

研究生教学用书

药理学研究的 新技术与新方法

The New Techniques and Methods
in Pharmacological Research

陈晓光 主 编

朱海波 副主编

中国协和医科大学出版社

研究生教学用书

药理学研究的新技术与新方法

The New Techniques and Methods in Pharmacological Research

主 编 陈晓光

副主编 朱海波

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 楠 王晓良 叶 菲 申竹芳

朱传江 朱海波 张 丹 张天泰

张建军 李 莉 李 燕 李学勇

杜国华 陈晓光 侯 琦 胡卓伟

郭 颖 彭 英

编者单位 中国医学科学院药物研究所



中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

药理学研究的新技术与新方法 / 陈晓光主编. —北京: 中国协和医科大学出版社, 2013. 7
ISBN 978-7-81136-875-8

I. ①药… II. ①陈… III. ①药理学-研究方法 IV. ①R96-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 124237 号

药理学研究的新技术与新方法

主 编: 陈晓光
责任编辑: 韩 鹏
文字助理: 杨小杰

出版发行: 中国协和医科大学出版社
(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65260378)

网 址: www.pumcp.com
经 销: 新华书店总店北京发行所
印 刷: 北京佳艺恒彩印刷有限公司

开 本: 787×1092 1/16 开
印 张: 21.75
字 数: 500 千字
版 次: 2014 年 3 月第 1 版 2014 年 3 月第 1 次印刷
印 数: 1—3000
定 价: 55.00 元

ISBN 978-7-81136-875-8

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其他质量问题, 由本社发行部调换)

内 容 简 介

本书共 18 章，从近年来药理学研究中所采用的最新技术和新方法着手，着重介绍了药理学研究中所涉及的均相时间分辨荧光技术、磁共振波谱技术、表面等离子共振技术、化学发光技术、荧光可视化技术、激光扫描共聚焦技术、双向电泳和飞行质谱技术、血糖钳夹技术、微透析技术、基因表达和蛋白表达技术、荧光偏振技术、流式细胞技术、圆二色谱技术、干细胞技术、小动物正电子发射断层成像技术，以及转基因与基因敲除动物和 CYP450 高表达体系在药理学研究中的应用，胰岛功能评价方法在抗糖尿病药理学研究中的应用等，结合疾病发生发展过程中的病理生理机制以及药理学研究特点，较详尽地介绍了各种新技术与新方法在防治心脑血管系统疾病、神经精神系统疾病、代谢综合征、抗肿瘤、抗炎免疫、抗病毒等药理学研究中的应用。本书注重科研思维方法的培养，引导学生把握新药研究当前国际发展的前沿领域，所采用的最新技术和方法，使学生对当前药理学研究的新技术和新方法有一定的了解，为这一领域新的课题研究提供技术手段，为科学研究奠定良好的基础。本书主要面向医药院校的研究生和从事新药研究的科研人员，既可作为一本教科书，也可作为一本专业参考书。

前 言

“药理学研究的新技术与新方法”课程自2007年3月授课以来,经过5年的授课实践和教学反馈,获得了业内同行和广大研究生的认可和好评。鉴于药理学研究中的新技术与新方法日新月异,目前国内还没有一本较全面的相关教科书,我们经与中国协和医科大学出版社协商,决定在2007年编写大纲的基础上,邀请我所近年来活跃在教学、科研第一线并对某一领域新技术新方法具有一定造诣和教学经验的中青年学者组成编写班子,对大纲所涉及的内容进行整理编辑出书,内容力求新颖、实用。

本书定位于全国高等医药院校及研究机构的药学、医学研究生的培养,侧重于科研,同时也兼顾临床医学研究生。按照研究生培养目标的要求,突出研究生教学特点,着重介绍药理学研究中所涉及的新技术新方法,结合撰稿人自身学科特点,较详尽地介绍新技术和新方法的背景、原理、技术流程以及应用范例,使学生对当前药理学研究中所涉及的新技术和新方法的全貌有概括性地了解,为其研究课题应用新的技术手段和研究思路提供帮助和借鉴。

本书有别于以往的教材,为避免成为单纯的技术手册和操作教程,充分结合药理学学科分支的前沿进展,尤其是体现撰写者在本技术方法领域的自身优势和经验体会,因此,每章(节)编写时遵循“背景→原理→技术流程→应用范例→参考文献”的顺序进行,突出研究生教材区别于其他教材的特色,力保全书思路的统一性及整体性。该书编写格式也力求与国际接轨,全书统一建立主题词索引,并列出相关书目与相关网站,以供读者参考和查找。

