

筛选蛋白质结晶条件的试剂盒研发进展*

张仙芳 刘 君 郭云珠 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 蛋白质结晶条件筛选是蛋白质分子三维结构解析的主要限速环节之一, 因此发展筛选效率较高的结晶条件筛选试剂盒有着十分重要的意义. 目前广泛应用的结晶条件筛选试剂盒的设计方法主要有不完全因子法、稀疏矩阵法和系统筛选法. 结晶学家基于这三种方法研发了一系列用于蛋白质结晶条件筛选的试剂盒. 评述了 20 世纪以来筛选试剂盒的设计方法及应用进展, 并展望了其未来的发展方向.

关键词 蛋白质结晶, 筛选试剂盒, 不完全因子, 稀疏矩阵, 系统筛选

学科分类号 Q617

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00361

蛋白质是生命的物质基础, 没有蛋白质就没有生命的存在, 而蛋白质的功能是由其分子的三维结构决定的, 因此确定蛋白质分子的三维结构有着至关重要的意义. 目前, X 射线衍射技术(X-ray diffraction)是确定蛋白质分子三维结构最可靠的方法, 迄今为止, 蛋白质结构数据库(Protein Data Bank, PDB)中 85%以上的结构都是通过 X 射线单晶衍射技术解析得到的. 对 X 射线衍射技术而言, 获得高质量的符合衍射要求的单晶仍是这一技术领域的主要瓶颈之一. 因此, 研究蛋白质结晶及其规律有十分重要的意义.

实践中, 获取蛋白质单晶一般需要经过两个步骤: 首先需要筛选出可以使蛋白质结晶的试剂条件, 然后再针对筛选出的结晶条件进行优化以获得高质量单晶. 其中, 筛选出可以使蛋白质结晶的试剂条件是第一步, 也是最重要的一步. 由于蛋白质分子的多样性, 目前还没有一种方法可以确保获得蛋白质晶体. 为了获得结晶条件, 常规的做法是用多种试剂条件分别与待结晶蛋白质的溶液混合, 测试这些试剂条件是否可以使蛋白质结晶. 这些用于尝试促使蛋白质结晶的试剂条件的集合就构成了蛋白质结晶条件筛选试剂盒. 配方设计合理的试剂集合能更有效地获得结晶条件, 不仅有利于节省成本, 更有利于提高效率. 因此, 设计开发试剂盒有

着重要的意义. 目前, 已有大量试剂盒应用于蛋白质结晶实验中. 本文借鉴和发扬前人智慧, 对 20 世纪以来蛋白质结晶条件筛选方法及筛选试剂盒的研制、发展历程进行了简要综述.

1 设计蛋白质结晶条件筛选试剂盒需要考虑的各种因素

蛋白质结晶是一个复杂的物理化学过程, 每一个条件的细微变化都有可能影响结晶过程的成败, McPherson^[1]将影响蛋白质结晶过程的各种因素按照类型的不同概括为以下三类, 如表 1 所示.

在众多因素中, 沉淀剂类型、pH 值、温度、溶液离子强度、过饱和度、蛋白质浓度、蛋白质的溶解度以及蛋白质的稳定性等几个因素显得尤为重要. 其中, 与设计结晶条件筛选试剂盒相关的因素包括沉淀剂类型、pH 值、溶液离子强度、过饱和度、蛋白质溶解度等, 在设计结晶条件筛选试剂盒、确定具体化学成分时, 可以作为主要考虑因素.

* 国家自然科学基金资助项目(10772150).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2010-07-08, 接受日期: 2010-09-13

Table 1 Factors affecting crystallization^[1]表 1 影响蛋白质结晶的各种因素^[1]

物理因素	化学因素	生物化学因素
温度	pH 值	蛋白质纯度
达到平衡的方法和速率	沉淀剂类型和浓度	配合体
重力	离子种类	抑制剂
大气压力	离子强度	蛋白质的聚集状态
时间	过饱和度	蛋白质来源
机械扰动 / 振动 / 声音	氧化 / 还原环境	蛋白质水解
电场 / 磁场	生物大分子的浓度	化学修饰
介质的电解质性质和黏度	交联体	遗传修饰
表面能	去垢剂和杂质	蛋白质自身对称性
均相 / 非均相成核	金属离子	蛋白质的稳定性和等电点

沉淀剂的组成对结晶成功率至关重要。生物大分子结晶数据库 (Biological Macromolecule Crystallization Database, BMCD) 已报道的结晶条件中包括 380 多种化学物质^[2-3], 按照类型一般可分为 4 种, 即盐(如硫酸铵)、挥发性的有机溶剂(如乙醇)、聚合物(如聚乙二醇)、非挥发性的多元醇(如 2- 甲基 -2, 4- 戊二醇, MPD)。

