

技术与方法

表面等离子共振生物传感器研究整合素蛋白
 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 与 RGD 多肽的特异结合*

路英杰 张 帆 隋森芳**

(清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要 整合素蛋白 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 是血小板上的一种钙依赖性膜受体, 其胞外结构域可与含有 RGD 序列的肽链特异结合. 通过将含有 NTA-DOGS 的磷脂单分子层膜转移到 50 nm 厚的金膜上, 制备了一种含有 NTA 头部的表面等离子共振 (SPR) 传感器敏感膜. 设计并合成了含有 6 个组氨酸和 RGD 基团的 His-tagged 短肽 P1, 并利用 SPR 生物传感器, 对整合素蛋白与含有 RGD 配基的支撑平面膜的特异相互作用以及 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 对该相互作用的影响进行了研究. 结果表明, NTA 敏感膜能很好地将 P1 锚定在支撑平面膜表面, 并能够保证 P1 维持一个有效的定向. 将 Ca^{2+} 从低结合位点去除或加入 Mn^{2+} 都能够增加整合素蛋白的配基结合活性. 二价阳离子对整合素蛋白配基结合能力的调节作用, 可能在整合素发挥其生理功能的过程中具有重要的意义.

关键词 表面等离子共振传感器, 整合素蛋白 $\alpha_{IIb}\beta_3$, His-tagged 多肽, RGD 多肽

学科分类号 Q6

表面等离子共振技术 (SPR) 由于其极高的测量灵敏度, 同时又具有实时观测和无需标记的特点, 已被广泛地用于获取界面或近界面处的生物化学反应的热力学和动力学信息. 实验室组装了一台 SPR 仪, 并利用平面支撑脂膜技术制备 SPR 生物传感器敏感膜^[1,2], 对膜脂和蛋白质的相互作用^[3,4], 蛋白质-蛋白质的相互作用^[5,6], DNA-蛋白质相互作用^[7]等进行了广泛的研究. 整合素蛋白 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 是血小板上的一种钙依赖性膜受体, 它与配基的结合可以介导血小板的聚集. $\alpha_{IIb}\beta_3$ 有多种配基, 如纤维原蛋白, 纤维连接蛋白, 副纤维连接蛋白, 以及血管性假血友病因子等, 这些配基上大多含有一个精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽 (RGD) 序列, 可以与 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 上特有的 RGD 结合位点相互识别^[8]. 整合素蛋白上有多个二价阳离子结合位点, 可以分别结合 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} . 这些二价离子在调整合素蛋白的功能和其配基结合活性方面起着重要的作用, 其中, Ca^{2+} 是最重要的. 整合素蛋白上有两类 Ca^{2+} 结合位点: 一个高亲和 Ca^{2+} 结合位点和 3~4 个低亲和 Ca^{2+} 结合位点^[9]. Ca^{2+} 与高亲和位点的结合是活化过程中整合素蛋白形成二聚体所必需的, 同时还可以促进其与配基的结合. 但是, 高浓度的 Ca^{2+} (5 mmol/L) 反而会导致已结合含有 RGD 配基的抗体 9 解离. 有报道 Mn^{2+} 在几种整合素介导的细胞吸附中有一定的调节作用; Mn^{2+} 还可

以增加整合素蛋白对 RGD 多肽的结合能力, 但会降低整合素蛋白对 fibrinogen 的结合能力. 有关二价离子对整合素蛋白功能的影响有待进一步的研究.

在本实验中, 通过一个人工合成的含有 6 个组氨酸和 RGD 基团的 His-tagged 短肽 P1 (组氨酸-组氨酸-组氨酸-组氨酸-组氨酸-ε-氨基己酸-甘氨酸-甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸), 我们利用 SPR 生物传感器对整合素蛋白和 RGD 配基的特异相互作用以及 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 对该相互作用的影响进行了研究. 实验结果表明, 整合素蛋白可以与 P1 发生特异性结合; 将 Ca^{2+} 从整合素蛋白的 Ca^{2+} 低亲和力和结合位点上去除以及加入 Mn^{2+} 都能促进整合素蛋白与 RGD 配基的结合; Mn^{2+} 可能是结合在 Ca^{2+} 的低亲和力位点上的.

