

Reform and Innovative Practice in Pharmaceutical Experimental Teaching Based on the CMC/RL-2020 Analyzer

Weina Ma Panpan Lei Sifan Xie

School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China

Abstract

This study developed an experimental teaching system using the domestic CMC/RL-2020 analyzer to investigate ligand-receptor interactions. Through systematic experiments evaluating affinity strength, target specificity, molecular forces, and binding reversibility, students gain deep insight into drug-receptor mechanisms. This approach integrates theory with modern analytical technology, enhancing comprehension of affinity chromatography and drug action while fostering research and innovation capabilities in drug development. Utilizing domestic advanced instruments improves technical and analytical skills, promotes technological self-reliance, and provides a practical platform for cultivating innovative pharmaceutical talents. This work offers valuable insights into pharmaceutical education reform and demonstrates significant value in training innovative researchers.

Keywords

cell membrane chromatography; drug discovery; pharmaceutical laboratory teaching reform; research-based innovative experiment

基于 CMC/RL-2020 型分析仪的药学实验教学改革与创新实践

马维娜 雷盼盼 谢思凡

西安交通大学药学院，中国·陕西西安 710061

摘要

本研究基于国产自主研发的CMC/RL-2020型分析仪，创新性地构建了配体-受体相互作用研究的实验教学体系。围绕亲和作用强度、作用靶点、分子作用力类型及结合可逆性四个维度，系统设计实验内容，深入揭示药物-受体作用机制。该教学实践将理论知识与现代分析技术融合，不仅深化了学生对亲和色谱原理及药物作用机制的理解，更有助于培养其药物研发能力和科研创新思维。采用国产先进仪器开展教学，在提升学生实验技能和数据分析能力的同时，增强了科技自立自强意识，为培养新时代药学创新人才提供了重要平台。本体系为药学实验教学改革提供了新思路，对促进创新型人才培养具有重要示范意义。

关键词

细胞膜色谱；药物发现；药学实验教学改革；研究型创新实验

1 引言

配体-受体相互作用是细胞信号转导的核心，本质为高特异性分子间非共价结合，可触发精确生物信号传导，进而调控相应生理或药理效应^[1]。因此，深入研究配体-受体相互作用特性，已成为创新药物发现的重要基础。

细胞膜色谱 (Cell Membrane Chromatography, CMC)

是一项原创仿生色谱技术，其核心在于模拟“配体-受体”相互作用，将体内互作过程转化为体外色谱分析，实现了活性物质的高效筛选和评价^[2]。该技术融合了分子识别原理与色谱分离分析的优势，为药物发现和分子互作研究提供新平台。

在国家自然科学基金 (No. 81227802) 支持下，CMC 已实现仪器化，CMC/RL-2020 型分析仪 (图 1) 是一款集生物识别与智能分析于一体，为配体-受体研究提供专业化分析工具^[3]。将这一原创分析仪器引入药学实验教学，通过创新性实验设计，有助于学生理解亲和色谱原理，培养药物-受体互作研究能力和药物研发思维，对培养药学创新人才具有重要意义。

【基金项目】西安交通大学 2024 年课程思政专项研究项目“细胞膜色谱课程思政元素的深度挖掘与教学实践研究”的研究成果。

【作者简介】马维娜 (1988-)，女，中国陕西西安人，博士，副教授，从事细胞膜色谱仪器研制及应用研究。

2 实验原理

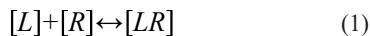
药物与膜受体的相互作用具有高特异性、强亲和力、可逆性及可饱和性等特征。通过三维空间结构的互补结合，药物被受体识别并触发其构象变化，进而激活下游信号通路，最终产生生物学效应。该过程主要包括药物-受体结合、构象变化启动细胞内信号、信号级联放大三个关键步骤^[4]。



图 1 CMC/RL-2020 型分析仪工程化样机

2.1 作用亲和强度求解

平衡解离常数 K_D 值是反映配体与受体结合强度的基本参数，也是评价药物特性的必备指标^[5]。根据 Clark 受体理论，配体-受体结合是可逆动态过程，可用以下方程表示：



