

# 使用小体积凝胶过滤快速筛选膜蛋白纯化的缓冲液

H. M. Eriksson<sup>1, 2</sup>和L. Kaiser<sup>2</sup>

1 生物化学和生物物理学系，斯德哥尔摩大学，斯德哥尔摩，瑞典

2 生物医学工程中心，马萨诸塞州技术研究所，剑桥，MA，USA

缓冲液组成的优化，如盐、还原剂和去污剂，对于蛋白质纯化尤其是膜蛋白纯化十分重要。现已开发了一种使用Superdex™ 200 5/150 GL凝胶过滤层析柱的方法比较不同缓冲液组成对两类膜蛋白的蛋白均质性的影响。小体积的层析柱减少了样品的体积、缓冲液的消耗和运行时间，最终降低了使用昂贵的去污剂的成本，并产生更高的通量。

## 介绍

膜蛋白是蛋白质结晶的富有挑战性和令人振奋的候选蛋白，但是必须使疏水性膜蛋白稳定在水溶液中，这要求我们仔细地研究不同的包含去污剂的缓冲液组成，以确定蛋白质为单分散性的和稳定的条件。

鉴定不同缓冲液组成对蛋白质功能性影响的最终技术是蛋白质活性分析。然而，这通常很难开发，而且现有的技术不适用于所有的膜蛋白，特别是当蛋白质从膜上溶解时<sup>(1, 2)</sup>。活性分析的一种吸引人的选择是使用凝胶过滤(GF)来研究蛋白质样品的均质性，凝胶过滤提供蛋白质大小和单分散性的信息。从凝胶过滤运行中得到的单一对称的蛋白质洗脱峰表明蛋白质被正确折叠且稳定，使它能够成为功能学和晶体学研究的候选蛋白<sup>(3, 4)</sup>。通过使用带有小柱床体积的短GF层析柱，每轮运行所需要的蛋白量低且运行时间短，

可以每天进行多轮运行和有效的缓冲液追踪。小的柱床体积也能够减少所需要的缓冲液量，从而减少昂贵的去污剂量。

我们提出一种使用3 ml Superdex 200 5/150 GL凝胶过滤层析柱的有效的方法，用以监测不同缓冲液组成如盐、还原剂和去污剂的影响。目标蛋白是一个七次跨膜G蛋白偶联受体(GPCR)，Mr 32000和一个膜结合糖基转移酶受体(GT)，Mr 45000。

## 蛋白质表达和分离

使用添加一种去污剂(FC14, Anatrace Inc., USA)的麦胚无细胞抽提物(Roche Diagnostics Corp., USA)表达的GPCR带有Rho标记并以可溶性形式存在。带有组氨酸标记的GT蛋白在大肠杆菌中表达，膜组分在4 °C下135000xg离心60分钟条件下收集。通过添加去污剂溶解膜颗粒并在4 °C下孵育2小时。在4 °C下20000xg离心30分钟去除不可溶的部分。

## 缓冲液置换和亲和纯化

为了置换缓冲液，含有表达的GPCR的麦胚裂解物被添加到活化的CH Sepharose™ 4B填料中，填料共价交联抗融合在GPCR上的Rho标记的1D4抗体。通过使用100个柱床体积的感兴趣的缓冲液洗涤后孵育4小时。蛋白质通过添加一个柱床体积含有200μM Rho特异标记肽(TETSQVAPA)被洗脱并在100xg离心10秒。

对于组氨酸标记的GT蛋白，上清被添加到100 μl的Ni Sepharose™ 6 Fast Flow填料中。这种填料预先用镍螯合配基充电以通过固定化金属离子吸附层析(IMAC)吸附组氨酸标记蛋白。填料用30个柱床体积含有20 mM咪唑和感兴趣的去污剂的缓冲液洗涤。蛋白通过加3×200μl含有250 mM咪唑的感兴趣的缓冲液洗脱，并使用Amicon™ YM-3浓缩5-10倍。

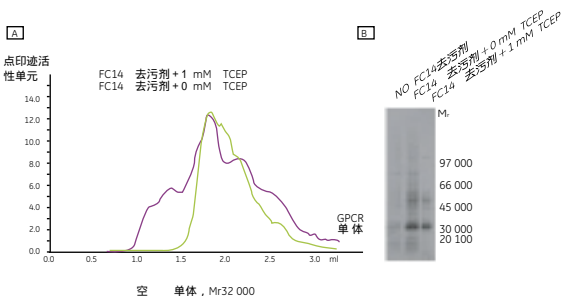


图1. 用有或无FC14去污剂或TCEP还原剂的缓冲液洗脱的凝胶过滤组分的GPCR特异性的点印迹。(A)用有或无TCEP还原剂的缓冲液洗脱的凝胶过滤组分的GPCR特异性的点印迹，箭头显示空的和单体保留体积。(B)从亲和层析纯化步骤得到的洗脱组分的SDS-PAGE分析，考马斯染色。

## 凝胶过滤和点印迹分析

连接有Superdex 200 5/150 GL层析柱的ÅKTApurifier™ 10被用于凝胶过滤分析。在UNICORN™ v5.11中建立用于Superdex 200 5/150 GL层析柱的方法，开始以一个泵洗涤，然后有两个柱体积的平衡步骤，接着使用10 $\mu$ l样品环注射洗脱的蛋白。从0.6 ml开始到3.0 ml，用96孔板收集50 $\mu$ l的组分。这可以把运行两轮的样品收集在一个板上。流速设定为0.3 ml/min。通过使用这种方法，一个样品的分析只需要40分钟，包括泵洗涤和层析柱平衡，每天可以运行12轮。