1 材料与方法

1.1 材料

氨基三乙酸二油酰甘油-3-琥珀酰赖氨酸 (NTA-DOGS) 购自 Avanti 公司; DPPG (dipalmitoylphosphatidylglycerol) 购自 Sigma 公司; 多肽 P1 和 GRGDSP 由 Anaspec 公司合成; 其他试

* 国家自然科学基金资助项目 (30070204).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62784768, E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2002-02-25, 接受日期: 2002-03-31

剂均购自国内, 为分析纯。

整合素蛋白的提纯参照 Fitzgerald 等^[10]的方法。提纯后的整合素蛋白在 4℃ 对缓冲液 A (0.1% Triton X-100, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Ca^{2+} , 1 mmol/L Mg^{2+}) 透析过夜。

1.2 方法

1.2.1 制备包含 NTA 的支撑单层膜

氨基三乙酸 (NTA) 可以与 His-tagged 蛋白通过镍离子形成稳定的螯合物, 已被广泛用于蛋白质提纯中。通过将含有 NTA-DOGS 的磷脂单分子层膜转移到 50 nm 厚的金膜上, 我们制备了一种含有 NTA 头部的表面等离子激元共振传感器敏感膜。首先在真空条件下在玻片表面镀上 50 nm 厚的金膜, 然后用 LB 膜方法将膜压为 42 mN/m 的脂单层膜水平转移到玻片上。在研究 P1 和 NTA 敏感膜作用时, 制备的是纯的 NTA-DOGS 支撑单层膜; 而在研究二价离子对整合素蛋白特异性结合的影响时, 制备的是 1:1 的 NTA-DOGS 和 DPPG 的混合支撑单层膜。

1.2.2 SPR 实验

SPR 仪为本实验室组装 (实验原理如图 1 所示)。在研究 His-tagged 短肽 P1 与 NTA 敏感膜相

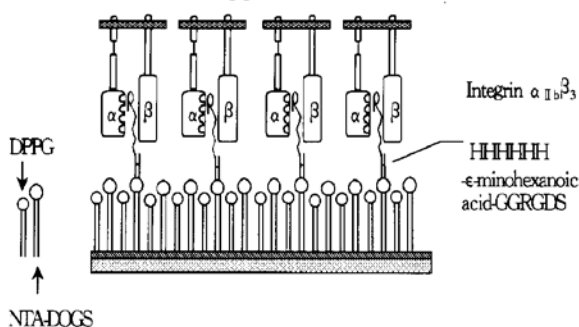


Fig. 1 The schematic model of experiment

As indicated in the figure, after the mixed monolayer was transferred to the sensor, His-tagged peptide was added into chamber to bind to NTA-DOGS. Then integrin will interact with RGD headgroup in the C-terminal of the peptide.

互作用时, 使用含有不同浓度咪唑的缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Ni^{2+} , 1 mmol/L Ca^{2+} , 1 mmol/L Mg^{2+} , pH 7.4) 作为体相。首先用 1% 的 BSA 封闭敏感膜上的非特异结合位点, 然后加入适量的 P1 进行特异性结合的分析。P1 的表观解离常数可以通过以下方程获得:

$$\text{P1} + \text{N} \rightleftharpoons \text{P2} \quad (1)$$

这里 P1 代表多肽 P1; N 代表 P1 的表面结合位点;

P2 代表结合在表面的 P1。当反应达到平衡时, K_d 可以由下式算出:

$$K_d = [\text{P1}][\text{N}]/[\text{P2}] = [\text{P1}]([\text{N}]_0 - [\text{P2}]) / [\text{P2}] \quad (2)$$

