MICHAEL TANOWITZ • *Department of Psychiatry, University of California, San Francisco, CA*
- ANDREW B. TOBIN • *Department of Cell Physiology and Pharmacology, University of Leicester, Leicester, United Kingdom*
- MYRON L. TOEWS • *Department of Pharmacology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE*
- HENRY F. VISCHER • *Department of Endocrinology, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands*
- QIN WANG • *Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN*
- RICHARD J. WARD • *Molecular Pharmacology Group, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, United Kingdom*
- MARK WHEATLEY • *School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom*
- GARY B. WILLARS • *Department of Cell Physiology and Pharmacology, University of Leicester, Leicester, United Kingdom*
- MARK VON ZASTROW • *Department of Psychiatry, University of California, San Francisco, CA*

译者序

细胞受体信号转导是揭示生物细胞信息传递过程及其机制的前沿领域,对其转导过程及调控机制的研究不仅有利于认识正常生理过程,而且对于揭示人类重大疾病的分子机制以及开发细胞信号转导相关的药物都有着重要意义。虽然目前国内已有一些很好的关于信号转导的著作和译作,但尚无一本完好的受体信号转导实验方法的读本。

本书全面反映了 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 及其信号转导领域中最新的研究现状和成就,详细介绍了受体及其信号转导研究的技术、方法及原理。内容涉及受体与配体的结合、受体抗体的制备、受体与 G 蛋白的相互作用和激动、受体表达和定位、受体内化和翻译后修饰、GPCR 与蛋白质相互作用以及如何利用敲除和敲入策略研究受体生理与药理功能等新技术、新策略。全书编排合理,图文并茂,内容丰富,可操作性强,特别是对实验步骤的详尽介绍。尤为难得的是作者们结合自己的实际工作经验,对每一种方法都介绍了操作过程中可能出现的问题和难点及其解决的办法。这本书是生命科学研究领域急需的一本极具指导性的实用工具书。我们将其介绍给中国读者,期望本书的翻译出版对我国生命科学研究的发展有所裨益。本书适合青年科学研究工作者、青年教师和研究生阅读,也是每一个生物医学研究实验室的必备参考书。

感谢所有译者,他们都是工作在科研第一线的年轻教师和研究生。他们花费了大量业余时间逐字逐句阅读,反复斟酌译文,努力做到“信”、“达”、“雅”。感谢北京大学医学出版社的支持及北京大学医学部科学出版基金的资助,使本书得以问世。感谢本书责任编辑主动、细致的工作。正是众人的努力才使读者终于能看到这本书。

张幼怡

2008 年 1 月

原著前言

与第1版《受体信号转导研究实验方法》有所不同，第2版不仅由新编者编写，而且集中论述了G蛋白偶联受体及其特性和G蛋白偶联受体与下游信号分子主要是（但不限于）异三聚化G蛋白之间的偶联反应。新版本更新了第1版中的重要章节，新加入过去五六年中关于G蛋白偶联受体研究的方法学进展。

一方面，信号转导的研究方法与其他诸多领域的研究方法一样不断在扩展，5年前很特殊的方法，现在已经作为常规方法收录在这本书里了。另一方面，虽然试剂盒技术的发展使许多领域的研究工作变得简单易行，但信号转导的研究却仍然需要相当丰富的经验。因此，本书收录了由国际知名专家根据他们在各自领域内多年的经验积累总结而得的方法，不仅在各个章节中清楚描述了相关的实验方法，还提供了实验中遇到问题时的解决思路和方法。

