



固定化药靶蛋白中药活性成分定向筛选研究进展

寸思迪,张子龙,王云杉,龙凯花,赵雪,王静,李倩,赵新锋

(西北大学 生命科学学院/西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室,陕西 西安 710069)

摘要 中药活性成分筛选及作用评价一直是破解药物发现周期长和成功率低等瓶颈问题的核心突破口和重要技术支撑。作者团队创新亲和色谱原理,将药靶蛋白定向固定于色谱担体表面,制备了系列高活性功能化色谱固定相,并提出了固定化药靶蛋白定向筛选中药药效成分的新观点。主要综述了作者团队近五年在固定化药靶蛋白色谱固定相制备技术、中药活性成分定向筛选技术以及活性成分早期成药性评价色谱技术等方面的工作,并对固定化药靶蛋白在中药活性成分定向筛选方面的研究进行了展望。

关键词 药靶蛋白定向固定;中药活性成分;定向筛选;早期成药性评价

中图分类号:R917 **DOI:**10.16152/j.cnki.xdxzbzr.2024-05-008

Research progress on targeted screening of bioactive compounds from traditional Chinese medicine by immobilized target proteins

CUN Sidi, ZHANG Zilong, WANG Yunshan, LONG Kaihua, ZHAO Xue, WANG Jing, LI Qian, ZHAO Xinfeng

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China,

Ministry of Education/College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract Drug discovery has always faced the problems such as long cycles and low success rates. The screening and evaluation of the potential compounds from traditional Chinese medicine have become the core breakthrough point and important technical support to solve the above problems. The authors' group innovated the principles of affinity chromatography. They immobilized several target proteins onto solid supports, prepared a series of highly active functional chromatographic stationary phases, and proposed the new concept of targeted screening of bioactive compounds from traditional Chinese medicine by immobilized target proteins. The paper reviews the work from the authors' group during the last five years, which included the methods for the oriented protein immobilization, the targeted screening approaches for bioactive compounds from traditional Chinese medicine, and the chromatographic methods for the early evaluation of potential compounds. Finally, the potential application of the immobilized target proteins in the targeted screening of bioactive compounds from traditional Chinese medicine were also summarized.

Keywords immobilized target proteins; bioactive compounds from traditional Chinese medicine; targeted screening; early evaluation of the potential compounds

收稿日期:2024-08-10

基金项目:国家自然科学基金(22374116,22074118)

第一作者:寸思迪,男,博士生,从事药物发现及药物分析方法研究,sidicun0411@163.com。

通信作者:赵新锋,男,博士,教授,博士生导师,从事药物分析新方法的创建及其应用研究,zhaoxf@nwu.edu.cn。

中药作为我国特色的医药卫生资源,其活性成分筛选及作用评价一直是破解药物发现周期长和成功率低等瓶颈问题的核心突破口和重要技术支撑。随着生物技术、材料科学、蛋白质组学等学科的突破性进展,中药活性成分筛选也进入了多学科交叉融合及多技术相互支撑的快速发展时期。受体是药物在人体内最主要的靶点,占比约50%,特别是对于G蛋白偶联受体而言,能够与药物分子通过高亲和作用识别并结合,启动下游信号而发挥药效。在前期研究中,作者所在团队受垂钧原理启发,将受体(药靶蛋白)识别药物的高特异性和色谱技术的高分离能力相结合,创新亲和和色谱原理,提出了固定化药靶蛋白色谱中药功效成分定向筛选的新观点,通过保留时间差异实现中药中潜在功效成分的筛选。在上述观点的指导下,作者团队对临床沙丁胺醇等平喘类一线用药进行了分析,明确了固定化药靶蛋白色谱中药功效成分筛选的可能性,进而应用于中药单药及其复方活性成分筛选,并取得了系列进展。然而,固定化药靶蛋白色谱作为一种新兴方法,在固定化药靶蛋白活性保持、活性成分药效特征区分及产业化推广等方面,仍然存在提升和改进的空间。因此,本文主要综述近五年作者团队及固定化药靶蛋白相关技术在中药活性成分筛选方面的研究工作,为中药新药研发提供借鉴。

1 药靶蛋白定向固定化技术

固定化药靶蛋白的生物活性是决定中药功效成分筛选准确度的前提,而高效温和的蛋白质固定化技术是保证其生物活性的核心与关键。与随意固定化方法相比,定向固定具有位点特异性,具有固定化药靶蛋白取向统一,活性位点损失小等优势,能够最大程度上保持固定化药靶蛋白的活性。因此,对现有药靶蛋白定向固定化技术进行综述。

1.1 基于酶标签自催化的一步定向固定化方法

生物正交反应是一类能够在生物体系内发生且不受体系内共存物干扰的化学反应。受该类反应启发,作者团队将卤代烷烃脱卤素酶(Halo-tag)、O₆烷基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(SNAP-tag)、表皮生长因子受体酪氨酸激酶活性域(EGFR-tag)和农杆菌VirD2蛋白融合于G蛋白偶联受体等药靶蛋白羧基末端,将酶的底物修饰于硅