其中, $[\text{P1}]$ 是溶液中自由 P1 的浓度; $[\text{N}]$ 是 P1 在 NTA 敏感膜上未结合的位点的浓度, $[\text{P2}]$ 是结合到敏感膜上的 P1 的面密度; $[\text{N}]_0$ 是 P1 在 NTA 敏感膜上未结合位点的起始面密度。重排方程 (2) 可以得到:

$$1/[\text{P2}] = K_d / ([\text{N}]_0 [\text{P1}] + 1) / [\text{N}]_0 \quad (3)$$

因为 $[\text{N}]_0$ 和 K_d 都是常数, 所以 $1/[\text{P2}]$ 与 $1/[\text{P1}]$ 呈线性关系, 因此 K_d 可以从下式推出:

$$K_d = \text{斜率} / \text{截距}$$

这里的斜率和截距的数值均可从方程 (3) 中获得。当 $[\text{P2}] = 0.5$, $[\text{P2}]_{\text{max}} = 0.5 [\text{N}]_0$ 时, $K_d = [\text{P1}]$ 。所以从实验获得的 K_d 即为 P1 的半饱和浓度。整合素蛋白 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 与 P1 结合实验在含有不同二价阳离子组分的缓冲液 C (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Mg^{2+}) 中进行。我们在缓冲液中分别加入 1 mmol/L EGTA; 1 mmol/L Ca^{2+} ; 1 mmol/L Mn^{2+} 或 1 mmol/L Mn^{2+} / 1 mmol/L Ca^{2+} 来研究不同二价离子对整合素蛋白结合活性的影响。在验证 Ca^{2+} 结合位点对整合素蛋白配基结合活性影响的实验中, 整合素蛋白用 Rivas 等^[9]的方法进行预处理。

2 结果和讨论

2.1 NTA 敏感膜的表征

NTA 可以特异性结合 His-tagged 蛋白。在 pH 8 时, 含有 6 个组氨酸联结的蛋白与 NTA 的解离常数为 10^{-13} , 这种结合远远强于大部分抗原抗体之间的结合 (解离常数为 10^{-6} 到 10^{-9})。根据 Hainfeld 等^[11]的工作, 10~40 mmol/L 咪唑可以抑制蛋白中原有的组氨酸对 NTA 的非特异性吸附, 100 mmol/L 咪唑可以阻断 His-tagged 蛋白与 NTA 的特异性结合。因此我们分别用含有 30 mmol/L 和 100 mmol/L 咪唑的缓冲液来检验 P1 对 NTA 的特异结合。由图 2 可知, 在 30 mmol/L 咪唑的缓冲液中, P1 的结合量 (RU) 从不含咪唑时的 120 减至 90。而当存在 100 mmol/L 咪唑时, P1 的结合几乎被完全抑制, 结合量减为 15。这表明 P1 与 NTA 敏感膜的结合是依赖于 His-tagged 的特异性结合。

