

网络出版时间:2022-12-26 17:18:48 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1521.004.html

基于 FRET 构建 A 型肉毒毒素活性检测的高通量方法

罗 森¹, 郭丽娜¹, 李 涛², 王 琴², 王 慧²

摘要 目的 利用荧光共振能量转移(FRET)构建针对 A 型肉毒毒素酶活性检测的高通量体外方法。方法 构建只识别 A 型肉毒毒素的基于双荧光标记底物的重组表达质粒,将其构建的质粒转入大肠杆菌表达系统进行表达,对表达后的荧光标记底物重组蛋白进行纯化和透析并保存备用;利用 A 型肉毒毒素轻链(ALC)对重组蛋白进行酶切检测活性;对本检测方法的条件进行优化;ALC 切割荧光标记底物测定其酶动力学参数 K_m 与 K_{cat} 值。结果 重组表达质粒构建成功,通过大肠杆菌表达系统表达后检测明显出现目的条带,对其纯化后获得的重组蛋白纯度在 90% 左右,命名重组蛋白为 CYA。对 CYA 通过酶 ALC、B 型肉毒毒素轻链(BLC)进行酶切鉴定,结果显示 CYA 只能被 ALC 酶切产生与预期相符的两个蛋白片段,不能被 BLC 酶切。对基于 FRET 底物的条件优化得到:设定滤光片灵敏度在 65 ~ 110 之间;实时动态检测间隔为 2 min/次,动态检测时间为 30 ~ 120 min,底物 CYA 合适的浓度范围 0.5 ~ 32 $\mu\text{mol/L}$ 。CYA 在 ALC 酶作用下随时间的变化与荧光值 528 与 485 的比值作图最小在 0.5 左右,最大时约为 0.9。酶动力学参数测定 ALC 切割 CYA 的值 K_{cat} 值为 $(5 \pm 0.4) \text{ s}^{-1}$ 和 K_m 为 $(2.33 \pm 0.21) \mu\text{mol/L}$ 。结论 成功构建了基于 FRET 技术的 A 型肉毒毒素活性检测的高通量体外分析方法。

关键词 FRET;肉毒毒素;高通量检测

中图分类号 R 378.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0015-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.004

肉毒毒素(botulinum neurotoxin, BoNT)是由梭菌属在厌氧环境中产生的外毒素,是已知的毒性最强的毒素。肉毒毒素分为 7 个血清型(A-G),肉毒中毒时有发生,主要是由 A、B 和 E 型引起^[1]。A、C1、E 型肉毒毒素识别切割 SNAP-25 的位点分别为

Q₁₉₇-R₁₉₈, R₁₉₈-A₁₉₉ 和 R₁₈₀-I₁₈₁^[2-4]。其中 A 型肉毒毒素已被应用于肌肉功能障碍的治^[5]以及美容领域^[6]。肉毒毒素还是一种潜在的生物恐怖袭击战剂^[7]。Dong et al^[8-9]描述了底物表达为 CFP 和 YFP 构建的融合体,通过荧光共振能量转移(FRET)检测肉毒毒素活性。该研究拟用 A 型底物肽 A_{sub}(SNAP-25₁₄₁₋₂₀₆)进行突变后,作为连接链连接 CFP 荧光蛋白和 YFP 荧光蛋白^[10]构建成 FRET 底物。以此建立的双荧光标记的 FRET 底物分析法有望能够满足 A 型肉毒毒素的活性检测及抑制剂的高通量体外分析所需。

1 材料与方法

1.1 材料 重组质粒 pET22b-CFP-YFP, A 型肉毒毒素重组蛋白轻链(botulinum toxin type A light chain, ALC)(制备方法见文献^[11])和 B 型肉毒毒素重组蛋白轻链(botulinum toxin type B light chain, BLC)(制备方法见文献^[12])由课题组前期制备和保存;A 型底物肽 A_{sub}(SNAP-25₁₄₁₋₂₀₆)突变 DNA 片段由上海生工生物工程股份有限公司合成;Fluoro-Nunc 96 孔黑板(丹麦 Nunc 公司);荧光信号检测(美国 BioTek 公司 SynergyTM HT 酶联仪);反应液为 50 mmol/L Hepes 液; pH 7.5、10 mmol/L NaCl、5 mmol/L DTT、10 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl₂、0.1% Tween 20。Amp、SDS、X-gal 和 IPTG 购于美国 promega 公司;蛋白胨及酵母提取物等培养基是英国 OXIOD 公司产品;琼脂糖、Taq DNA 聚合酶和限制性内切以及酶 T4 DNA 连接酶为 NEB(北京)有限公司;蛋白质相对分子质量标志物、D2000 bp marker、DNA 凝胶回收试剂盒、pEASY-T1 载体、E. coli DH5 α 、BL21(DE3) Rosetta 感受态细胞(北京全式金生物技术公司);HisTrap FF 柱产品购于美国 GE Healthcare 公司;其他试剂均为国产分析纯或超纯。