溶液的 pH 值是一个很重要的因素, 大多数蛋白质都对溶液的 pH 值非常敏感, 调节 pH 值可以改变蛋白质晶体的尺寸和形貌。确定 pH 值可依据特定蛋白质的性质, 比如纯化特点、等电点、溶解性、稳定性以及相关蛋白质的结晶经验等。若不清楚结晶最佳 pH 值则首选条件为 pH 值等于 6.5 的甲次磷酸盐^[4], 这是因为甲次磷酸盐缓冲液的 pKa 值范围较广, 而且可以抑制巯基集团引起的蛋白质聚合。另外, 有报道指出, 一般情况下溶液的 pH 值大约为蛋白质等电点的一半时有利于晶体的析出^[5]。

溶液的离子强度也对蛋白质结晶产生重要影响。McPherson^[6]利用 12 种盐研究了 23 种蛋白质的结晶情况, 发现 12 种盐中丙二酸钠的成功率最高。丙二酸盐是一种有机酸, 带两个负电荷, 电荷密度较高, 在相同浓度的情况下, 丙二酸钠的离子强度是仅带一个负电荷盐的 4 倍。因此可得出结论: 蛋白质结晶溶液中的离子强度越高, 越容易促进蛋白质结晶。

另外, 过饱和度作为结晶的驱动力也是一个非常重要的因素, 可以通过改变过饱和度促使蛋白质结晶。例如, Gosavi 等^[7]将乙腈和甘油用于溶菌酶和木糖异构酶的结晶实验, 发现乙腈和甘油通过增加蛋白质的溶解度而降低了形核势垒, 进而降低了

形核所需的过饱和度, 实现了蛋白质晶体的形核与生长, 另外发现, 木糖异构酶结晶所需过饱和度大于溶菌酶, 这可能是由于木糖异构酶的分子质量 (173 ku) 大于溶菌酶分子质量 (14.6 ku)。由此推论: 蛋白质分子质量越大, 结晶所需过饱和度就越高。

对于一些难溶的蛋白质来说, 加入一些提高蛋白质溶解度的化学物质是很必要的。Golovanov 等^[8]向溶解蛋白质的缓冲液中加入 50 mmol/L 带电荷的氨基酸(精氨酸和谷氨酸), 发现这类氨基酸可以使蛋白质的溶解度提高 8.7 倍左右, 阻止蛋白质聚集和沉淀, 并能抑制蛋白质水解, 增强蛋白质在溶液中的长期稳定性。又如, Izaac 等^[9]通过筛选研发了一套溶解蛋白质的缓冲液, 他们发现: 与标准的溶解蛋白质的缓冲液对比, 优化的缓冲液可以提高蛋白质的溶解度, 从而提高蛋白质的结晶成功率。

2 设计蛋白质结晶条件筛选试剂盒的方法及应用

如上所述, 蛋白质结晶受众多因素影响, 这些因素之间往往还相互影响, 改变一个因素的同时其他因素的作用也会随之变化。所以, 在寻找最优化的结晶条件时往往很杂乱, 无章可循。鉴于此, 发展一系列高效、相互补充的筛选试剂盒成为大势所趋和热点, 结晶学家们也在这方面花费了大量的精力和财力, 取得了一些显著的成果。下文逐一列出了近年来涉及该领域的研究成果和应用。

2.1 统计学实验设计及其应用

统计学实验设计源于英国统计学家 Fisher^[10]的思想。首先找出实验要考虑的各种因素, 其次确定每种因素的各种水平, 最后通过实验结果分析得出哪一个因素对实验结果影响最大, 甚至哪个因素的

某一水平对实验结果影响最大. 统计学实验设计的出发点是找到对实验结果发挥重要作用的一些因素, 下面介绍的不完全因子法就是一个最基本的例子, 其主要目的不是优化结晶条件, 而是粗略地将影响晶体生长的因素分为重要的和不重要的两类^[11-12], 为后面优化结晶条件做好铺垫工作. 统计学实验设计优于其他方法的原因在于即使得不到获得晶体的条件, 也能从实验结果的分析中得出有用的信息, 指导后续工作.

2.1.1 全因子设计法. 全因子设计法(complete factorial design)^[12]是将实验所要考虑的所有因素的各种水平的各种组合全部考虑在内的一种实验设计方法, 这种实验设计无疑是最理想的, 但是由于蛋白质结晶需要考虑的因素很多, 应用这种方法需要大规模的实验作为基础, 不太容易实现, 可以考虑在因素较少的时候使用.

