

膜蛋白结晶方法学研究进展*

呼延霆 张辰艳 马晓亮 尹大川**

(西北工业大学生命学院, 空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072)

摘要 膜蛋白执行着物质运输、能量转换和信号转导等重要生物学功能, 其分子的三维结构解析对阐述其功能及开展理性药物设计有着十分重要的意义。目前膜蛋白结构解析以 X 射线单晶衍射技术为主, 该技术需要高质量晶体作为衍射对象。然而由于膜蛋白具有两亲性, 难以得到高度有序的三维晶体, 进而导致其结构解析十分困难。针对此问题, 研究者们发展了一些专门面向膜蛋白的结晶方法, 如基于去垢剂的方法, 基于脂类的方法等。本文回顾了这些方法, 并对未来膜蛋白的结晶研究进行了展望。

关键词 膜蛋白, 结晶方法, 去垢剂, 脂立方相

学科分类号 1801450

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00235

膜蛋白是生物膜功能的主要执行者之一, 所有的细胞和细胞器都由疏水的脂双分子层包裹, 膜蛋白与双层脂膜结合或镶嵌在脂膜中, 主要承担着物质运输、能量转换和信号转导等重要功能, 而且至少有 40% 小分子药物的靶标是膜蛋白^[1-3], 它与许多疾病都密切相关, 因此膜蛋白的结构解析对膜蛋白功能研究和药物设计均有十分重要的意义。目前, 解析膜蛋白分子三维结构主要的方法是 X 射线单晶衍射技术。对该技术而言, 高质量的膜蛋白晶体是衍射的基础, 因此如何获得高质量晶体是研究膜蛋白结构的关键环节之一。自 1985 年 Michel, Huber 和 Deisenhofer 等^[4]得到了第一个膜蛋白结构之后, 解析出的膜蛋白结构数量逐年增加。尽管如此, PDB 数据库中的 73 338 个结构(截止 2011 年 5 月 31 日)中, 膜蛋白结构仅占约 1%(812 个), 其中只有 290 个结构属于特异折叠的膜蛋白结构。由此可见, 膜蛋白结构解析仍然是生命科学领域中极具挑战性的难题, 而构成此难题的重要原因之一是膜蛋白的结晶存在很大的困难。

获得高质量的膜蛋白晶体缘何如此困难? 膜蛋白分子具有两亲性, 疏水部分靠近膜内, 亲水部分暴露在膜外, 这种既亲脂又亲水的结构使得它们只要离开了天然的磷脂双分子层疏水环境, 其非极性部分就倾向于形成无序化聚合物, 进而难以得到高

度有序的三维晶体, 从而给膜蛋白的结构解析带来巨大的障碍^[5]。因此, 如何得到稳定并且堆积有序的膜蛋白晶体是膜蛋白结晶研究的核心问题。本文对膜蛋白结晶方法学中发展出的技术及其近年来的新进展进行了回顾, 并展望了未来膜蛋白结晶的研究方向。

1 膜蛋白结晶方法学原理

膜蛋白结构的特殊性, 使其一旦脱离天然磷脂双分子结构就会发生聚集变性, 导致其三维结构改变和功能的丧失。因此, 要保证膜蛋白的结晶, 首先必须找到一种能够高效地从天然环境中提取膜蛋白并能稳定其结构功能的方法。使用两亲性分子诸如去垢剂、脂类分子是目前最主要的手段, 其中去垢剂应用最为广泛, 但近年来脂类分子也逐渐受到了研究者越来越广泛的关注。

1.1 两亲性分子自组装原理

两亲性分子的亲水基与疏水基与水有相反的作用

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB710905)和西北工业大学博士论文创新基金(CX201023)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 029-88460254, E-mail: yinde@nwpu.edu.cn

收稿日期: 2011-05-31, 接受日期: 2011-07-28

用倾向: 亲水基倾向于进入水中, 而疏水基则倾向于远离水相. 二者平衡的结果是: 两亲性分子将在水的表面聚集并覆盖在水面上, 其中每个分子的亲水基都伸入水中, 而疏水基则指向水相之外. 但当两亲性分子的浓度进一步增大, 水表面完全被单层两亲性分子覆盖. 此时继续增加浓度, 将迫使这些分子不得不在水中开始发生自组装, 形成亲水基与疏水基隔离的胶团结构. 形成这种胶团的最低浓度被称为临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)^[5]. 超过了 CMC 后, 两亲性分子通常能进行分子自组装形成圆柱状、圆锥状、楔子状等结构, 这些组装成的微团按照形状的不同可分为三种类型^[6]

(图 1): Type 0 (Lamellar phase)、Type 1 (Normal micelle)、Type 2 (Inverse micelle). 为了满足能量最小原理, 这些类型的微团分别将其分子的疏水部分与水相隔离起来. Type 1、Type 2 分别是以去垢剂和脂类分子为典型代表, Type 0 则两者都可以装配形成. 其中 Type1 去垢剂分子包围的区域是被去垢剂烷基尾巴所充满而不是真空的区域, 去垢剂分子通常有一个单链烷基, 其含有大量的亲水基促进了去垢剂组装成 Type 1 微团, 反之脂类分子含有单链或者双链烷基, 因此有比去垢剂更强的疏水性质, 这样促使其自组装成 Type 2 微团.

