

用 His MultiTrap FF 和 Superdex 200 5/150 GL 对含组氨酸标签的膜蛋白进行去污剂筛查和大小均一性分析

应用

膜蛋白的纯化需要用温和去污剂将膜溶解，在去污剂存在的情况下，对溶液中的蛋白进行分离。合适的去污剂应该能提取目标蛋白并且能够保证在纯化过程中蛋白质没有天然结构和功能的丢失。对去污剂溶液中目标蛋白能否进行稳定和均一地制备是晶体学或核磁共振(NMR)结构分析成功地关键。

要想获得最佳的产量，纯度和大小均一性，需对多种去污剂进行试验，以确定适合膜蛋白的去污剂。由于膜蛋白通常表达水平较低，因此该工作需能适应极少的蛋白量。

该过程讲述了如何筛查出最佳的去污剂类型和浓度。目标蛋白的富集在 His MultiTrap FF 96 孔板上进行，同时大小均一性分析在 Superdex™ 200 5/150 柱上进行。

1.当膜蛋白去稳定后容易发生寡聚和聚集的现象，因此大小均一性可作为稳定性的有用的指征。

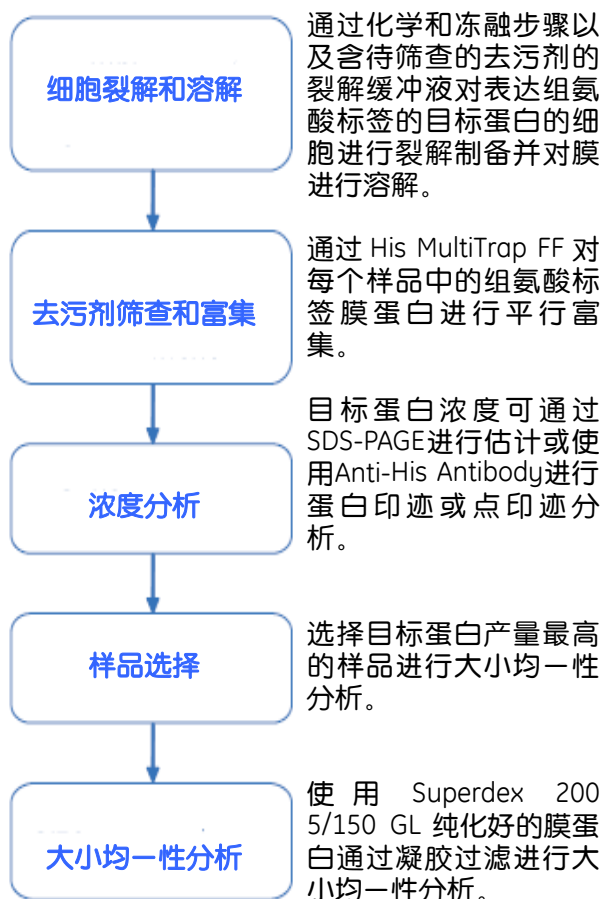


图 1. 使用 His MultiTrap FF 联合 Superdex 200 5/150 对去污剂筛查，膜蛋白富集以及大小均一性分析的概述。



细胞裂解和膜蛋白溶解

材料

在以下缓冲液中对大肠杆菌进行化学和反复冻融，使其达到溶解和细胞破裂：裂解缓冲液：20 mM 磷酸钠, 100 mM 氯化钠, 20 mM 咪唑, 0.5 mM 磷酸三(2-氯乙基)酯, 5 U/ml 核酸酶, 1 mg/ml 溶菌酶, 不含EDTA的蛋白酶抑制剂混合物, 1%到2% 待筛查的去污剂, pH 7.4

*每个样品中分别加入不同的待筛查的去污剂。

方法

使用以下步骤对膜蛋白进行裂解和溶解：

1. 4°C下 8000×g 离心 10 min 或 1000 - 1500×g 离心 30 min 收集培养液中的细胞。
2. 弃上清。将细菌沉淀置于冰上。
3. 每 1 克湿细胞用 5 至 10 ml 裂解缓冲液进行细胞沉淀的重悬。
4. 室温或 4°C 轻微搅动 2h, 这一时间取决于目标蛋白的敏感度。
5. 如有必要可测量和调节 PH。

