

• 专题报道 •

膜蛋白稳定技术及其在药物筛选中的应用进展

方家豪, 曹雨虹, 何宇臻, 洪战英*, 柴逸峰

(海军军医大学药学院, 上海 200433)

摘要: 膜蛋白承担了生物膜的主要功能, 是新药研发最重要的靶点群, 大约 60% 的药物以膜蛋白为靶点。由于膜蛋白在水溶液中有明显的聚集和变性倾向, 在体外很难模拟维持膜蛋白正确构象的类膜环境, 导致膜蛋白的结构和功能以及相关配体药物的研究远远滞后于水溶性蛋白。膜蛋白稳定技术对于建立高专属性、高灵敏度和高通量的膜蛋白配体药物筛选方法具有重要的意义。本文综述了目前用于稳定分离纯化膜蛋白的一些技术, 包括洗涤剂、人造膜、聚合物、慢病毒颗粒等, 以及这些技术在药物筛选中的具体应用。

关键词: 膜蛋白; 稳定技术; 洗涤剂; 人造膜; 聚合物; 慢病毒颗粒; 药物筛选

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2325-10

Advancements in stabilization technologies for membrane protein and its application in drug screening

FANG Jia-hao, CAO Yu-hong, HE Yu-zhen, HONG Zhan-ying*, CHAI Yi-feng

(School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Membrane proteins are the main undertakers of biofilm function, and also the most important target group for innovative drug discovery and research. About 60% of drugs targets are membrane proteins. Due to the obvious aggregation and denaturation tendency of membrane proteins in aqueous solution, it is difficult to simulate the membrane like environment to maintain the correct conformation of membrane proteins *in vitro*, which results in the slower-growing research on the structure and function of membrane proteins and related ligand drugs than that of water-soluble proteins. Membrane protein stabilization technology is the premise of establishing high specificity, high sensitivity and high throughput drug screening methods for membrane protein ligands, which is of great significance. In this paper, some techniques for stable separation and purification of membrane proteins are reviewed, including detergents, artificial membranes, polymers, lentiviral particles and so on, as well as their specific applications in drug screening.

Key words: membrane protein; stabilization technology; detergent; artificial membrane; polymer; lentivirus particles; drug screening

膜蛋白 (membrane proteins, MPs) 是细胞膜的重要组成部分, 在物质运输、信号转导和细胞间识别等多种细胞功能中发挥着重要作用。人类基因组中编码的 MPs 约占总蛋白质组的 25%。这些 MPs 与囊性纤维化、动脉粥样硬化、帕金森病和阿尔茨海默病等多种疾

病相关^[1]。MPs 暴露在细胞外的区域是许多药物作用的潜在靶点, 据估计 MPs 是 60% 药物的靶点^[2], 如 ABC 转运蛋白^[3]、核苷转运蛋白^[4]、G 蛋白偶联受体^[5]、微囊蛋白-1^[6]等。一些 MPs 可调节细胞反应使药物直接进入细胞内, 或者以通道的形式帮助药物进入细胞内部发挥药效; 而另一些 MPs 则主动从细胞中泵出药物, 因此 MPs 可以极大地影响药物的治疗效果。

作为最具前景的药物潜在靶点群, MPs 的分离纯

收稿日期: 2021-04-20; 修回日期: 2021-07-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872829, 81673386).

*通讯作者 Tel: 86-21-81871269, E-mail: hongzhy001@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0573

化对于其结构和功能研究以及新药研发具有重大意义。研究发现MPs需要维持脂质双分子层或类脂环境才可以保持其天然构象,但是这种环境在体外很难模拟;并且MPs在水溶液中还有明显的聚集和变性倾向,因此MPs的结构生物学研究十分滞后。目前已知结构的蛋白中只有2%~3%是MPs^[7]。此外,MPs的表达量一般都较低,难以被分离纯化得到足够量的目标MPs。如何将MPs分离纯化并获得稳定的结构是MPs研究的难点问题。针对MPs脱离天然膜环境后易聚集和变性的现象,早期研究者提出了以表面活性剂为主的洗涤剂策略,利用其形成的胶束来分离MPs,但在应用过程中存在一些问题^[8];进而提出了以脂质体、纳米盘等两亲体系来模拟天然膜环境,一定程度上保证了MPs在分离纯化过程中构象和功能的完整性^[9];近年来还出现了保护MPs周围局部脂质环境的聚合物稳定技术^[10]、慢病毒颗粒稳定技术^[11]等。

本文针对MPs稳定技术进行综述,包括传统和新型的洗涤剂、人造膜、聚合物、慢病毒颗粒等稳定技术以及其在药物筛选中的具体应用,为下游MPs结构和功能研究提供可靠的技术支持,促进以MPs为靶点的新药研发和中药活性成分的高通量筛选。

1 洗涤剂稳定技术 (detergent)

早期的MPs稳定主要采用洗涤剂策略实现。洗涤剂是以表面活性剂为主的一类混合物的统称,它能降低两种不混溶液体之间的界面张力^[12]。洗涤剂的整体分子结构由亲水的极性头基团和疏水的非极性尾基团组成。水溶液中,细胞膜以脂质双分子层的形式存在,洗涤剂分子在高于临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC) 时以胶束形式存在。当细胞膜和洗涤剂胶束混合时,洗涤剂分子首先以非协同的方式结合在细胞膜表面,随着洗涤剂数量的增加,洗涤剂分子从细胞膜表面掺入进脂质双分子层内部,此时的非协同结合转变为协同结合,洗涤剂与细胞膜的协同和非协同结合称为跨双分子层机制^[13]。随着越来越多的洗涤剂被合并到膜中,脂-洗涤剂混合胶束形成,细胞膜被裂解,洗涤剂成功地提取MPs形成胶束,过程如图1所示。

1.1 传统洗涤剂 传统洗涤剂包括*N*-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (*N*-octyl- β -D-glucopyranoside, OG)、*N*-癸基- β -D-麦芽糖苷 (*N*-decyl- β -D-maltoside, DM)、*N*-十二烷基- β -D-麦芽糖苷 (*N*-dodecyl- β -D-maltoside, DDM)、*N*-壬基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (*N*-nonyl- β -D-pyranoglucoside, NG) 和月桂基二甲基氧化胺 (lauryl dimethylamine oxide, LDAO)。其中DDM作为最经典的洗涤剂,通常是MPs提取的首选洗涤剂^[14]。不同洗涤剂对