结合凝胶过滤和点印迹来分析每个组分中的GPCR的量。从每个点上记录和强度被插入UNICORN中的活性柱状图中并消除了两个组分的体积。对于GT蛋白，使用SDS-PAGE进行凝胶过滤组分的分析。

GPCR结合凝胶过滤和点印迹分析显示在缓冲液中添加1 mM TCEP导致GPCR蛋白从单体和低聚体状态混合物向完全的单体形式的转变(图1A)。在纯化缓冲液中添加TCEP也能够导致纯蛋白从Superdex 200填料上洗脱(图1B)。点印迹增强了分析的敏感性，也使它能够分析不纯的样品，通过快速去除不利的缓冲液组成节约时间，而不需要纯化蛋白(图2)。

对于膜结合GT蛋白的最佳去污剂类型和浓度，可以使用凝胶过滤鉴定。低浓度n-十二烷基- $\beta$ -D-麦芽糖苷(DDM, Anatrace Inc., USA)分别和更高浓度的DDM和CYMAL™-5 (Anatrace Inc., USA)相比，相应的蛋白大小的正确保留时间处有明确的峰(比较图3A和图3B)。0.1 mM浓度的DDM也产生高纯度的蛋白(图3C)。0.1 mM浓度的DDM也产生高纯度的蛋白(图3C)。

## 结论

短的凝胶过滤层析柱如Superdex 200 5/150 GL能够用于筛选最佳的缓冲液组成，如去污剂盐、和还原剂的类型和浓度，节约时间和成本。此外，本文提及的亲的和层析 - 凝胶过滤程序可以进行两种通过其他方法很难进行分析的膜蛋白的纯化和分析。

## 参考文献(略)

## 订购信息

产品	货号
Superdex 200 5/ 150 GL	28-9065-61
Ni Sepharose 6Fast Flow,25ml	17-5318-01
ÅKTApurifier 10	28-4062-64
Activated CH Sepharose 15g	17-0490-01
UNICORN Control software	inquire

关于本文中纯化产品的详细信息，请登陆  
[www.gelifesciences.com/protein-purification](http://www.gelifesciences.com/protein-purification)

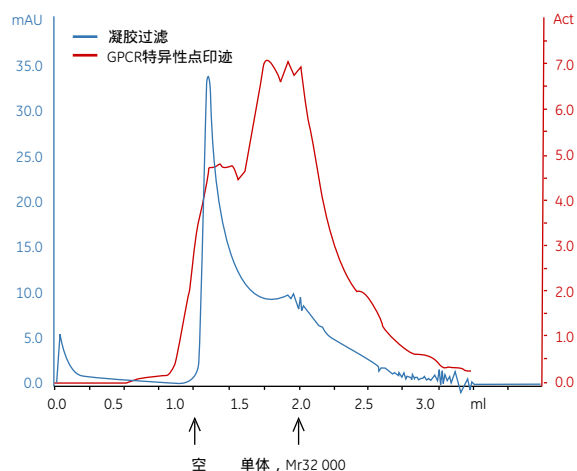


图2. 使用UV吸光值和GPCR特异性点印迹检测凝胶过滤组分的图谱的比较。箭头显示空的和单体保留体积。

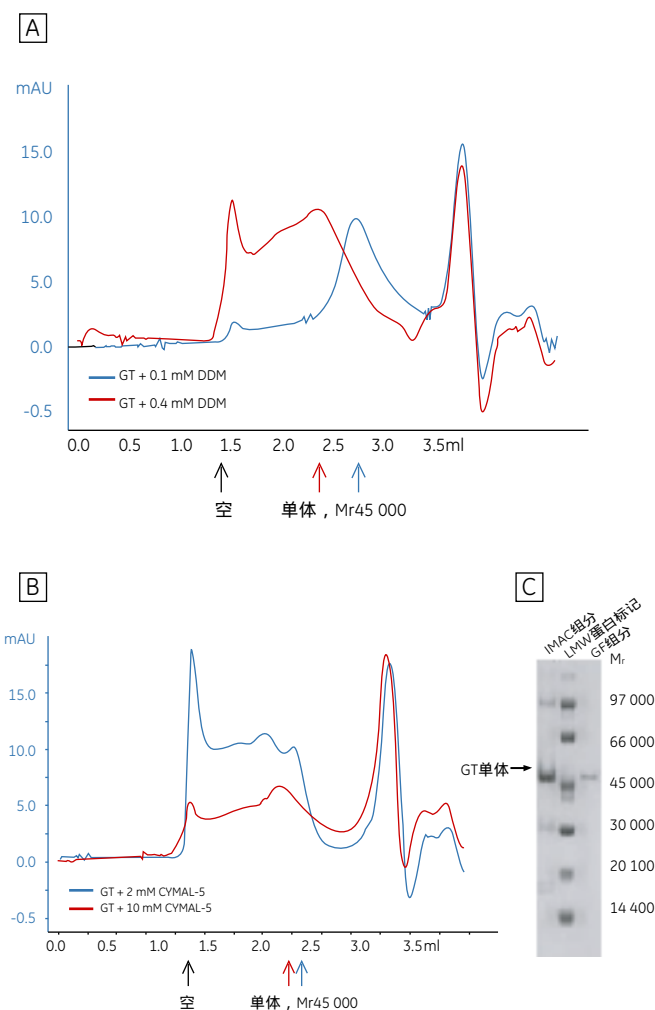


图3. GT在不同类型和浓度的去污剂中使用Superdex 200 5/150 GL层析柱的凝胶过滤，箭头显示空的和单体保留体积。(A)0.1和0.4 mM DDM (B)2和10 mM CYMAL-5 (C)0.1 mM DDM纯化的IMAC和GF组分的SDS-PAGE分析，考马斯染色。