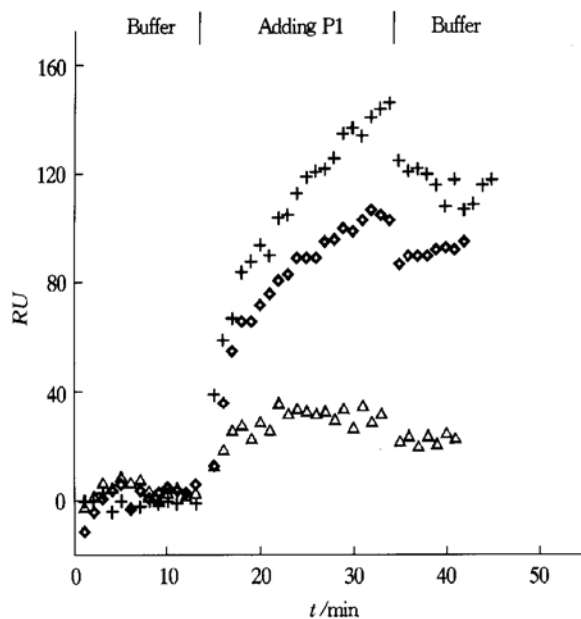


Fig. 2 Inhibitory effect of imidazole on the binding of P1 to NTA sensor

The sensor surface was first blocked with 1% BSA. After 3 cycles of buffer washing, the binding of P1 to NTA sensor was carried out in the buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Ni^{2+} , 1 mmol/L Ca^{2+} , 1 mmol/L Mg^{2+} , pH 7.4) without imidazole (+), with 30 mmol/L imidazole (◇) or with 100 mmol/L imidazole (△).

NTA 敏感膜可以通过 EDTA 洗脱和 Ni^{2+} 孵育再生. 当 P1 与 NTA 的结合达到平衡时, 用 10 mmol/L EDTA 溶液可以将结合在敏感膜上的 P1 脱附. 然后将敏感膜在 1 mmol/L Ni^{2+} 缓冲液中孵育 30 min, 继续加入 P1 进行结合. 如图 3 所示, NTA 敏感膜进行了 3 次再生循环, 结果表明

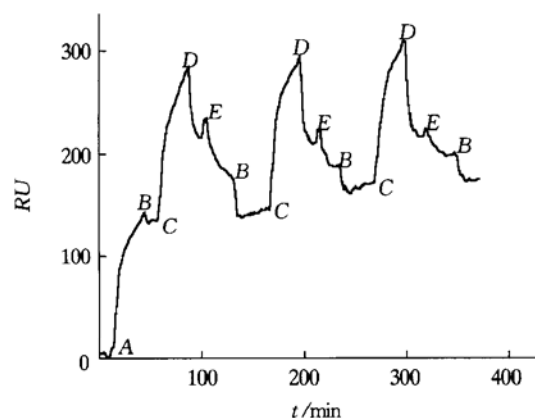


Fig. 3 Regeneration of NTA sensor

After P1 was bound to sensor in 1 mmol/L Ni^{2+} , the surface bound P1 was cleaned by 10 mmol/L EDTA, and then the surface binding activity was regenerated by 30 min incubation with 1 mmol/L Ni^{2+} at room temperature. This process was repeated for 3 times. A is adding 1% BSA for blocking; B is changing buffer to 1 mmol/L Ni^{2+} ; C is adding P1; D is washing the sensor by 1 mmol/L Ni^{2+} and E is washing by 10 mmol/L EDTA.

NTA 敏感膜可以重复使用, 但有 20% 左右的活性丧失. 因为 EDTA 是 Ni^{2+} 的螯合剂, 而 P1 仅在含 Ni^{2+} 的缓冲液中才能与 NTA 特异结合, 所以活性的丧失可能是由于 P1 非特异吸附于敏感膜表面造成的.

2.2 P1 的表观解离常数

如材料与方法中所述, 通过将不同浓度的 P1 加入到样品池中测定其结合量, 可以获得 P1 的表观解离常数. 图 4a 显示了 P1 的结合量与 P1 浓度的相互关系. 图 4b 用来计算 P1 的解离常数, 得到 K_d 为 1.17 $\mu\text{mol/L}$. 我们测得的 P1 与含 NTA 的支撑平面膜的解离常数在 $\mu\text{mol/L}$ 量级, 这与 His-tagged 蛋白与 NTA 磷脂脂质体的结合常数是相近的. 由于 P1 是用 N 端的组氨酸与敏感膜结合, 由中间的碳骨架支撑的 RGD 头部 (位于 P1 的 C 端) 可以伸向外部, 这为进一步研究 RGD 与整合素的结合提供了基础.