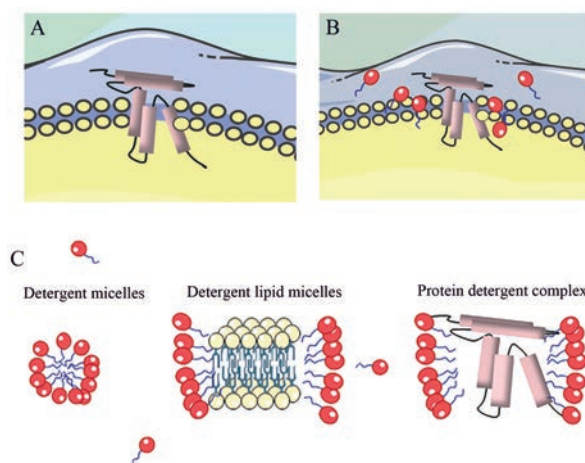


Figure 1 The process of membrane protein separation by detergent. A: Membrane protein embedded in lipid bilayer; B: Detergent interacts with lipid bilayer; C: Dissolution of lipid bilayer and extraction of membrane protein

于MPs的分离纯化有各自不同的倾向性。Iwata等^[15]发现DDM对转运蛋白和呼吸复合物的分离作用较好,而OG对通道蛋白的分离作用较好。Newstead等^[16]发现LDAO会导致大多数的转运蛋白聚集。Simon等^[17]的研究表明DDM、DM、OG、NG对于 α 螺旋蛋白提取效率相近。有报道^[18]称在LDAO中,电压依赖性阴离子通道蛋白可保持稳定结构。此外,不同类型的洗涤剂提取MPs时所需的磷酸盐浓度也不同。Metola等^[19]研究发现在较高的磷酸盐浓度时,两性离子型洗涤剂LDAO比非离子型洗涤剂DDM有更高的提取效率。不同类型洗涤剂对蛋白的稳定性也不同,据估计只有20%的MPs能在LDAO中维持稳定^[20];相比之下,非离子型洗涤剂DDM中大部分蛋白质稳定性明显优于LDAO,但非离子型洗涤剂的提取效率往往低于两性离子型洗涤剂。在传统洗涤剂的应用过程中,研究者们描述的共性问题在于胶束中的MPs稳定性不高,很难保持MPs的天然构象,限制了MPs结构和功能研究及其下游应用。

1.2 新型洗涤剂 针对传统洗涤剂中MPs稳定性不高的问题,研究者开发出一系列新型洗涤剂,主要有:环戊烷基麦芽糖苷、杯芳烃基洗涤剂、不对称麦芽糖新戊二醇、线性和支化甘露醇基两亲体、三苯基核麦芽糖苷等。它们与传统洗涤剂相比,能更好地稳定MPs。

Das等^[21]制备了一类以环戊烷为核心单元的新型非对映体洗涤剂,即环戊烷基麦芽糖苷 (cyclopentyl maltosides, CPMs),并对其稳定几种模型MPs的能力进行了评价。与常规洗涤剂DDM相比,CPMs对包括两个G蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs)

在内的所有被测 MPs 表现出更高的稳定性和提取效率。而 Hardy 等^[22]开发的杯芳烃基洗涤剂具有更高的热稳定性。在杯芳烃基洗涤剂中, MPs 能保持稳定的温度与经典洗涤剂 DDM 相比至少提高了 30 °C。Hyoungh 等^[23]制备了一系列的不对称麦芽糖新戊二醇(neopentyl maltose glycols, NMGs), 并对它们的 MPs 溶解和稳定性能进行评估, 包括两种 G 蛋白偶联受体, 结果显示与 DDM 相比, NMGs 对所测的 MPs 有更高的稳定性。此外还有很多比经典洗涤剂 DDM 性能更好的洗涤剂, 如基于间苯二酚的葡萄糖苷和麦芽糖苷的两亲性洗涤剂^[24] (分别称为 RGAs 和 RMAs)、三苯基核麦芽糖苷洗涤剂^[25] (triphenyl maltosides, TPMs)、锡基肌醇苷洗涤剂^[26] (tin inositol glycoside, SIGs) 等都在一定程度上具有更高的 MPs 稳定性和提取效率。Hussain 等^[27]设计合成了线性和支化甘露醇基两亲体 (mannitol amphiphilics, MNAs), 通过比较研究表明, 大多数支化 MNAs 在 MPs 稳定性方面都优于线性 MNAs。

尽管新型洗涤剂在一定程度上提高了分离纯化过程中 MPs 的稳定性, 但新旧洗涤剂都有一些共性的缺陷^[28]: ① 对于未知性质 MPs 的分离、纯化和稳定的洗涤剂选择, 需要进行广泛筛选; ② 洗涤剂以形成胶束的形式分离纯化 MPs, 常常会导致 MPs 失去与脂质和其他蛋白质的天然相互作用; ③ 稳定分离 MPs 效果好的洗涤剂有时会干扰下游应用。因此, 无法预测哪种洗涤剂对给定的蛋白质最有效, 需要通过反复实验来确定。

2 人造膜稳定技术

针对洗涤剂策略的不足, 研究者们提出了新的模拟天然膜环境的两亲体系的人造膜策略。该策略的灵感来自新兴的纳米科学, 充分考虑了磷脂双分子层的复杂性和维持 MPs 活性的重要性, 确保在局部膜环境中稳定地分离纯化 MPs。人造膜稳定 MPs 的基本原理是将二油酰基磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰甘油、棕榈油酰磷脂酰胆碱、胆固醇等细胞膜含有的磷脂类成分, 采用不同的反应条件, 制备成脂质体、双胞体和纳米圆盘等多种形式, 并与纯化或重组的 MPs 按一定比例混合, 即可实现 MPs-人造膜镶嵌模型重构。

2.1 脂质体 (liposome) 脂质体是将两性分子如磷脂和鞘脂分散于水相, 分子的疏水尾部倾向于聚集在一起, 避开水相, 而亲水头部暴露在水相, 形成具有双分子层结构的封闭囊泡。脂质体可由纯脂质或混合脂质制备, 其比例可根据目的蛋白进行调整。脂质体的大小可通过分散制备步骤进行调整, 如膨胀^[29]、挤压^[30]、乳化、超声波、电形成^[31]、喷墨形成和冻融循环等。对于 MPs 中的转运体如核昔转运蛋白, 脂质体有其独特

的优势。重组脂质体可以通过选择性浓缩脂质体内底物对 MPs 进行功能完整性测试。同样, 如果蛋白质脂质体是在底物存在下形成, 也可以进行反向评估^[32]。此外, 脂质体中脂质的比例和种类会极大的影响 MPs 的活性、稳定性和结晶性能^[33]。脂质体可以通过稳定蛋白质折叠、单体和亚单位之间的联系来促进结晶, 也可以通过脂质体介导的晶格接触来促进结晶, 从而测定 MPs 的结构和功能以及相应的药物靶点研究。Kurisu 等^[34]发现与传统磷脂相比, 加入非天然脂质二油酰基卵磷脂 (DOPC) 可以促进蓝藻细胞色素 b₆f 复合体的结晶。Jidenko 等^[35]用洗涤剂/DOPC 混合物溶解并结晶得到在酵母中过表达的哺乳动物 Ca²⁺-ATP 酶。