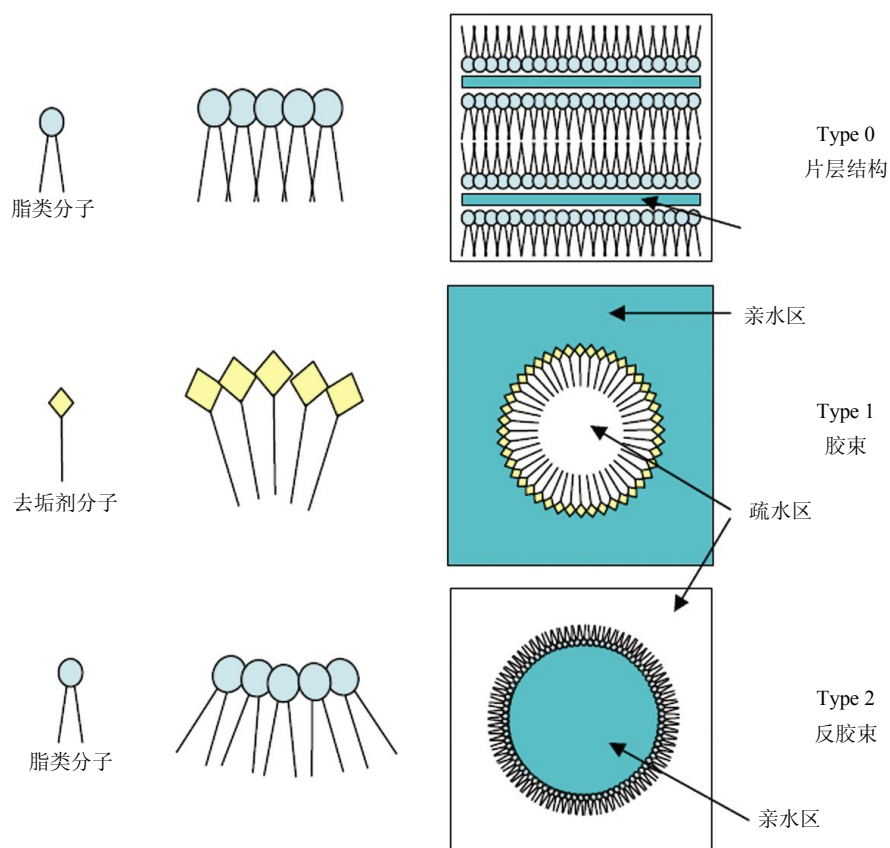


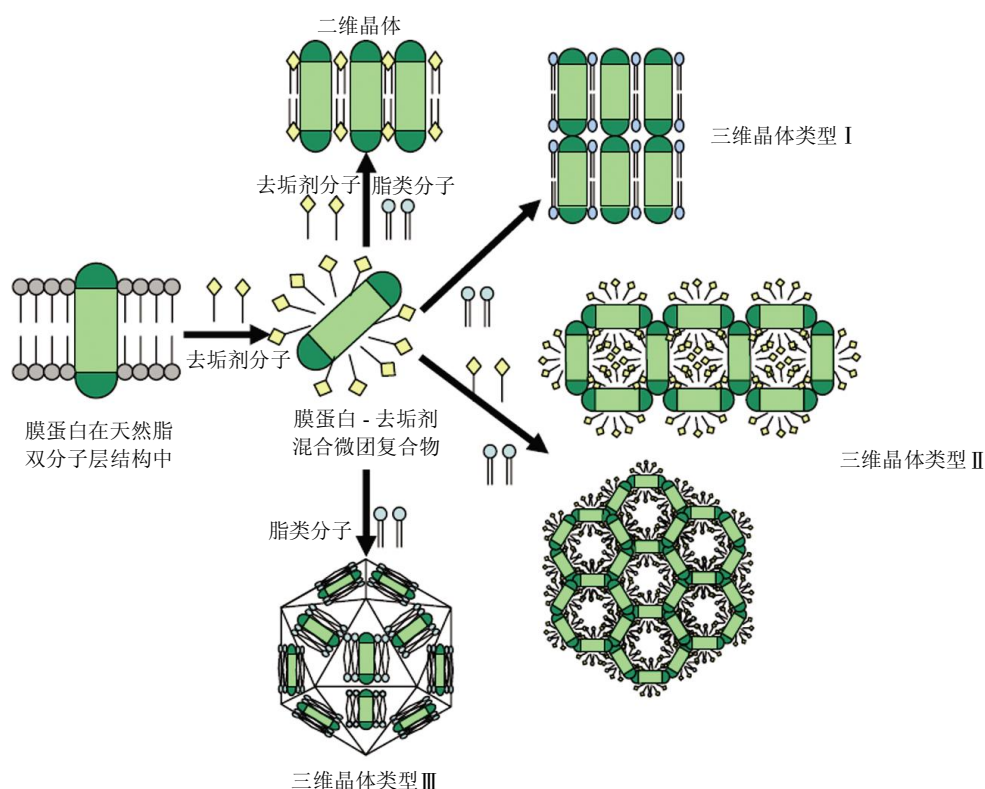
Fig. 1 Types of micelles self-assembled by amphiphile^[6]

图 1 两亲性分子自组装微团类型^[6]

1.2 膜蛋白提取原理及其晶体分类

去垢剂分子的结构特征是具有一个亲水的头部和一个疏水的尾巴. 当把去垢剂加入到含有脂双层的溶液中后, 去垢剂分子首先进入膜表面和水相之间, 导致局部膜组分变形. 当越来越多的去垢剂进

入后, 膜组分被去垢剂饱和并最终崩塌与去垢剂分子一起形成蛋白质 - 去垢剂混合微团复合物(protein detergent complex, PDC), 膜蛋白包裹于 PDC 之中后被提取出来(图 2).

Fig. 2 Morphology of membrane protein crystals^[7, 9, 13]图2 膜蛋白晶体类型^[7, 9, 13]

根据后续结晶实验中使用的方法可将膜蛋白晶体分为3类^[7]：二维晶体(2-D crystal)、三维晶体 I (3-D crystal type I)和三维晶体 II (3-D crystal type II)。其中，二维晶体实质上是在脂类分子重新装配成脂双层的膜平面上形成的，因此只能通过2-D 电子显微镜观察。三维晶体 I 具有典型的层状结构，主要通过基于脂类分子的方法获得，其膜蛋白分子间的相互作用靠疏水表面来介导，因此增加了膜蛋白间的相互接触而可以产生蛋白质分子的密集堆积，通常能得到很好的衍射数据^[9]。对于X射线单晶衍射来说需要膜蛋白的三维晶体，最通常的晶体类型是三维晶体 II。这种类型的晶体是PDC在与可溶蛋白相同的结晶方法下生长得到的。但是由于去垢剂的存在，晶格的有序堆积会受到影响：在实验操作中去垢剂分子浓度变化会影响膜蛋白的稳定性，并且去垢剂包裹着的膜蛋白疏水区域会阻碍膜蛋白质分子之间的相互作用进而影响晶格的有序堆积。因此去垢剂种类和浓度的确定在膜蛋白结晶研究中至关重要。2003年，Snijder等^[9]报道了三

维晶体 II 的一个亚类，这种类型晶体并不像前面两种晶体那样完全依赖疏水作用或者亲水作用来形核，而是基于亲水和疏水相互作用而堆积形成一种复杂三维晶格，其中不仅包括了去垢剂，还添加有温和的有机亲水脂分子。实验证明，适量的有机亲水脂分子可以促进膜蛋白的结晶，因为它们增加了PDC的变形性、流动性，并且减小了其微团大小。很多膜蛋白都可以形成这种类型晶体，如细胞色素c氧化酶(cytochrome c oxidase)、菌视紫红质(bacteriorhodopsin)、外膜蛋白A(OmpA)等^[10-12]。