胶微球等色谱担体表面,通过酶与底物的高特异性共价反应,可以从细胞裂解液中将药靶蛋白一步捕获至固体材料表面,实现药靶蛋白的一步定向固定(见图1)^[1-16]。

野生型卤代烷烃脱卤素酶在脱卤反应过程中,酶活性位点Asp106通过亲核取代卤代烷烃中的卤素基团而得到Asp酯,从而形成一个共价烷烃酶中间体;而酶中的His272可催化共价烷烃酶中间体水解,释放终产物脂肪醇,使脱卤素酶再生;若将酶中的His272定点突变为苯丙氨酸,共价烷烃酶中间体则不会水解^[1]。作者团队首次将突变后的卤代烷烃脱卤素酶Halo-tag重组于 β_2 肾上腺素受体(β_2 -AR)、血管紧张素II 1型和2型受体(AT₁R和AT₂R)^[1]、聚(ADP-核糖)聚合酶1(PARP-1)^[3]和5-羟色胺受体1A(5-HT_{1A})^[4]等受体末端,将末端卤代有机酸(6-溴己酸和6-氯己酸)通过酰化反应修饰至色谱担体表面,将Halo标签重组目标药靶蛋白的裂解液与色谱担体直接混合,从而实现药靶蛋白的一步固定。进一步优化末端卤代有机酸结构,发现有机酸中若含有PEG功能基团,能够使得色谱固定相上非特异性吸附和色谱峰峰形拖尾现象有所改善,且有效提高了受体色谱的抗污和耐高盐性能^[5-6]。

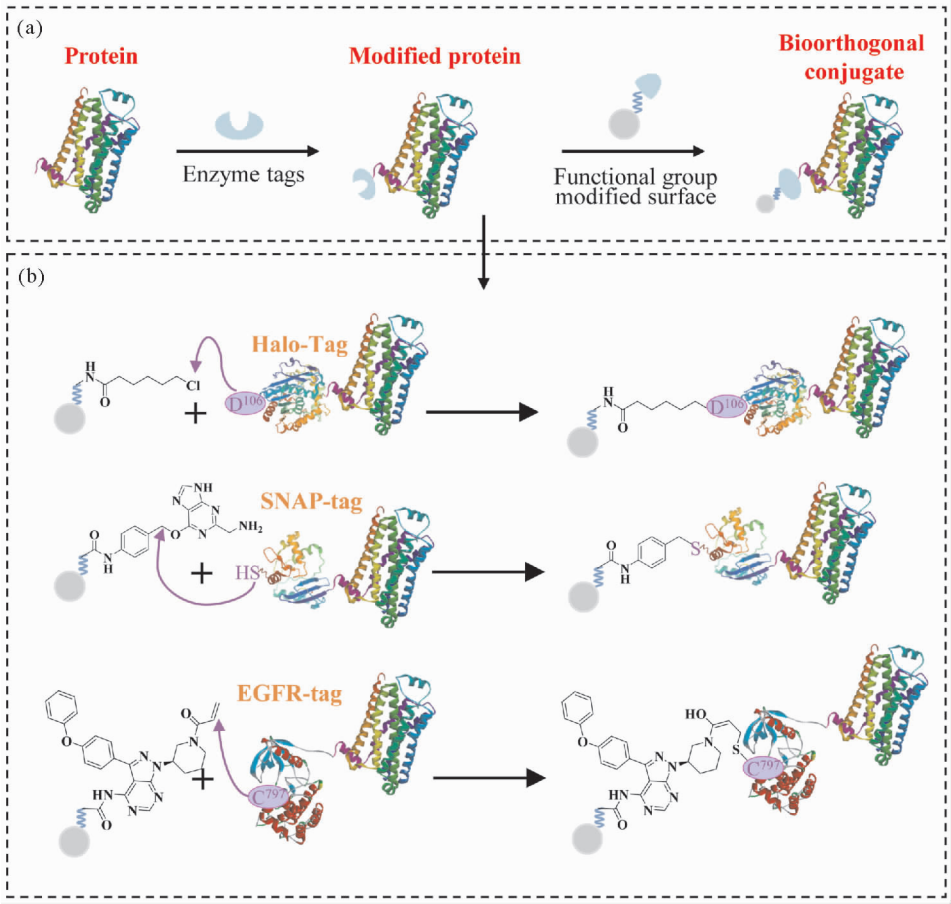
SNAP-tag无论在体内还是体外,均能通过典型的SN2亲和取代反应将底物鸟嘌呤或胞嘧啶衍生物的侧链基团转移到半胱氨酸残基上活性巯基位点,形成硫醚共价键^[2]。作者团队将SNAP-tag重组至 β_2 -AR和AT₁R碳末端,并在大肠杆菌细胞中高表达两种受体蛋白^[2,7]。将上述细菌破碎后的上清液与苄基鸟嘌呤衍生物修饰的微球直接混合,即能捕获复杂体系中的目标受体,反应效率高。