1.2 方法

1.2.1 设计和构建表达载体的过程 设计原理和过程见文献^[13-14],将构建好的 pET22b-CFP-YFP 保存备用。针对 A 型肉毒毒素的底物肽 A_{sub}(SNAP-25₁₄₁₋₂₀₆)进行了相应位点的突变,突变位点如下:

2022-10-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31201352);遵义市科技计划项目[编号:遵市科合 HZ 字(2019)195 号]

作者单位:¹遵义医药高等专科学校细胞生物学与免疫学教研室,遵义 563006

²军事医学科学院微生物流行病学研究所、病原微生物生物安全国家重点实验室,北京 100071

作者简介:罗 森,男,副教授;

王 慧,女,研究员,责任作者, E-mail: geno0109@vip.sina.com

D₁₇₉突变为 K, R₁₈₀突变为 W, I₁₈₁突变为 E, E₁₈₃突变为 I;突变后构建的序列应只能被 A 型识别,而不能被其他肉毒毒素的型别识别。

A 型底物肽 A_{sub}(SNAP-25₁₄₁₋₂₀₆)突变后合成的 DNA 片段与载体 pEASY-T1 连接后,立即转化入已制备的 DH5 α 感受态细胞中;将转化的培养菌均匀涂平板,将平板置于培养箱 37 °C 培养 24 h,观察平板是否长出单菌落,单菌落挑取于试管培养 12 h,然后通过 PCR 鉴定,结果为阳性克隆菌送测序,菌液保存;测序正确的克隆菌利用质粒提取试剂盒提取克隆质粒,保存克隆质粒;37 °C 下用 BamH I 内切酶酶切重组克隆质粒 12 h,用 DNA 凝胶电泳分离 A_{sub}(SNAP-25₁₄₁₋₂₀₆) DNA 片段,切割含有目的 DNA 凝胶并利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收;同样的方法,用 BamH I 内切酶酶切并回收的载体 pET22b-CFP-YFP 片段,再用 T4 DNA 连接酶将两者连接 4 h,利用 DH5 α 感受态细胞转化其连接产物,均匀涂转化菌于平板上,平板 37 °C 培养 24 h,观察平板是否长出单菌落,单菌落挑取于试管内培养 12 h,增菌后 PCR 鉴定,阳性菌株送测序并序列比对,与模板比对完全一致的质粒菌株用质粒提取试剂盒提取,保存于 -20 °C 表达质粒备用。

1.2.2 在大肠杆菌表达系统中对重组目的蛋白诱导表达、分析及纯化 于感受态细胞 BL21(DE3) Rosetta 中转化表达质粒,37 °C 培养后涂平板,将平板于 37 °C 继续培养,观察平板是否长出单菌落,PCR 鉴定菌落,将阳性菌株保存 -20 °C 备用。在 10 ml 含氨苄培养基中接种构建成功的表达菌,在培养箱中以 200 r/min、37 °C 培养 12 h,于 3 L 大瓶 LB 培养基中以 1:100 比例接种,继续在 37 °C 下振荡培养至(波长 600 nm)0.7 左右吸光度值,加入诱导剂 IPTG 至 1 mmol/L 的终浓度,继续在 20 °C 下培养 24 h 以诱导表达目的蛋白。用离心机(6 000 r/min)收集菌体离心 20 min,保存菌体备用 -20 °C 冰箱。重悬菌体用 PBS,利用超声方法以充分破碎菌体(保持在冰水中),用低温离心机(10 000 r/min)离心 20 min,收集菌液上清液以分析重组目的蛋白表达情况(15% SDS-PAGE 蛋白电泳)。

将表达菌放大培养于 6 L 的 LB 培养基中,培养条件和诱导条件同上,收集菌体(在冰水中进行)超声充分破碎处理细菌后,用低温离心机(10 000 r/min)离心 20 min 菌液以收集上清液备用 4 °C 下。进行 His 亲和层析纯化:先用结合缓冲液(10 个柱床体积)平衡镍柱后,再使用 HisTrap FF 柱上样上

清液,最后洗脱缓冲液(500 mmol/L NaCl、20 mmol/L 磷酸钠、500 mmol/L 咪唑、pH7.4)(用不少于 10 个柱体积)线性梯度洗脱。收集前 6 管洗脱液的样品进行蛋白电泳分析(15% SDS-PAGE)。于缓冲液(50 mmol/L HEPES, pH7.5)中至少透析重组目的蛋白 3 次,测定蛋白浓度后保存冰箱 -20 °C 备用。

1.2.3 通过 ALc 和 BLc 对重组目的蛋白生物活性鉴定 (在反应缓冲液中)先加入重组目的蛋白,设定阴性对照组中只加反应缓冲液,将 ALc 和 BLc 分别与荧光标记底物在 37 °C 反应 20 min,通过 15% SDS-PAGE 电泳分析反应后的重组目的蛋白酶切情况鉴定。