膜蛋白富集

材料

样品：100 μl 未澄清的细胞裂解物，其中含有组氨酸标签的膜蛋白和待筛查的去污剂。

待筛查的去污剂：1% Fos-choline 12 (FC12); 1% 十一烷基麦芽糖苷 (UDM); 1% 十二烷基麦芽糖苷 (DDM); 1% Cymal™5; 1% Cymal 6; 2% 辛基糖苷(OG); 1% Triton™ X-100 (TX-100), 1%十二烷基二甲基氧化胺 (LDAO)。所有去污剂的浓度均高于临界胶束浓度(CMC)。

吸附缓冲液：20 mM 磷酸钠, 500 mM 氯化钠, 20 mM咪唑, 0.5 mM TCEP, 1% - 2% 去污剂, pH 7.4

清洗缓冲液：20 mM 磷酸钠, 500 mM 氯化钠, 40 mM 咪唑, 0.5 mM TCEP, 0.03% 十二烷基麦芽糖苷 (DDM), 1% - 2% 去污剂, pH 7.4

洗脱缓冲液：20 mM 磷酸钠, 500 mM 氯化钠, 500 mM 咪唑, 0.5 mM TCEP, 0.03% 十二烷基麦芽糖苷 (DDM), 1% - 2% 去污剂, pH 7.4。

通过离心，将多个未澄清的样品富集在 His MultiTrap FF板上。

方法

1. 撕去MultiTrap FF 96孔板底部的封膜。
注释：当移去底部封膜时需将平板置于器皿上方以防止储存液发生少量渗漏。
2. 将平板倒置，轻轻晃动使粘在顶部的亲和介质落下。
注释：每个孔含有500 μl 10%保存在储存液中的 Ni Sepharose Fast Flow匀浆(50 μl介质储存在20%的乙醇中)。
3. 将平板竖起，当平板面朝向试验台面时揭去顶部封膜。
4. 将平板置于500 μl V底收集板(编号28-4039-43)上。
注释：必要时，以下步骤操作时应谨记更换或控干V底收集板。
5. 500×g下将平板离心2 min，去除介质中的储存液。
6. 加入500 μl去离子水/孔，500×g下 离心2 min。

- 加入500 μ l 吸附缓冲液/孔并进行简单的混合，以平衡介质。500xg 离心2 min。重复一次。
- 每个孔加入100 μ l 样品，简单混合后孵育3 min。(如果收率太低，可适当延长孵育时间)。
- 100xg 离心4 min 去除流穿液(或离心至孔干为止)。
- 加入500 μ l 吸附缓冲液/孔，简单混合后洗去为结合样品。500xg 离心2 min。
- 重复一次(或直到所有未结合样品清除，高纯度时，280 nm 检测值[A280]应小于0.1)。
- 加入200 μ l 洗脱液/孔，混合1 min。500xg 将平板离心2 min，收集液体。重复两次(总共3次洗脱)或直至所有目标蛋白清除。如有必要，每次洗脱之间可更换收集板(避免目标蛋白不必要的稀释)。

更多产品使用细节见 His MultiTrap FF(编号 11-0036-62 AD)说明。

浓度分析

由于 His MultiTrap FF 的富集作用，使得目标膜蛋白的浓度可通过 SDS-PAGE 检测。对于每种待筛查的去污剂，收集 His MultiTrap FF 板上富集蛋白的前两次洗脱液进行分析(图2)。若需要更加敏感或特异的方法，可采用 Anti-His Antibody(GE Healthcare 编号: 27-4710-01)进行定量蛋白免疫印迹或点印迹分析(图3)。需要了解 GE Healthcare ECL Western blotting 产品，参见参考文献1。

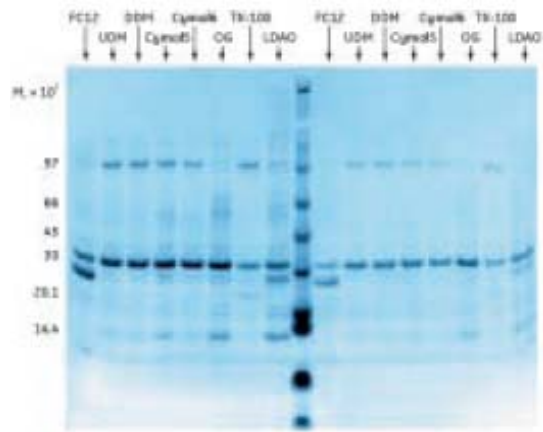


图2. 采用 His MultiTrap FF 对膜蛋白 EM29 进行去污剂筛查，SDS-PAGE(考马斯亮蓝染色)对洗脱成分1和2(泳道1-8和10-17)进行分析。第9泳道为分子量标准。完整信息请参见参考文献2。