EGFR为G蛋白偶联受体超级家族中的成员之一,与癌症等疾病密切相关^[8]。EGFR结构域中含酪氨酸激酶活性域,该激酶的共价抑制剂(依鲁替尼)能够与EGFR-tag中的半胱氨酸797(Cys797)的巯基通过迈克尔迈克尔加成反应,形成不可逆共价复合物^[9]。利用该原理,将EGFR-tag重组于内皮素A受体(ET_AR)^[10]、 β_1 肾上腺素受体(β_1 -AR)^[11]和N-甲基-D-天冬氨酸受体2A(NMDA-R_{2A})^[12]等受体的非活性末端,将依鲁替尼修饰至大孔硅胶表面,实现目标药靶蛋白的固定化。

上述3种类型酶标签自催化反应的底物均为

小分子化合物,而酶标签本身分子量较大,由于空间位阻效应的存在,使得固定相上的小分子化合物与酶标签结合可能受阻。针对该问题,作者团队将 VirD2 标签 (VirD2tag) 引入至半胱氨酰白三烯受体 1 (CysLTR1) 的固定化过程^[13]。由于 VirD2 蛋白能够特异性识别 TDNA 序列,并与其

5'端磷酸基团形成磷酸二酯键(5'GCTCAAATTA-CAACGGTATATATCCTGCCAGTCAG-3')而实现共价连接^[14]。该研究中,TDNA 被修饰于大孔硅胶表面,而 VirD2-tag 重组表达至 CysLTR1 末端,由于 DNA 为大分子,其于 VirD2-tag 接触的界面更大,使得反应脱靶效应大大降低。



(a) 总体示意图;(b) Halo-tag、SNAP-tag、EGFR-tag 融合受体定向固定化路线图^[17]

图 1 酶标签自催化一步定向固定化方法

Fig. 1 Methods for self-labeling enzyme-catalyzed protein immobilization

除了 DNA 等核酸分子,多肽也能够作为底物分子被修饰于色谱担体表面。文献中,化脓性链球菌纤连蛋白结合蛋白 Fba B 的 Lys³¹和 Asp¹¹⁷之间具有自发异肽键的结构域,Lys³¹的未质子化胺在邻近的 Glu⁷⁷催化下亲核攻击 Asp¹¹⁷的羰基碳。通过对 Fba B 结构进行拆分,能得到 SpyTag(含 13 个氨基酸的短肽)与 SpyCatcher(含 116 个氨基酸的蛋白),两者在数分钟内可形成稳定的酰胺键而实现共价偶联^[15]。该研究将 SpyCatcher 作为蛋白标签重组至 β_2 -AR 末端,将 SpyTag 修饰于硅胶表面,从而实现 SpyCatcher 标签药靶蛋白的一步定向固定^[16]。

综上,上述基于酶标签自催化反应的固定化

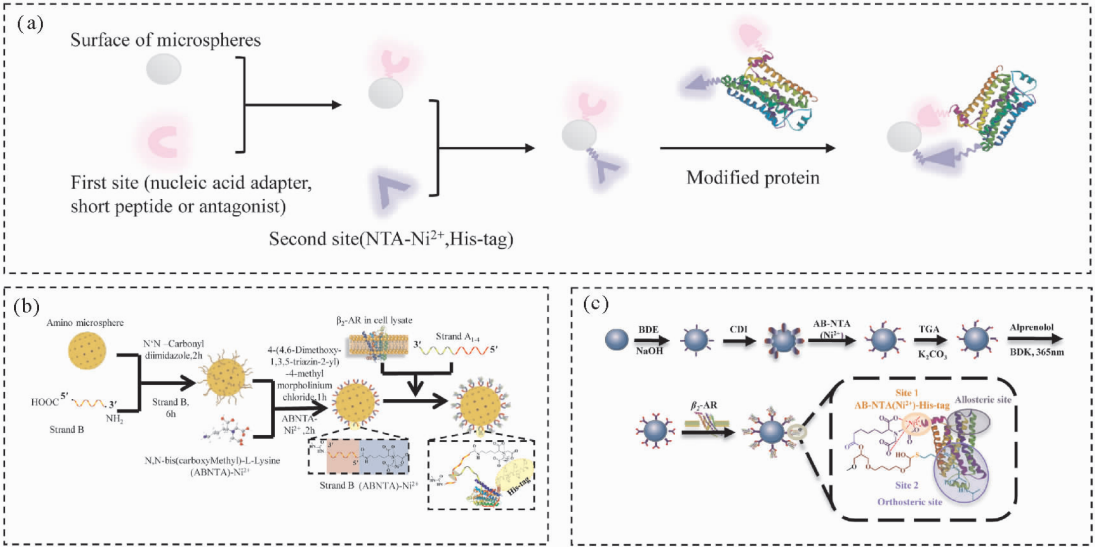
方法,避免了目标蛋白纯化步骤,能在最大程度上保证药靶蛋白活性,具有快速、高效、简便的特点。

1.2 基于双位点高亲和的定向固定化方法

上述酶标签自催化的一步定向固定本质上属于单位点共价固定,为保证功能基团的活性,一般而言,酶标签与药靶蛋白通过柔性连接臂相连,连接臂的柔性可能会使得固定后药靶蛋白取向难以完全控制,活性位点因与基质表面或邻近药靶蛋白相互作用导致损失的问题。因此,作者团队引入了一系列双位点固定药靶蛋白的方法,其核心是以核酸适配体、激动类活性短肽或拮抗剂为受体的构象稳定配基(第一位点),以氮川三乙酸镍(NTA-Ni²⁺)与受体组氨酸标签的亲 and 位点为第