除上述膜蛋白三维晶体基本类型外，Liu和Chang等^[13]在研究菠菜主要捕光复合物(LHC-II)结构中发现了膜蛋白三维晶体堆积的第三种方式：首先由60个膜蛋白LHC-II分子、脂分子及色素分子组装成一个正二十面体的空心球体结构，然后将该二十面体结构作为基本单位进行晶体的周期排列。这种全新的堆积方式完全不同于前面所述的I型和II型膜蛋白晶体，可作为第三类膜蛋白三维晶体类型(3-D crystal type III)。该重大研究发现不但丰

富了膜蛋白晶体结构研究内容, 而且为光合作用捕光机制和光保护机制的研究奠定了重要的结构基础。

2 膜蛋白结晶方法研究进展

基于两亲性分子自组装以及能与膜蛋白分子装配成复合物结晶的原理, 膜蛋白结晶研究目前主要有两种方法——基于去垢剂的 *in surfo* 结晶法和基于脂类的 *in cubo* 结晶法。

2.1 基于去垢剂的结晶研究(*in surfo* methods)

去垢剂也称表面活性剂(surfactant), 一般情况下其亲水性质要比脂类分子强, 因此形成的微团类型属于 Type 1, 其结构特征为微团的烷基尾巴聚集在一起, 被亲水的头部所包裹。在膜蛋白结晶方法学中, 以去垢剂结晶为代表的 *In surfo* 结晶法是最为经典也最为传统的方法。

2.1.1 去垢剂微团结晶法(detergent micelles method).

In surfo 结晶法中去垢剂微团结晶法是最常用的方法, Michel 等应用此方法获得了世界上第一个膜蛋白结构——紫细菌光反应中心结构^[9]。该方法的原理简单来说是利用去垢剂提取膜蛋白, 使膜蛋白与其形成的复合物 PDC 可以像可溶性蛋白那样直接用气相扩散(悬滴法和坐滴法)和透析等方法来结晶^[14-15]。PDC 是一个很复杂的网络结构, 包括膜蛋白分子、去垢剂和水缓冲液, 其中去垢剂分子会贯穿在晶格中形成网络结构, 而膜蛋白分子间的相互作用是形成晶格的最重要因素。晶格对于 PDC 的大小和形状有严格的要求, 小的 PDC 一般可以形成有序的膜蛋白晶格堆积, 因此去垢剂在结

晶过程中的选择至关重要。非离子型去垢剂和两性去垢剂已成功应用于膜蛋白结晶中, 其中前者的应用更为广泛。装配 PDC 过程中也可添加一种或几种去垢剂, 有时根据靶蛋白的性质也可以添加一些脂类分子或者其他化学分子。

去垢剂微团结晶法最主要的优点是 PDC 在溶液条件下的结晶实验相对容易处理, 但在此复合物中, 膜蛋白分子的柔性和构象不均一性会产生一些固有的问题, 而且由于去垢剂等分子的存在, 晶体内膜蛋白分子之间的相互作用也可能受到影响。尽管如此, 这种方法操作简单、性价比高、实用性好, 至少可以在初期的结晶筛选中得到应用。

2.1.2 抗体片段共结晶法(antibody fragment method).

Michel 等研究发现: Type II 晶体结构是由膜蛋白膜外区域的极性表面通过极性键的相互作用而形成, 如果膜蛋白(例如主要由跨膜螺旋组成的转运蛋白或者通道蛋白)的亲水区域很少的话将会很难结晶。因此, 2002 年他们探索了特异性的抗体片段与靶蛋白结合方法^[16](图 3, 即通过去垢剂提取膜蛋白后, 再与抗体片段结合, 进行结晶), 在同一体系中共结晶并成功得到了晶体。该方法的原理是通过与抗体片段的结合, 增大靶蛋白的亲水表面, 在晶格中形成稳定的蛋白质-蛋白质极性相互作用, 进而可以得到高质量的有序的 Type II 晶体。值得一提的是, 靶蛋白结合抗体片段后柔性降低, 其构象的均一度得到提高, 且因整个抗体的结构很大而且有更多的分子柔性, 所以利用抗体片段要比整个抗体更有利于结晶。目前至少有三种膜蛋白(细胞色素 c 氧化酶、细胞色素 bc1 复合物、KcsA 钾离子通道)^[17]已经应用该方法成功结晶。

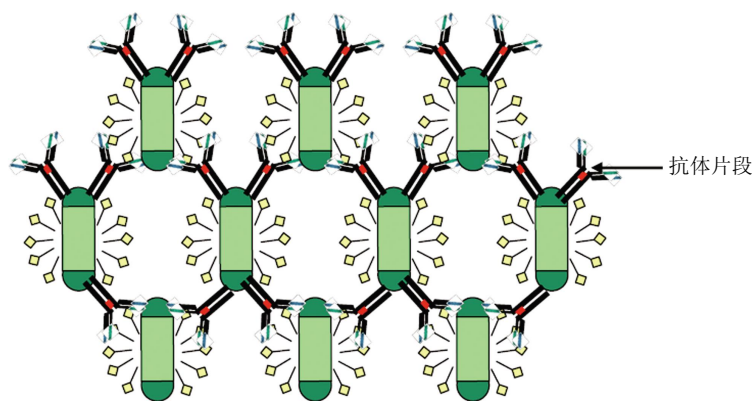


Fig. 3 Antibody fragment cocrystallization method^[16]

图 3 抗体片段共结晶法^[16]

2.1.3 油类分子结晶法 (oil method). 油类分子最初应用在微配液结晶法(microbatch)中, 作为惰性密封剂阻止溶液的蒸发. 实验数据表明, 油类分子不仅能影响晶体的形核和生长阶段, 而且还能增强晶体的稳定性, 在 Microbatch 中扮演着重要的角色. 1997 年 Chayen 等^[18-19]首次提出在膜蛋白结晶中使用油类分子, 利用这种方法成功地得到了菠菜中光系统 II (photosystem II) 叶绿素结合蛋白 43 (chlorophyll binding protein 43, CP43) 的晶体. 其基本原理可能是在晶体生长过程中, 油类分子慢慢地从结晶液滴中吸收去垢剂, 迫使膜蛋白逐渐从结晶液滴中析出而最终得到晶体. 但目前由于学术界对膜蛋白结晶中亲油性组分的适用性还存在争论, 油类分子在膜蛋白结晶中还未得到广泛应用.