1.2.4 基于 FRET 底物的分析方法的条件优化 对 FRET 底物的活性利用 ALc 确定,检测方法和步骤的反应条件优化如下:① 根据以往经验报告显示 CFP 是 434 nm(激发波长),而 CFP 为 470 nm 左右(最强的荧光波长),本课题选取的检测为 CFP 的波长 485 nm;发生 FRET(荧光共振能量转移)后,YFP 为 527 nm 左右(最强荧光波长),本课题选取的检测值 FRET 波长 528 nm。因此,在酶标仪中装入激发波滤光片(420/50),检测分别滤光片为 485/20 的 528/20。② 在 37 °C 条件下,加入总体积为 100 μ l 的一系列浓度的 FRET 底物 CYA,对 FRET 底物 CYA 动态检测 CFP485 和 FRET528 的值变化和 FRET528/CFP485 变化作图。③ (在相同条件下)加入酶 ALc 对比对 FRET 底物 CYA 动态检测 CFP₄₈₅ 和 FRET₅₂₈ 的值变化和 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 变化作图,再进行标准化后与 FRET 底物 CYA 蛋白电泳结果作相关性分析。本底孔中只有反应液,加入含有一定浓度的底物 CYA,再分别加入酶 BLc 和酶 ALc,加好样后立即用酶标仪检测。利用 Gen5(BioTek)分析软件处理和分析检测结果数据。④ 检测方法的优化,对以下 4 个参数检测并优化:底物的浓度(0.01 ~ 100 μ mol/L);酶的浓度(0.1 ~ 100) nmol/L;检测发射波信号的间隔时间(0.5 ~ 10) min;检测发射波信号的持续时间(20 ~ 80 min)。

1.2.5 测定酶活动力学 检测条件:激发波长 434 nm,检测发射波长分别 CFP 为 485 nm 和 FRET 为 528 nm,至少动态连续检测 30 min(间隔时间 2 min/次),在特定浓度下的 ALc 和底物(300 ~ 33 μ mol/L)系列梯度进行测定米氏常数 K_m 和催化常数 K_{cat} 。具体计算方法参见文献^[12]和米氏方程。

1.3 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用 SPSS 19.0 软件进行分析处理。线性回归拟合采

用最小二乘法对数据进行分析。采用 Graphpad Software Prism 5.0 软件制图。

2 结果

2.1 构建重组突变表达载体 A 型底物肽 Asub (SNAP-25₁₄₁₋₂₀₆) 突变后合成的 DNA 片段与载体 pEASY-T1 连接后,立即转化后培养挑取单菌落于试管进行培养后 PCR 鉴定,鉴定为阳性的克隆菌送测序,测序结果显示正确并保存备用;将其质粒提取后用 BamH I 酶酶切重组克隆质粒,用 DNA 凝胶电泳分离并回收 Asub (SNAP-25₁₄₁₋₂₀₆) DNA 片段,回收检测条带与预期相符,说明回收成功;用 BamH I 酶切并回收的 pET22b-CFP-YFP 载体片段;最后使用 T4 DNA 连接酶连接底物肽 Asub (SNAP-25₁₄₁₋₂₀₆) DNA 片段到 pET22b-CFP-YFP 载体中;连接后将其连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中,培养转化的培养菌均匀涂平板培养过夜后,于平板上挑取挑单菌落摇菌 PCR 后,再琼脂糖凝胶电泳检测,见图 1A,进行 PCR 鉴定,得到了与预期相符目的条带,测序后比对,显示结果正确,见图 1B,说明已成功构建

质粒,将其命名为 pET-22b-CYA。

2.2 重组蛋白底物在大肠杆菌表达系统中诱导表达、分析与纯化结果 重组质粒 pET-22b-CYA 转入 BL21 (DE3) Rosetta 表达菌后培养,加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 诱导目的蛋白表达,收集菌进行蛋白电泳分析显示,诱导菌上清液中出现明显与预期相符的蛋白条带。超声破碎处理菌并进行 His 亲和层析纯化后的重组蛋白,见图 2,测定蛋白纯度约为 90%,命名此针对 A 型肉毒毒素 FRET 底物为 CYA。

2.3 对 CYA 活性分析 利用酶 BLc 和酶 ALc 对底物 CYA 酶切分析,结果经 SDS-PAGE 分析见图 3:加入的 Blc 组没有出现酶切变化,加入 ALc 组出现 CYA 能被酶解后产生与预期相符的 CFP-SNAP₍₁₄₁₋₁₉₇₎ 蛋白片段和 SNAP₍₁₉₇₋₂₀₆₎-CFP 蛋白片段。构建针对 A 型肉毒毒素的 FERT 底物 CYA 只能被 A 型识别。

2.4 基于荧光标记底物的内肽酶分析法检测指标的确定 对底物 CYA 单独测定 CFP 荧光值 485 和 FRET 荧光值 528 时,底物 CYA 分别检测 FRET₅₂₈ 荧