二位点,采用双重亲和的方式将药靶蛋白进行定向固定(见图2)^[18-20]。该类方法的优势体现在两方面,一是双重亲和使得药靶蛋白与固定相表面配基的亲合力明显提升,受体稳定性好;二是双位

点固定受体的取向统一,构象稳定,活性更高,使得固定化药靶蛋白色谱柱可用于区分具有不同药效特征的配体。



(a) 总体示意图; (b) 核酸适配体和 NTA-Ni²⁺ 双位点固定 β_2 -AR 示意图^[19]; (c) 拮抗剂和 NTA-Ni²⁺ 双位点固定 β_2 -AR 示意图^[20]

图2 双位点高亲和定向固定化方法

Fig.2 Methods for high-affinity two-point immobilization

1.3 基于小标签的药靶蛋白定向固定化方法

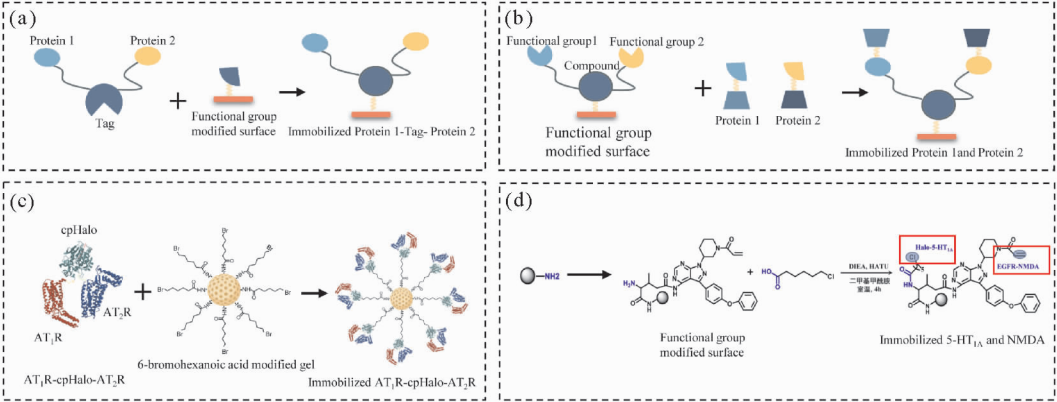
酶标签 (HaloTag: 33 kDa; SNAP-tag: 22 kDa; EGFR-tag: 37 kDa; VirD2: 25 kDa; SpyCatcher: 13 kDa) 分子量相对较大,对于分子量较小的药靶蛋白来说并不适合以其作为标签。针对该问题,作者团队通过琥珀密码子 (UAG) 将非天然氨基酸 p-叠氮化物 L 苯丙氨酸 (pAzF) 引入至 AT₁R 碳末端,通过叠氮基团与硅胶表面炔烃的环加成反应,实现了 AT₁R 的定向固定。与 HaloTag 和 SNAP-tag 相比, pAzF 标签更小,非特异性吸附更小,对于 AT₁R 生物活性的保持具有一定优势,亲和参数准确度测定明显提升^[7]。然而,上述方法的缺陷在于,传统的 E. Coli 基因组中存在多个琥珀密码子, pAzF 也可能会插入至菌体的内源性蛋白中,需先纯化药靶蛋白,再进行固定。敲除了基因组琥珀密码子的 E. Coli Δ C321 菌种能够很好的解决这一问题,使得非天然氨基酸仅能在目标药靶蛋白中定点插入,用细菌裂解液进行反应,即可一步固定药靶蛋白^[21]。

1.4 基于“一柱双靶”的固定化方法

与单靶点药物相比,双靶点药物具有协同起效、安全性能高和耐药性能高等特点,已成为药物

研发的重点方向。然而,传统的基于单柱单靶点固定化方法已经不能满足双靶点药物筛选需求,据此,作者团队前期分别将两种不同的药靶蛋白修饰于微球表面,将微球按一定比例混合后填入同一色谱柱,或将等摩尔的两种药靶蛋白混合后同时与微球反应得到双靶点固定相,用于双靶点药物筛选。红景天的生物活性物质筛选中使用的共固定化 β_2 -AR 和电压依赖性阴离子通道 1 (VDAC-1) 的受体色谱柱,其固定相的制备采用随意固定的方式,将 N,N'-羰基二咪唑活化后的氨基微球与含有等摩尔浓度 β_2 -AR 和 VDAC-1 的磷酸盐缓冲液反应而得^[22]。然而,两种药靶蛋白在固定相表面的比例和距离无法精确控制,筛选所得药物是否为双靶点仍需后期验证。因此,作者团队将化合物 A 修饰于微球表面,由于该化合物中含有两个功能基团 (6-氯己酸和依鲁替尼),分别能与 HaloTag 和 EGFR-tag 药靶蛋白反应,实现两种不同标签蛋白的共固定^[23]。另一种更为直接的方法以环形脱卤素酶 (cpHalo) 为标签,采用基因重组的方法将两种药靶蛋白融合表达至 cpHalo 两端,利用 cpHalo 与其底物的共价反应,将 AT₁R 和 AT₂R 两种药靶蛋白捕获至微球表面,