2.2 基于脂类的结晶研究(*in cubo* methods)

如前文所述, 脂类分子与去垢剂相比通常具有更强的疏水性质, 因此自组装形成的微团结构为

Type 2, 也称反向微团. 如图 1 所示, 其疏水尾巴将水包围形成水核. 脂类分子包括磷脂、甘油酯和鞘脂类等, 由于其种类、亲水区域、脂链长度以及溶剂组分等因素不同, 可分别自组装成各种类型的一维、二维、三维空间结构, 包括薄层相、六角相和立方相等形式^[20], 但其中的薄层相和六角相微团并不适合膜蛋白结晶^[21], 立方相则在膜蛋白结晶中受到了越来越多的关注. 双连续脂分子层的立方相是具有立体对称性、黏性、半固态的液晶, 其尺寸大小在 6~25 nm 范围内, 根据晶体学空间群不同有三种类型的立方相: Im3m、Pn3m、Ia3d. 这三种立方相分别有 6、4、3 个水通道并且夹角为 90°、109.28°、120°(图 4), 它们具有相似的几何基础结构, 其中 Ia3d 的弯曲度最大, Pn3m 居中, Im3m 最小. 研究表明 Pn3m 适用于几乎所有的蛋白质结晶, 但 Im3m 更适合作为膜蛋白结晶的中间相^[22].

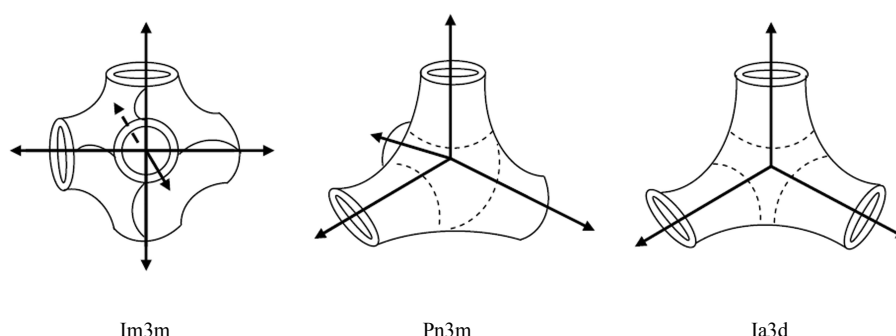


Fig. 4 Schematic of the water channel junctions observed in three bicontinuous cubic phases^[20]

图 4 双连续立方相类型及其水通道^[20]

2.2.1 脂立方相结晶(lipid cubic phase, LCP).

基于脂类的脂立方相结晶方法早在 1996 年就被 Landau 和 Rasenbusch 提出^[23], 但直到近年来才开始逐渐成为一种广泛接受的膜蛋白结晶方法. 脂立方相由一定比例的脂、缓冲液和蛋白质组成, 形成一个结构化、周期性的三维脂立方排列, 其中充满相互沟通的水通道(图 5). 在这一体系中膜蛋白镶嵌在双连续膜脂层中形成三维立方格结构, 这与它在生物膜中的构象十分相似, 也称 *in cubo* 结晶法.

膜蛋白在脂双分子层上的锚定并不影响其宏观性质, 很多膜蛋白镶嵌在脂立方相后仍保持天然构象和酶活性, 比在去垢剂中更为稳定, 而且较多的

脂-水界面有利于晶体形核, 脂双层的网状分布则有利于膜蛋白的侧向移动从而促进晶体生长^[23]. 因此, 该体系为具有疏水特征的膜蛋白结晶提供了一个有利的生长环境. 膜蛋白在脂立方相中的结晶分为 4 个基本过程: a. 选择合适的去垢剂提取并纯化目标膜蛋白, 形成可溶的 PDC. b. 膜蛋白嵌入脂立方相, PDC 溶液与脂类分子按照 4:6 的比例混合后通过离心作用形成立方相(也可以使用预先自组装的立方相与 PDC 溶液混合). c. 盐诱导结晶的起始, 在 20℃ 下, 添加沉淀剂盐溶液来诱导晶体的形核和生长过程. d. 数小时或者数周得到晶体后, 用溶解液(去垢剂或者酯酶)将立方相中的晶体分离并保存在合适条件下以备后续的 X 射线

晶体衍射研究. 然而整个过程并不是这样简单, LCP 结晶溶液体系涉及到许多组分和参数的选择, 是该技术的主要瓶颈问题. 目前关于此结晶方法还没有一个很全面的基本原理和操作方法, 探索其结晶过程的机理成为国内外众多研究团队的一个重要方向. 尽管如此, 由于脂立方相具有高度的结构性及易于紧密堆叠的性质, 该结晶方法是一种有利于膜蛋白形核及三维晶体生长的新方法体系. 近年来, 基于此方法(包括后续的 LSP 及 bicelles 结晶法)已得到了众多膜蛋白晶体结构(表 1).

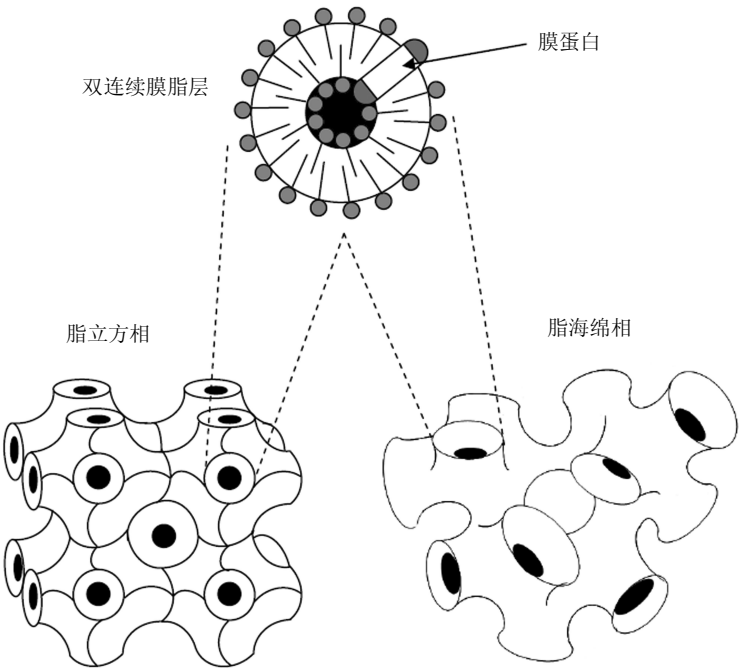


Fig. 5 Schematic structure of LCP and LSP^[22, 24]
图 5 脂立方相及脂海绵相结构示意图^[22, 24]