其中 $[R]$ 是游离膜受体的浓度， $[L]$ 是配体浓度， $[LR]$ 是受体-配体偶联物的浓度，在平衡状态下，这个复合物的 K_D 值由下式给出：

$$K_D = \frac{[L][R]}{[LR]} \quad (2)$$

前沿分析法通过将不同浓度的配体连续通过受体色谱柱，固定相逐渐达到饱和，获得一系列突破曲线（图 2a, b）。突破曲线的拐点位置与流动相配体浓度、色谱柱固定化受体数目和配体-受体结合常数有关，如下式所示：

$$\frac{1}{m_{Lapp}} = \frac{K_D}{m_L} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{m_L} \quad (3)$$

式中： m_{Lapp} 为在给定的摩尔浓度的分析物条件下，达到突破曲线中点所需的分析物的摩尔数； m_L 为固定相上的结合受体的总摩尔数； $[A]$ 为分析物的摩尔浓度。

依据公式（3），以 $1/m_{Lapp}$ 对 $1/[A]$ 作图，如图 2c 所示，斜率和截距的比值则为 K_D 值。

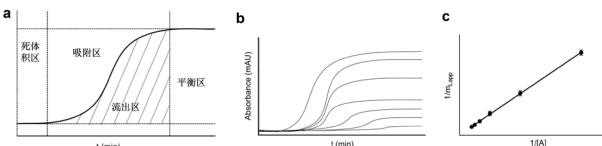


图 2 CMC-作用曲线

a. 突破曲线；b. 梯度浓度的药物形成多条突破曲线；c.

$1/m_{Lapp}$ 对 $1/[A]$ 线性回归曲线。

2.2 作用可逆性

配体-受体的可逆结合是药物产生效应的分子基础，对阐明药物的药理效应、活性及毒性特征具有指导意义。在 CMC 体系中，此作用体现为特征性结合曲线（图 3）。该曲线可直观反映配体-受体相互作用的动态平衡特性。

通过解析结合曲线可获得配体的容量因子 k 及不对称因子 AS ，计算公式如下：

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

$$AS = \frac{b}{a} \quad (5)$$

其中， t_0 为非作用组分在 CMC 检测体系的死时间； t_R 为配体的保留时间； a 和 b 为结合曲线 10% 峰高（ h ）处的峰底宽。

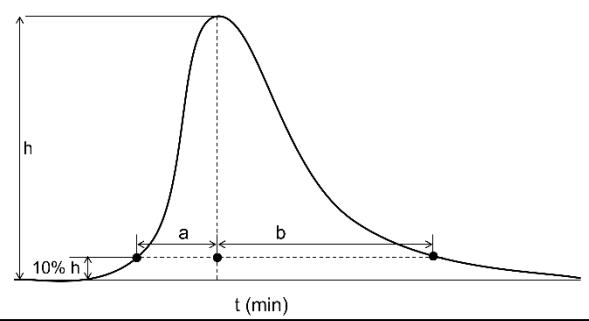


图 3 CMC 不对称性结合曲线示意图

2.3 作用靶点分析

竞争性结合机制对药物靶点研究至关重要。通过 CMC 技术可直观观测这一现象：当受体位点被竞争性配体饱和后，待测物的保留时间会随竞争剂浓度增加而缩短，结合曲线前移（图 4a），保留因子 k 与竞争剂浓度呈负相关（图 4b）。该方法能有效区分药物分子的结合位点差异，阐明作用特异性。

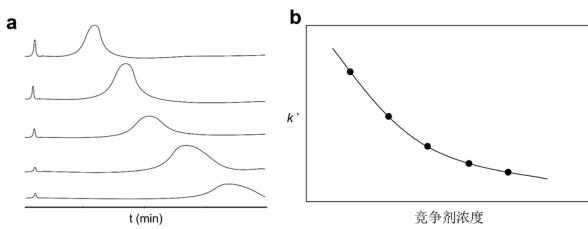


图 4 CMC 竞争置换曲线

a. 不同浓度分析物平衡色谱柱后标记物的保留曲线；b. 竞争曲线。

2.4 作用力类型

为评估各作用力的贡献，可采用基于“计量置换保留模型”的竞争置换实验，其溶质的色谱保留特性可以用（6）

式表示:

$$\lg k = \lg I - Z \lg a_D \quad (6)$$

式中: k 为溶质的容量因子; a_D 为流动相中置换剂的浓度; $\lg I$ 和 Z 均为常数。其中, Z 值反映了流动相中的离子浓度对每个样品进行结合固定相的影响。