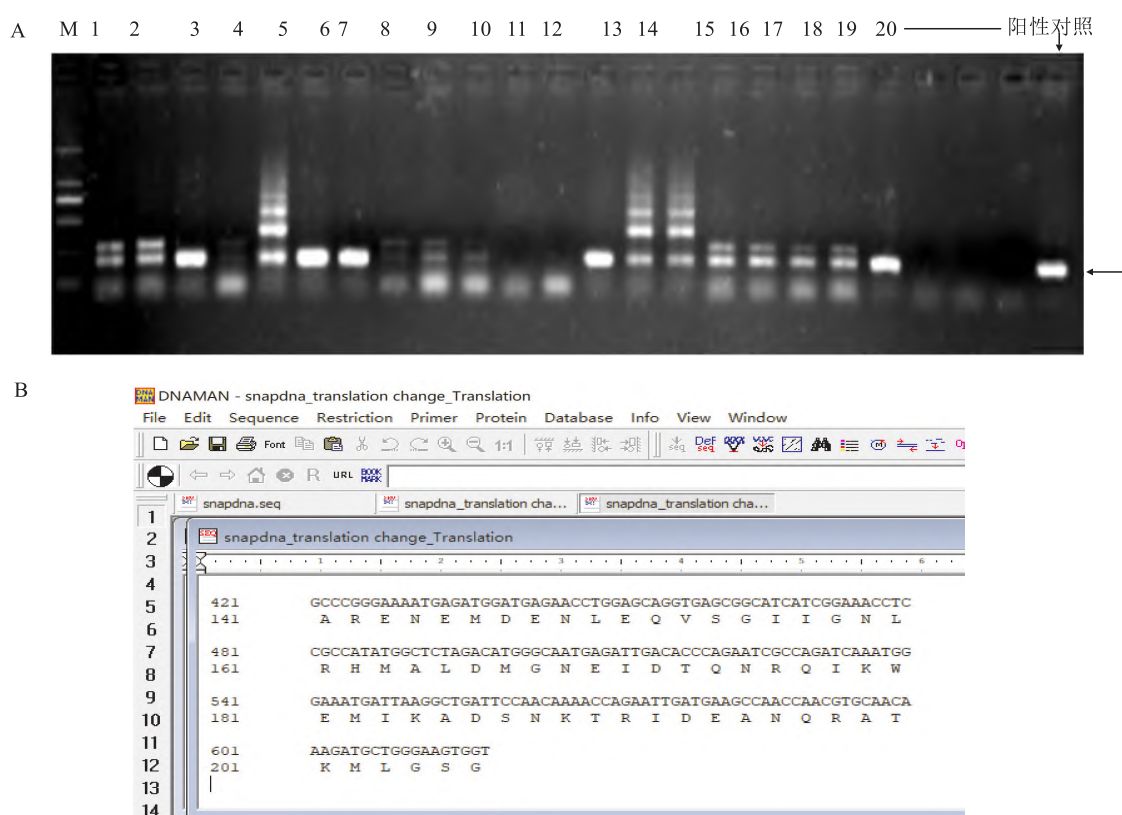


图1 构建的表达载体转化克隆菌后 PCR 鉴定电泳图和测序图

A:PCR 鉴定电泳图;M:2 000 bp DNA Marker;B:构建的表达载体的底物肽 Asub (SNAP-25₁₄₁₋₂₀₆) 片段测序图;箭头:提取 Asub DNA 片段;3,6,7,13,20 为阳性克隆