我们十分感谢所有参与编书的同志们的大力支持,感谢他们在百忙的科研与教学工作中亲自执笔、及时完稿。

在本书成书过程中,得到中国协和医科大学出版社的鼎力支持,中国医学科学院药物研究所的金晶博士、连泽勤博士、渠凯先生承担了大量的辅助工作,在此一并致以诚挚的谢意。

陈晓光

2013年8月于北京

目 录

第一章 均相时间分辨荧光技术在药理学研究中的应用	(1)
第一节 均相时间分辨荧光技术	(1)
第二节 HTRF 技术在 SIP 受体激动剂研究中的应用	(5)
第三节 HTRF 技术的延伸——Tag-lite 技术	(13)
第二章 基于核磁共振的代谢组学技术在调血脂创新药物研究中的应用	(25)
第一节 背景	(25)
第二节 原理	(27)
第三节 技术流程	(28)
第四节 应用范例	(32)
第三章 表面等离子共振技术在药理学研究中的应用	(46)
第一节 表面等离子共振技术发展史	(46)
第二节 表面等离子共振技术的原理	(47)
第三节 表面等离子共振技术在药物研究中的应用	(51)
第四章 化学发光技术在药理学研究中的应用	(59)
第一节 化学发光与生物发光	(59)
第二节 与生物发光和化学发光关联的化学反应	(59)
第三节 生物/化学发光可检测的目标分子	(65)
第四节 生物/化学发光的应用	(66)
第五节 生物/化学发光的检测方法	(68)
第六节 生物/化学发光检测的优缺点	(69)
第五章 激光扫描共聚焦技术在药理学研究中的应用	(70)
第一节 激光扫描共聚焦技术简介	(70)
第二节 样品制备	(73)
第三节 常用的荧光染料	(75)
第四节 LSCM 的功能	(81)
第五节 LSCM 在医学生物学上的应用	(83)

第六节 LSCM 的应用举例	(88)
第七节 结语	(94)
第六章 双向凝胶电泳和飞行质谱技术在药理学研究中的应用	(96)
第一节 双向凝胶电泳技术	(96)
第二节 MALDI-TOF 质谱技术	(106)
第三节 2DGE 和 MALDI-TOF-MS 技术在药理学研究中的应用	(110)
第七章 转基因与基因敲除动物在药理学研究中的应用	(116)
第一节 转基因动物在药理学研究中的应用	(116)
第二节 基因敲除动物在药理学研究中的应用	(124)
第八章 CYP450 高表达体系在药理学研究中的应用	(131)
第一节 CYP450s 的组成、特性及功能	(131)
第二节 CYP450s 高表达体系的建立	(136)
第三节 CYP450s 高表达体系的应用	(146)
第九章 血糖钳夹技术及其在抗代谢综合征药理学研究中的应用	(150)
第一节 发展背景	(150)
第二节 技术原理	(151)
第三节 实验步骤	(152)
第四节 应用范例	(155)
第十章 微透析技术在神经药理学研究中的应用	(159)
第一节 微透析技术的发展历史	(159)
第二节 微透析技术的基本原理	(160)
第三节 微透析取样分析	(162)
第四节 微透析技术的应用现状	(169)
第五节 微透析技术的研究进展和展望	(179)
第十一章 基因表达和蛋白表达技术在药理学研究中的应用	(183)
第一节 基因转染技术及蛋白表达技术	(183)
第二节 基因表达的检测技术	(186)
第三节 蛋白表达的检测技术	(188)
第四节 基因、蛋白表达技术在病理生理和药理机制研究中的应用	(192)
第十二章 荧光偏振技术在药理学研究中的应用	(200)
第一节 荧光偏振技术原理	(200)

第二节	荧光偏振技术的应用	(204)
第十三章	流式细胞技术在分子免疫药理学研究中的应用	(210)
第一节	流式细胞仪的基本结构和工作原理	(210)
第二节	流式细胞术样品制备技术	(214)
第三节	流式细胞术的应用	(220)
第四节	利用流式细胞术进行药物机制研究及药物筛选	(234)
第十四章	圆二色谱技术在药理学研究中的应用	(241)
第一节	圆二色谱原理及仪器	(241)
第二节	利用圆二色谱方法研究蛋白质的结构与功能	(243)
第三节	利用圆二色谱方法研究核酸的结构与功能	(253)
第四节	圆二色谱应用研究实例	(258)
第十五章	胰岛功能评价方法在抗糖尿病药理学研究中的应用	(263)
第一节	体内胰岛素储存和分泌功能的评价方法	(263)
第二节	体外胰岛功能评价方法	(275)
第三节	胰岛 β 细胞量的评价	(278)
第十六章	液质联用在抗炎免疫药理学研究中的应用	(282)
第一节	免疫炎症中神经酰胺及信号通路的调控	(282)
第二节	液相色谱-质谱联用仪代谢组学实验技术在药理学研究中的应用	(290)
第十七章	干细胞在药理学研究中的应用	(299)
第一节	干细胞概论	(299)
第二节	诱导多能干细胞	(302)
第三节	干细胞的定向诱导分化	(307)
第四节	肿瘤干细胞	(313)
第十八章	小动物正电子发射断层成像技术在神经药理学研究中的应用	(318)
第一节	小动物 PET 成像的基本原理	(318)
第二节	小动物 PET 成像的设备组成	(319)
第三节	小动物 PET 在神经药理学研究中的应用	(321)
索引词		(332)