2.1.2 正交试验设计. 一般实验室的蛋白质样品都有限. 为了大大减少实验次数和样品用量, Kingston 等^[13]把正交试验设计(orthogonal fractional factorial design)用在了蛋白质结晶实验中, 并成功地长出了葡萄糖-果糖氧化还原酶和丙酮酸脱羧化酶晶体. 正交试验设计是全因子设计的一个子集, 它有两点要求: 一是每一个因素的各种水平出现的次数相等; 二是各个因素的各种水平的排列方式齐全而且均衡, 即每个因素的每个水平与另一个因素的水平各碰面一次. 这样可以大大减少实验次数, 比如一个四因素三水平的实验, 如果用全因子设计法需要做 81(3⁴)次实验, 但用正交试验设计只需做 9 次实验.

2.1.3 不完全因子设计法.

不完全因子法(incomplete factorial design, IF)最初由 Carter 等^[14]提出. 此方法有两大特点: 一是平衡原则, 即对每一个因素来说它的各种水平出现的次数要尽可能相等, 因为这样有利于统计出各个因素的哪一个水平最适合结晶; 二是随机性, 即每个因素的各种水平的排列都是随机的, 这样可以减少外部因素对实验统计的干扰. 这种方法可以大大减少实验的次数. 同时, 每一次实验改变的不仅仅是一个因素, 它可以同时改变好几个因素, 这不仅节省了蛋白质样品, 而且还可以通过对实验结果的分析看出哪一个因素的哪一个水平对蛋白质结晶影响最大.

目前, 不完全因子法已得到较广泛应用^[11, 15]. 但也有对该方法的改进. Abergel 等^[16]将 Carter 等^[14]

的不完全因子法与 Roussel 等^[17]设计的程序软件 CRISTAL 结合使用, 利用具有不同性质的蛋白质(3 种脂肪酶、2 种蛋白酶、1 种蝎毒蛋白)检验了不完全因子法的效果. 该工作与传统的完全因子法有三点不同: 一是利用程序软件 CRISTAL 将数据库中与目标蛋白序列相似或结构相似的蛋白质的结晶信息进行统计, 这样有利于决定该重点设置哪些因素. 比如, CRISTAL 软件发现所有的磷脂酶都在 Mg²⁺ 的存在下才能结晶, 则在设计脂肪酶结晶因素时 Mg²⁺ 就是一个必不可少的因素. 二是用来分析实验结果的打分系统比 IF 要简单, IF 有 9 个档次而本实验只分了三个档次, 即液滴澄清的为 0 分, 各种类型的沉淀物为 1 分, 长出蛋白质晶体的是 2 分. 三是该实验的变量是连续的, 而 IF 的变量是不连续的. 通过这些改进, Abergel 找到了决定这 6 种蛋白质结晶的关键因素并且得到了尺寸较大的单晶.

2.2 稀疏矩阵筛选法及其应用

稀疏矩阵法(sparse matrix sampling)是 Jancarik 等^[18]首次提出的, 这种方法是围绕目前已知的或已发表的结晶条件(文献或结晶数据库)进行结晶条件设计的一种方法. 其优点是一旦在某一条条件下能够使蛋白质结晶, 其他与之相关的条件也可能使蛋白质结晶, 但是这种方法的参数往往不连续, 因此有可能遗漏一些结晶条件. Jancarik 等^[18]设计了一套 50 条件的稀疏矩阵筛选试剂盒, 用了 3 种类型的沉淀剂: a. 挥发性的有机沉淀剂(异丙醇), b. 非挥发性的有机沉淀剂(如: 2-甲基-2, 4-戊二醇、不同分子质量的 PEG), c. 各种盐. 另外还有上述 3 种类型沉淀剂的混合物. 该试剂盒取得了巨大的成功, 用 15 种以前结晶过的蛋白质检测了它的成功率, 结果显示至少有一个试剂配方条件下长出蛋白质晶体. 另外, 他们还利用该试剂盒检测了 31 种以前没有获得晶体的蛋白质, 其中 25 种都得到了蛋白质晶体.

目前, 稀疏矩阵法已经得到了广泛的应用. 基于该设计思想, 人们已经发展了很多种类的商业化结晶条件筛选试剂盒. 例如, 面向一般可溶性蛋白质的 JCSG-plus HT^[19] (Molecular Dimensions)、Crystal Screen 和 Crystal Screen 2^[20] (Hampton Research)等, 专门针对核酸及核酸-蛋白质复合物的 Natrix 与 Natrix 2^[21] (Hampton Research)、JBScreen Nuc-Pro^[2, 22-23] (Jena Bioscience)等.

随着生物大分子结晶数据库 BMCD 数据量的

增加, 人们已经具备了重新审视结晶条件试剂盒的条件. 因此, 根据 BMCD 数据库中成功率较高的试剂, 结合一些新发现的规律, 重新设计新的筛选试剂盒, 成为一个提高结晶条件筛选效率的良好途径. 一些试剂盒, 如一种小型 34 条件试剂盒^[2, 24]、以盐为主的 96 条件试剂盒 SaltRx HT^[2](Hampton Research)等, 就是通过这种途径设计出来的.