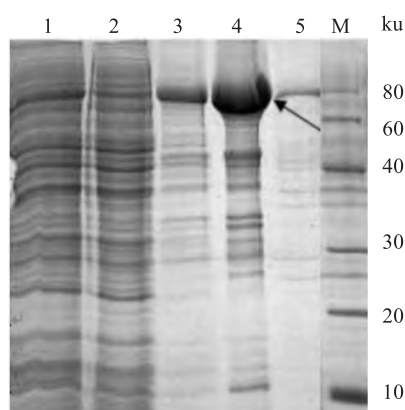


图2 重组目的蛋白在表达菌中的表达检测
及纯化后鉴定的 SDS-PAGE 分析

1:表达菌液纯化前上清液;2:表达菌液纯化后上清液;3~5:咪唑洗脱液洗脱收集的1~3管;箭头标记为与预期相符的目的蛋白条带;M:蛋白质相对分子质量标准

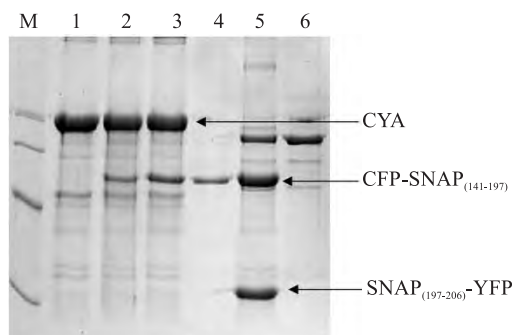


图3 BLc 蛋白酶和 ALc 蛋白酶与 CYA 底物的
反应结果 SDS-PAGE 分析

1:CYA 底物;2,3:CYA 底物加入 BLc 蛋白酶;4:BLc 蛋白酶;5:CYA 底物加入 ALc 蛋白酶;6:ALc 蛋白酶;M:Marker

光值和 CFP₄₈₅ 荧光值实时动态作图,见图 4A,检测 80 min,X 轴检测时间(2 min/次),Y 轴为 FRET₅₂₈ 荧光值和 CFP₄₈₅ 荧光值,发射波长 485 nm 和 528 nm 均随检测时间而降低;将一定浓度(500 nmol/L) CYA 底物动态收集 FRET 发射波为 528 nm 荧光值与 CFP 发射波为 485 nm 荧光值进行相比(即 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅)的变化作图,见图 4B,检测 80 min,X 轴检测时间(2 min/次),Y 轴为 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅。测 CYA 底物的 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 在 0.75 均值处波动,较为稳定。加入 ALc 蛋白酶组,FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 随着酶切时间进行而规律下降;检测 1 nmol/L 浓度下 ALc 酶切浓度 500 nmol/L 底物 CYA 的随时间变化的 SDS-PAGE 电泳检测结果。依次在(0、2、4、7、10、15、20、30、40、70)min 检测,CYA 被酶切产生了与预期一致的蛋白片段条带分别所指为 CFP-SNAP(141-197)和 SNAP(198-206)-YFP,见图 4C,图中显

示出有明显的酶切反应。动态检测 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 标准化为底物量减少作图与上述相同条件下处理的底物进行蛋白电泳分析作图对数据利用线性回归的最小二乘法进行拟合作图,见图 4D,X 轴为 SDS-PAGE 检测中完整的 CYA 变化,Y 轴为检测 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 标准化百分比变化,再通过线性回归拟合, $R^2 = 0.96$,结论得出两者相关呈线性。说明检测 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 标准化后与 SDS-PAGE 分析作图反映的量效关系是高度一致。

2.5 基于荧光标记底物分析方法的条件优化结果

在滤光片的灵敏度设置为 75 下,通过对倍梯度浓度(32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125) $\mu\text{mol/L}$ 的底物 CYA,实时动态检测(检测间隔时间为 2 min/次) FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 作图,见图 5,X 轴为检测时间(2 min/次),共检测 95 min,Y 轴为 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅,下同。结果显示,底物 CYA 的浓度不能过低,一旦低于 125 nmol/L 时则 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 就会出现实时动态监测的变化波动幅度较大。实时动态测定系列浓度(32、16、8、4、2、1) $\mu\text{mol/L}$ 的底物 CYA 在梯度浓度(0、1、2、4) nmol/L ALc 蛋白酶作用下,FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 的实时动态检测作图,分别见图 6A~F。以上作图分析显示底物 CYA 高于 32 $\mu\text{mol/L}$ 时,虽然 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 较为稳定,但是在梯度浓度的 ALc 蛋白酶切后反映不出明显的量效关系。

对分析方法底物浓度和酶浓度的条件优化后结果得到,CYA 动态监测较适宜的范围为(0.125 ~ 32) $\mu\text{mol/L}$ 。当浓度为 500 nmol/L 的底物 CYA 时,ALc 在纳摩尔浓度水平与 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 斜率随时间变化呈现出量效关系,得到系列浓度(0、1、2、4、6) nmol/L 梯度的 ALc 在与 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 曲线斜率之间呈正比关系,见图 6。类似地对其他参数进行优化得到:酶联仪滤光片设定灵敏度的设置范围(65 ~ 110);动态实时检测合适的间隔时间为 2 min/次;检测持续时间较合适范围为(30 ~ 120) min;FRET 底物 CYA 在内肽酶 ALc 酶切下 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 动态监测作图,最大比值在 0.9 左右,最小比值在 0.5 左右。

2.6 酶活动力学常数测定结果 测定酶活动力学参数得到:ALc 蛋白酶切割底物 CYA 的值 K_m 为 $(2.33 \pm 0.21) \mu\text{mol/L}$ 和 K_{cat} 值为 $(5 \pm 0.4) \text{s}^{-1}$ 。