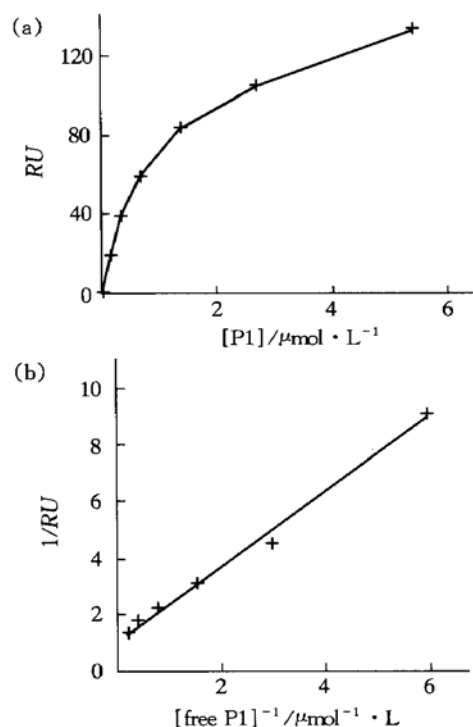


Fig. 4 Determination for the dissociation constant of P1

Series of concentrations of P1 were added to the sample chamber and the bound amount after buffer wash was recorded. The running buffer is 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Ni^{2+} , 1 mmol/L Ca^{2+} , 1 mmol/L Mg^{2+} . (a) shows the relationship between P1 binding and P1 concentration. (b) shows the plot used to calculate the apparent dissociation constant.

2.3 整合素蛋白与 P1 的特异性结合

多肽 GRGDSP 是整合素蛋白与 P1 头部 RGD

序列特异性结合的竞争性抑制剂。如图 5 所示, 加入多肽 GRGDSP 可以抑制整合素蛋白与锚定于 NTA 敏感膜表面的 P1 的特异结合。在溶液中有或没有 GRGDSP 的情况下, 整合素蛋白的表面结合量有显著的差异。在 GRGDSP 不存在时, 结合在 P1 上的整合素蛋白有一半是用缓冲液无法洗掉的。相应的, 含有 17 $\mu\text{mol/L}$ GRGDSP 时, 所有结合的整合素蛋白均可被缓冲液洗掉。在两种情况下, 被缓冲液洗掉的蛋白数量是相近的, 这部分整合素蛋白是靠非特异性结合吸附在敏感膜上的。由此可见, 整合素蛋白在敏感膜表面的结合是非特异性和特异性结合两部分的综合结果。特异性结合是非常牢固、而且无法用缓冲液洗掉, 而非特异性吸附作用则比较微弱, 可以被缓冲液洗掉。

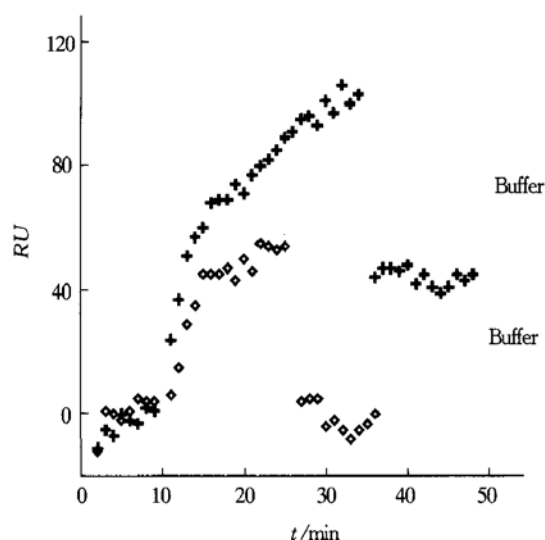


Fig. 5 Inhibitory effect of GRGDSP on integrin binding to P1
Integrin binds to P1 in the absence (upper curve) or in the presence of 17 $\mu\text{mol/L}$ GRGDSP (lower curve). Running buffer is 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Ca^{2+} , 1 mmol/L Mg^{2+} , pH 7.4.