针对膜蛋白的结晶, 也有基于稀疏矩阵思想设计的结晶条件筛选试剂盒. 由于非特定聚合经常会抑制膜蛋白甚至可溶性蛋白质的结晶, 而采用去垢剂能够有效抑制由于疏水作用引起的非特异性聚合^[25-26]. 根据这种规律, 面向膜蛋白和溶解度较小的蛋白质可以使用添加了去垢剂的结晶条件筛选试剂盒, 例如 MembFac(Hampton Research)、NeXtal CubicPhase I Suite 和 NeXtal CubicPhase II Suite (Qiagen)、MemGold(Molecular Dimensions)、Beta-Mem(Emerald Biosystems)等. 这些试剂盒都要与去垢剂试剂盒结合使用, 例如 Detergent Screen HT (Hampton Research)等.

2.3 系统筛选法及其应用

系统筛选法(systematic screening)一般是根据研究者的理论及经验, 对结晶条件进行系统的有规律的搜索, 以获得目标蛋白质的可结晶条件. 下面介绍几种经典的系统筛选法.

2.3.1 系统筛选法.

(a)印迹筛选法(footprint screening)与反向筛选法(reverse screening).

1992 年 Stura 等^[27]提出了印迹筛选法. 该方法主要用于获取以生物大分子浓度和结晶剂浓度为坐标轴的溶解度线和沉淀线(即我们常说的结晶相图). 溶解度线及沉淀线显然可以用于指导确定生物大分子的结晶条件. 此外, 通过印迹筛选法可描绘出不同纯化工艺下得到的生物大分子的溶解度线与沉淀线, 并可以根据这些溶解度线与沉淀线的表现来挑选适于纯化后结晶的纯化工艺. 这一点对许多靠自身较难结晶的生物大分子有重要意义, 如糖蛋白或蛋白质复合物常常需要通过结合各种配体或其他对分子改性的方法来促使结晶. 通过不同纯化或改性工艺得到的蛋白质, 如果使用印迹筛选法获得它们的溶解度规律, 就可以预知哪种条件下得到的蛋白质容易结晶, 以此帮助确定合适的纯化工艺或改性工艺.

Stura 等的印迹筛选法试剂盒包含 6 种结晶剂(3 种分子质量的 PEG 和 3 种盐)的组合. 这些 PEG

和盐的各 4 个浓度组成了 24 个筛选条件. 利用这 24 个条件, 可以同步筛选, 用于确定在不同结晶剂条件下的溶解度线及沉淀线(每一种结晶剂对应一张相图, 相图的确定主要依靠观察气相扩散过程液滴的变化情况, 如沉淀、澄清、结晶等状况来确定). 在确定相图的时候可能出现两种情况: 一种情况是, 在实验过程中就发现了晶体. 这种晶体可以用做后续的蛋白质结晶优化中的籽晶^[28], 或用于确定溶解度线(将晶体放在溶液中, 观察晶体的溶解或长大, 以确定溶液处于饱和还是欠饱和, 从而得到溶解度值). 另一种情况是, 在实验中没有得到晶体. 但在这种情况下, 可以根据何种条件下出现沉淀或澄清两种状态, 得到进一步细化条件的提示.

印迹筛选法的进一步发展是反向筛选法^[29]. 反向筛选之得名, 来自于其与普通筛选方法的区别. 普通筛选方法是采用大量的试剂条件去与蛋白质溶液混合, 观察哪种条件可能获得晶体, 这是一种寻找合适结晶剂的途径. 而反向筛选中, 则是事先就确定某种结晶剂作为研究对象, 即先假定该结晶剂有希望促使目标蛋白结晶, 而不是通过大量筛选来寻找结晶剂. 通常反向筛选法使用结晶实践中被证明十分有效的各种 PEG 和硫酸铵, 以及其他报道比较有效的结晶剂作为逐步测试的对象, 然后对该结晶剂与目标蛋白之间的多种条件组合方式进行系统研究(此时需要印迹筛选法来确定溶解度变化规律, 从而帮助确定结晶条件), 并获得有效的结晶条件. 在该方法中, 也可以对添加剂进行检测, 以了解添加剂的效果.

总体而言, 反向筛选方法比较适合于蛋白质样品量特别少的情况, 可以不必经过大规模的条件筛选, 而是直接进入类似结晶优化的过程.

(b)格子筛选法.