3 讨论

在过去的 30 多年里,小鼠生物测定或致死性试验一直是检测含肉毒毒素样品的标准^[15-16]。该方

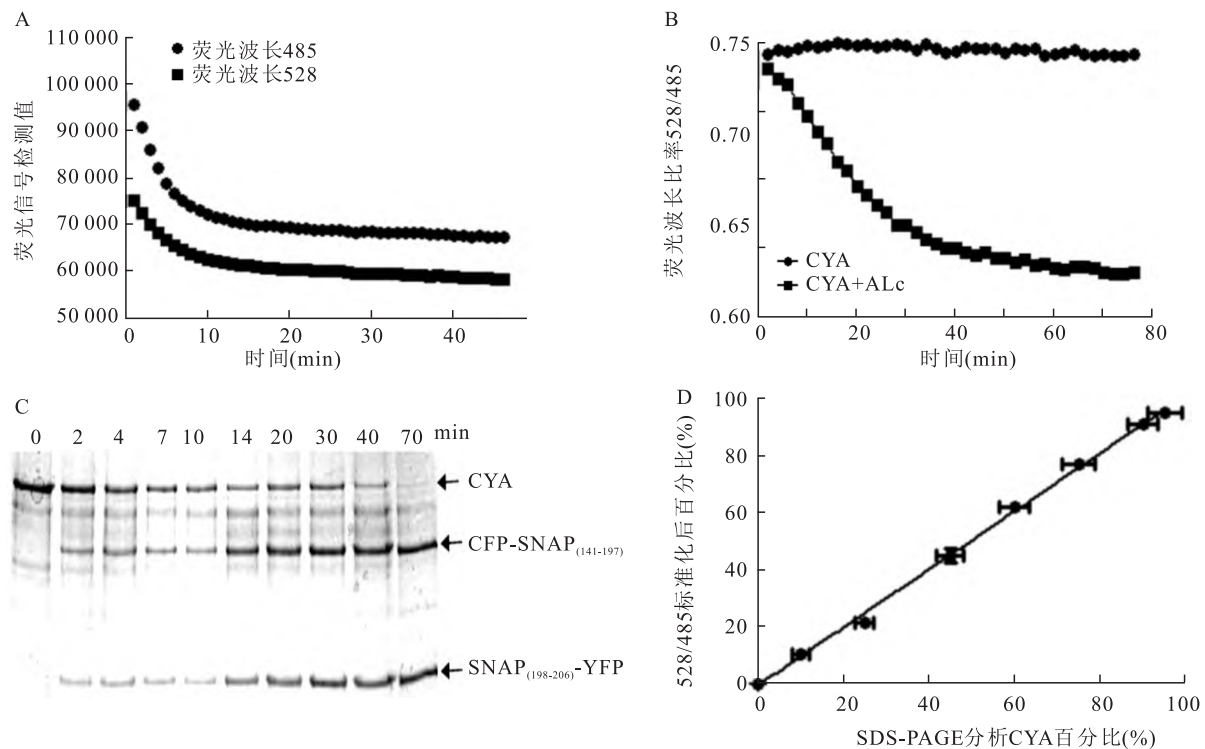


图4 底物 CYA 的 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 实时动态检测分析及其与对应的 SDS-PAGE 的相关性分析研究

A: CYA 分别检测 FRET₅₂₈ 荧光值和 CFP₄₈₅ 荧光值实时动态作图; B: ALC 酶切 CYA 的 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 动态检测作图; C: ALC 酶切 CYA 的 SDS-PAGE 电泳检测结果; D: 检测 CYA 的 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 标准化的百分比与 SDS-PAGE 分析 CYA 百分比的变化作图

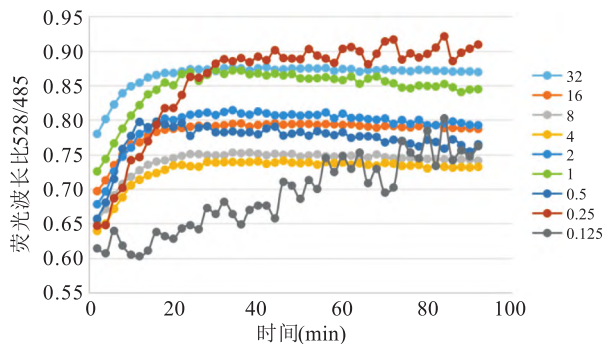


图5 CYA 在系列浓度下检测荧光信号 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 作图

法使用于检测食品和血清样本中是否存在肉毒毒素,而制药行业使用该方法进行质量控制,并量化“供人类使用”的肉毒毒素制剂。小鼠生物测定法的低通量方法也限制了其在肉毒毒素拮抗剂开发中的应用,小分子实验室筛选是不切实际的,且检测过程需要牺牲大量小鼠为代价,可能会引起伦理问题。通过定点突变获得 A 型特异底物片段,以区别于不同型的毒素对同一底物切割,成功构建了 FRET 底物 CYA。通过原核表达过程中,发现利用 BL21. DE3 Rosetta 表达菌株能够大大提高蛋白表达

含量,其原因可能与该表达菌株加入稀有密码有利于高表达有关。通过组氨酸标签亲和纯化得到的 CYA 的纯度能满足后续研究需要。本研究制备的 CYA 通过相应的蛋白酶切割显示出具有型特异专属特性。

在实时动态监测过程中,由于 CYA 本身性质的原因,多次激发检测会导致单独的 FRET₅₂₈ 荧光值和 CFP₄₈₅ 荧光值都出现减弱的现象,因此,不能单独测定 FRET₅₂₈ 荧光值和 CFP₄₈₅ 荧光值的变化来作底物 CYA 酶切变化的衡量指标。在实时动态检测实验中,对单独的底物 CYA 的 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅,显示开始约 10 min 的 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅ 比 10 min 之后的比值要小,在 10 min 之后趋于稳定。原因可能是开始几分钟底物 FRET 现象没有充分体现出来。也可能是其他原因导致的,其具体原因未知,需进一步研究。

本研究显示,如果实时动态检测底物 CYA 的 FRET₅₂₈/CFP₄₈₅,则比值恒定的最低限约为 125 nmol/L。但如果为了提高检测灵敏度,以用于市场用肉毒毒素的检测,则检测条件需要进一步研究和检测方法的改进和优化。检测灵敏阈值设定显示,若高于 110 就会出现背景信噪比高,出现超出检测