Table 1 Crystal structures of membrane proteins obtained from in cubo methods^[23]
表 1 基于脂类分子结晶得到的膜蛋白晶体结构^[23]

蛋白质名称	分辨率 /Å	来源	PDB Entry	结晶方法	发表时间
菌视紫红质(Bacteriorhodopsin)	2.5	嗜盐菌	1AP9	LCP	1997
盐细菌视紫红质(Halorhodopsin)	1.8	嗜盐菌	1E12	LCP	2000
视网膜紫质 II (Sensory rhodopsin II)	2.1	盐碱古菌	1H68	LCP	2001
视网膜紫质 II 传导复合物(Sensory rhodopsin II -transducer complex)	1.94	盐碱古菌	1H2S	LCP	2002
光反应中心(Reaction center)	2.35	类球红细菌	1OGV	LCP	2003
鱼腥藻视网膜紫质(Anabaena sensory rhodopsin)	2.0	鱼腥藻	1XIO	LCP	2004
人类 β_2 肾上腺素能受体(Human β_2 -adrenergic receptor)	2.4	人	2RH1	LCP	2007
外膜黏附素(OpcA outer membrane adhesin)	1.95	脑膜炎球菌	2VDF	LCP	2007
人类 A ₂ A 腺苷酸受体(Human A ₂ A adenosine receptor)	2.6	人	3EML	LCP	2008
光反应中心(Reaction center)	2.2	类球红细菌	2GNU	LSP	2006
光能复合物 II (Light harvesting complex II)	2.45	嗜酸红假单胞菌	2FKW	LSP	2006
维生素 B ₁₂ 外膜受体(BtuB)	1.95	大肠杆菌	2GUF	LSP	2006
光反应中心(Reaction center)	1.95	绿色绿芽菌	2WJM	LSP	2009
菌视紫红质(Bacteriorhodopsin)	2.0	嗜盐菌	1KME	Bicelle	2002
β_2 -肾上腺素能 G 蛋白偶联受体(β_2 -Adrenergic G-protein-coupled receptor)	3.4/3.7	人	2R4R	Bicelle	2007
电压依赖性阴离子通道(Voltage-dependent anion channel)	2.3	小鼠	3EMN	Bicelle	2008

2.2.2 脂海绵相结晶(lipid sponge phase, LSP). 尽管利用 LCP 结晶法已成功得到了许多膜蛋白晶体结构, 然而 LCP 也存在一些缺点^[23]: 首先, LCP 所形成的水通道很窄, 这样可能会阻碍膜蛋白亲水基间的相互作用, 其次, LCP 的高黏度使得操作和观察晶体很不方便, 而且 LCP 经低温冷却后会变得不透明, 获得晶体尺寸小, 为晶体定位带来麻烦. 为了克服这些困难, Wadsten 等^[24]提出了一种与 LCP 类似的脂海绵相结晶方法(lipid sponge phase, LSP). LSP 和 LCP 都有三维的双连续分子层, 唯一不同的是脂海绵相的形成过程中添加了聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)、2-甲基-2,4-戊二醇(2-methyl-2,4-pentanediol, MPD)等溶剂. 相比 LCP 结晶, LSP 有以下几个优点: a. LSP 形成的水通道比 LCP 的水通道增加了 3 倍(图 5), 因此它能允许更大的膜蛋白很容易地进入 LSP 水通道中, 也可以看做是一种溶胀的脂立方相; b. LSP 在室温下是液态的, 具有更好的流动性和更小的黏度, 能直接使用悬滴法或者坐滴法进行结晶实验; c. 便于使用商业化结晶移液系统, 目前已经被应用在高通量膜蛋白结晶筛选研究中. 2008 年 Wadsten 等^[25]发展了一种由 48 个 LSP 条件组成的稀疏矩阵结晶筛选方法, 并得到了 8 个不同来源的膜蛋白晶体. 作为 LCP 结晶方法的改进, LSP 更

接近膜蛋白的天然环境, 因此该方法是膜蛋白结晶研究中的一个重要工具.

2.3 基于脂类和去垢剂混合物的结晶研究

2.3.1 脂类 - 去垢剂混合微团结晶法(lipid-detergent mixed micelles method). 除了 LSP 结晶法, 2002 年 Faham 等^[26]发展了脂类 - 去垢剂混合微团结晶法, 也称双层膜微团法(bicelles methods). 这也是一种基于 LCP 方法的改进方法, 该法在最近几种重要膜蛋白的结构研究中获得了成功^[27-29], 因此受到了越来越多研究者的关注. Bicelles 是按一定浓度比例的脂类 / 去垢剂混合而形成的双分子层圆盘结构. 与单一去垢剂微团相比, bicelles 的双分子层环境将更接近膜蛋白天然的脂双分子层. 实验证明, 在低温下脂类 / 去垢剂混合形成的 bicelles 没有黏性, 但是随着温度的升高 bicelles 的黏度会增加, 因此可以调节温度来得到许多种双分子层脂膜结构的 bicelles. 利用 bicelles 结晶的方法流程(图 6)是: 首先将 DMPC 和去垢剂 Chapso 混合在水中, 通过反复涡旋混匀、超声、加热、冷却样品形成 bicelles. 然后将 bicelles 与蛋白质在冰上混合, 并在一个硅化的盖玻片上与沉淀剂混合, 混合后的溶液使用标准气相扩散法进行晶体生长. 该方法的优点在于: a. 类似于 *in cubo* method, 能使膜蛋白稳定在一个双分子层环境中; b. 相对 LCP 和