2.2 双胞体 (bicelles) 双胞体是由长链磷脂和短链脂质 (或洗涤剂) 混合形成的自组装圆盘结构^[36], 长链磷脂形成含 MPs 的双分子层, 然后由位于双分子层边缘的短链脂质稳定。目前最常用的组合是二己酰磷脂酰胆碱 (DHPC, 短脂) 和二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC, 长脂) 的组合。根据长脂与短脂的比例、温度、pH 值和盐浓度的不同, 双胞体具有不同的构象。双胞体是介于脂质体囊泡和经典洗涤剂胶束之间的一种中间形态, 结合了这两种系统的优点。与脂质体相比, 双胞体更容易实现均匀混合; 与经典洗涤剂胶束相比, 双胞体中洗涤剂用量更低, 并且更加接近天然的膜环境^[37]。但双胞体也有其局限性, 如 [DMPC]:[DHPC] 的合适比例往往难以控制。在双胞体中洗涤剂交换步骤有时会导致 MPs 的聚集, 存在洗涤剂使用相关问题的限制。

2.3 纳米盘 (nanodisc) 纳米盘由磷脂和两亲性螺旋蛋白, 也称膜支架蛋白 (membrane scaffold protein, MSP) 组成。一般由 130~160 个磷脂形成含 MPs 的双分子层, 然后由 MSP 作为与 MPs 结合的疏水基团保持其天然构象^[38]。单个 MPs 可形成 150 kDa 大小的纳米盘。组装纳米盘时, 首先将 MSP 按照一定比例与预先溶解在洗涤剂 (通常是胆酸钠) 中的磷脂混合, 孵育一段时间后利用透析或疏水吸附剂去除洗涤剂, 随后纳米盘自行组装形成纳米级别类膜结构圆盘^[39]。组装包含 MPs 的纳米盘只需在体系中再加入适量 MPs, 其自组装过程与空纳米盘相似。包含 MPs 的纳米盘与空纳米盘通过生化手段进行分离, 随后用分子排阻色谱进一步纯化, 过程如图 2 所示^[40]。

对于 MPs 的稳定分离纯化而言, 纳米盘体系可以在溶液中提供类膜环境, 它具有和细胞膜一样的脂质组成。与其他人造膜相比, MSP 的添加可以更好地稳定 MPs 的天然构象。应用纳米盘开展的 MPs 研究较广泛, GPCR 家族蛋白 β 2AR 被证明在纳米盘体系中可

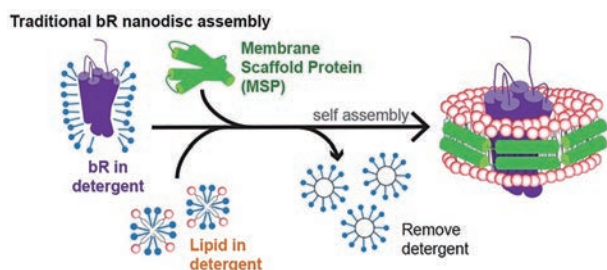


Figure 2 Self assembly process of nanodisc. After the detergent was removed by dialysis or hydrophobic adsorbent, nanodisc was assembled by itself^[40]

以保持蛋白的结构完整和功能活性^[38]。此外 Yao 等^[41]使用纳米盘研究 B 细胞淋巴瘤/白血病基因表达的抗凋亡蛋白 (BCL-XL) 在其膜环境下的构象和功能, 结果显示纳米盘并未改变 BCL-XL 的 N 端的球状结构, 并且增强了其 BH₃ 配体的结合活性。针对传统的纳米盘的构型, Nasr 等^[42]设计了共价环化纳米盘 (covalently circularized nanodiscs, CNDs), 其较传统纳米盘具有更高的稳定性、可控的直径和形状可调等优点, 被应用到电压依赖性阴离子通道蛋白-1 (VDAC-1) 和 G 蛋白偶联受体-NRT1 上。

与双胞胎一样, 纳米盘的第一步是基于洗涤剂的增溶, 需要优化所使用的洗涤剂的性质和浓度, 这在纳米盘重组中可能造成蛋白质活性损失, 因此同样存在洗涤剂使用相关问题的限制。表 1^[34,35,41-45]比较了脂质

体、双胞胎、纳米盘的组成及其优缺点。

3 聚合物稳定技术

针对洗涤剂和人造膜分离纯化和稳定 MPs 的不足, 研究人员从保护 MPs 周围局部脂质环境的思路出发, 开发出了完全不添加洗涤剂的新方法, 采用包括苯乙烯马来酸、二异丁烯马来酸、聚甲基丙烯酸酯等聚合物来稳定含有 MPs 的纳米级脂质圆盘。

3.1 苯乙烯-马来酸酐 (styrene maleic anhydride, SMA) 聚合物

SMA 是苯乙烯和马来酸酐通过自由基聚合得到一种性能优良的共聚物, 该聚合物由亲水性的马来酸和疏水性的苯乙烯交替组成^[46]。SMA 和大约 140 个脂质组成苯乙烯-马来酸酐脂质颗粒 (SMA lipid particles, SMALPs)^[47]。组装 SMALPs 时, 首先将细胞悬液破碎处理, 然后将一定量 SMA 添加到 pH 值 ≥ 6.5 的细胞破碎悬液中, 孵育一段时间后可发现该混合体系变澄清, 表明 SMALPs 自组装完成^[48], 接下来采用光散射技术来检测 SMALPs 组装完成后的物理参数。Xue 等^[49]通过研究 SMALPs 自组装过程发现, SMA 共聚物首先将末端的苯乙烯基团结合到膜表面, 随后疏水相互作用驱动苯乙烯基团插入脂质双分子层的中心。当 SMA 共聚物的疏水侧链完全插入时, 局部脂质双分子层产生波动, 形成小的跨膜孔。随着跨膜孔生长, SMA 将羧基定向到跨膜孔上, 并且在脂质尾部之间插入苯基来稳定边缘, 从而完成 SMALPs 自组装, SMA 提取纯化膜蛋白过程如图 3 所示^[50]。

Table 1 Comparison of different types of artificial films

Artificial membrane	Component	Advantage	Shortage	Application	Ref.
Liposome	Phospholipid	More suitable for the functional characterization of transporters	Poor uniformity of liposomes	Cytochrome b6f calcium pump	[34] [35]
Bicelles	Long chain phospholipids and short chain lipids (or detergents)	Easy to mix evenly	Need detergent The appropriate ratio of [DMPC] and [DHPC] is difficult to determine	VDAC-1 β 2-Adrenergic receptor	[43]
Nanodisc	Phospholipids and amphiphilic helical proteins	Adding MSP can stabilize the natural conformation of membrane protein better	Need detergent Specific proteins require a specific buffer system	G protein coupled receptor CYP3A4 BCL-XL VDAC-1, NRT1	[44] [45] [41] [42]