在 CMC 体系中, 使用强离子置换剂可获得反映离子力大小的曲线(图 5a); 使用脲等分子则可评估氢键作用(图 5b), 从而系统解析各类非共价力的相对贡献。

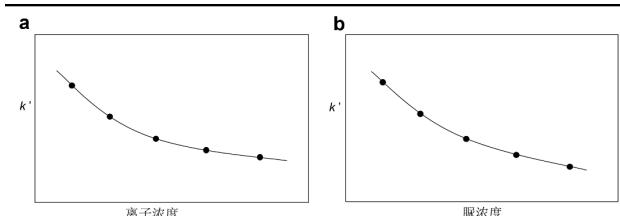


图 5 CMC 置换曲线

a. 离子力竞争曲线; b. 脲竞争曲线。

3 实验课程设计

3.1 实验仪器与材料

CMC/LR-2020 型分析仪; 装柱机; 油浴锅; 真空抽滤泵。色谱柱 (10 mm × 2 mm I.D.) ; 筛板, 柱套。氨基硅胶; 三聚氯氰 (TCT); N, N-二异丙基乙胺 (DIEA); 6-[[4-(氨基甲基)苯基]甲氧基]-7H-嘌呤-2-胺 (BG), NaH₂PO₄ · 12H₂O, 脲。

3.2 实验流程

3.2.1 细胞膜色谱柱的制备

采用过表达目标受体的 HEK293 细胞, 经消化、收集、低渗破碎与差速离心后, 取细胞膜组分。最终膜组分用 5 mL 预冷生理盐水重悬, 制备成细胞膜悬液备用。将氨基硅胶经 TCT 活化后, 与 BG 在 95℃回流反应 8 h, 制得 SiO₂-BG 固定相。将固定相与细胞膜悬液在 37℃震荡孵育 30 min, PBS 漂洗后得固定化细胞膜固定相。以超纯水为流动相, 在 10 MPa 下装柱 30 min, 制得细胞膜色谱柱, 可连接系统使用或于 4℃ 生理盐水中保存。

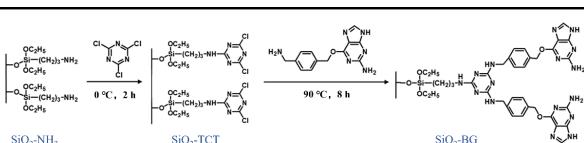


图 6 SiO₂-BG 固定相合成路线

3.2.2 作用亲和强度求解--前沿分析

采用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (A 液) 平衡 CMC 色谱柱 1-2 h。将待测样品配制成 1×10^{-6} mol/L 的 B 液, 通过调节 A/B 液比例, 使样品浓度从 1×10^{-7} 至 1×10^{-6} mol/L 依次进入色谱柱。每一浓度在柱中达到吸附平衡后, 用 100% A 液洗脱, 循环此吸附-洗脱过程, 获得 6 条突破曲线。最后利用仪器

智能分析系统, 计算 K_D 值。

3.2.3 作用可逆性分析--不对称因子

将分析样品以 1 mg/mL 溶于甲醇, 经 0.45 μm 滤膜过滤后进样。以水或生理盐水平衡 CMC 柱, 进样 5 μL 分析, 获得结合曲线以计算不对称因子, 并评估结合可逆性。

3.2.4 作用靶点分析--竞争置换

竞争置换实验需选用受体的经典阳性药作为标记物。首先用磷酸盐缓冲液 (A 液) 平衡色谱柱 1 h。将分析物配制成 1×10^{-8} 至 1×10^{-6} mol/L 依次进入色谱柱。每一浓度达平衡后, 直接注入 5 μL 标记物。通过分析标记物保留曲线是否随分析物浓度增大而前移, 判断二者是否竞争结合于受体的同一区域。