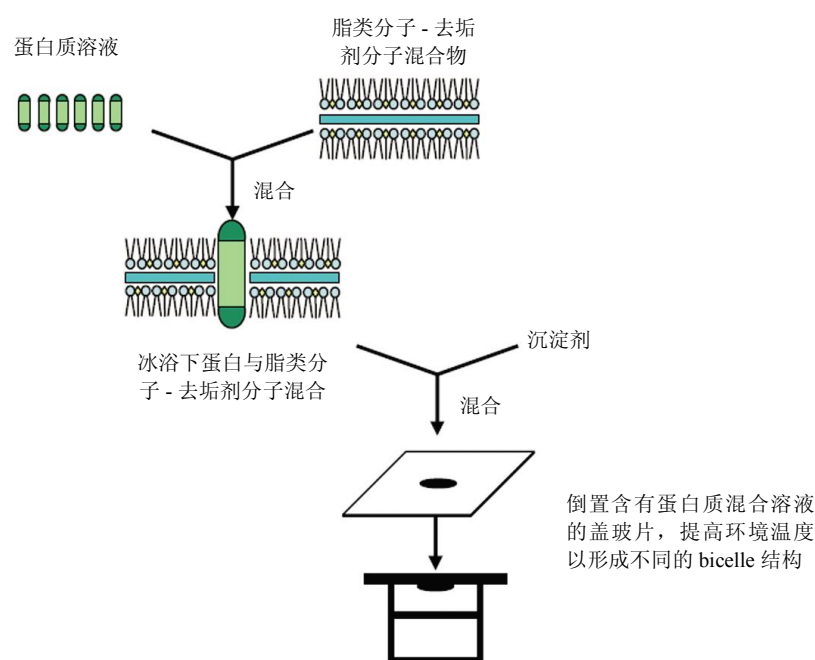


Fig. 6 Outline of the bicelle method^[26]

图 6 Bicelle 结晶方法示意图^[26]

LSP 结晶法, 其操作更容易, 应用的技术更常规. 然而 bicelles 方法也存在着一些技术上的问题, 其中很重要的问题是经常会形成双折射液晶、聚集物或者针状晶体, 这就需要研究者对 bicelles 法的结晶条件进行筛选优化; 需要考虑的另外一个潜在问题是: 提高温度后形成的 bicelles 结构可能会不适合一些稳定性差的膜蛋白结晶. 总之, 研究者还需要更多的实验经验来指导使用该方法在膜蛋白结晶中的应用.

2.3.2 囊泡融合结晶法 (vesicle fusion method).

囊泡融合结晶法是由 Takeda 等^[30]在 1998 年提出的, 具体过程是: a. 首先用脂类双分子层方法形成目标膜蛋白的二维晶体; b. 将该二维晶体混合去垢剂分子和沉淀剂形成一种混合物, 然后在高温 32℃ 孵育或脱水作用下, 使上述混合物装配成一种连续的囊泡结构; c. 囊泡融合后, 可以观察到膜蛋白与去垢剂混合物被插入到脂双分子层中而形成的三维晶体(图 7). 整个过程中, 囊泡融合过程是关键步骤, 该过程的融合速度很慢, 因此晶体生长会花费很长的时间. 通过这种方法, Takeda 等成功获得了菌视紫质膜蛋白的三维晶体. 由于大多数具有重要功能膜蛋白在去垢剂溶解状态下很容易变性, 该方法能够在过量去垢剂变性条件下结晶, 因此该方法被认为是一种有发展前景的膜蛋白结晶方法.

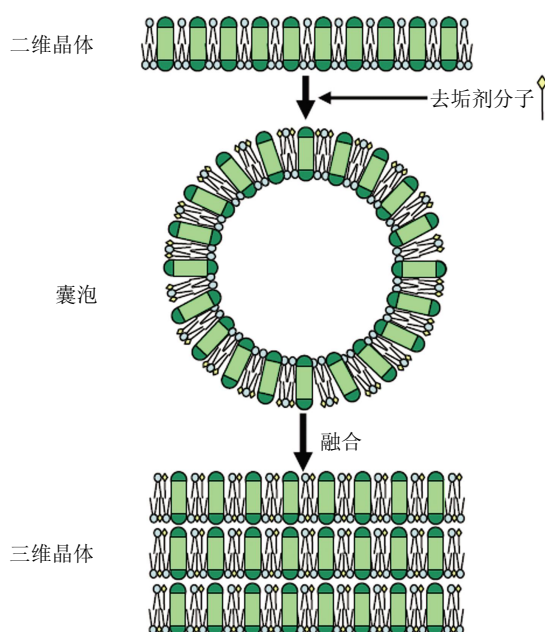


Fig. 7 Schematic diagram showing the crystallization processes of vesicle fusion method^[30]

图 7 囊泡融合结晶过程示意图^[30]

2.4 基于其他两亲性分子的结晶研究

除了去垢剂和脂类分子, 许多基于多肽设计的两亲性分子, 例如 peptitergents、脂肽类去垢剂 (lipopeptide detergents, LPDs)、短肽表面活性剂均可以作为膜蛋白溶解和结晶的候选者^[31-33], 但是迄今为止还没有得到广泛的应用. 随后发展的两亲性聚合物 (amphipols) 可以模拟天然状态下膜蛋白的疏水环境^[34-35], 可惜的是这种方法是否能得到高质量高分辨率的晶体还未有报道, 而且这种两亲性聚合物并不能将膜蛋白从生物膜中提取出来. 近年来报道的一些低分子质量的试剂, 例如半氟化表面活性剂 (hemifluorinated surfactants, HFS)^[36]、类胆酸^[37]等两亲分子虽然具有良好的潜力, 但它们的应用范围还有待探索. 总之, 膜蛋白结晶研究的一个重要方向就是寻找另外一种比去垢剂更能有效稳定膜蛋白并提高膜蛋白结晶成功率的两亲性分子.

2010 年美国威斯康星大学麦迪逊分校和斯坦福大学的研究者们合成了一类两亲性分子^[38], 这些化合物制备简单、价格便宜、并在数十种不同的膜蛋白研究中得到了令人满意的结果. 首先他们设计的这类两亲性分子特征是拥有一个季碳原子中心和一个亲水基团, 其季碳原子中心来自于 2, 2-二甲基丙二醇, 亲水基团来自于麦芽糖, 因此他们将这些化合物命名为麦芽糖-2, 2-二甲基丙二醇 (maltose-neopentyl glycol, MNG). MNG 与传统的去垢剂分子结构上有显著区别(图 8), MNG 有两个亲水基和两个疏水基, 去垢剂仅有一个亲水基和疏水基. 研究者推测亲水和疏水表面的可调折叠性和不同的方向性也给予了这些 MNG 分子区别于传统去垢剂的不同特性, 它们被应用在维持蛋白质构象、膜上提取蛋白质、高质量晶体生长以及体外转录翻译等膜蛋白结构研究中. 但是在后续的实验中提出了许多重要的问题, 首先是 MNG 与膜蛋白形成的微团结构大小的测定以及 MNG 结构如何影响微团大小, 其次是测定一个微团中两亲性分子平均数是非常必要的. 总之, 这一类新型两亲性分子将有利于推进膜蛋白三维结构的研究, 并推动生物医药领域研究的发展.