实现“一柱双靶”色谱固定相制备^[24],为双靶点药物的高效筛选提供可能(见图 3)。



(a) 基于同一标签的一柱双靶固定化方法示意图; (b) 基于不同标签的一柱双靶固定化方法示意图; (c) AT₁R-cpHalo-AT₂R 共固定示意图^[24]; (d) 5-HT_{1A}R 和 NMDA 共固定示意图^[23]

图 3 一柱多靶固定化方法

Fig. 3 Immobilization methods for the preparation of columns with multi-target proteins

2 固定化药靶蛋白中药活性成分定向筛选与评价

2.1 固定化药靶蛋白中药活性成分定向筛选

2.1.1 中药活性成分定向筛选

上述药靶蛋白的定向固定化方法被广泛应用于亲和色谱(HPAC)技术对中药活性成分筛选中,如温郁金^[4]、附子^[11]、栀子^[12]、紫苏叶^[13]、厚朴^[16]、莱菔子^[25]等单药以及麻黄附子细辛汤^[26]、三子养亲汤等复方^[27],辅以液相色谱质谱联用鉴定而筛选得到的对应各药靶蛋白的活性成分。

2.1.2 激动、拮抗和别构配体筛选

基于固定化药靶蛋白的筛选方法已成功应用于中药单药和复方中活性成分的高效筛选^[28],然而,现有的单位点固定化方法难以区分复杂体系中配体的激动、拮抗或别构活性^[29-31]。作者团队发展了系列双位点固定化方法,使得固定化药靶蛋白的活性更高,实现了中药丹参和 DNA 编码中药分子库中药靶蛋白激动、拮抗和别构活性成分的选择性筛选(见图 4)。该类筛选方法能在筛选的同时明确所得活性成分潜在的药效特征,具有生物学意义上的优势。

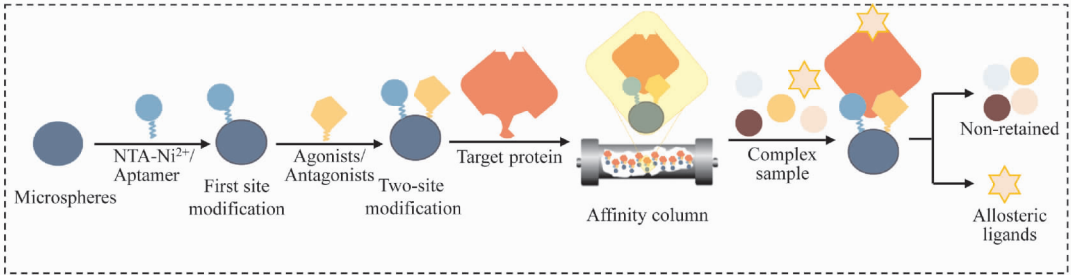


图 4 别构配体筛选示意图

Fig. 4 Schematic diagram for the screening of allosteric ligands

2.1.3 DNA 编码中药分子库的筛选

DNA 编码化合物库(DECLs)由于其水溶性好、结构多样和鉴定简便的特点,是新兴的药物筛选化合物库。作者团队首次将中药成分引入至 DECLs 构建过程,构建了两种不同类型的中药分子 DECLs,并从中筛选获得了靶向 AT₁R 且具有良好降压活性的 Hit 1 和别构活性成分 APF^[32],

以及同时靶向 β_2 -AR 和 CysLT1 的双靶点活性成分 XC267^[33]。

2.1.4 基于固定化药靶蛋白的亲合和拉曼筛选

表面增强拉曼光谱(SERS)是一种基于拉曼散射现象的光谱检测手段,在生物分析方面具有分析时间短、与固液界面兼容性好和对生物样品损伤小的特点。作者团队以 HaloTag 血清素转运

蛋白(5-HTT)为例,通过 HaloTag 和卤代烷烃间的生物正交反应,将 5-HTT 固定至 SiO₂@ Ag 核壳纳米颗粒表面,首次提出了亲和 SERS 技术,实现了栀子提取液中红花苷 I 的高灵敏检测和同步筛选,为亲和 SERS 技术在中药复杂样品中的应用提供了方法^[34]。

2.2 中药中非对映异构体的筛选

中药中富含的生物碱、黄酮和萜类等化合物是其发挥功效的最主要的活性成分。上述成分的母核结构中,可能存在多个手性中心,使得中药中富含化学结构和物理化学性质基本或完全相同的对映异构体和非对映异构体^[35]。然而,对映异构体或非对映异构体的生物活性可能差异较大,往往其中一种异构体活性较强而另一种异构体具有毒性^[36]。作者团队以中药麻黄中麻黄碱和伪麻黄碱的分离为例,将 β_2 -AR 活性短肽(ASSIVSF, Ala-Ser-Ser-Ile-Val-Ser-Phe)固载于大孔硅胶表面,制备特异性活性短肽亲和色谱固定相,首次实现了中药复杂体系中非亲和干扰成分的去除和非对映异构体麻黄碱与伪麻黄碱的靶向识别与同步分离^[37]。