第一章 均相时间分辨荧光技术在药理学研究中的应用

均相时间分辨荧光 (homogeneous time-resolved fluorescence, HTRF) 是用来检测纯液相体系中待测物的一种常用方法, 是研究药物靶标的较理想技术之一。该技术结合了荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 和时间分辨荧光 (time resolved fluorescence, TRF) 两种技术。HTRF 技术是对 TRF 技术的改良, 提供了更高的灵敏度和稳定性。

第一节 均相时间分辨荧光技术

一、技术原理

HTRF 技术结合了 TRF 和 FRET 两种技术。该技术利用具有穴状结构的铕 (Eu) 元素的螯合标志物和 XL665 作为一个供体 (donor), 是基于 Eu 穴状化合物的供体与受体 (第二荧光标志物) 之间的荧光共振能量转移 (FRET)。在荧光共振能量转移中, 受体发射荧光的寿命与供体发射荧光的寿命相同。因为 Eu 的荧光衰减周期较长, 所以含 Eu 的供体会诱导 XL665 受体长时间地发射荧光, 受体激发后产生的荧光便能持续较长时间, 通过时间分辨就可以区分那些短寿命的自身散射的荧光, 从短寿命荧光背景中很容易区分出 FRET 信号。

当两个荧光基团由于生物分子相互作用而接近时, 在激发时被穴状化合物捕获的部分能量释放, 发射波长为 620nm; 另一部分能量转移到受体 (acceptor) 上, 发射波长为 665nm。665nm 的发射光仅仅由供体引起的 FRET 产生。所以, 当生物分子相互作用时, 有两个激发光 620nm 和 665nm; 当不存在相互作用时, 只有 620nm 一个激发光。

HTRF 技术原理示意图见图 1-1-1; TPB Eu³⁺穴状物和 XL665 的发射光谱见图 1-1-2。

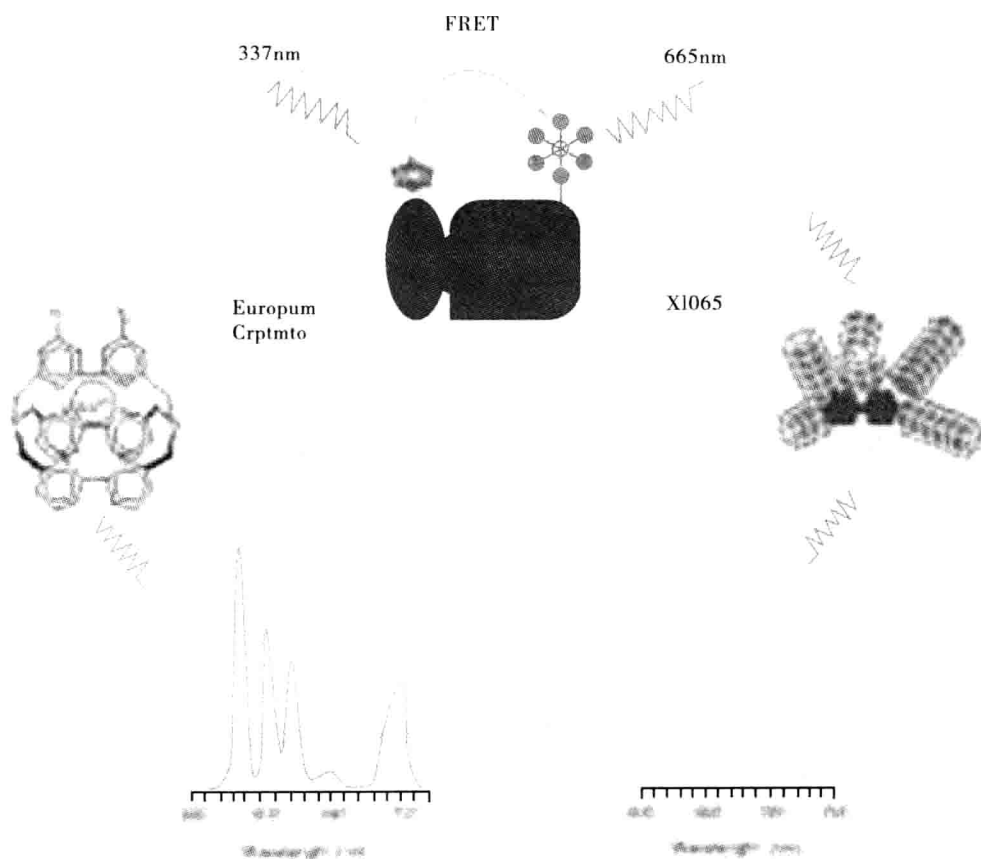
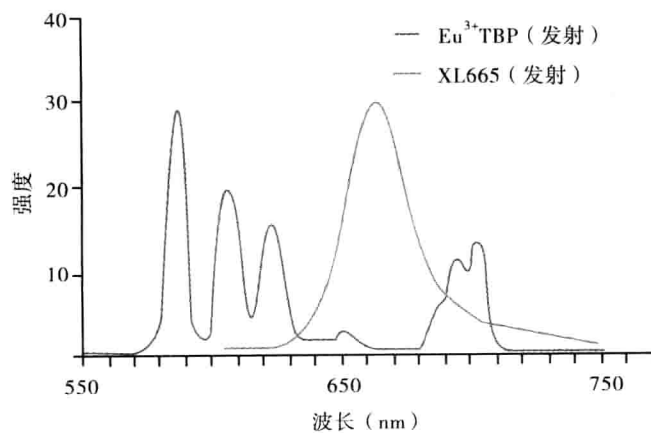