Malvern Cosmeceutics 有限公司开发了一种叫 “Lipodisq” 商用聚合物 / 脂质聚集体, 目前这种聚集体主要作为脂溶性药物的运送载体, 该公司用苯乙烯马来酸 (styrene maleic acid, SMA) 作为脂分子, SMA 共聚物形成的单分散脂质盘 (lipid disk) 能够维持膜蛋白的完整结构^[39]. 用膜蛋白菌视紫质与 SMA

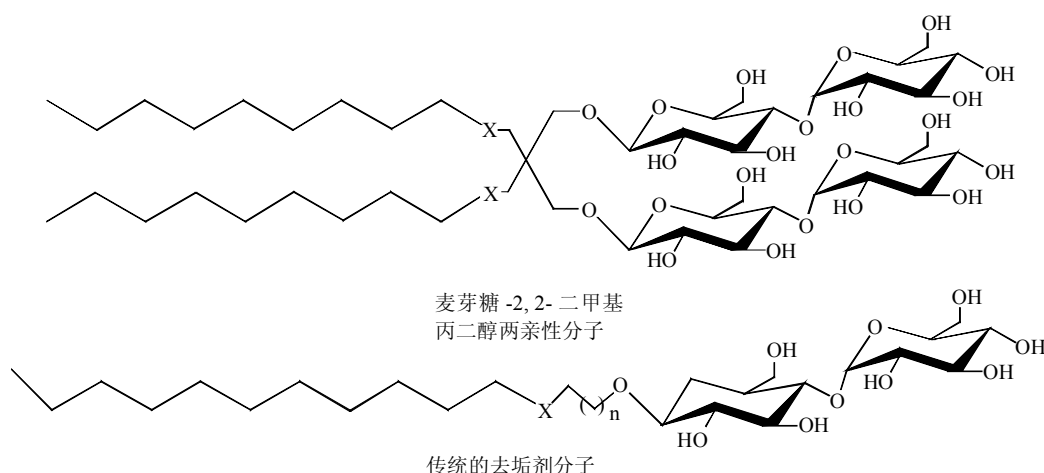


Fig. 8 Chemical structures of MNG amphiphiles and conventional detergents^[38]

图8 MNG分子和常规去垢剂的化学结构式^[38]

形成盘状聚合物纳米颗粒, 实验分析结果表明, 这种复合物结构提高了菌紫质的相对稳定性, 溶解性也明显高于去垢剂, 并且其在后续的结晶研究方面初显其优势.

近期, 德国慕尼黑大学 Beckmann 研究小组报道了一种可以在脂双层环境中得到膜蛋白复合物亚纳米级分辨率晶体结构的新方法^[40]. 该方法是将大肠杆菌膜蛋白 SecYEG 复合物嵌入一种高密度脂蛋白微粒 (high-density lipoprotein, HDL) 中进行研究. 这种微粒也称为纳米小碟 (nanodiscs), 这种纳米小碟是一种纳米级可溶的脂质体超微结构^[41-42], 与天然细胞膜的磷脂双分子层组成几乎一样, 因此可以模拟膜蛋白的天然脂环境. 应用这种纳米小碟研究技术不仅有助于揭示膜蛋白在天然脂双分子层中的生化行为机理, 还提出了一条获得膜蛋白晶体的新途径.

3 未来膜蛋白结晶研究的讨论及展望

目前核磁共振技术、电子显微技术、原子力显微技术得到了飞速发展, 但这些方法与 X 射线晶体衍射技术的分辨率相比还有一定的差距. 因此, X 射线衍射仍然是研究生物大分子结构的主要手段, 获得高质量的晶体是 X 射线晶体衍射技术的基础. 膜蛋白的疏水性是制约膜蛋白结晶的瓶颈之一. 膜蛋白结晶方法都是基于两性分子与靶蛋白自装配的基础之上, 去垢剂作为最经典最传统的分子在膜蛋白结晶中扮演着举足轻重的角色, 然而近

年来真核生物膜蛋白晶体结构越来越受到人们的关注, 由于一些真核膜蛋白通常只在磷脂环境中稳定存在, 传统的去垢剂环境不利于这些真核生物膜蛋白的稳定和结晶, 因此基于脂类分子结晶方法作为一个强有力的补充已经成功地应用于真核膜蛋白结晶研究中, 并且成为当今膜蛋白结晶方法学的研究热点之一.

近年来尤其是高通量结晶试剂筛选技术^[43]、融合标签技术、抗体共结晶技术和微流控技术等膜蛋白结晶研究中的广泛应用使得膜蛋白结晶成功率得到了极大的提高, 得到了数个重量级的膜蛋白晶体结构 (例如 G 蛋白偶联受体)^[27-29], 这为膜蛋白结晶研究领域开辟了新的道路. 同时, 就目前来说还没有一个普适的结晶方法适用于所有的膜蛋白, 因此我们还必须在膜蛋白结晶方法学研究中继续探索, 以期寻找更有效的方法来为膜蛋白结晶研究提供新的思路, 并且国内外研究者正在携手共同努力制定一个高效的、规范化的膜蛋白结晶研究技术流程, 相信不远的未来更多的新方法新思路将会不断出现并成熟, 并把更多的膜蛋白晶体结构提交到 PDB 数据库中, 最终将推动人类对生命活动的认识进入到一个以三维分子结构为基础的新层次.