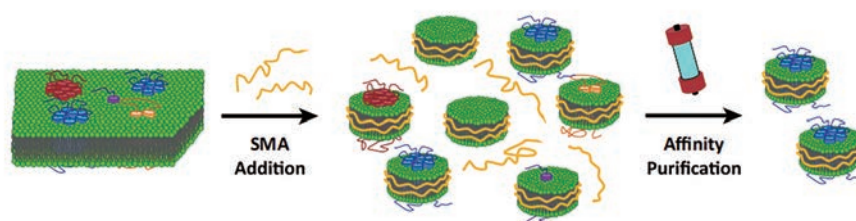


Figure 3 Extraction of membrane proteins with native lipid environment by SMA. SMA additions leads to the formation of native nanodiscs containing different MPs or only lipid material. Subsequent affinity purification allows for the isolation of native nanodiscs with the protein of interest^[50]

目前 SMA 方法已经成功地应用于稳定和分离纯化离子通道蛋白^[51]、转运蛋白^[51]、酶^[52]、呼吸链复合物^[53]以及受体^[54]等。当苯乙烯与马来酸的比例为 2:1 或 3:1 时, SMA 对 MPs 的分离纯化效果最好。另外 SMA 的提取效率还受到目标蛋白的大小和蛋白在膜中的包裹密度的影响^[46]。与洗涤剂 and 人造膜相比, SMA 的优势在于其通过 SMALPs 的自发组装将目标蛋白与天然脂质双分子层以及相关蛋白一起提取。这不仅提供了相关蛋白与目标蛋白相互作用的信息, 而且还提供了一种识别目标蛋白周围内源性脂质组成的方法。此外, 纯化成 SMALPs 的 MPs 具有显著的稳定性, 在 4 °C 时 SMALPs 至少能保持一周稳定, 在经过几轮冻融循环后, SMALPs 颗粒完整性和蛋白功能损失最小^[55]。

但 SMA 对低 pH 和二价阳离子不耐受的特点限制了该策略在 MPs 下游研究中的应用^[56, 57], 因此人们对 SMA 进行结构修饰, 合成 SMA-ED、SMAd-A^[58] 和 SMI^[59]等 pH 值可调和耐受二价阳离子的聚合物脂质纳米盘, 有望成功应用于 MPs 的稳定提取上。

3.2 二异丁烯-马来酸 (diisobutylene maleic acid, DIBMA) 聚合物 SMA 对二价阳离子耐受性低, 限制了 Mg²⁺和 Ca²⁺等阳离子的使用, 而这些阳离子通常用于蛋白质纯化和活性测定的缓冲液中。最近有研究表明, 二异丁烯-马来酸 (DIBMA) 共聚物也能够直接溶解膜, 形成 DIBMA 脂质颗粒 (DIBMALPs), 可以克服上述 SMA 局限性。Oluwole 等^[60]发现 DIBMALPs 比 SMALPs 对二价阳离子如 Mg²⁺耐受性更高。当 Mg²⁺浓度超过 4 mmol·L⁻¹时, SMALPs 内的蛋白质开始聚集变性, 在 Mg²⁺浓度为 8~10 mmol·L⁻¹时蛋白质全部失活。但在 DIBMALPs 中, 当 Mg²⁺浓度为 10 mmol·L⁻¹时, 只有 20% 的蛋白质变性失活。Danielczak 等^[61]研究发现当使用 DIBMA 时, 添加 Mg²⁺或 Ca²⁺可以提高提取效率。尽管 DIBMA 对于某些 MPs 的提取纯度和稳定性要比 SMA 低, 但 DIBMA 对二价阳离子有更高的耐受性, 可以为蛋白质构象和动力学的研究提供了更好的环境^[62]。因此, 选择哪种聚合物取决于所研究的

目标蛋白的特征。

3.3 聚甲基丙烯酸酯 (polymethacrylate, PMA) 聚合物 尽管 SMA 和 DIBMA 在一些 MPs 的分离纯化中取得了成功^[63], 但存在 SMA 对二价阳离子耐受性低、DIBMA 提取纯度和稳定性低的缺陷并且这两种聚合物都有强烈的紫外吸收, 可能干扰紫外检测^[57]。因此人们开始寻找非“烯炔-马来酸支架”替代聚合物。最近, 两亲性聚甲基丙烯酸酯聚合物 (polymethacrylate, PMA) 被证明可将脂质双分子层溶解成纳米圆盘。PMA 比常见的苯乙烯-马来酸聚合物具有潜在的优势, 但目前 PMA 对于 MPs 的纯化应用较少^[64]。Lavington 等^[63]以神经紧张素受体 1 (NTSR1) 为对象, 探索使用 PMA 的无洗涤剂纯化。通过使用 Sf9 细胞中表达的 NTSR1-eGFP 融合蛋白, 筛选了一系列的增溶条件, 证明了温度、pH、NaCl 浓度以及聚合物和膜样品的相对数量的重要性。此外还发现 PMA 对二价阳离子有一定耐受性。PMA 溶解的 NTSR1 比洗涤剂溶解的 NTSR1 表现出更大活性, 这表明 PMALPs 为 NTSR1 提供了更天然的膜环境^[63]。因此, PMA 是一种可替代 SMA 的 MPs 纯化方法, 在研究 NTSR1 和其他 MPs 方面具有良好的前景。表 2 比较了 SMA、DIBMA、PMA 的组成、优缺点及其应用。

4 慢病毒载体稳定技术

慢病毒 (lentivirus) 载体是以人类免疫缺陷 I 型病毒 (HIV-1) 为基础发展起来的基因载体。慢病毒载体可以将外源基因或外源的 shRNA 有效地整合到宿主染色体上, 从而达到持久性表达目的基因的效果。基于慢病毒颗粒 (lentivirus particles, LVPs) 作为 MPs 载体的策略是将目的基因插入慢病毒转染所需的质粒当中, 慢病毒从包装细胞出芽的过程中会携带包装细胞的细胞膜片段, 从而获得细胞膜上的 MPs^[65]。这种慢病毒稳定策略具有以下优点: ① 慢病毒颗粒表面的 MPs 受体表达水平高, 活性高; ② 慢病毒颗粒可以直接固定在芯片上, 无需标记; ③ 慢病毒颗粒易于表达和纯化。因此, 基于慢病毒颗粒的稳定策略在研究 MPs 与配体之间的相互作用方面有巨大潜力, Heym