格子筛选法(grid screening)是 Weber^[30]提出的. 该方法是通过有规律地改变沉淀剂的浓度和 pH 值这两个因素来找到结晶的最优条件. 首先对特定蛋白质进行初级筛选, 通过对初始筛选结果的分析, 再缩小 pH 以及沉淀剂浓度的范围, 对初始结晶条件进行优化, 直至得到符合衍射的比较大的单晶. 应用该方法往往会出现 3 种情况: a. 初次筛选就得到结晶条件, 这种情况只需要在长出晶体的结晶条件周围缩小参数范围进行优化; b. 沉淀和澄清液滴同时出现, 但未出现晶体, 这种情况需要在这两种极端情况之间设计参数变化直至出现晶体;

c. 全部澄清或全部沉淀, 这种情况就需要改变实验温度或蛋白质的初始浓度再进行实验直至出现晶体. Weber 通过对 8 种蛋白质的结晶结果分析发现, 大多数蛋白质长出晶体(对晶体质量不作要求)的参数范围相对较广, pH 值的范围一般在 1.5~2 个单位之间, 硫酸铵作为沉淀剂的最佳过饱和度范围为 20%~25%, 聚乙二醇和乙醇作为沉淀剂的最佳过饱和度范围为 10%左右. 但是要想得到较大尺寸(最小尺寸大于 0.1 mm)的单晶, 所选参数范围相对要窄.

2.3.2 系统筛选法的应用.

格子筛选法的应用也较多, Weber 等^[31]用这种方法成功得到大肠杆菌异构酶的单晶. 另外也有一些格子筛选的商业试剂盒, 比如 EasyXtal Anions Suite 和 EasyXtal Cations Suite(Qiagen)、Grid Screen Salt HT(Hampton Research)等.

Brzozowski 等^[4]设计了两个相互补充的 24 条件的系统筛选试剂盒: Clear strategy screens I 和 Clear strategy screens II. Clear strategy screens I 是依据 Brzozowski 的经验^[32-33]设计的, 主要针对酶蛋白, 沉淀剂为各种分子质量的 PEG, 另外有文献表明^[34], 为了解决结构解析中的相问题, 可以加入卤族阳离子, 基于这一思想, Clear strategy screens I 中有 4 个条件加入了溴化钾, 实验结果中有几个衍射分辨率较高的晶体都是在这些条件下获得的. Brzozowski 用该试剂盒成功得到了用 Crystal Screen 和 Crystal Screen 2(Hampton Research)没能获得的一些酶蛋白晶体. Clear strategy screens II 是对 Clear strategy screens I 的补充, 沉淀剂不仅有 PEG, 还有盐、有机物、重金属阳离子等. 此筛选试剂盒的设计思想包括以下几点: 一是化学或结构上相似的生物大分子在结晶方式上也具有相似性^[35]; 二是在大多数情况下, 结晶条件需要简单; 三是对于经验较少的实验者来说, 大多数商业筛选试剂盒的设计理念不明显, 而该试剂盒设计简单且弹性较大, 使用者可以根据目标蛋白的需要改变一些参数.

McPherson^[36]验证了不同分子质量的 PEG 对 22 种蛋白质的结晶情况, 结果发现有 6 种蛋白质被首次结晶出来, 可见 PEG 是一个很好的初始筛选试剂. 已发表的结晶条件中 PEG 占据了 60%. PACT premier HT(Molecular Dimensions)、PEG/Ion HT 和 PEGRx HT(Hampton Research)就是以 PEG 为沉淀剂的 96 条件的系统筛选, 不仅可以作为初始筛选试剂盒, 而且当已知某种蛋白质可以在 PEG 条件

下结晶时也可以用来对结晶条件进行优化.

在低离子强度的时候, 样品的溶解度对溶液的 pH 值和温度很敏感, 因此用此方法可以筛选出温度及 pH 值对样品溶解度及结晶的影响. 有研究发现单克隆抗体适合在低离子强度的条件下长出晶体^[37], 商业化的 Low Ionic Strength Screen(Hampton Research)就是针对单克隆抗体设计的一套筛选试剂盒.

3 其他类型试剂盒

3.1 综合各种筛选方法的高效筛选试剂盒

综合各种筛选方法, 可以设计出一些高效的筛选试剂盒. 例如综合了格子筛选^[30]、稀疏矩阵筛选^[18]和不完全因子法^[14]设计思路研制的 Index HT(Hampton Research)即属此类. 该试剂盒包含 96 条件, 被用来做蛋白质及蛋白质复合物、多肽、核酸等的初始筛选. 目前该试剂盒在初始筛选中已得到了广泛应用^[38-40]. 顾名思义, Index 囊括了一些传统的试剂和一些新的试剂, 试剂种类较多, 包括不同 pH 下的盐, 如 pH 范围为 3.5~8.5 的硫酸铵和氯化钠, 中性有机酸如 pH 为 7.0 的丙二酸钠和 Tacsimate(丙二酸钠、醋酸钠、柠檬酸三铵、琥珀酸、DL-苹果酸、甲酸钠、酒石酸二铵的混合物), 高浓度的盐和低浓度的聚合物相结合以及低浓度的盐和高浓度的聚合物相结合, 低离子强度的有机溶剂(比如 2-甲基-2,4-戊二醇和季戊四醇)等. 其总体 pH 范围为 3~9, 覆盖了一般结晶所需的 pH 范围. 通过使用该结晶条件筛选试剂盒, 如果发现筛选出的结晶条件以盐为主, 则可以用以盐为主要沉淀剂的结晶试剂盒进行优化, 而如果筛选出的结晶条件以 PEG 为主时, 则可以考虑选用以 PEG 为主要沉淀剂的筛选试剂盒进行进一步的优化, 直到找到合适的结晶条件.