再次感谢邀请我们编写本书第2版的丛书主编 John Walker，感谢为本书倾注热情和做出杰出贡献的全体作者。

Gary B. Willars

R. A. John Challiss

目 录

第 1 章	细胞膜和完整细胞的放射性配体结合分析 ...	(1)
第 2 章	放射性配体结合技术测定变构相互作用	(35)
第 3 章	受体选择性抗体的制备、应用与鉴定	(57)
第 4 章	G 蛋白偶联受体表达和定位的免疫细胞 化学鉴定	(79)
第 5 章	表位标记受体的制备和应用	(94)
第 6 章	Northern 印迹和原位杂交技术检测 G 蛋 白偶联受体 mRNA 表达	(112)
第 7 章	电子显微镜研究受体定位	(140)
第 8 章	表达重组 G 蛋白偶联受体细胞系的构建 ...	(157)
第 9 章	病毒感染实验方法	(175)
第 10 章	显微注射法在成年哺乳动物神经元中表 达 G 蛋白信号通路分子	(189)
第 11 章	G 蛋白共价修饰——亲和标记法	(207)
第 12 章	[³⁵ S] GTP γ S 结合实验评价 G 蛋白偶联 受体介导的总 G 蛋白和 G α 亚型激活	(222)
第 13 章	G 蛋白 α 亚单位的鉴定与定量分析	(234)
第 14 章	受体-G 蛋白和受体-G 蛋白信号蛋白调 节子融合蛋白的功能分析	(257)
第 15 章	受体内化和再循环的评价	(284)
第 16 章	G 蛋白偶联受体的磷酸化和棕榈酰化	(313)

第 17 章	双向磷酸化多肽图谱分析 G 蛋白偶联受体磷酸化位点	(321)
第 18 章	G 蛋白偶联受体的泛素化	(339)
第 19 章	受体结构-功能研究中的基因突变策略	(347)
第 20 章	生物发光共振能量转移研究 G 蛋白偶联受体-蛋白质相互作用	(365)
第 21 章	荧光能量共振转移技术研究活细胞中的受体二聚化	(377)
第 22 章	酵母双杂交和免疫共沉淀技术鉴定蛋白质相互作用	(396)
第 23 章	凝胶叠加实验和谷胱甘肽 S 转移酶融合蛋白 pull-down 技术研究 G 蛋白偶联受体-蛋白质相互作用	(414)
第 24 章	受体敲除和敲入技术	(424)
第 25 章	G 蛋白偶联受体研究中的统计学方法	(438)
	常用试剂缩写英中对照	(465)
	专业词汇英中对照	(466)

第 1 章 细胞膜和完整细胞的 放射性配体结合分析

David B. Bylund, Jean D. Deupree, Myron L. Toews

摘要

在 G 蛋白偶联受体的研究中,放射性配体结合分析是一个相对简单而有效的工具。放射性配体结合分析包括三种基本实验:(1)饱和实验,用于测定放射性配体对受体的亲和力以及结合位点的密度;(2)抑制实验,用于测定未标记放射性核素的竞争配体与受体的亲和力;(3)动力学实验,用于测定放射性配体与受体的结合速率常数和解离速率常数。本章将详细介绍用以检测细胞膜和完整细胞的 G 蛋白偶联受体的经典的放射性配体结合分析方法,以及对实验数据分析的具体过程。

关键词

亲和性 (affinity), 分析, 结合, 竞争, G 蛋白偶联受体, 抑制, 完整细胞, 动力学, 非特异性结合, 放射性配体, 放射性受体, 速率常数, 受体, 饱和。

1 引言

在 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptor, GPCR) 的研究中,放射性配体结合分析 (radioligand-binding assay) 是相对简单而有效的方法。它可用于测定多种药物对受体的亲和力,表征受体数目和亚细胞定位的调节性变化。因此,该分析方法被众多学科的研究者广泛采用 (也经常被误用)。本章主要讨论用于组织和细胞系的膜制品以及完整细胞的放射性配体结合分析方法。当然,类似技术也可用于研究可溶性受体、组织切片上的受体 (受体放射自显