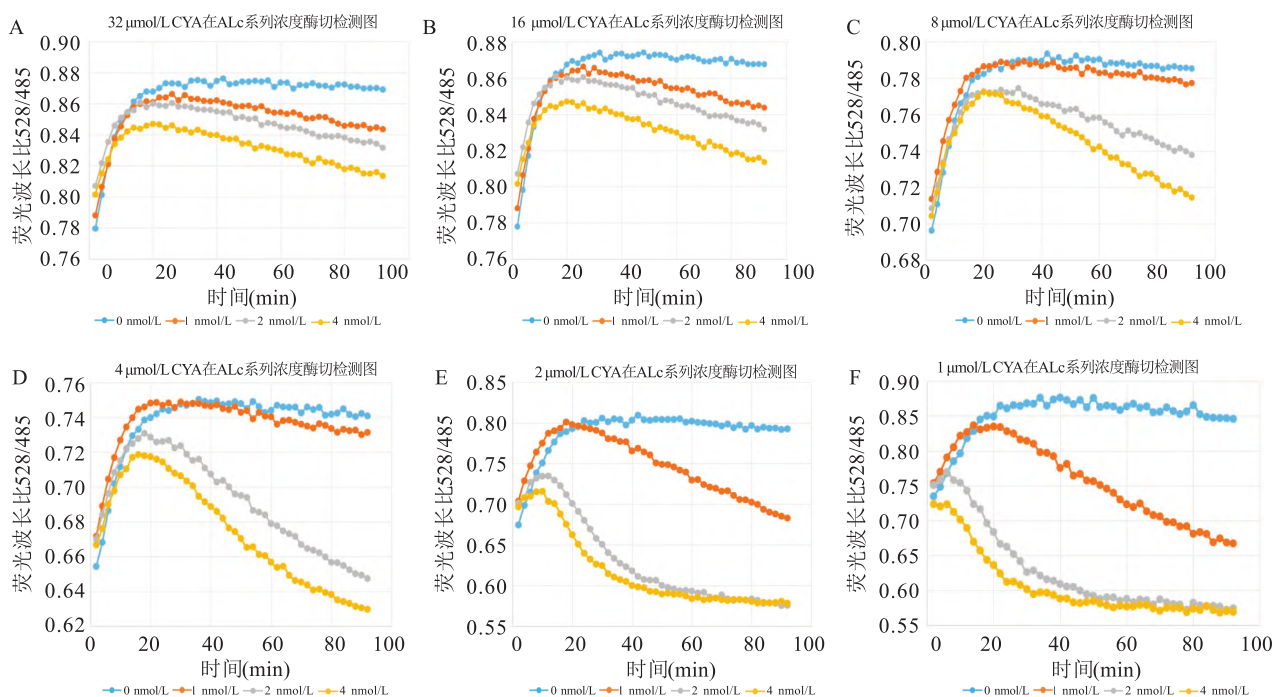


图6 不同浓度的CYA在ALc梯度浓度下酶切检测荧光信号FRET₅₂₈/CFP₄₈₅作图

A~F: 底物CYA分别在浓度(32、16、8、4、2、1) μmol/L时, ALc梯度浓度(0、1、2、4) nmol/L下酶切检测荧光信号FRET₅₂₈/CFP₄₈₅作图

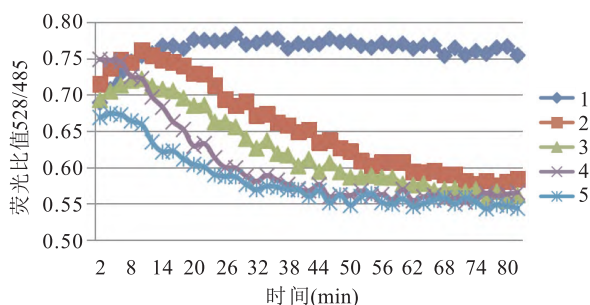


图7 动态检测底物CYA(500 nmol/L)在梯度浓度下内肽酶ALc酶切与FRET₅₂₈/CFP₄₈₅作图

1~5: 0、1、2、4、6 nmol/L下的ALc

范围并溢出;但若低于65会出现检测的FRET₅₂₈和CFP₄₈₅荧光信号都较弱且变化小,不能很敏感地反应变化情况。实时动态监测间隔时间若太长会导致不能敏感反应变化情况,但对于高通量太短(低于2 min)检测会出现无法扫描完整个检测孔(96孔板),这些结果与B型肉毒毒素分析结果^[14]有相通的地方,但检测荧光比值和检测曲线图却有较大的差别。

基于FRET的报告分子适用于肉毒毒素拮抗剂的高通量筛选(HTS),底物和酶均利用成熟的大肠杆菌表达系统表达,和利用组氨酸标签亲和纯化制备得到高纯度的底物和酶。该技术无需复杂装备或

大量培训即可经济高效快捷地对大量样本检测分析,不需要牺牲动物,具有灵敏、实时和定量的优点。本课题组已将该方法应用于A型肉毒毒素小分子拮抗剂的初步筛选中,并已得到一定抑制作用的潜在拮抗剂(数据还未发表)。