2.3 固定化药靶蛋白中药活性成分早期成药性评价

2.3.1 亲和力测定

亲和力代表活性成分与药靶蛋白结合能力的大小,是其早期成药性评价的一个重要标准。前沿分析法、竞争置换法、直接进样法和非线性色谱等方法能够通过公式或软件拟合获得药靶蛋白与活性成分的亲和力,但上述方法仅能揭示一种蛋白与一种配体的作用,通量较低。据此,作者团队基于质量守恒定律和多元线性回归,分别推导了两种配体与一种蛋白[公式(1)]以及一种配体与两种蛋白[公式(2)]的亲和力参数测定公式,提高了亲和力参数测定通量,为“一药双靶”和“一靶双药”的亲亲和参数快速准确测定提供了方法^[27-38]。

$$\frac{1}{k'_A V_m} = \frac{1}{K_{AP} n_i} + \frac{1}{n'_i} \cdot \frac{n_A}{(1 + k'_A) V_m} + \frac{K_{BP}}{K_{AP} n_i} \cdot \frac{n_B}{(1 + k'_B) V_m}, \quad (1)$$

$$k'(1 + k') V_m^2 = - (K_{P1} + K_{P2}) \cdot k' n_i V_m - K_{P1} K_{P2} \cdot \frac{k'}{1 + k'} n_i^2 + K_{P1} K_{P2} (n_{P1} + n_{P2}) \cdot n_i +$$

$$(K_{P1} n_{P1} + K_{P2} n_{P2}) \cdot (1 + k') V_m \quad (2)$$

式中: A 和 B 分别代表两种配体; P1 和 P2 分别为两种蛋白; k' 为容量因子, V_m 为色谱系统死体积; n 为进样量; n_i 为结合位点数; K 为结合常数。

2.3.2 超热力学参数测定

不同温度下活性成分与药靶蛋白的亲合力不同,能够反应二者作用熵焓变化的热力特征,而超热力学能够利用线性自由能关系,将物理化学过程的详细模型与热力学参数相结合,推断药物与受体结合过程中的结构信息。作者团队以 α_{1A} 肾上腺素能受体(α_{1A} -AR)为例,通过热力学和超热力学参数测定[公式(3)],研究了 5 种配体与 α_{1A} -AR 相互作用过程的变化,明确了其中的两种配体甲磺酸酚妥拉明和坦索罗辛与受体的结合存在焓-熵补偿关系,结合方式为非共价且该过程结合能变化明显^[39]。

$$\Delta G(T) = \Delta H_r - T \Delta S_r + \Delta G_p [T - T_r - T \ln(\frac{T}{T_r})] \quad (3)$$

式中: 下标 r 为选定的参考温度 T(K), ΔH (kJ/mol)、 ΔS (J/mol · K) 和 ΔG (kJ/mol) 分别表示配体与蛋白质结合过程种的焓变、熵变以及吉布斯自由能变, ΔC_p (J/K) 为热容。

2.3.3 速率常数和驻留时间测定

结合/解离速率常数以及驻留时间是能够反应活性成分与药靶蛋白结合快慢以及结合时间长短的参数,而驻留时间在数值上等于解离速率常数倒数的 63%,结合速率常数在数值上等于解离速率常数与亲和力的乘积。上述参数的测定,能够反应活性成分成药的可能性和毒性,对于其早期评价具有重要意义。团队以 ET_AR 为例,采用非线性色谱、峰轮廓法和峰值衰减法对不同药物与固定化药靶蛋白的解离速率常数和驻留时间进行了测定,明确了 3 种方法的适用范围,为速率常数和驻留时间的准确测定提供了参考^[40]。

2.3.4 类药性评价

类药五原则要求小分子药物需满足分子量小于 500、氢键给体数目小于 5、氢键受体数目小于 10 和脂分配系数小于 5。传统的亲和色谱筛选方法在中药活性成分筛选方面多以亲和力为指标,而忽视了类药物原则中的评价参数。据此,本团队通过引入结合效率指数[BEI,公式(4)]、表面效率指数[SEI,公式(5)]、动能效率[KE,公式(6)]和配体亲脂性效率[LLE,公式(7)],建立了

一种抗哮喘活性成分药性色谱评价技术,为中药活性成分早期评价提供了方法学参考^[41]。

$$BEI = \frac{pK_D}{MW} \quad (4)$$

$$SEI = \frac{pK_D}{PSA} \quad (5)$$

$$KE = \frac{t}{N_{HA}} \quad (6)$$

$$LLE = pK_D - c \log P \quad (7)$$

式中: MW 为分子量; PSA 为极性表面积; t 为保留时间; N_{HA} 为重原子数量。

3 总结与展望

本文综述固定化药靶蛋白色谱固定相制备及其应用,并且重点阐述了该技术在中药及其复杂体系功效成分定向筛选及药物先导化合物分子早期评价中的应用实例。尽管作者团队在上述研究中取得了系列研究成果,然而,从纵深角度讲,该技术仍需进一步完善。① 现有药靶蛋白固定化方法主要依赖于靶蛋白非活性末端的融合标签,难以实现复杂体系天然蛋白的固定化,在后期研究中,作者团队重点发展基于亲和导向的天然蛋白质固定化方法研究,有望实现复杂体系天然蛋白质的固定化。② 在药物先导化合物发现方面,由于现有方法难以同步体现所得药物分子的下游信号,因此,重点开展功能选择性配体筛选研究以实现上述目标。③ 药靶蛋白种类繁多,涉及疾病多种多样,作者团队目前仅聚焦心脑血管病、抑郁症、呼吸系统疾病和糖脂代谢异常等相关药靶蛋白,但所建立的方法具有通用性,能够扩展至抗肿瘤等其他药物靶点。

参考文献

[1] ZENG K Z, LI Q, WANG J, et al. One-step methodology for the direct covalent capture of GPCRs from complex matrices onto solid surfaces based on the bioorthogonal reaction between haloalkane dehalogenase and chloroalkanes[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(2): 446-456.