图 1-1-1 HTRF 技术原理示意图

Eu^{3+} 穴状物与 XL665 分别作为供体和受体，在激发条件下，当供体和受体足够接近时，将发生能量共振转移，受体 XL665 会在 665nm 发出特定的持续时间较长的荧光。

图 1-1-2 TPB Eu^{3+} 穴状物和 XL665 的发射光谱

二、HTRF 的含义

均相 (homogeneous) 是指所有参与反应的试剂或化合物无需经过吸除处理, 反应体系内的各成分互不影响。时间分辨荧光 (TRF), 全称时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET)。时间分辨 (time resolved) 指依靠时间来去除那些寿命较短的荧光, 从而分辨目标荧光。F 是荧光共振能量转移 (FRET) 的意思, 指在供体和受体相互靠得很近时, 光子能从一个受激发的荧光团 (供体) 转移到另一个荧光团 (受体), 并使后者发出荧光。

(一) FRET 技术

FRET 技术利用了两种荧光基团的能量转移, 这两种荧光基团分别称为 (能量) 供体和 (能量) 受体。供体被外来能源激发 (例如闪光灯或激光), 如果它与受体在足够近的距离之内, 可以将能量共振转移到受体上。受体受到激发, 发出特定波长的发射光。将供体和受体分别与相互作用的两个生物分子结合, 生物分子的结合可以将受体和供体拉到足够近的距离, 产生能量转移。由于受体分子的发射光来自于能量转移, 所以在实验中不需要将未结合与已结合的分子分开, 即不需要洗涤步骤。这种均相的实验方式操作简单, 缩短了实验时间且节约了费用。

一般情况下, 在 FRET 实验中使用的供体和受体是快速荧光基团, 半衰期非常短。传统 FRET 技术的限制因素是背景荧光, 后者来自于样品成分, 包括缓冲液、细胞裂解液的自发荧光和其他蛋白质、化合物。背景荧光极大地影响了实验灵敏度, 并使数据分析复杂化。但背景荧光的持续时间非常短暂 (寿命为纳秒级), 可以利用时间分辨荧光方法将其去除。

(二) TRF 技术

如前所述, 在生物溶液或血清中的很多化合物和蛋白质是自发荧光的, 利用传统的快速荧光基团进行检测极大地影响了实验的灵敏度。如果使用长寿命的荧光基团结合时间分辨的检测方式 (在荧光激发和发射检测之间有一个时间延迟) 可将快速荧光的干扰降到最低。时间分辨荧光 (TRF) 利用稀土元素中镧系元素的独特性质。与传统荧光基团相比, 它们具有大的动力位移和非常长的发射半衰期 (从微秒到毫秒级), 这使它们在生物学荧光应用领域显得尤为重要。在 TRF 中常用的镧系元素是钐 (Sm)、铕 (Eu)、铽 (Tb) 和镝 (Dy)。

通过直接激发难以使镧系元素离子产生荧光, 因为这些离子很难吸收光子。镧系元素必须首先与有机分子形成复合物, 有机分子收集光子并通过分子内非放射过程转移到镧系元素上。稀土元素螯合物和穴状化合物是能量收集装置的典型代表, 它们收集能量并转移到镧系元素离子上, 后者则发出其特征性的长寿命的荧光。