Table 2 Comparison of different types of polymers

Polymer	Component	Advantage	Shortage	Application	Ref.
SMA	Styrene and maleic anhydride	High extraction efficiency and stability	The tolerance to pH lower than 6.5 and divalent cations is low. Strong ultraviolet absorption	Ion channel Transporters Enzyme Respiratory Chain complex recipient	[50] [50,51] [52] [53] [54]
DIBMA	Diisobutylene maleic acid	Higher tolerance with divalent cations	Strong ultraviolet absorption	ZipA	[61]
PMA	Polymethacrylate	Higher tolerance with divalent cations; No strong UV absorption	Less application	NTSR1	[63]

等^[11]将慢病毒颗粒结合表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 和表面声波技术应用于 GPCR 与其配体 (CXCR4 抗体-12G5、AMD3100) 的结合动力学研究。结果显示,该方法得到的动力学参数和亲和参数,与经典的细胞亲和实验测量值一致,为靶向 GPCRs 的小分子动力学分析提供基础。此外, Hoffman 等^[66]构建 LVPs-SPR 体系来研究趋化因子受体 4 (cx-chemokine receptor 4, CXCR4) 与其配体的相互作用。以 293T 细胞为宿主,构建了高/低表达 CXCR4 的慢病毒颗粒,并将其偶联在 Biacore F1 芯片上进行 CXCR4 的抗体亲和力评估。表 3 总结比较了上述 MPs 稳定技术的原理、分类以及优缺点。

5 MPs 稳定技术结合表面等离子共振技术在药物筛选中的应用

MPs 配体药物筛选和 MPs 的生物标志物发现是目前新药研发的重要方向。据统计在 DrugBank 数据库中,已批准的药物靶点中有 54% 是 MPs。截至 2017 年, FDA 批准的分子靶标中只有 667 个是蛋白质,而在 DrugBank 数据库中的 MPs 靶标总数为 3 041 个^[2,67]。可见,批准的 MPs 靶标数远少于 MPs 靶标总数。MPs 的低表达量以及强疏水性等特点限制了 MPs 靶标的体外研究以及配体药物筛选。因此, MPs 稳定技术结合表面等离子共振技术的发展给众多待开发的潜在 MPs 靶标和相关配体药物筛选带来了曙光。

目前针对 MPs 的配体高通量筛选技术中最具代表性的是 SPR。它是一种敏感的表面分析技术,它是通过分子吸附在重金属膜上引起介电常数的变化来进行检测,自 20 世纪 90 年代以来,这种方法被广泛用于简单的蛋白配体以及小分子药物的高通量筛选^[68]。Johzuka 等^[69]建立了高精度表面等离子共振 (HP-SPR)-3D 系统,它能在加药 1 h 内对抗癌药物进行模拟体内表型筛选。Wang 等^[70]模拟了 PD-1/PD-L1 在蛋白

质-蛋白质界面上的潜在结合区域,在内部肽库中结合虚拟筛选和 SPR 亲和力评估,得到三种 PD-1 靶向肽抑制剂。此外, SPR 也成功应用于表皮生长因子受体的配体^[71]、泛素化抑制剂^[72]、IL-6 家族细胞因子受体 GP130 PPI 抑制剂^[73]的筛选。

然而,对于 GPCR、ABC 转运蛋白等表达量低且结构复杂的多次跨 MPs,当它们直接与固体底物特别是 Biacore 系统中的金底物接触时,MPs 通常会失去功能或变性。所以,研究者们引入 MPs 稳定技术获得活性良好的 MPs,再与 SPR 结合用于其相应的配体药物的筛选。Komolov 等^[74]将洗涤剂稳定化的视紫红质蛋白偶联于 SPR 芯片表面,成功用于分析视紫红质蛋白与其配体间的相互作用。与经典的洗涤剂策略相比,人造膜稳定策略结合 SPR 技术在 MPs 配体筛选以及新药研发中应用更为广泛。Oshima 等^[75]将包裹有 hERG 通道蛋白的人工双层脂质膜重建在硅芯片的微孔中,评价了这个体系的耐用性,随后 Tadaki 等^[76]优化了该组装过程, Komiya 等^[36]根据优化后条件,将该系统定量评价西沙必利对细胞合成 hERG 钾通道的作用。结果发现用该体系测得的 IC₅₀ 与膜片钳法测量值一致,最终建立了作用于 hERG 钾离子通道的药物快速筛选平台。Das 等^[45]将纳米盘稳定技术和局域表面等离子体共振技术 (LSPR) 结合,用于分析 12 种小分子药物与细胞色素 P450 3A4 酶的结合类型。结果显示,溴隐亭、睾酮、洛伐他汀、阿德司琼、 α -萘酚酮、红霉素和硝苯地平为 I 型药物,通过取代配位水分子来调节酶活性;酮康唑、伊曲康唑、曲酰环丙胺、双氯芬酸和特非那定为 II 型药物,通过直接与铁结合来抑制酶。Maynard 等^[77]为解决 GPCR 配体筛选方法的局限性,首先用脂质双分子层将 GPCR 分离纯化,随后通过纳米孔将其固定在芯片上,用 SPR 技术采集 GPCR 配体结合的剂量-反应曲线,建立了 GPCR 配体的高通量筛选平台。

Table 3 Comparison of four membrane protein stabilization techniques

Membrane protein stabilization technology	Method	Category	Advantage	Shortage
Detergent	Replacing natural membrane environment with micelles	Traditional detergent and new detergent	The specificity of membrane protein extraction is high	The stability of membrane protein is low and its application scope is limited
Artificial membrane	Artificial simulation of natural membrane environment	Liposomes Bicells Nanodisc	The stability of the extracted membrane protein was high, which protected the functional and structural properties of the membrane protein to a certain extent	Need to add detergent, restricted by the use of detergent
Polymer	Extraction of membrane proteins from polymer coated natural membrane	SMA DIBMA PMA	The stability of the extracted membrane protein is high and no detergent is needed	The specificity of membrane protein extraction is low
Lentivirus particles	Extraction of membrane protein from lentivirus particles		No need to label membrane protein, high activity	The construction of lentivirus particles is relatively complex

Rich 等^[78]以 SPR 技术建立了 CCR5 蛋白最佳的增溶条件筛选体系, 以抗体 Fab (2D7) 为阳性药, 在 96 种不同的洗涤剂中找出既能有效溶解受体又能保持其活性的洗涤剂, 结果显示大多数保持 CCR5 活性的去污剂是带有 C9 到 C13 烷基尾的麦芽糖, 而短 ($\leq C8$) 或长 ($\geq C14$) 烷基链的麦芽糖是无效的增溶剂。Xu 等^[79]采用纳米圆盘稳定的离子通道蛋白 KcsA-Kv1 偶联于 SPR 芯片上, 用于分析 KcsA-Kv1 蛋白及其抑制剂间的相互作用。