参 考 文 献

- [1] Overington J P, Al-Lazikani B, Hopkins A L. How many drug targets are there?. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(12): 993-996
- [2] 杨福愉, 张旭家. 生物膜膜蛋白三维结构研究的现状与展望. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 569-575

- Yang F Y, Zhang X J. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (6): 569–575
- [3] Deisenhofer J, Epp O, Miki K, *et al.* Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, 1985, **318**(6047): 618–624
- [4] 邹喻萍. 膜蛋白晶体生长及其进展. *生物化学与生物物理进展*, 1994, **21**(3): 207–211
- Zhou Y P. *Prog Biochem Biophys*, 1994, **21**(3): 207–211
- [5] Iwata S E. *Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins*. Biotechnology Series International University Line, USA: 2003
- [6] Hunte C C, von Jagow G, Schagger H. *Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide*. Academic Press, San Diego: 2003
- [7] Ostermeier C, Michel H. Crystallization of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 1997, **7**(5): 697–701
- [8] Cherezov V. In meso structure of the cobalamin transporter, BtuB, at 1.95 Å resolution. *J Mol Biol*, 2006, **364**(4): 716–734
- [9] Snijder H J. Detergent organisation in crystals of monomeric outer membrane phospholipase A. *J Struct Biol*, 2003, **141**(2): 122–131
- [10] Iwata S, Ostermeier C, Bernd L, *et al.* Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, 1995, **376**(6542): 660–669
- [11] Essen L O, Siegert R, Lehmann, *et al.* Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(20): 11673–11678
- [12] Pautsch A, Schulz G E. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol*, 1998, **5**(11): 1013–1017
- [13] Liu Z F, Yan H C, Chang W R, *et al.* Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 2004, **428**(6980): 287–292
- [14] Jia Y. Investigation on the mechanism of crystallization of soluble protein in the presence of nonionic surfactant. *Biophys J*, 2005, **89**(6): 4245–4251
- [15] Nollert P. Molecular mechanism for the crystallization of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases. *FEBS Lett*, 2001, **504**(3): 179–186
- [16] Hunte C, Michel H. Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, **12**(4): 503–508
- [17] Iwata S E. *Methods and results in crystallization of membrane proteins*. USA: Biotechnology. Series International University Line USA, 2003: 318–328
- [18] Chayen N E. The role of oil in macromolecular crystallization. *Structure*, 1997, **5**(10): 1267–1274
- [19] Chayen N E, Saridakis E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction quality crystal. *Nat Methods*, 2008, **5**(2): 147–153
- [20] Luzzati V. Biological significance of lipid polymorphism: the cubic phases. *Curr Opin Struct Biol*, 1997, **7**(5): 661–668
- [21] Grabe M. Protein aggregation in the lipid cubic phase. *Biophys J*, 2002, **82**(1): 535A
- [22] Ehdud M L, Rosenbusch J P. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(25): 14532–14535
- [23] Johansson L C. Membrane protein crystallization from lipidic phases. *Curr Opin Struct Biol*, 2009, **19**(4): 372–378
- [24] Wadsten P. Lipidic sponge phase crystallization of membrane proteins. *J Mol Biol*, 2006, **364**(1): 44–53
- [25] Annemarie B Wo hri, Johansson L C, Wadsten-Hindrichsen P, *et al.* A lipidic-sponge phase screen for membrane protein crystallization. *Structure*, 2008, **16**(7): 1003–1009
- [26] Faham S, Bowie J U. Bicelle crystallization. a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J Mol Biol*, 2002, **316**(1): 1–6
- [27] Luecke H. Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton pump with a dual chromophore. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(43): 16561–16565
- [28] Ujwal R. The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(46): 17742–17747
- [29] Rasmussen S G F. Crystal structure of the human beta 2 adrenergic G-protein coupled receptor. *Nature*, 2007, **450**(7168): 383–387
- [30] Takeda K. A novel three-dimensional crystal of bacteriorhodopsin obtained by successive fusion of the vesicular assemblies. *J Mol Biol*, 1998, **283**(2): 463–474
- [31] Schafmeister C E, Meircke L J W, Stroud R M. Structure at 2.5 Å of a designed peptide that maintains solubility of membrane proteins. *Science*, 1993, **262**(5134): 734–738
- [32] McGregor C L. Lipopeptide detergents designed for the structural study of membrane protein. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(2): 171–176
- [33] Zhao X. Designer short peptide surfactants stabilize G protein-coupled receptor bovine rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(47): 17707–17712
- [34] Tribet C, Audebert R. Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(26): 15047–15050
- [35] Popot J L. Amphipols, nanodiscs, and fluorinated surfactants: three nonconventional approaches to studying membrane proteins in aqueous solutions. *Annu Rev Biochem*, 2010, **79**(7): 737–775
- [36] Breyton C. Micellar and biochemical properties of (hemi)fluorinated surfactants are controlled by the size of the polar head. *Biophys J*, 2009, **97**(4): 1077–1086
- [37] Zhang Q. Designing facial amphiphiles for the stabilization of integral membrane protein. *Angew Chem Int Edn*, 2007, **46** (37): 7023–7025
- [38] Chae P S, Rasmussen S G, Rana R R, *et al.* Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods*, 2010, **7**(12): 1003–1008
- [39] Knowles T J, Finka R, Smith C, *et al.* Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(22): 7484–7485

- [40] Frauenfeld J, Gumbart J. Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, **18**(5): 614–621
- [41] Nath A, Atkins W M. Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry*, 2007, **46**(8): 2059–2069
- [42] Borch J, Hamann T. The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies. *Biol Chem*, 2009, **390**(8): 805–814
- [43] 张仙芳, 刘 君, 尹大川, 等. 筛选蛋白质结晶条件的试剂盒研发进展. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(3): 280–287
- Zhang X F, Liu J, Yin D C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(3): 280–287

Progresses on Crystallization Methodology of Membrane Proteins*

HUYAN Ting, ZHANG Chen-Yan, MA Xiao-Liang, YIN Da-Chuan**

(Key Laboratory for Space Bioscience & Biotechnology, School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract Membrane proteins play crucial roles in substance transportation, energy transformation and signal transduction. Three dimensional structural determination of membrane protein is significantly important for its biological function study and rational drug design. The molecular structures of membrane proteins are mainly determined *via* X-ray single crystal diffraction technique, for which high quality membrane protein crystals are required. However, due to its amphipathicity, the membrane proteins are hard to crystallize, resulting in difficulties in the structural determination. In recent years, some methods (such as *in surfo* methods and *in cubo* methods) have been developed specifically for crystallizing membrane proteins. The progresses on crystallization methodology of membrane proteins are reviewed, and the prospective in this field are also discussed.

Key words membrane proteins, crystallization methodology, detergent, lipid cubic phase

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00235

* This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2011CB710905) and The Doctorate Foundation of Northwestern Polytechnical University (CX201023).

**Corresponding author.

Tel: 86-29-88460254, E-mail: yindc@nwpu.edu.cn

Received: May 31, 2011 Accepted: July 28, 2011