影术)或整体动物上的受体。

放射性配体结合实验包括三种基本类型: (1) 饱和实验, 用于测定放射性配体对受体的亲和力 (K_d) 以及结合位点的密度 ($B_{\max}$); (2) 抑制实验, 用于测定未标记的竞争配体与受体的亲和力 (K_i); (3) 动力学实验, 用于测定放射性配体与受体的结合速率常数 (k_{+1}) 和解离速率常数 (k_{-1})。本章将对在 G 蛋白偶联受体研究中经典的放射性配体结合分析进行介绍。

1.1 饱和实验

饱和实验 (saturation experiment) 常用于确定受体密度 (受体的数目) 在发育或实验干预 (如药物治疗) 时的变化。保持受体数不变而改变放射性配体浓度可得到饱和曲线。从该实验中可估计受体最大结合量 ($B_{\max}$) 和受体对放射性配体的解离常数 (K_d)。饱和实验的结果以结合配体数 (与受体结合的放射性配体的浓度) 为 Y 轴, 游离配体数 (未与受体结合的放射性配体的浓度) 为 X 轴作图。如图 1-1 所示, 当放射性配体浓度增大时结合配体数逐渐增加, 当达到某一点以后, 再增多放射性配体量也不引起结合配体数的显著增加。所得图形为一直角双曲线, 即饱和曲线。 $B_{\max}$ 为随放射性配体浓度增加所对应的最大结合数, 即饱和曲线的最高趋近点所对应的 Y 值, 亦可代表所研究组织中的受体密度。 K_d 为占据受体 50% 结合位点时的配体浓度。

1.2 抑制实验

抑制实验 (inhibition experiment) 主要用于确定可溶性化合物与受体结合的亲和力。因此, 该实验常用于测定受体的药理学特性和新药的高通量筛选。在抑制实验中, 孵育液中只有抑制剂 (无放射性) 的浓度是变化的, 可通过放射性配体确定药物对受体的解离常数 (K_i)。以结合的放射性配体数量对无放射性标记的配体浓度 (取对数) 作图, 可得如图 1-2 所示经典的抑制实验结果。曲线的底部为非特异性结合的数目。抑制放射性配体 50% 特异性结合时的非放射性标记药物的浓度定义为 IC_{50} , 并通过其计算 K_i 。

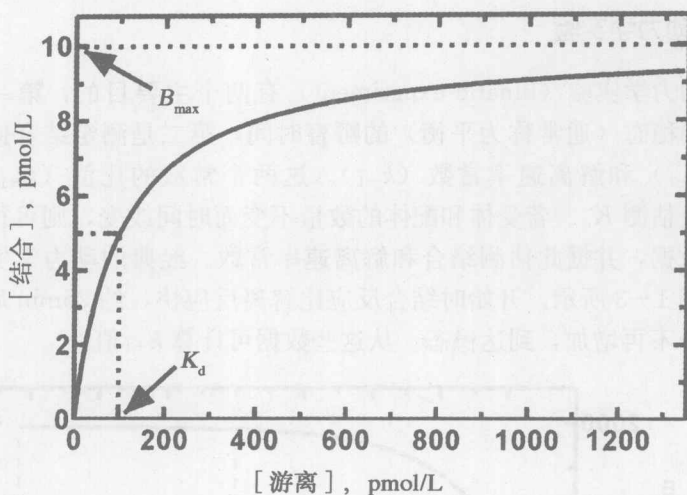


图 1-1 经典的饱和实验。在本范例中, $B_{\max}$ (受体最大结合量) 为 10 pmol/L, K_d (解离常数或使受体与配体的结合量达到最大结合量一半时所需的放射性配体的浓度) 为 100 pmol/L。