参考文献

- [1] Rachael Z M, Jason G K, Daniele G S, et al. A role for the phagosome in cytokine secretion [J]. Science, 2005, 31 (5753): 1492-5.
- [2] Gerst J E. SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis [J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55(5): 707-34.
- [3] Ungar D, Hughson F M. SNARE protein structure and function [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003, 19: 493-517.
- [4] Benagiano V, Lorusso L, Flace P, et al. VAMP-2, SNAP-25A/B and syntaxin-1 in glutamatergic and GABAergic synapses of the rat cerebellar cortex [J]. BMC Neurosci, 2011, 12: 118.
- [5] Verma G. Role of botulinum toxin type-A (BTX-A) in the management of trigeminal neuralgia [J]. Pain Res Treat, 2013, 2013: 831094.
- [6] Lebeda F J, Cer R Z, Stephens R M, et al. Temporal characteristics of botulinum neurotoxin therapy [J]. Expert Rev Neurother, 2010, 10(1): 93-103.
- [7] Singh A K, Stanker L H, Sharma S K. Botulinum neurotoxin: where are we with detection technologies [J]. Crit Rev Microbiol, 2013, 39(1): 43-56.

- [8] Dong M, Tepp W H, Johnson E A, et al. Using fluorescent sensors to detect botulinum neurotoxin activity *in vitro* and in living cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(41): 14701 – 6.
- [9] Ruge D R, Dunning F M, Piazza T M, et al. Detection of six serotypes of botulinum neurotoxin using fluorogenic reporters[J]. Anal Biochem, 2011, 411(2): 200 – 9.
- [10] 杨凤娇, 黄紫薇, 赵殿元, 等. Tnfrsf11aCre 介导黄色荧光素蛋白有效标记脑小胶质细胞[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(9): 1345 – 9.
- [11] 罗 森, 齐芬芳, 宫路路, 等. A 型肉毒毒素轻链的原核表达、纯化及活性鉴定[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(5): 632 – 5.
- [12] 罗 森, 陈芳红, 李 涛, 等. B 型肉毒毒素轻链的高效制备及活性鉴定[J]. 生物技术通讯, 2018, 29(1): 59 – 63.
- [13] 罗 森. 肉毒毒素内肽酶活性体外分析方法的建立及其初步应用[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- [14] 罗 森, 丁朋晓, 李 涛, 等. 基于 FRET 技术构建破伤风毒素和 B 型肉毒毒素酶类抑制剂高通量体外筛选方法[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(5): 739 – 45.
- [15] Rowe B, Schmidt J J, Smith L A, et al. Rapid product analysis and increased sensitivity for quantitative determinations of botulinum neurotoxin proteolytic activity[J]. Anal Biochem, 2010, 396(2): 188 – 93.
- [16] Kalb S R, Moura H, Boyer A E, et al. The use of Endopep – MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples [J]. Anal Biochem, 2006, 351(1): 84 – 92.

High throughput *in vitro* screening method for botulinum neurotoxin type A based on FRET technology

Luo Sen¹, Guo Lina¹, Li Tao², Wang Qin², Wang Hui²

(¹Dept of Pathogenic Microbiology and Immunology, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563006;

²State Key Laboratory of Pathogens and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071)

Abstract Objective To construct a high-throughput *in vitro* method for the detection of botulinum toxin A enzyme activity by using fluorescence resonance energy transfer (FRET). **Methods** Recombinant expression plasmid based on double fluorescent labeled substrate was constructed to recognize botulinum toxin type A only, and the constructed plasmid was transferred into the *E. coli* expression system for expression. The expressed recombinant protein of fluorescent labeled substrate was purified, dialyzed and stored for standby; The activity of the recombinant protein was detected by digestion of botulinum toxin type A light chain (ALC); The conditions of this detection method were optimized; The enzyme kinetic parameters K_m and K_{cat} were determined by cutting the fluorescent labeled substrate with ALC. **Results** The recombinant expression plasmid was successfully constructed. After being expressed in the *E. coli* expression system, the target band appeared obviously. The purity of the purified recombinant protein was about 90%. The recombinant protein was named CYA. CYA was identified by enzyme digestion of ALC and Botulinum toxin type B light chain (BLC). The results showed that CYA could only be digested by ALC to produce two protein fragments that were consistent with expectations, but could not be digested by BLC. By optimizing the conditions based on FRET substrate, it was obtained that the filter sensitivity was set between 65 – 110; The real-time dynamic detection interval was 2 min/time, the dynamic detection time was 30 – 120 min, and the appropriate concentration range of substrate CYA was 0.5 – 32 $\mu\text{mol/L}$. The ratio of the time change of CYA at any time under the action of ALC enzyme to the fluorescence value 528 and 485 was plotted to be about 0.5 at the minimum and 0.9 at the maximum. The enzyme kinetic parameters determined that the value of ALC cleaving CYA K_{cat} was $(5 \pm 0.4) \text{ s}^{-1}$ and K_m was $(2.33 \pm 0.21) \mu\text{mol/L}$. **Conclusion** A high-throughput *in vitro* method for the detection of botulinum toxin type A activity based on FRET technology is successfully constructed.

Key words FRET; botulinum toxin; high throughput screening