3.2 基于样品浓度的筛选

样品浓度在筛选中是一个很重要的变量, 浓度太高容易形成沉淀, 浓度太低则液滴澄清, 这种现象在筛选中非常常见. 所以样品浓度不合适会降低筛选的成功率. 因此, 在开展结晶条件筛选之前, 如果能够事先确定一个比较合适的蛋白质溶液浓度, 则可预期在后续的结晶条件筛选中, 增加获得晶体的机会. 一种事先确定蛋白质溶液浓度的方法是使用几种试剂条件与目标蛋白质溶液混合, 观察混合后澄清或沉淀的情况, 以确定是否需要稀释或提高蛋白质溶液浓度. 例如 PCT(Pre-Crystallization

Test, Hampton Research)即是面向此需求设计的试剂盒. 该试剂盒包含 4 种试剂. A1: 0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.5, 2.0 mol/L 硫酸铵; B1: 0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.5, 1.0 mol/L 硫酸铵; A2: 0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.5, 0.2 mol/L 氯化镁, 30%PEG4000; B2: 0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.5, 0.2 mol/L 氯化镁, 15% PEG4000. A1 和 A2 代表高浓度的盐和高浓度的 PEG, B1 和 B2 代表低浓度的盐和低浓度的 PEG. 试验中如果发现 A1 和 A2 都生成沉淀则需稀释样品, 同理若 A1 和 A2 都澄清则需提高蛋白质浓度, 依此类推.

3.3 基于小分子添加剂的试剂盒

大量实验表明, 小分子添加剂可以提高晶体质量和晶体的尺寸^[20, 41-42], 这可能是由于小分子添加剂通过影响样品-样品、样品-溶剂之间的相互作用而影响样品的溶解度, 从而影响蛋白质结晶. 商业化的 Additive Screen(Hampton Research)就是一套添加剂的筛选试剂盒, 该试剂盒可以与任何一种筛选试剂盒联用, 它包括 18 种类型的小分子添加剂(多价阳离子、盐、离液剂、去垢剂、聚胺、交联体、还原剂、聚合物、挥发性的有机物和非挥发性的有机物等).

近年来, McPherson 等^[43-44]基于各种小分子在蛋白质结晶的过程中能形成稳定的分子间非共价键从而促进晶格形成的假设, 通过建立 3 组独立的实验评价了 200 多种小分子化学物质对 81 种不同的蛋白质结晶的影响, 该实验只用了 2 种沉淀剂, 即 30%的 PEG3350 和 50%的 Tacsimate, pH 值均为 7.0. 结果结晶出了 65 种蛋白质(85%), 其中 35 种蛋白质只在添加剂存在的情况下才被结晶出来, 可见小分子的添加剂的作用非常明显. 研究中发现, 在各种添加剂中最有效的是多价的带电荷的基团, 比如二羧酸或者三羧酸, 双氨基化合物, 磺酰基以及多磷酸盐, 还有各种生物化学试剂, 如辅酶、配体等. 之后的实验通过对 9 种晶体的 X 射线衍射技术分析证明了上述假设, 并阐明了小分子参与晶格之间相互作用的方式^[45]. 2008 年 Larson 等^[46]又对 McPherson 等^[43]的方法做了进一步拓展, 该实验只用了 PEG3350 作为沉淀剂, 做了两组独立的实验评价了 72 种蛋白质的可结晶性, 该实验结果进一步证明小分子可以通过氢键作用和静电相互作用促进晶格的形成.

基于上述思想, 一种新型的 96 条件添加剂试剂盒(Silver Bullets HT, Hampton Research)被研发

出来, 其中每一个条件里含有 2~20 种小分子. Silver Bullets HT 可以与该试剂盒配套的各种 pH 的 PEG/Tacsimate 联用, 也可以与其他一些试剂盒联用. 具体用法如下: 以坐滴法^[47]为例, 池液中只有结晶试剂, 可以是 PEG/Tacsimate 或其他筛选试剂盒, 液滴中包括三部分, 蛋白质样品、沉淀剂、Silver Bullets HT, 其比例一般为 2:1:1. 另外, 由于 Silver Bullets HT 中包括很多种小分子化学物质, 所以很容易出现盐晶, 因此运用该试剂盒一般要做对照实验, 对照实验只需要将蛋白质样品去掉, 其他条件都不变. 如果发现实验结果与对照实验相似, 则有可能是盐晶.

