

# 高效抽提跨膜蛋白



## 简介

哺乳动物跨膜蛋白承担各种生物功能,在疾病的发生、发展过程中扮演重要角色。已知的许多针对人类疾病研发的药物的靶标是膜蛋白或膜关联蛋白(综述: Landry 2007),而成功的药物设计很大程度上依赖于人们对膜蛋白的结构与功能数据的正确把握。膜蛋白的蛋白质组学分析是被大家看好的辨识新的药物靶标和/或疾病的生物学标记的好方法,并已得到广泛应用。然而,多年的蛋白质组学研究支撑技术的显著进步,也没能解决膜蛋白的抽提和增溶困难的问题。同时,膜蛋白样品的制备并不是孤立的,还需要充分考虑到与下游的胶分析及质谱分析等应用配套,这使膜蛋白样本制备成为一个难以逾越的挑战。虽然膜蛋白研究的重要性众所周知,到目前为止有效的样本制备技术方法仍然非常缺乏,极大地限制了膜蛋白蛋白质组学的进展。

跨膜蛋白通过许多疏水氨基酸残基锚定在膜结构里面,很难溶解在水性缓冲液系统中。为了制备膜蛋白样品,传统的方法是使用去污剂和表面活性剂增溶。去污剂处理会使膜蛋白丧失其天然结构,因而妨碍了膜蛋白的功能研究。

根据其明显的疏水性特点,人们常用“去污剂+机械处理”的操作方法获取膜蛋白,用于增溶的去污剂有离子型(如 SDS)和非离子型的(如 Triton®-X)等。SDS 会使多数蛋白完全变性,限制了很多下游分析。非离子型的去污剂较为温和,但抽提膜蛋白(特别是有多个跨膜区的膜蛋白)的效果往往很差。发展

一种有效的膜蛋白抽提方法,使其既能保持膜蛋白的天然结构(或至少是活性结构),又有较高的产量和纯度等优点,已经成为研究者的急切要求。

Novagen 新近研发上市的 ProteoExtract 跨膜蛋白抽提试剂盒(简称 TM-PEK)是一种基于化学而非去污剂方法的高产膜蛋白制备试剂盒(操作参见图 1)。其简便的两步法操作可以高效地富集膜蛋白和膜关联蛋白。试剂盒包括两种试剂, TM-PEK 试剂 A 和 TM-PEK 试剂 B, 分别用于制备抽提缓冲液 2A 和抽提缓冲液 2B。使用者通过实验摸索,可以根据特定目的蛋白的特点从中灵活选择最适缓冲液。用 ProteoExtract TM-PEK 试剂抽提得到的蛋白适合用于常见的各种蛋白分析方法。从以下的报告中,列举了 TM-PEK 制备的跨膜蛋白和多次跨膜蛋白样品在免疫印迹、活性分析及 2D 电泳等方面的实例。

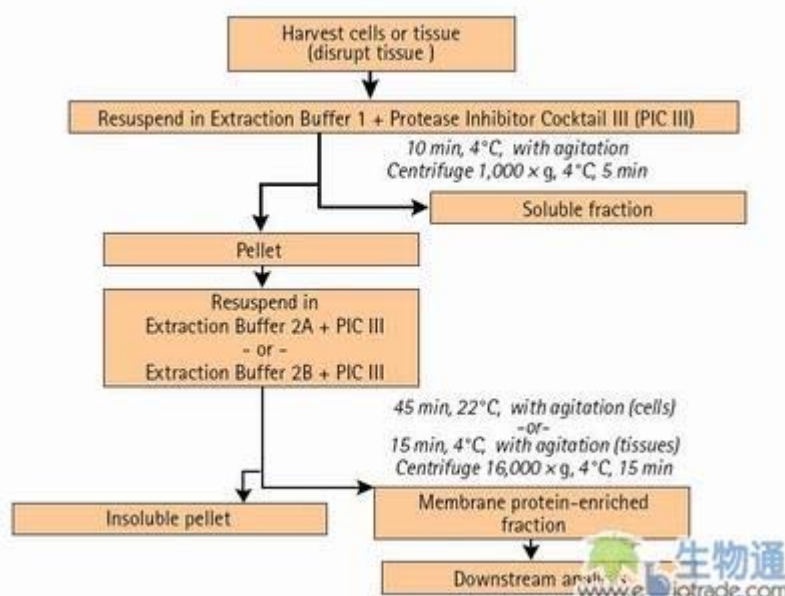


图 1 TM-PEK 的操作流程

带 7 个跨膜区的蛋白的抽提结果与讨论  
为了验证 ProteoExtract 跨膜蛋白抽提试剂盒  
抽提多次跨膜蛋白的有效性,我们用免疫印迹  
比较了 Frizzled-4, CELSR-3