稀土元素复合物具有特殊的性质, 包括稳定性、较高的发射光产率, 并且能够与生物分子连接, 因此可以成功应用于生物学检测中。除此之外, 当直接在生物溶液中反应时, 复合物能够耐受荧光淬灭又显得尤为重要。但稀土元素螯合物稳定性较差, 而且有的化合物可竞争螯合物活性基团, 当与 FRET 技术结合在一起时其灵敏度也受到限制。如果稀土元素与穴状化合物结合, 可排除许多限制因素。

三、技术特点

虽然 HTRF 也是基于 TR-FRET 的化学技术，但它的许多特点把它与其他 TR-FRET 技术区分开来。这些特点包括使用了镧系元素（铕和铽），从而具有较长的半衰期，很大的动力位移（如图 1-1-3 所示， Eu^{3+} 动力位移 $> 300\text{nm}$ ）；同时，镧系元素与络合的穴相结合，这种结合的穴状物（cryptate）与其他所有 TR-FRET 技术使用的螯合物结构（chelate）相比，显著增加了稳定性（可耐受低 pH 值、金属离子、DMSO、EDTA 等）。

穴状化合物的形成是将一个阳离子装入到一个立体笼中。笼能收集光，然后将能量转移到核心的镧系元素。大环的性质有利于与镧系元素紧密相连，这种牢固地连接会形成非常稳定的复合体。穴结构能耐受一些特殊的实验条件，如大量存在的阳离子（ Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 等）、螯合物（EDTA）等特殊的溶剂和温度。它适用于高浓度的血清（50%），HTRF 技术可应用于临床诊断。在读板前或孵育时加入氟离子能增强实验对大量化合物的抗干扰性。穴状物没有光漂白性，多次读数后信号无损失，因此能按照需要的次数去读，可以进行动力学检测。而螯合物结构的稳定性尚未达到该水平。

总体而言，HTRF 技术的特点如下：①荧光持续时间更久；②时间选择（时间延迟读取测量）；③低背景；④校正干扰因素；⑤均质式检测；⑥能抵抗金属离子对信号的影响。

四、HTRF 技术的主要实验方法

（一）竞争分析法

该技术涉及了能与目标测定物相结合的特异性抗体（含有 HTRF 荧光基团供体）和能

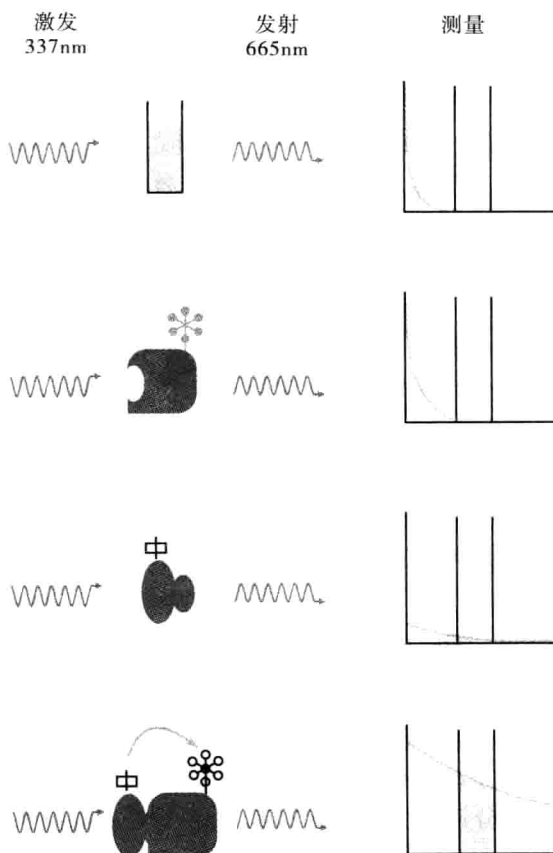


图 1-1-3 在 665nm 处的荧光时间选择

在介质处于受激发状态下，未聚集的受体或穴状物在 665nm 处产生的大部分荧光都会被时间分辨的方法所辨别。

与抗体结合的竞争性抗原（含有 HTRF 荧光基团受体）。目标测定物与抗体结合并不会发出荧光，抗体与竞争性抗原结合会发出荧光。目标测定物和竞争性抗原共同竞争结合特异性抗体，待稳定后测定荧光值的变化便可量化待测物的浓度。

（二）三明治分析法

某些待测物能与两个不同的抗体相结合，而不是一个。根据此特性，该技术涉及了 2 种含有荧光基团的抗体（一个有荧光基团供体、一个有荧光基团受体）与目标测定物进行结合。当测定物与两种抗体共同结合时，2 个荧光基团之间便会激发从而发射荧光。