针对慢病毒载体稳定技术结合 SPR 在中药活性成分筛选中的应用, 本课题组已展开一些探索性研究。P-糖蛋白 (P-gp) 是体内最重要的外排型转运蛋白, 具有 12 次跨膜的复杂结构, 且尚未商品化。Cao 等^[80]采用 LVPs 稳定策略, 获得活性良好的 P-糖蛋白, 构建了一种基于 SPR 的 P-糖蛋白配体筛选系统。首先, 获得 P-gp 高表达和低表达的 LVPs, 然后将 P-gp 高/低表达的 LVPs 分别固定在 CM5 芯片上作为活性通道和参比通道。以 P-gp 抑制剂伐司朴达 (valsopodar, Val) 和环孢素 (cyclosporin, CsA) 为阳性对照, 从天然产物库中快速筛选出厚朴酚、和厚朴酚和白藜芦醇作为潜在的 P-gp 配体 (图 4)^[80]。Chen 等^[81]构建了 CXCR4 的配体筛选体系, 将高/低表达的 CXCR4 的慢病毒颗粒固定在 CM5 芯片上, 以趋化因子受体拮抗剂 AMD3100 为阳性化合物, 从川芎提取物中筛选出洋川芎内酯 I 为 CXCR4 的潜在配体。

MPs 稳定技术在面向结构复杂的 MPs 的药物筛选中是不可缺少的关键技术, 它能够模拟 MPs 所需的天然

脂质环境, 保证 MPs 结构和功能的完整性, 为建立高专属性、高灵敏度和高通量的药物筛选方法提供技术支持。

6 小结与展望

MPs 功能的完整性对于药物靶点的发现和新药研发至关重要, 而 MPs 的稳定技术是保障其基本功能完整性的关键。本文总结了近年来 MPs 稳定技术的发展。最初研究人员利用洗涤剂胶束来分离 MPs, 但此方法忽略了天然脂质环境对 MPs 结构和功能的独特作用; 人造膜稳定技术有助于模拟 MPs 天然的功能和结构, 但在人造膜组装过程中仍然需要应用洗涤剂增溶, 未能避免洗涤剂应用中产生的问题; 目前最新的聚合物稳定技术在完全无洗涤剂的环境下可以将目的蛋白与天然脂质双分子层一起分离, 使其保持天然的膜环境, 能在最大程度上减少 MPs 结构和功能的缺失; 而慢病毒颗粒稳定策略无需处理就能直接与 SPR 芯片结合, 使得其在下游应用特别是与 SPR 联用上有其独特优势。然而上述这些策略仍然存在一些技术难点, 包括如何增加 MPs 提取的特异性, 如何减少 MPs 提取过程中带来的结构和功能的缺失, 需要更全面的 MPs 功能验证来确保所建立的方法的准确性。因此, 研究人员一直致力于开发新型 MPs 稳定技术, 以期在维持 MPs 正确结构的前提下获得纯度较高的目标 MPs。尽管 MPs 稳定技术在药物筛选中已联合 SPR 技术有了一些应用, 但今后仍需拓宽其应用范围, 以更好地服务于药物靶标发现与配体筛选。MPs 的稳定是药物研究中亟待解决的科学问题, 开发特异性强、效率更高的新

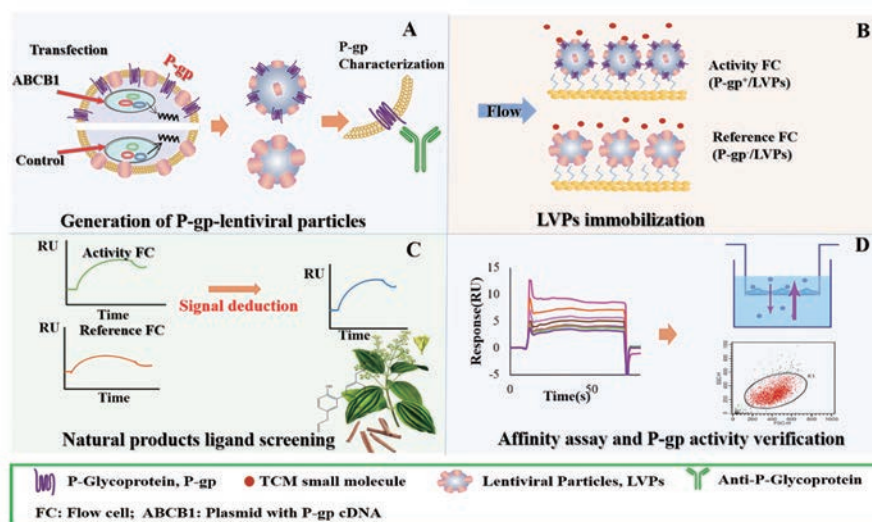


Figure 4 Work flow of screening P-gp small molecule ligands from natural products based on SPR-PLSS. A: To prepare high and low expression P-gp-LVPs; B: To fix different expression P-gp-LVPs on different channels of the chip; C: To obtain the affinity between natural products and P-gp through dual channel signal derivation, and to screen target compounds with significant response signal; D: To verify the effect of active compounds on the function and expression of P-gp^[80]