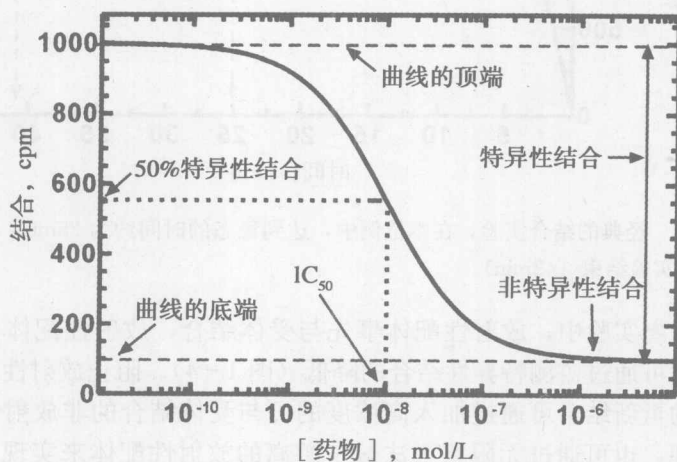


图 1-2 经典的抑制实验。在本范例中, 特异性结合为 900 cpm, IC_{50} 值 (抑制放射性配体 50% 特异性结合时的药物浓度) 为 10 nmol/L。

1.3 动力学实验

动力学实验 (kinetic experiment) 有两个主要目的, 第一是确定达到稳态 (通常称为平衡) 的孵育时间, 第二是测定结合速率常数 (k_{+1}) 和解离速率常数 (k_{-1})。这两个常数的比值 (k_{-1}/k_{+1}) 可独立估测 K_d 。若受体和配体的数量不变而时间改变, 则可得到动力学数据, 并据此估测结合和解离速率常数。经典的动力学实验结果如图 1-3 所示。开始时结合反应比解离反应快, 约 25min 后特异性结合不再增加, 到达稳态。从这些数据可计算 k_{+1} 值。

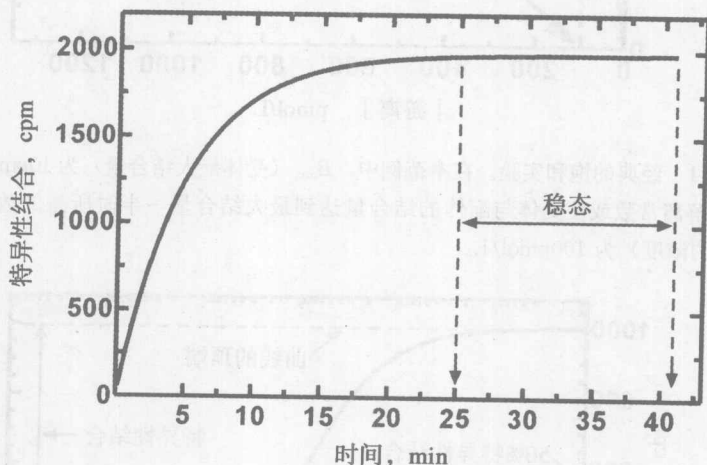


图 1-3 经典的结合实验。在本范例中, 达到稳态的时间约为 25min, 且一直持续到实验结束 (42min)。

解离实验中, 放射性配体事先与受体结合, 放射性配体与受体的解离可通过监测特异性结合的降低 (图 1-4)。阻止放射性配体与受体的重新结合可通过加入高浓度的可与受体结合的非放射性药物来实现, 也可通过无限稀释法减少游离的放射性配体来实现。解离反应具有一级反应动力学特点, 因此, k_{-1} 等于解离反应的 $t_{1/2}$ 除以 0.693 ($\ln 2$)。