五、HTRF 的应用

HTRF 技术被广泛应用于细胞、生化实验以及其他药理学研究中，并应用于药物研发的不同阶段，从实验方法的建立，高通量筛选（HTS），先导化合物到候选化合物，再到临床前研究。这是一种灵敏且稳定的技术，可以使用 384 和 1536 孔板。从 10 年前 HTRF 技术进入药物研发领域以来，研究者们采用该技术加快了很多基于抗体的研究，包括 G 蛋白偶联受体（GPCR）（受体配体结合、受体二聚化、cAMP 和 IP-1 的检测以及磷酸化 ERK 的定量）、激酶、细胞因子和生物标志物、生物过程（抗体和蛋白生产）等，以及蛋白与蛋白、蛋白与多肽、蛋白与 DNA/RNA 相互作用的研究等。HTRF 具有与 ELISA 同等的检测范围和检测极限，但是不需要洗板，可以极大地缩短实验时间，所以 HTRF 技术可以取代大部分 ELISA 实验方法，为均相 ELISA。

第二节 HTRF 技术在 S1P 受体激动剂研究中的应用

一、S1P 受体激动剂体外筛选模型

稳定转染人 S1P1 的 CHO 细胞：S1P1 CHO-K1 Gαq5 stable cell line（CG1047-1）

稳定转染人 S1P3 的 CHO 细胞：S1P3 CHO-K1 Gαq5 stable cell line（CG1049-1）

（购自美国 Multispan 公司）

培养条件：90% DMEM/F12；10% FBS；10 μg/ml 嘌呤霉素；250 μg/ml 潮霉素。

二、S1P 受体激动剂体外筛选方法

HTRF IP-1 细胞水平检测——Gq 信号转导通路活化水平检测（IP-1 kit 购自 Cisbio 公司）。

（一）Gq 信号转导通路简介

S1P1 和 S1P3 均属于 G 蛋白偶联受体，G 蛋白偶联受体介导的信号通路主要有三种，通过四个亚型来介导，Gs，Gi，G12/13 和 Gq。本研究中细胞模型属于 Gq 通路检测范畴。Gq 通路的效应分子为磷脂酶 C-β（PLCβ），引起细胞内 Ca²⁺ 浓度升高和钙调蛋白活化。如图 1-2-1 所示，信号分子与 Gq 受体结合后，激活细胞膜上的 PLC，水解 PIP2 为 IP3 和 DAG。IP3 继而与滑面内质网和线粒体上的受体结合，钙通道活化，引起细胞内钙

离子浓度升高。所以，Gq 通路的活性有两种检测途径，即测定细胞内的钙浓度和 IP3 的含量。

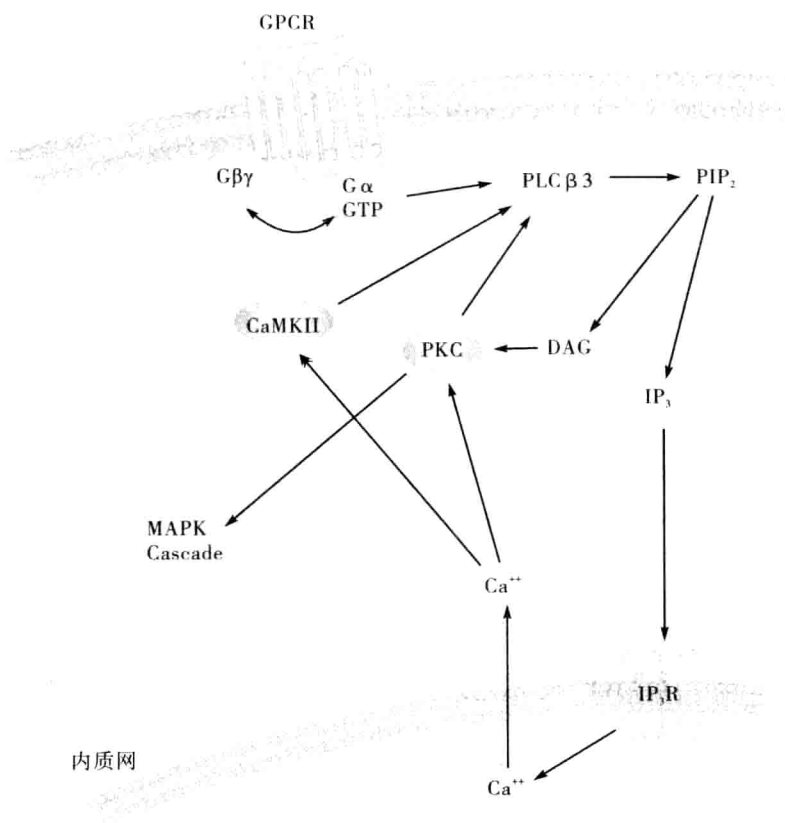


图 1-2-1 Gq 蛋白介导的信号转导通路

IP3 半衰期很短 (<30s)，其产生后很快变成 IP2，然后生成 IP1，终产物为 myo-肌醇。如图 1-2-2 所示，LiCl 可以阻断 IP1 到 myo-肌醇的产生，引起 IP1 积聚。通过测定 IP1 的含量，可以知道 IP3 的含量，从而研究 Gq 通路的活化过程。