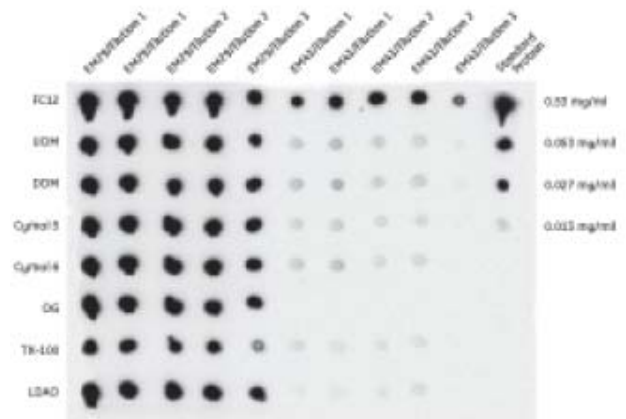


图3. 对 His MultiTrap FF 纯化的含组氨酸标签的膜蛋白通过硝酸纤维素膜点印迹法进行特异检测。完整信息请参见参考文献2。

大小均一性分析

凝胶过滤可作为蛋白聚集的快速检测方法。该方法能在很宽泛的条件下应用。经常用作对已纯化好的膜蛋白进行大小均一性评估的有效检测方法。洗脱成分中含可观的目标蛋白收率，可通过 SDS-PAGE, 免疫蛋白印迹或点印迹等对其浓度进行检测，其大小均一性可通过 Superdex 200 5//150 GL 柱进行凝胶过滤来分析。该柱操作时只需要 4 -50 μ l 的样品载量和小体积的含去污剂的洗脱液。

材料

样品: 从去污剂筛查环节获得的洗脱组分

平衡缓冲液: 20-50 mM 磷酸钠, 100 mM 氯化钠, x%去污剂(最佳去污剂 -从去污剂筛查环节选择能获得最高收率的去污剂; 浓度为 1.2 -2 倍临界胶束浓度), PH 5-9

系统: ÄKTAdesign™系统如ÄKTAexplorer™

方法

1. 用6 ml平衡缓冲液平衡柱体，流速为0.3 ml/min。
2. 载入10 μ l去污剂筛查环节得到的洗脱成分。
3. 继续用4.5 ml平衡液进行洗脱，280 nm下测量吸收度。柱压维持在1.5 MPa以下。

在层析系统中设定层析柱的详细说明参见说明手册18- 1163- 79 AD。说明书随产品一起提交给客户。

评论

层析结果图谱中每个单峰对应一种大小均一的蛋白，这种均一成分的蛋白通常认为最适合于晶体化。色谱图上额外的谱峰通常代表目标膜蛋白存在不理想的多聚或聚集，或者样品中有杂质存在。图 4 为整合膜蛋白(分子量约 6000)典型的凝胶过滤，用于分析不同 PH 和盐条件下蛋白的均一性。PH 5.2, 0.1 M 氯化钠条件下纯化可获得对称谱峰，表明在这些条件下蛋白成分均一。而更高盐浓度(0.3 M)条件下，在靠近空体积处出现小峰，表明蛋白寡聚化或聚集达到极限。当 PH 7.5 和 PH 9.5 时，靠近空体积处出现明显的谱峰，表明有明显的寡聚或聚集发生。整个筛查过程少于 2 小时，其中包括了柱平衡时间。整个筛查过程样品消耗为 6 \times 10 μ l。