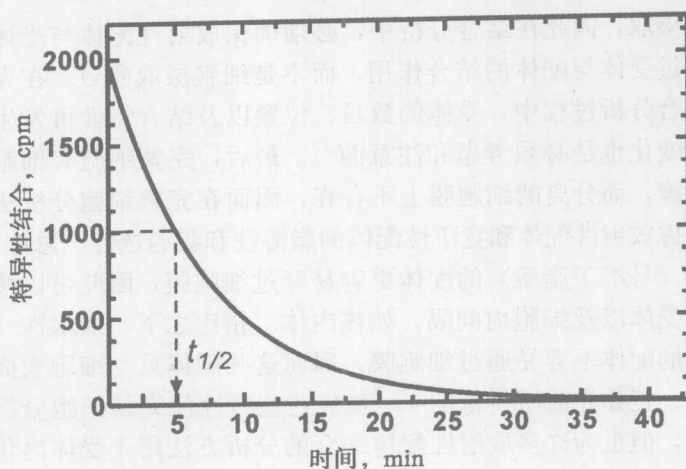


图 1-4 经典的解离实验。在本范例中， $t_{1/2}$ （特异性结合下降 50% 的时间）为 5min。

1.4 完整细胞的分析

尽管放射性受体分析中最普遍使用的是细胞膜制品，但有时直接对完整细胞进行分析可能更好。用完整细胞进行分析的最大优点是，被测受体处于细胞的自然状态。而且相对有利的是，可在与检测受体介导的功能反应相同的实验条件下，对相同制品中受体的结合特性进行评价。这就能更直接的比较受体在激动或抑制后的各种生理反应中的结合特征。当需要对大量不同细胞样本进行研究的时候，由于不需要提前裂解细胞和分离细胞膜，完整细胞分析的方法更显示出它的优势。例如，在初步筛选转染各种 G 蛋白偶联受体 cDNA 的细胞克隆时，完整细胞分析的方法已被证实非常有用，从而实现了目的克隆的快速鉴定扩增及后续研究。

有很多实验体现了完整细胞法的优点，同样也在很多实验中体现出完整细胞法的局限性。例如，完整细胞分析法使研究可在生理条件下进行，但同时也使改变或控制实验条件以确定调节受体结合的因素更为困难。对于完整细胞，放射性配体可通过许多转运过程

被细胞摄取,因此在结合分析中,必须确保放射性配体与受体的联系是通过受体与配体的结合作用,而不是细胞摄取所致。在完整细胞的结合分析过程中,受体的数目、位置以及结合特性可发生适应性调节变化也是必须考虑和注意的^[1]。最后,完整细胞有细胞膜通透性屏障,而分离的细胞膜上不存在,因而在完整细胞分析法中必须要考虑放射性配体和竞争性配体的脂溶性和膜通透性。总的来说,亲脂性(易溶于脂质)的配体更容易穿过细胞膜,因此可以接近细胞表面受体以及细胞内间隔,如核内体。相比之下,亲水性(易溶于水)的配体不容易通过细胞膜,因而这些配体只与细胞表面的受体结合。正如先前所讨论的^[1],虽然这些特性使完整细胞分析法更为复杂,但也为许多放射性配体结合的分析方法用于受体内化研究提供了基础。

2 材料

本部分仅介绍细胞膜制品的检测分析,关于整体细胞分析的信息可见 3.4 中的实验方案。

1. 合适的放射性配体(见注释 1)。在细胞膜饱和实验中,在含 550 μ l 5mmol/L HCl 的玻璃试管中加入适量放射性配体,彻底混匀,然后取 200 μ l 该溶液加入 300 μ l 5mmol/L 的 HCl 中。取 200 μ l 该溶液加入 300 μ l 5mmol/L 的 HCl 中得到更低浓度的溶液,以相同方法制备一系列稀释液,共制备 6 个浓度的稀释液,使放射性配体的浓度梯度为 1~100 倍。其他稀释方法见表 1-1 (见注释 2)。在细胞膜抑制实验和动力学实验中,只需要一种放射性配体浓度(见注释 3)。
2. 受体,来自于提取的细胞膜或整体细胞。细胞膜制备的标准过程是,将感兴趣的组织或细胞在低渗缓冲液中用 Polytron (Brinkman) 或类似的匀浆器匀浆。值得注意的是,大多数受体在室温下数小时内是稳定的,但将组织迅速置于冰上更好。将 500mg 组织在约 35ml 洗涤缓冲液(50mmol/L Tris-HCl 或