3.2.5 作用力类型考察-计量置换

为分析配体-受体相互作用的贡献力, 分别通过改变流动相中磷酸盐与脲的浓度进行测定。离子力分析: 调节 A 液 (50 mmol/L 磷酸盐缓冲液) 与 B 液 (超纯水) 比例, 使磷酸盐浓度在 1-50 mmol/L 范围内变化, 进样 5 μL 并计算各浓度下的容量因子。氢键分析: 调节 A 液 (100 mmol/L 脲, 含 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液) 与 B 液 (50 mmol/L 磷酸盐缓冲液) 比例, 使脲浓度在 6.25-100 mmol/L 范围内变化, 同上测定并计算容量因子。通过容量因子随各置换剂浓度的变化趋势, 分别评估离子力与氢键作用的贡献。

4 课程设计特色

4.1 “四维一体”递进式实验架构

构建了“亲和强度→可逆性→靶点特异性→作用力类型”的递进式实验体系, 完整覆盖配体-受体相互作用研究全链条。各模块既独立又关联, 形成从宏观参数到微观机制的系统性知识进阶路径。

4.2 国产仪器的教学化应用

首次将自主研制的 CMC/RL-2020 型分析仪引入教学, 配套开发了仿生色谱柱构建、标准化装柱及智能化分析方法。

4.3 科研反哺教学的转化

将国家自然科学基金项目成果 (No.81227802) 转化为教学实验, 实现科研方法与教学实践的有机衔接。

4.4 自主创新意识的培养

通过“仪器操作→技术实践→数据处理→方案设计”的全流程训练, 强化自主研发意识和创新应用能力。

本课程实现了受体理论与分析技术的深度融合, 构建了“理论-技术-应用”三位一体的教学模式, 将复杂机制研究转化为可操作的教学体系, 为培养具备创新能力和仪器开发素养的药学人才提供了标准化方案。

5 结语

基于 CMC/LR-2020 型分析仪的实验教学, 为学生系统

研究配体 - 受体相互作用提供了创新平台。本实验通过四个维度引导学生深入探究：亲和作用强度，定量表征结合能力；作用靶点，明确特异性结合位点；分子作用力类型，解析氢键等非共价相互作用；结合可逆性，考察动态结合特性。这种多维度设计不仅深化学生对药物作用机制的理解，也为药物设计与筛选提供了实验依据。

本实验采用国产 CMC/LR-2020 型分析仪作为核心设备，具有多重教育价值：既让学生接触前沿国产仪器，拓展科学视野；又通过完整实验流程系统培养其实验设计、数据分析和科研思维能力。更重要的是，在掌握先进分析技术的同时，有效增强了学生的科技自立意识，为其未来科研创新奠定基础。

该实践将理论与操作深度融合，既巩固了学生对药物 - 受体作用原理的认知，又培养了运用现代技术解决科学问题的能力，是培养创新型药学人才的重要途径。

参考文献

- [1] Takeuchi, J., Fukui, K., Seto, Y., et al. Ligand-receptor interactions in plant hormone signaling [J]. Plant Journal, 2021, 105(2): 290-306.
- [2] Ma, W., Wang, C., Liu, R., et al. Advances in cell membrane chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1639: 461916.
- [3] 贺浪冲. 细胞膜色谱法 [M]. 北京：化学工业出版社，2025.
- [4] Heydenreich, F.M., Marti-Solano, M., Sandhu, M., et al. Molecular determinants of ligand efficacy and potency in GPCR signaling [J]. Science, 2023, 382(6677): eadh1859.
- [5] Rukundo, J.L., Latimer, J., Jain, S., et al. Streamlined Data Processing for Determination of Equilibrium Dissociation Constants with Accurate Constant via Transient Incomplete Separation (ACTIS) [J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(7): 3563-3568.
- [6] Drager, R.R., Regnier, F.E. Application of the stoichiometric displacement model of retention to anion-exchange chromatography of nucleic acids [J]. Journal of Chromatography, 1986, 359: 147-155.