(二) 实验原理

HTRF IP1 检测是基于 HTRF 技术的竞争性免疫检测，使用铽穴状化合物 (Tb) 标记的抗 IP1 单抗和 d2 标记的 IP1。细胞内所产生的 IP1 可以和试剂盒提供的标记了 d2 的 IP1 竞争 IP1 抗体的抗原结合位点。当铽标记抗 IP1 抗体与 d2 标记的 IP1 结合后，会发生能量共振转移，产生比较大的信号。随着细胞内 IP1 的增多，游离 IP1 与抗体的结合增多，信号逐渐减小 (图 1-2-3)。

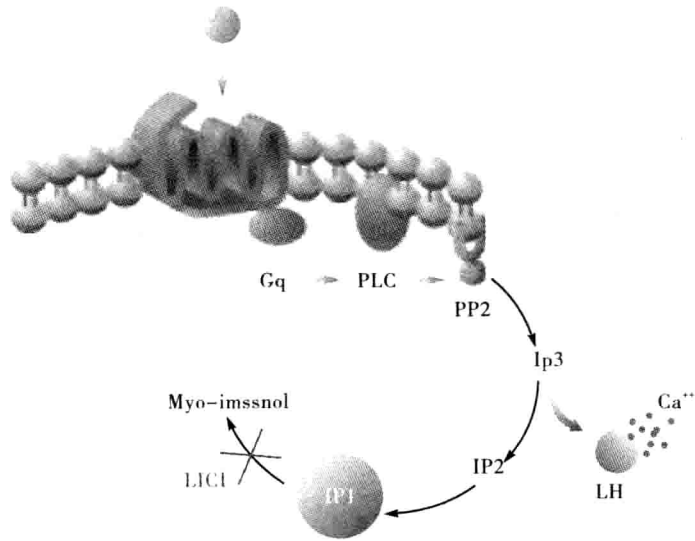


图 1-2-2 IP₃ 的产生及代谢过程

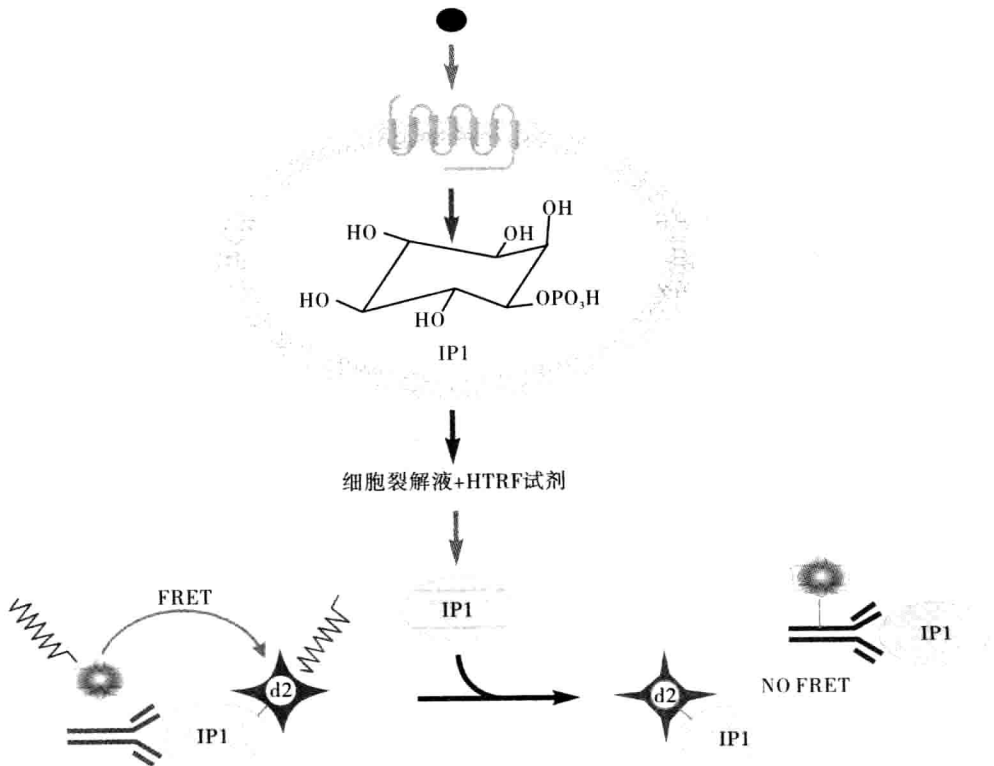


图 1-2-3 HTRF IP-1 检测原理示意图

(三) 实验步骤

细胞重悬于 $1 \times$ stimulation buffer (含 LiCl), 以 70,000 个细胞/孔的密度铺于 384 孔板, 每孔 $7 \mu\text{l}$ 。加入 $7 \mu\text{l}$ 不同浓度的待测化合物, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 孵育 2 小时, 同时做标准曲线。加入 $3 \mu\text{l}$ 用 Lysis Buffer 稀释好的 IP1-d2, 再加入 $3 \mu\text{l}$ 稀释好的 Ab-Cryp, 室温孵育 1 小时。Envision 检测波长 665 与 615 的吸光度。