除了介绍的上述试剂盒外, 现有的商业试剂盒还有很多, 见网络版附录, 表 S1 (http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20100361&flag=1).

4 总结与展望

综上, 本文对现有的蛋白质结晶条件筛选试剂盒的设计思路、现状和应用情况进行了评述. 不完全因子法主要是研究者对特定蛋白质进行自行设计的一种方法, 因此很难商业化. 而稀疏矩阵法可以包括很多种类的筛选条件, 因此其适用的蛋白质种类较多, 是目前应用最广的, 商业试剂盒很多. 系统筛选法一般是在前两种方法的基础上, 研究者根据自己得到的经验将实验条件范围缩小, 在这个小范围内系统有规律地设计简单的试剂盒, 进一步得到更好的结晶条件, 商业试剂盒也较多. 这些试剂盒的使用效果, 很难说哪一个是最好的, 也没有哪一个试剂盒可以完全面向所有蛋白质. 在实际应用中, 只有根据目标蛋白的性质, 如蛋白质种类(可溶蛋白、膜蛋白、复合物等)、蛋白质溶解性等, 有针对性、有策略地选择合适的试剂盒, 才能有效地提升结晶条件的筛选效率.

还应当看到, 随着对蛋白质结晶机理研究的深入, 新的发现和新的思想不断出现. 将这些新的发现和思想体现在新的结晶条件筛选试剂盒中, 以进一步提升结晶条件筛选效率、丰富筛选试剂盒种类与体系, 无疑将是有意义的重要研究方向.

参 考 文 献

- [1] McPherson A. Introduction to protein crystallization. *Methods*, 2004, 34(3): 254-265
- [2] Gilliland G L, Tung M, Blakeslee D M, *et al.* Biological macromolecule crystallization database, Version 3.0: new features,