更多详情，请参见参考文献 3 和 4。

层析柱: Superdex 200 5/150 GL
 样品: 来自大肠杆菌的整合膜蛋白(分子量 60 000)
 样品体积: 10 μ l
 洗脱成分(包括0.1或0.3 M 氯化钠):
 缓冲液1: 20 mM 醋酸钠, 0.03 % 十二烷基麦芽糖苷, 0.5 mM TCEP, pH 5.2;
 缓冲液2: 20 mM HEPES, 0.03 % 十二烷基麦芽糖苷, 0.5 mM TCEP, pH 7.5
 缓冲液3: 20 M CAPSO, 0.03 % 十二烷基麦芽糖苷, 0.5 mM TCEP, pH 9.5
 流速: 0.35 ml/min
 检测: 280 nm紫外吸收
 系统: ÄKTAexplorer

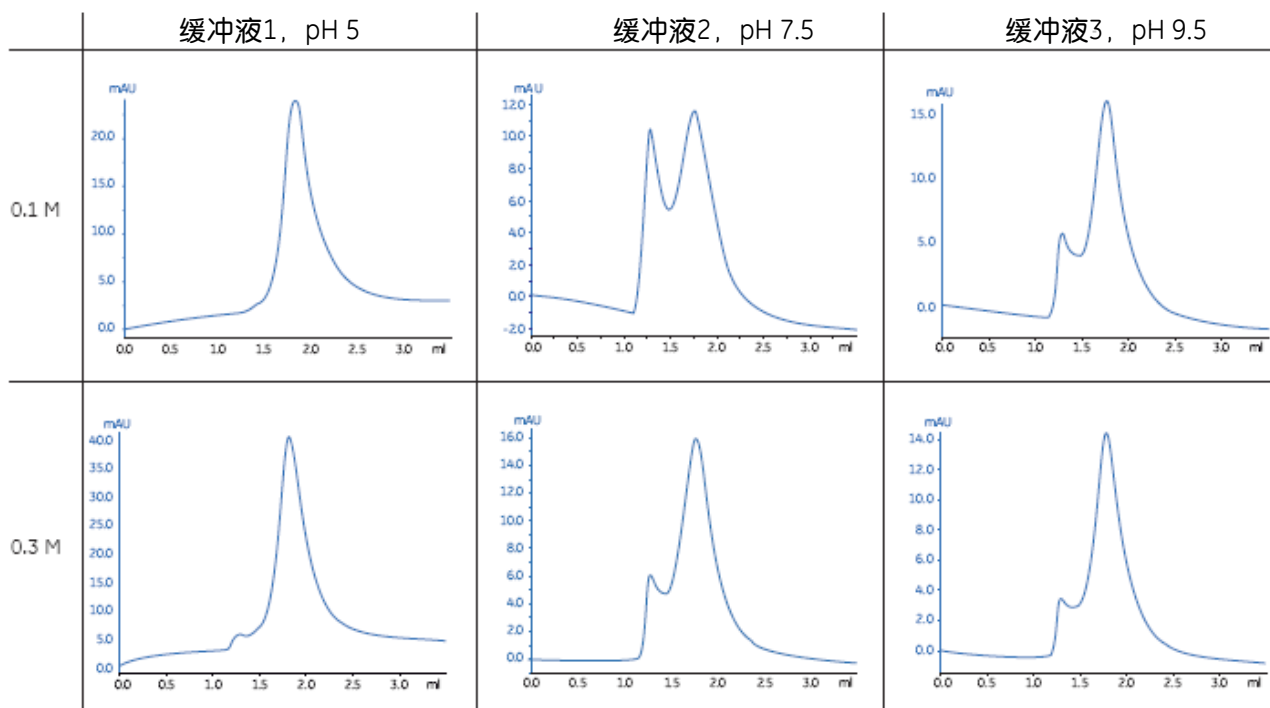


图 4.去污剂溶解的膜蛋白在 Superdex 200 5/150 GL 上分析得到的典型色谱图。

膜蛋白的纯度分析

膜蛋白的最终纯度通过 SDS-PAGE 测定。

参考文献

1. GE Healthcare online, Western blotting: www.gelifesciences.com/ecl
2. Data file: His MultiTrap FF and His MultiTrap HP, GE Healthcare, 11-0036-63, Edition AB (2007).
3. Purifying Challenging Proteins: Principles and Methods, GE Healthcare 28-9095-31, Edition AA (2007), pp 15-30.
<http://www.gelifesciences.com/handbooks>
4. Purifying Challenging Proteins: Principles and Methods, GE Healthcare 28-9095-31, Edition AA (2007), pp 40-42.
<http://www.gelifesciences.com/handbooks>