型 MPs 稳定技术任重而道远。

作者贡献: 方家豪负责文献检索及论文撰写; 曹雨虹负责修改文章; 何宇臻负责修改文章; 洪战英负责文章选题、指导写作、修改及校对文章。柴逸峰负责审阅文章。

利益冲突: 本文无利益冲突。

References

- [1] Lappano R, Maggiolini M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10: 47-60.
- [2] Santos R, Ursu O, Gaulton A, et al. A comprehensive map of molecular drug targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 19-34.
- [3] Wu CP, Ambudkar VS. The pharmacological impact of ATP-binding cassette drug transporters on vemurafenib-based therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2014, 4: 105-111.
- [4] Minuesa G, Huber-Ruano I, Pastor-Anglada M, et al. Drug uptake transporters in antiretroviral therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 132: 268-279.
- [5] Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, et al. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 829-842.
- [6] Yang C, He B, Dai W, et al. The role of caveolin-1 in the biofate and efficacy of anti-tumor drugs and their nano-drug delivery systems [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 961-977.
- [7] He Y, Wang K, Yan N. The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins [J]. *Protein Cell*, 2014, 5: 658-672.
- [8] Das M, Du Y, Mortensen JS, et al. Correction: trehalose-cored amphiphiles for membrane protein stabilization: importance of the detergent micelle size in GPCR stability [J]. *Org Biomol Chem*, 2019, 17: 4919-4920.
- [9] Fiori MC, Jiang Y, Zheng W, et al. Polymer nanodiscs: discoidal amphiphilic block copolymer membranes as a new platform for membrane proteins [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 15227-15236.
- [10] Bada Juarez JF, Harper AJ, Judge PJ, et al. From polymer chemistry to structural biology: the development of SMA and related amphiphilic polymers for membrane protein extraction and solubilisation [J]. *Chem Phys Lipids*, 2019, 221: 167-175.
- [11] Heym RG, Hornberger WB, Lakics V, et al. Label-free detection of small-molecule binding to a GPCR in the membrane environment [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1854: 979-986.
- [12] Anandan A, Vrielink A. Detergents in membrane protein purification and crystallisation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 922: 13-28.
- [13] Lichtenberg D, Ahyauch H, Alonso A, et al. Detergent solubilization of lipid bilayers: a balance of driving forces [J]. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38: 85-93.
- [14] Kotov V, Bartels K, Veith K, et al. High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 10379-10398.
- [15] Iwata S. *Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins* [M]. La Jolla: International University Line Press, 2003: 106-114.
- [16] Newstead S, Kim H, Von Heijne G, et al. High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 13936-13941.
- [17] Newstead S, Ferrandon S, Iwata S. Rationalizing alpha-helical membrane protein crystallization [J]. *Protein Sci*, 2008, 17: 466-472.
- [18] Hiller S, Garces RG, Malia TJ, et al. Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles [J]. *Science*, 2008, 321: 1206-1210.
- [19] Metola A, Bouchet AM, Alonso-Mario M, et al. Purification and characterization of the colicin A immunity protein in detergent micelles [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2017, 1859: 2181-2192.
- [20] Mcgregor CL, Chen L, Pomroy NC, et al. Lipopeptide detergents designed for the structural study of membrane proteins [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 171-176.
- [21] Das M, Mahler F, Hariharan P, et al. Diastereomeric cyclopentane-based maltosides (CPMs) as tools for membrane protein study [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 21382-21392.
- [22] Hardy D, Bill RM, Rothnie AJ, et al. Stabilization of human multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) using novel solubilization agents [J]. *SLAS Discov*, 2019, 24: 1009-1017.
- [23] Hyoun EB, Du Y, Hariharan P, et al. Asymmetric maltose neopentyl glycol amphiphiles for a membrane protein study: effect of detergent asymmetry on protein stability [J]. *Chem Sci*, 2019, 10: 1107-1116.
- [24] Hussain H, Du Y, Tikhonova E, et al. Resorcinarene-based facial glycosides: implication of detergent flexibility on membrane-protein stability [J]. *Chemistry*, 2017, 23: 6724-6729.
- [25] Ehsan M, Du Y, Mortensen JS, et al. Self-assembly behavior and application of terphenyl-cored trimaltosides for membrane-protein studies: impact of detergent hydrophobic group geometry on protein stability [J]. *Chem Eur J*, 2019, 25: 11545-11554.
- [26] Sadaf A, Ramos M, Mortensen JS, et al. Conformationally restricted monosaccharide-cored glycoside amphiphiles: the effect of detergent headgroup variation on membrane protein stability [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 1717-1726.
- [27] Hussain H, Helton T, Du Y, et al. A comparative study of branched and linear mannitol-based amphiphiles on membrane protein stability [J]. *Analyst*, 2018, 143: 5702-5710.
- [28] Rothnie AJ. Detergent-free membrane protein purification [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1432: 261-267.
- [29] Reeves JP. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles [J]. *J Cell Physiol*, 1969, 73: 49-60.
- [30] Traïkia M, Warschawski DE, Recouvreur M, et al. Formation of

- unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and ³¹P-nuclear magnetic resonance [J]. *Eur Biophys J*, 2000, 29: 184-195.
- [31] Pott T, Bouvrais H, Méléard P. Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions [J]. *Chem Phys Lipids*, 2008, 154: 115-119.
- [32] Johnson ZL, Lee SY. Liposome reconstitution and transport assay for recombinant transporters [J]. *Methods Enzymol*, 2015, 556: 373-383.
- [33] Hunte C, Richers S. Lipids and membrane protein structures [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2008, 18: 406-411.
- [34] Kurisu G, Zhang H, Smith JL, et al. Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity [J]. *Science*, 2003, 302: 1009-1014.
- [35] Jidenko M, Nielsen R, Sorensen T, et al. Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 11687-11691.
- [36] Komiya M, Kato M, Tadaki D, et al. Advances in artificial cell membrane systems as a platform for reconstituting ion channels [J]. *Chem Rec*, 2020 Jul, 20: 730-742.
- [37] Sanders CR, Prosser RS. Bicelles: a model membrane system for all seasons? [J]. *Structure*, 1998, 6: 1227-1234.
- [38] Leitz AJ, Bayburt TH, Barnakov AN, et al. Functional reconstitution of Beta2-adrenergic receptors utilizing self-assembling nanodisc technology [J]. *BioTechniques*, 2006, 40: 601-602.
- [39] Nath A, Atkins WM, Sligar SG. Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins [J]. *Biochemistry*, 2007, 46: 2059-2069.
- [40] Yeh V, Lee TY, Chen CW, et al. Highly efficient transfer of 7TM membrane protein from native membrane to covalently circularized nanodisc [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 13501-13510.
- [41] Yao Y, Nisan D, Fujimoto LM, et al. Characterization of the membrane-inserted C-terminus of cytoprotective BCL-XL [J]. *Protein Expr Purif*, 2016, 122: 56-63.
- [42] Nasr ML, Baptista D, Strauss M, et al. Covalently circularized nanodiscs for studying membrane proteins and viral entry [J]. *Nat Methods*, 2017, 14: 49-52.
- [43] Parmar MJ, Lousa Cde M, Muench SP, et al. Artificial membranes for membrane protein purification, functionality and structure studies [J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44: 877-882.
- [44] Dorr JM, Koorengel MC, Schafer M, et al. Detergent-free isolation, characterization, and functional reconstitution of a tetrameric K⁺ channel: the power of native nanodiscs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 18607-18612.
- [45] Das A, Zhao J, Schatz GC, et al. Screening of type I and II drug binding to human cytochrome P450-3A4 in nanodiscs by localized surface plasmon resonance spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2009, 81: 3754-3759.
- [46] Swainsbury DJK, Scheidelaar S, Foster N, et al. The effectiveness of styrene-maleic acid (SMA) copolymers for solubilisation of integral membrane proteins from SMA-accessible and SMA-resistant membranes [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2017, 1859: 2133-2143.
- [47] Jamshad M, Lin YP, Knowles TJ, et al. Surfactant-free purification of membrane proteins with intact native membrane environment [J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39: 813-818.
- [48] Knowles TJ, Finka R, Smith C, et al. Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 7484-7485.
- [49] Xue M, Cheng L, Faustino I, et al. Molecular mechanism of lipid nanodisk formation by styrene-maleic acid copolymers [J]. *Biophys J*, 2018, 115: 494-502.
- [50] Dörr JM, Scheidelaar S, Koorengel MC, et al. The styrene-maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research [J]. *Eur Biophys J*, 2016, 45: 3-21.
- [51] Gulati S, Jamshad M, Knowles TJ, et al. Detergent free purification of ABC transporters [J]. *Biochem J*, 2014, 461: 269-278.
- [52] Long AR, Brien C, Malhotra K, et al. A detergent-free strategy for the reconstitution of active enzyme complexes from native biological membranes into nanoscale discs [J]. *BMC Biotechnol*, 2013, 13: 41-51.
- [53] Smirnova IA, Sjöstrand D, Li F, et al. Isolation of yeast complex IV in native lipid nanodiscs [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016: 2984-2992.
- [54] Jamshad M, Charlton J, Lin YP, et al. G-protein coupled receptor solubilization and purification for biophysical analysis and functional studies, in the total absence of detergent [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35: 1-10.
- [55] Logez C, Damian M, Legros C, et al. Detergent-free isolation of functional g protein-coupled receptors into nanometric lipid particles [J]. *Biochemistry*, 2016: 38-48.
- [56] Morrison KA, Akram A, Mathews A, et al. Membrane protein extraction and purification using styrene-maleic acid (SMA) co-polymer: effect of variations in polymer structure [J]. *Biochem J*, 2016, 473: 4349-4360.
- [57] Lee SC, Knowles TJ, Postis VL, et al. A method for detergent-free isolation of membrane proteins in their local lipid environment [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11: 1149-1162.
- [58] Ravula T, Hardin NZ, Ramadugu SK, et al. pH Tunable and divalent metal ion tolerant polymer lipid nanodiscs [J]. *Langmuir*, 2017, 33: 10655-10662.
- [59] Hall SCL, Tognoloni C, Charlton J, et al. An acid-compatible co-polymer for the solubilization of membranes and proteins into lipid bilayer-containing nanoparticles [J]. *Nanoscale*, 2018, 10: 10609-10619.
- [60] Oluwole AO, Danielczak B, Meister A, et al. Solubilization of membrane proteins into functional lipid-bilayer nanodiscs using a diisobutylene/maleic acid copolymer [J]. *Angew Chem Int Ed*