(cadherin-EGF-lag seven-pass  
receptor-3) 和 EGFR (表皮生长因子, 只有  
一个跨膜区) 的样本制备效果。Frizzled 和  
CELSR 是 WNT/ PCP (平面细胞极性) 通  
路的重要组成成分,而这个重要的通路则控制  
了组织的极性和细胞的迁移。Frizzled 蛋白与  
GPCRs 有远源关系,但是除开都具有 7 个跨  
膜区的结构外,它们的结构和功能存在很大差  
异(参见 Huang 2004)。血浆膜定位 Frizzled  
蛋白是 Wnt 分泌蛋白和其它多种配基的受体  
(参见 Huang 2004, Planutis 2007)。在人  
体内, Frizzled-4 与家族性渗出性玻璃体视网  
膜病变(familial exudative vitreoretinopathy)  
有关,这个疾病导致视网膜破坏及听力持续下  
降。CELSR-3 和 CELSR-2 的功能是控制神  
经元接触位点的相互作用和神经突触的生长。  
CELSR-3 抑制生长,而 CELSR-2 促进生长  
(参见 Shima 2007)。关于 CELSR-3 的数  
据很有限,反映出要制备完整的 CELSR-3 非  
常困难。Western blot 分析(图 2)比较了  
Triton-X 100 和新发明的 TM-PEK 试剂 A 的  
抽提效果, SDS 抽提的作为目的蛋白大小的  
阳性对照。结果表明,对于仅具单跨膜区的  
EGFR, Triton- X 100 和 TM-PEK 试剂 A 的  
抽提效率相同。Triton-X-100 抽提 Frizzled-4  
效果很差,相反, TM-PEK 试剂 A 得到的  
Frizzled-4 在 western blot 中获得了明显的信  
号(图 2B)。而 TM-PEK 试剂对 CELSR-3  
的抽提效果非常令人惊喜,这种全长的  
358kD 蛋白只有 TM-PEK 试剂 A 才能获得,

而 SDS 或 Triton X-100 效果都使人失望(图  
2)。

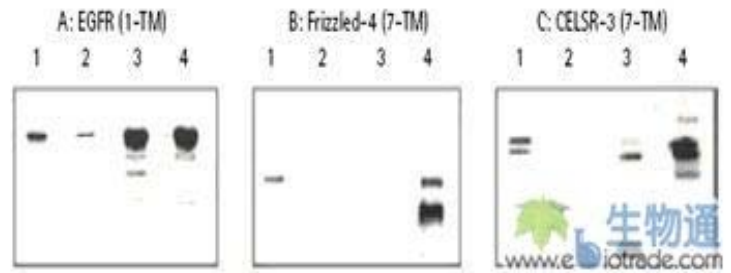
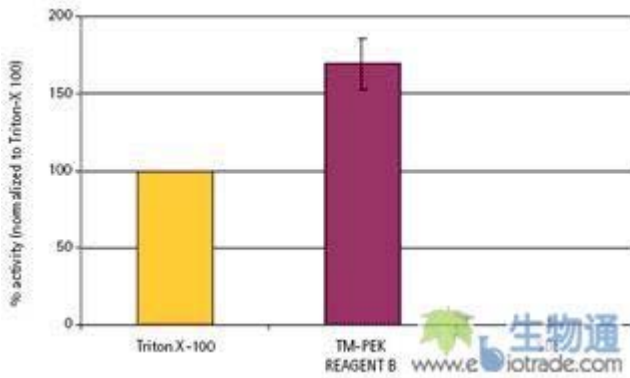