2.4 二价阳离子对整合素蛋白配基结合的影响

由于二价阳离子对整合素蛋白与配基结合的亲合力有很大的影响, 我们进行了如下实验来检验不同离子的作用。如图 6 所示, 在 1 mmol/L EGTA 存在时, 整合素的结合量 (RU) 仅为 15, 这表明 EGTA 可以清除大部分整合素的特异结合。在 1 mmol/L Ca^{2+} 存在的情况下, 结合量 (RU) 为 50。而经过透析的整合素蛋白 (除去低亲和位点的 Ca^{2+}) 在不含 Ca^{2+} 的缓冲液中结合量 (RU) 增加到 70。 Ca^{2+} 结合到高亲和位点对于整合素的配基结合是必需的, 因为去除高亲和位点的 Ca^{2+} 可以使整合素蛋白发生聚集, 从而失去配基结合活

性^[12]。我们的实验表明, 在含有 1 mmol/L EGTA 或 1 mmol/L Ca^{2+} 或不含 Ca^{2+} 的缓冲液中, 整合素蛋白在敏感膜上有不同的结合量。这说明 Ca^{2+} 确实是整合素蛋白与配基结合所必需的, 而且结合在低亲和位点的 Ca^{2+} 对整合素蛋白的配基结合有明显的抑制作用。Rivas 等^[9]的工作表明, 整合素蛋白上几个低亲和位点对于 Ca^{2+} 的亲合力是相同的, 因此 Ca^{2+} 应该是结合到所有的低亲和位点, 然后对整合素蛋白的配基结合产生抑制。

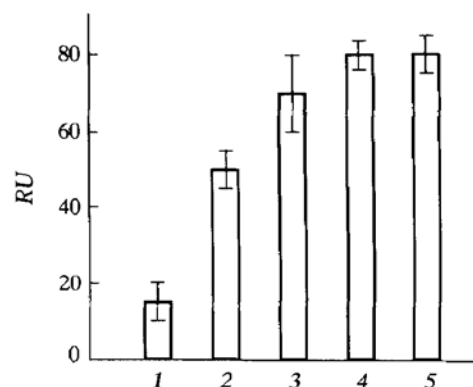


Fig. 6 Effects of divalent cations on integrin ligand binding activity

After P1 is immobilized on NTA sensor, the binding of dialyzed integrin was carried out in the buffer 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Mg^{2+} , pH 7.4 with different cations as indicated in the figure.

1: EGTA; 2: Ca^{2+} ; 3: buffer; 4: Mn^{2+} ; 5: $\text{Mn}^{2+} / \text{Ca}^{2+}$

Mn^{2+} 与非活性状态的整合素蛋白结合可以促进 RGD 配基的作用。从图 6 中我们可以看到在 1 mmol/L Mn^{2+} 存在时, 无论缓冲液中有无 Ca^{2+} , 整合素的结合量 (RU) 都增加到 80。这说明 Mn^{2+} 可以消除由 Ca^{2+} 结合到低亲和位点引起的结合量下降。尽管 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 在整合素蛋白上的结合位点仍未确定, 但有人曾推测 Mn^{2+} 可能会结合在 Ca^{2+} 的低亲和位点。我们的实验进一步证明了 Mn^{2+} 的加入会抑制 Ca^{2+} 与低亲和位点结合所引起的结合量降低, 这可能是 Mn^{2+} 结合在 Ca^{2+} 低亲和位点引起的, 由此可知对于这个位点, Mn^{2+} 具有比 Ca^{2+} 更高的亲和能力。低亲和位点被 Mn^{2+} 占据后, Ca^{2+} 对整合素配基结合能力的抑制作用就消失了。

综上, 我们制备了一种 NTA 的敏感膜, 并且人工合成了一段 His-tagged 的多肽, 将其以一定的方向锚定在 NTA 敏感膜表面, 用来检测二价阳离子对整合素蛋白的配基结合能力的影响。结果表明, Ca^{2+} 结合到低亲和位点会降低整合素的配基

结合能力, 而 Mn^{2+} 的加入会消除这种作用. Mn^{2+} 的结合位点可能就是 Ca^{2+} 的低亲和位点. 二价阳离子在调节整合素蛋白配基结合能力的作用, 可能对于整合素发挥其生理功能具有重要的意义.