(四) 实验结果

1. 标准曲线 每块 384 孔板都做标准曲线, 将标准曲线 665/615 比值与 IP-1 浓度进行 nonlinear least squares fit (Graph pad 软件)。将所有测定得到的 665/615 比值 (包括各个浓度的化合物以及阴性对照) 代入标准曲线的线性段, 得到相应的 IP-1 浓度。举例如图 1-2-4, 图 1-2-5。

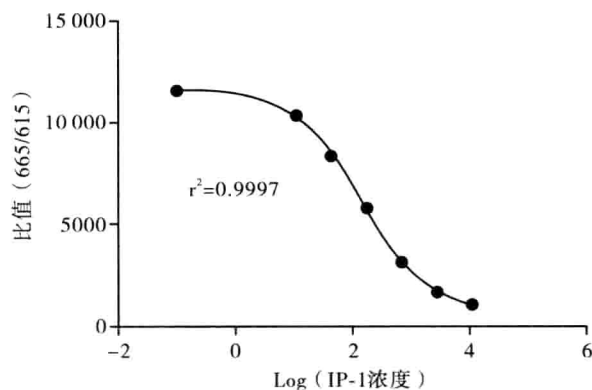


图 1-2-4 IP-1 标准曲线 (Graph Pad)

注: IP1 浓度分别为 0, 11, 43, 172, 688, 2750, 11 000 nmol/L。图中横轴为 IP-1 浓度的 Log 值。但由于 0 不能取 Log, 因此作图时以 0.1 替代, 实际进行计算时, 只是取线性段。

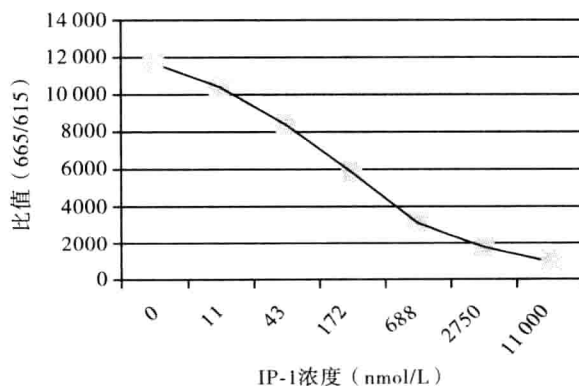


图 1-2-5 IP-1 标准曲线 (Excel)

2. 化合物检测结果 将代入标准曲线得到的 IP-1 浓度值与对应化合物浓度的 Log 值进行 nonlinear least squares fit (log agonist vs response-variable slope), 得到 EC_{50} 值, 详见表 1-2-1 及图 1-2-6 ~ 图 1-2-17。

表 1-2-1 化合物对 S1P1 和 S1P3 受体的激动作用

化合物	EC_{50} (nmol/L)	
	S1P1	S1P3
948-p	90	882
925-p	330	>5000
926-p	139	942
955-p	12.6	161
963-p	409	203
929-p	6.9	683
927-p	9.4	>5000
933-p	88	1547
916-p	2.5	1012
934-p	59	979
922-p	3.9	148
978-p	44	1738

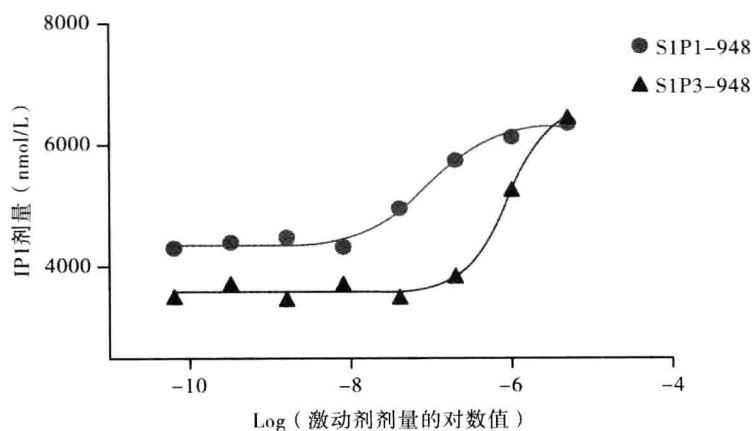


图 1-2-6 948-P 对 S1P1 和 S1P3 受体激动作用曲线