图 2 培养 MDA-MB-468 乳腺癌细胞的  
跨膜蛋白抽提

按照 Novagen 操作手册 TB477, 以  
TM-PEK 跨膜蛋白抽提试剂盒抽提 MDA-MB  
468 细胞跨膜蛋白。第一步,两份  $1 \times 10^7$  个  
细胞用 TM-PEK 1 处理,获得细胞质可溶蛋白。  
不溶部分再用 TM-PEK 抽提缓冲液 2A(即  
TM-PEK 2A) 或 0.5% Triton X-100 处理。样  
品的 1/10 体积(相当于  $1 \times 10^6$  个细胞获得的  
抽提物)跑 10% SDS-PAGE 胶,再转到硝酸  
纤维素膜。膜封闭,并以 EGFR 一抗孵育(A  
板), Frizzled-4 (B 板) 或 CELSR-3 (C  
板)。用 HRP 标记二抗和化学发光底物显色。  
第 1 道 0.5% SDS 抽提(总细胞抽提物);  
第 2 道可溶组分(TM-PEK 1); 第 3 道膜组  
分(Triton X-100); 第 4 道膜组分(TM-PEK  
2A)。箭头显示全长蛋白的迁移。SDS 抽  
提(总细胞裂解物)作为阳性对照。

#### 活性膜蛋白的抽提

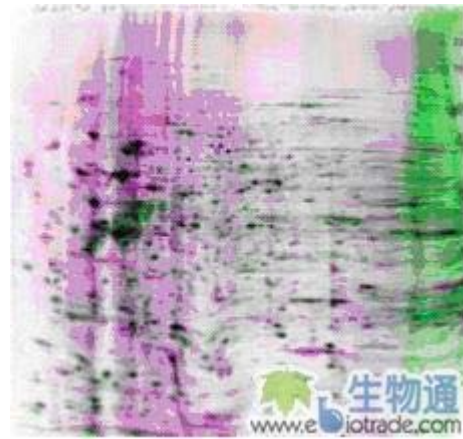
图 3 显示内源的糖基化磷脂酰肌醇锚定  
蛋白碱性磷酸酶的活性通过以 p-硝基苯基磷  
酸盐为底物的方法测定, TM-PEK 试剂 B 抽  
提的蛋白活性较 Triton X-100 的高 70%。



**图 3 Triton X-100, TM-PEK 试剂 B 和 SDS 抽提的膜组分的碱性磷酸酶活性检测结果比较**

以 p-硝基苯基磷酸盐为底物，在 A405 测每分钟代谢率。反应缓冲液为 0.1M 氨基乙酸，1mM MgCl<sub>2</sub>，1mM ZnCl<sub>2</sub>，pH10.4。数据根据 Triton X-100 的效果做标准化处理，做了 4 个独立的重复实验。

膜蛋白质组的抽提效果发现受体介导的信号通路中新的生物学标记的第一步是抽提膜蛋白。然而，无论是样本制备还是膜蛋白分离还都困难重重。目前最为主流的方法是 2D 电泳分离蛋白加质谱分析。可惜，传统的 2D 电泳对膜蛋白非常不适用，疏水的膜蛋白在等电聚焦时常常会发生积聚(参见 Braun 2007)。同时，膜蛋白也难以从疏水固定的 pH 梯度胶进入第二向的 SDS 胶(参见 Braun 2007)。正如图 4 的数据所显示的，用 ProteoExtract 跨膜蛋白抽提试剂盒从 A431 细胞制备的蛋白进行 2DGE 分离时获得了与 Triton X-100 处理不同的结果，而且 TM-PEK 得到的蛋白组的代表性也明显较好(图中胶的右侧)。



**图 4 A431 细胞 Triton X-100 抽提(洋红色)和 TM-PEK 试剂 B 抽提(绿色)效果比较**

2D 电泳每种样品上样量为 200μg。黑色为重叠的同种蛋白。第一向为 IEF，pH 3-10(左至右)；第二向是 4-15% Tris-HCl SDS-PAGE。

#### 结论

以上数据表明 ProteoExtract 跨膜蛋白抽提试剂盒能够非常有效地抽提膜蛋白。其温和的非去污剂设计使抽提产物适用于各种蛋白质组研究方法，包括酶活分析(如激酶活性检测)，非变性胶电泳，1D 和 2D SDS-PAGE，western blot 以及 ELISA 等。1D 或 2DGE 后，样品经胰酶消化可以做 MS 分析。此外，可按起始材料按比例放大或减少试剂用量，以及可优化选择试剂配方的抽提操作，又进一步提高了这个试剂盒获取完整膜蛋白和生物条件下的膜关联蛋白的效果。ProteoExtract 跨膜蛋白抽提试剂盒重现性极好，易与下游实验配套。与其它方法不同，这个方法不需要超声，长时间高强度涡旋，超速离心和高温孵育等破坏蛋白的处理，从而使蛋白的降解和次级修饰的风险降到最低。