参 考 文 献

- 1 Sui S F, Xiao C D, Zhou Y, *et al.* Surface plasmon resonance biosensors based on biofunctional interfaces. *Adv Biosensors*, 1999, **4**: 123~ 137
- 2 Xiao C D, Sui S F. Numerical simulations of surface plasmon resonance system for monitoring DNA hybridization and detecting protein-lipid film interactions. *Eur Biophysics J*, 1999, **28** (2): 151~ 157
- 3 Sui S F, Sun Y T, Mi L Z. Calcium-dependent binding of Rabbit C-reactive protein to supported lipid monolayers containing exposed phosphorylcholine group. *Biophys J*, 1999, **76** (1): 333~ 341
- 4 Lu Y J, Xia X F, Sui S F. The interaction of trichosanthin with supported phospholipid membranes studied by surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1521** (2): 308~ 316
- 5 Hu B, Sui S F, Guttenberg Z, *et al.* Study of interaction between integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and synthesized cyclic hexapeptide containing RGD. *Chin Sci Bull*, 2000, **45** (23): 2148~ 2152
- 6 Yang J, Sun Y T, Wu W C, *et al.* Binding of gp41 with its receptors immobilized at liquid/solid interface studied by surface plasmon resonance. *Mol Cryst Liq Cryst*, 1999, **337**: 465~ 468
- 7 Tsai P Y, Yang J, Sun Y T, *et al.* Surface plasmon resonance study of DNA polymerases binding to template-primer DNA duplexes immobilized on supported lipid monolayers. *Langmuir*, 2000, **16** (16): 6590~ 6596
- 8 Ruoslahti E, Pierschbacher M D. Arg-Gly-Asp—a versatile cell recognition signal. *Cell*, 1986, **44** (4): 517~ 518
- 9 Rivas G A, Gonzalez-Rodriguez J. Calcium binding to human platelet integrin GPIIb/IIIa and to its constituent glycoproteins—effects of lipids and temperature. *Biochem J*, 1991, **276** (1): 35~ 40
- 10 Fitzgerald L A, Leung B, Phillips D R. A method for purifying the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. *Anal Biochem*, 1985, **151** (1): 169~ 177
- 11 Hainfeld J F, Liu W Q, Halsey M R, *et al.* Ni-NTA-Gold clusters target His-tagged proteins. *J Struct Biol*, 1999, **127** (2): 185~ 198
- 12 Steiner B, Parise L V, Leung B, *et al.* Ca^{2+} -dependent structural transitions of the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. Preparation of stable glycoprotein IIb and IIIa monomers. *J Biol Chem*, 1991, **266** (23): 14986~ 14991

Specific Binding of Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ to RGD Peptide: a Surface Plasmon Resonance Study*

LU Ying-Jie, ZHANG Fan, SUI Sen-Fang**

(Department of Biological Sciences & Biotechnology, State-Key Laboratory of Biomembrane,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is a calcium-dependent heterodimeric protein on platelet, and its extracellular part can bind to RGD containing ligands. Here, a type of sensor prepared by transferring NTA-DOGS containing lipid monolayer to a 50 nm thick gold layer deposited on glass slide is reported. The surface binding ability and regeneration of the sensor were characterized by using a synthetic polypeptide P1 containing six histidine and RGD ligand. The specific binding of integrin to RGD ligand and the effect of divalent cations were investigated. The results show that His-tagged protein can be immobilized on the NTA sensor surface with a functional orientation and the results also show that removing of Ca^{2+} bound on low affinity sites or adding of Mn^{2+} can increase the binding ability of integrin.

Key words surface plasmon resonance, integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, His-tagged peptide, RGD

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30070204).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62784768, E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn

Received: February 25, 2002 Accepted: March 31, 2002