- Engl, 2017, 56: 1919-1924.
- [61] Danielczak B, Meister A, Keller S. Influence of Mg^{2+} and Ca^{2+} on nanodisc formation by diisobutylene/maleic acid (DIBMA) copolymer [J]. Chem Phys Lipids, 2019, 221: 30-38.
- [62] Gulamhussein AA, Uddin R, Tighe BJ, et al. A comparison of SMA (styrene maleic acid) and DIBMA (di-isobutylene maleic acid) for membrane protein purification [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2020, 1862: 183281-183311.
- [63] Lavington S, Watts A. Detergent-free solubilisation & purification of a G protein coupled receptor using a polymethacrylate polymer [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2021, 1863: 183441-183450.
- [64] Yasuhara K, Jin A, Ravula T, et al. Spontaneous lipid nanodiscs formation by amphiphilic polymethacrylate copolymers [J]. J Am Chem Soc, 2017, 139: 18657-18663.
- [65] Martínez-Muoz L, Barroso R, Guedán Paredes A, et al. Methods to immobilize GPCR on the surface of SPR sensors [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1272: 173-188.
- [66] Hoffman TL, Canziani G, Jia L, et al. A biosensor assay for studying ligand-membrane receptor interactions: binding of antibodies and HIV-1 Env to chemokine receptors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 11215-11220.
- [67] Gong J, Chen Y, Pu F, et al. Understanding membrane protein drug targets in computational perspective [J]. Curr Drug Targets, 2019, 20: 551-564.
- [68] Hou X, Sun M, Bao T, et al. Recent advances in screening active components from natural products based on bioaffinity techniques [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 1800-1813.
- [69] Junko J, Toshihiro O, Masatoshi N. One hour *in vivo*-like phenotypic screening system for anti-cancer drugs using a high precision surface plasmon resonance device [J]. Anal Sci, 2018, 34: 1189-1194.
- [70] Wang Y, Guo H, Feng Z, et al. PD-1-targeted discovery of peptide inhibitors by virtual screening, molecular dynamics simulation, and surface plasmon resonance [J]. Molecules, 2019, 24: 3784-3791.
- [71] Zhang F, Wang S, Yin L, et al. Quantification of epidermal growth factor receptor expression level and binding kinetics on cell surfaces by surface plasmon resonance imaging [J]. Anal Chem, 2015, 87: 9960-9965.
- [72] Wang YZ, Liu X, Way G, et al. An *in vitro* Förster resonance energy transfer-based high-throughput screening assay identifies inhibitors of SUMOylation E2 Ubc9 [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41: 1497-1506.
- [73] Song D, Yu W, Ren Y, et al. Discovery of bazedoxifene analogues targeting glycoprotein 130 [J]. Eur J Med Chem, 2020, 199: 112375-112433.
- [74] Komolov KE, Senin II, Philippov PP, et al. Surface plasmon resonance study of G protein/receptor coupling in a lipid bilayer-free system [J]. Anal Chem, 2006, 78: 1228-1234.
- [75] Oshima A, Hirano-Iwata A, Mozumi H, et al. Reconstitution of human ether-a-go-go-related gene (hERG) Channels in microfabricated silicon chips [J]. Anal Chem, 2013, 85: 4363-4369.
- [76] Tadaki D, Yamaura D, Araki S, et al. Mechanically stable solvent-free lipid bilayers in nano- and micro-tapered apertures for reconstitution of cell-free synthesized hERG channels [J]. Sci Rep, 2017, 7: 17736-17745.
- [77] Maynard JA, Lindquist NC, Sutherland JN, et al. Surface plasmon resonance for high-throughput ligand screening of membrane-bound proteins [J]. Biotechnol J, 2010, 4: 1542-1558.
- [78] Rich RL, Miles AR, Gale BK, et al. Detergent screening of a G-protein-coupled receptor using serial and array biosensor technologies [J]. Anal Biochem, 2009, 386: 98-104.
- [79] Xu H, Hill JJ, Michelsen K, et al. Characterization of the direct interaction between KcsA-Kv1.3 and its inhibitors [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1848: 1974-1980.
- [80] Cao Y, Cao Y, Shi Y, et al. Surface plasmon resonance biosensor combined with lentiviral particle stabilization strategy for rapid and specific screening of P-glycoprotein ligands [J]. Anal Bioanal Chem, 2021, 413: 2021-2031.
- [81] Chen L, Lv D, Wang S, et al. Surface plasmon resonance-based membrane protein-targeted active ingredients recognition strategy: construction and implementation in ligand screening from herbal medicines [J]. Anal Chem, 2020, 92: 3972-3980.