[2] WANG J, WANG Y X, LIU J J, et al. Site-specific immobilization of β_2 -AR using O^6 -benzylguanine derivative-functionalized supporter for high-throughput receptor-targeting lead discovery[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(11): 7385-7393.

[3] OU Y Y, QIAO S, LI T, et al. Affinity chromatographic method for determining drug-protein interaction with enhanced speed than typical frontal analysis[J]. *Langmuir*, 2023, 39(29): 10259-10269.

[4] CHEN Y Y, JIN Y H, SHAYIRANBIEKE A, et al. Preparation and characterization of immobilized 5-HT_{1A} receptor stationary phase for high throughput screening of the receptor-binding ligands from complex systems like Curcuma Wenyujin Y. H. Chen et C. Ling extract[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 211: 114632.

[5] FU X Y, LI L K, WEN X, et al. Halo-tagged protein immobilization: Effect of halide linkers on peak profile and drug-protein interaction[J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1640: 461946.

[6] QIAO S, ZHENG X X, OU Y Y, et al. Highly efficient GPCR immobilization with enhanced fouling resistance, salt tolerance, and chromatographic performance[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2024, 236: 113818.

[7] ZUO H Y, LI T, ZHANG D D, et al. Enhancing chromatographic performance of immobilized angiotensin II type 1 receptor by strain-promoted alkyne azide cycloaddition through genetically encoded unnatural amino acid[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(45): 15711-15719.

[8] SABBAB D A, HAJJO R, SWEIDAN K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2020, 20(10): 815-834.

[9] GAO W, WANG M, WANG L, et al. Selective anti-tumor activity of ibrutinib in EGFR-mutant non-small cell lung cancer cells[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2014, 106(9): dju204.

[10] ZHAO X F, JIN Y H, YUAN X Y, et al. Covalent inhibitor-based one-step method for endothelin receptor A immobilization: From ligand recognition to lead identification[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(20): 13750-13758.

[11] JIN Y H, CHEN Y Y, JIAO M Z, et al. Identifying potential ligands specifically binding to beta1-adrenoceptor from Radix Aconiti Lateralis Praeparata extract by affinity chromatographic method[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 220: 115022.

[12] CHEN Y Y, XUE Y, YIN J T, et al. N-methyl-D-aspartic acid receptor 2A functionalized stationary phase:

- A reliable method for pursuing potential ligands against Alzheimer's disease from natural products [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2023, 29 (5): 1290-1299.
- [13] WEN X, CHEN M Y, LI Z M, et al. Site-specific immobilization of Cysteinyl leukotriene receptor 1 through enzymatic DNA-protein conjugation strategy for lead screening [J]. *Journal of Chromatography A*, 2024, 1727: 464948.
- [14] BERNARDINELLI G, HÖGBERG B. Entirely enzymatic nanofabrication of DNA-protein conjugates [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(18): e160.
- [15] ZAKERI B, HOWARTH M. Spontaneous intermolecular amide bond formation between side chains for irreversible peptide targeting [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(13): 4526-4527.
- [16] XUE Y, ZHANG Z L, WANG G, et al. Protein superglue inspired in-situ one-step site-specific immobilization of beta2-adrenoceptor and its application in bioactive compound screening from *Cortex Magnoliae Officinalis* [J]. *Journal of Chromatography A*, 2023, 1690: 463780.
- [17] LI Q, YIN G W, WANG J, et al. An emerging paradigm to develop analytical methods based on immobilized transmembrane proteins and its applications in drug discovery [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 157: 116728-116735.
- [18] LIU J J, LI T, WANG G, et al. Aptamer-assisted two-point immobilized agonist-bound angiotensin II type 1 receptor for a second-site modulator discovery [J]. *iScience*, 2022, 25(11): 105361.
- [19] GAO J, YUAN X Y, ZHENG X X, et al. Two-point immobilization of a conformation-specific beta₂-adrenoceptor for recognizing the receptor agonists or antagonists inspired by binding-induced DNA assembly [J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(23): 7934-7943.
- [20] TIAN R, YIN J T, YAO Q Q, et al. Development of an allosteric responsive chromatographic method for screening potential allosteric modulator of beta₂-adrenoceptor from a natural product-derived DNA-encoded chemical library [J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94 (25): 9048-9057.
- [21] ZHAO X, XIANG M J, ZHANG Z L, et al. A label-free strategy for immobilization of GPCRs using site-specific encoded non-natural amino acids to develop a selectively chromatographic approach for pursuing potential ligands binding to 5-hydroxytryptamine 1A receptor [J]. *Journal of Chromatography A*, 2024, 1718: 464715-464725.
- [22] LIU T, HOU Y N, LIU J J, et al. Screening bioactive compounds with multi-targets from *Rhodiola crenulata* by a single column containing co-immobilized beta₂-adrenergic receptor and voltage dependent anion channel isoform 1 [J]. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1100/1101: 76-82.
- [23] 陈圆圆. 阿尔茨海默病双靶点受体色谱模型的建立及其在益气聪明汤活性成分筛选中的应用 [D]. 西安: 西北大学, 2024: 16-47.
- [24] QU L J, LI T, SUN S D, et al. A chromatographic method for determining the interaction between a drug and two target proteins by fabricating a dual-heterogeneous surface [J]. *Journal of Chromatography A*, 2024, 1715: 464606.
- [25] WANG J, ZHAO X, YUAN X Y, et al. Rapid screening of bioactive compound in Sanzi Yangqin Decoction and investigating of binding mechanism by immobilized beta₂-adrenogenic receptor chromatography coupled with molecular docking [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 197: 113957.
- [26] JIN Y H, WANG W W, ZHANG Z L, et al. Stepwise frontal analysis coupled with affinity chromatography: A fast and reliable method for potential ligand isolation and evaluation from Mahuang-Fuzi-Xixin Decoction [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2023, 20 (3): e202201057.
- [27] WANG J, GAO Q Y, YIN J T, et al. Covalent immobilization of beta2 adrenergic receptor through transmethylation reaction by SNAP-tag and its application in anti-asthmatic compound screening from *Raphani Semen* [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 219: 114952.
- [28] SHAYIRANBIEKE A, LIANG Q, WANG T T, et al. Development of immobilized beta1-adrenoceptor chromatography for rapid discovery of ligands specifically binding to the receptor from herbal extract [J]. *Journal of Chromatography A*, 2022, 1677: 463298.
- [29] ZHAO X, FU X Y, WANG T T, et al. Screening of bioactive flavour compounds targeting muscarinic-3 acetylcholine receptor from *Siraitia grosvenorii* and evaluation of their synergistic anti-asthmatic activity [J]. *Food Chemistry*, 2022, 395: 133593.
- [30] ZHAO X, FU X Y, YUAN X Y, et al. Development and characterization of a selective chromatographic approach to the rapid discovery of ligands binding to muscarinic-3 acetylcholine receptor [J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1653: 462443.

- [31] JIA X N, LIU J J, SHI B M, et al. Screening bioactive compounds of *siraitia grosvenorii* by immobilized β_2 -adrenergic receptor chromatography and druggability evaluation[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 915.
- [32] LIANG Q, ZUO H Y, YANG T, et al. Discovery of dual-target ligands binding to beta2-adrenoceptor and cysteinyl-leukotriene receptor for the potential treatment of asthma from natural products derived DNA-encoded library[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 233: 114212.
- [33] LIANG Q, ZHAO X, FU X Y, et al. Identification of selective ligands targeting two GPCRs by receptor-affinity chromatography coupled with high-throughput sequencing techniques [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 112: 104986.
- [34] ZHANG D D, MA J, ZHENG X X, et al. Fabrication of a bioconjugated dual-functional SERS probe for facile compound screening and detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 234: 115369.
- [35] CHEN Y N, QIAN Y K, SHI Y J, et al. Accumulation of chiral pharmaceuticals (ofloxacin or levofloxacin) onto polyethylene microplastics from aqueous solutions[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 823: 153765.
- [36] LI Y, JIN X N, CHENG Y, et al. Recent advances on chiral mobile phase additives: A critical review[J]. *Journal of Analysis and Testing*, 2022, 6(2): 129-162.
- [37] YIN J T, GOU Y H, WANG Y H, et al. Can the heptapeptide ASSIVSF of the β_2 -adrenoceptor recognize ephedrine and pseudoephedrine epimers in a complex system? [J]. *Journal of Chromatography A*, 2024, 1722: 464857.
- [38] QIAO S, OU Y Y, LIU L, et al. Mathematical and experimental validation of an approach for simultaneously determining the binding parameters of two drugs to a receptor[J]. *Journal of Chromatography A*, 2022, 1685: 463593.
- [39] YUAN X Y, SHAYIRANBIEKE A, XU R, et al. Site-selective covalently immobilized alpha 1A adrenergic receptor for thermodynamic and extra-thermodynamic study of four ligands binding to the receptor by chromatographic methods[J]. *Journal of Chromatography A*, 2022, 1665: 462827.
- [40] LI P, SHI B W, LI L K, et al. Semi-quantitatively predicting the residence time of three natural products on endothelin receptor A by peak profiling using the receptor functionalized macroporous silica gel as stationary phase[J]. *Journal of Analysis and Testing*, 2023, 7(1): 40-52.
- [41] ZHENG X X, FAN H S, SONG Z, et al. Immobilized beta2-adrenergic receptor: A powerful chromatographic platform for drug discovery and evaluation of drug-like property for natural products[J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1659: 462635.

(编辑 亢小玉)