- data and the NASA archive for protein crystal growth data. *Acta Crystallographica Section D*, 1994, **50**(4): 408–413
- [3] Gilliland G L, Tung M, Ladner J E. The Biological Macromolecule Crystallization Database: crystallization procedures and strategies. *Acta Crystallographica Section D*, 2002, **58**(6 Part 1): 916–920
- [4] Brzozowski A M, Walton J. Clear strategy screens for macromolecular crystallization. *J Applied Crystallography*, 2001, **34**(2): 97–101
- [5] Kantardjieff K A, Rupp B. Protein isoelectric point as a predictor for increased crystallization screening efficiency. *Bioinformatics*, 2004, **20**(14): 2162–2168
- [6] McPherson A. A comparison of salts for the crystallization of macromolecules. *Protein Science*, 2001, **10**(2): 418–422
- [7] Gosavi R A, Bhamidi V, Varanasi S, *et al.* Beneficial effect of solubility enhancers on protein crystal nucleation and growth. *Langmuir*, 2009, **25**(8): 4579–4587
- [8] Golovanov A P, Hautbergue G M, Wilson S A. A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J American Chemical Society*, 2004, **126**(29): 8933–8939
- [9] Izaac A, Schall C A, Mueser T C. Assessment of a preliminary solubility screen to improve crystallization trials: uncoupling crystal condition searches. *Acta Crystallographica Section D*, 2006, **62**(7): 833–842
- [10] Fisher R A. *The Design of Experiments*. 3rd. London: Oliver and Boyd, 1949
- [11] Carter C W, Baldwin E T, Frick L. Statistical design of experiments for protein crystal growth and the use of a precrystallization assay. *J Crystal Growth*, 1988, **90**(1–3): 60–73
- [12] Carter C W Jr. Efficient factorial designs and the analysis of macromolecular crystal growth conditions. *Methods*, 1990, **1**(1): 12–24
- [13] Kingston R L, Baker H M, Baker E N. Search designs for protein crystallization based on orthogonal arrays. *Acta Crystallographica Section D*, 1994, **50**(4): 429–440
- [14] Carter C W Jr, Carter C W. Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J Biol Chem*, 1979, **254**(23): 12219–12223
- [15] Betts L, Frick L, Wolfenden R, *et al.* Incomplete factorial search for conditions leading to high quality crystals of *Escherichia coli* cytidine deaminase complexed to a transition state analog inhibitor. *J Biol Chem*, 1989, **264**(12): 6737–6740
- [16] Abergel C, Moulard M, Moreau H, *et al.* Systematic use of the incomplete factorial approach in the design of protein crystallization experiments. *J Biol Chem*, 1991, **266**(30): 20131–20138
- [17] Roussel A, Serre L, Frey M, *et al.* Rapid access to an updated biological macromolecule crystallization database through artificial intelligence. *J Crystal Growth*, 1990, **106**(2–3): 405–409
- [18] Jancarik J, Kim S H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J Applied Crystallography*, 1991, **24**(4): 409–411
- [19] Newman J, Egan D, Walter T S, *et al.* Towards rationalization of crystallization screening for small- to medium-sized academic laboratories: the PACT/JCSG+ strategy. *Acta Crystallographica Section D*, 2005, **61**(10): 1426–1431
- [20] Cudney R, Patel S, Weisgraber K, *et al.* Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Crystallographica Section D*, 1994, **50**(4): 414–423
- [21] Berger I, Kang C, Sinha N, *et al.* A highly efficient 24-Condition matrix for the crystallization of nucleic acid fragments. *Acta Crystallographica Section D*, 1996, **52**(3): 465–468
- [22] Berman H M, Westbrook J, Feng Z, *et al.* The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 2000, **28**(1): 235–242
- [23] Ke A, Doudna J A. Crystallization of RNA and RNA-protein complexes. *Methods*, 2004, **34**(3): 408–414
- [24] Gao W, Li S X, Bi R C. An attempt to increase the efficiency of protein crystal screening: a simplified screen and experiments. *Acta Crystallographica Section D*, 2005, **61**(6): 776–779
- [25] Garavito R M, Markovic-Housley Z, Jenkins J A. The growth and characterization of membrane protein crystals. *J Crystal Growth*, 1986, **76**(3): 701–709
- [26] Barends T R M, Dijkstra B W. Oils used in microbatch crystallization do not remove a detergent from the drops they cover. *Acta Crystallographica Section D*, 2003, **59**(12): 2345–2347
- [27] Stura E A, Nemerow G R, Wilson I A. Strategies in the crystallization of glycoproteins and protein complexes. *J Crystal Growth*, 1992, **122**(1–4): 273–285
- [28] Stura E A, Wilson I A. Analytical and production seeding techniques. *Methods*, 1990, **1**(1): 38–49
- [29] Stura E A, Satterthwait A C, Calvo J C, *et al.* Reverse screening. *Acta Crystallographica Section D*, 1994, **50**(4): 448–455
- [30] Weber P C. A protein crystallization strategy using automated grid searches on successively finer grids. *Methods*, 1990, **1**(1): 31–37
- [31] Weber P C, Zhu C X, Tse-Dinh Y-C. Systematic investigation of crystallization parameters for protein-nucleic acid complexes: application to an active truncated form of *Escherichia coli* topoisomerase I. *J Crystal Growth*, 1992, **122**(1–4): 293–297
- [32] Brzozowski A. Crystallization of a *Humicola lanuginosa* lipase-inhibitor complex with the use of polyethylene glycol monomethyl ether. *Acta Crystallographica Section D*, 1993, **49**(3): 352–354
- [33] Brzozowski A M, Tolley S P. Poly(ethylene) glycol monomethyl ethers—an alternative to poly(ethylene) glycols in protein crystallization. *Acta Crystallographica Section D*, 1994, **50**(4): 466–468
- [34] Dauter Z, Dauter M, Rajashankar K R. Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides. *Acta Crystallographica Section D*, 2000, **56**(2): 232–237
- [35] Hennessy D, Buchanan B, Subramanian D, *et al.* Statistical methods for the objective design of screening procedures for macromolecular crystallization. *Acta Crystallographica Section D*, 2000, **56**(7): 817–827
- [36] McPherson A Jr. Crystallization of proteins from polyethylene glycol. *J Biol Chem*, 1976, **251**(20): 6300–6303
- [37] Lisa J H, Eileen S, McPherson A. Crystallization of intact monoclonal antibodies. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1995, **23**(2): 285–289
- [38] D'Arcy A, Mac Sweeney A, Stihle M, *et al.* The advantages of

- using a modified microbatch method for rapid screening of protein crystallization conditions. *Acta Crystallographica Section D*, 2003, **59**(2): 396–399
- [39] Feil S C, Tang J, Hansen G, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of glutathione transferases from cyanobacteria. *Acta Crystallographica Section F*, 2009, **65**(5): 475–477
- [40] Zhang C Y, Yin D C, Lu Q Q, *et al.* Cycling temperature strategy: A method to improve the efficiency of crystallization condition screening of proteins. *Crystal Growth & Design*, 2008, **8** (12): 4227–4232
- [41] Sergei T, Florante A Q. Influence of divalent cations in protein crystallization. *Protein Science*, 1995, **4**(9): 1914–1919
- [42] Sousa R. Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization. *Acta Crystallographica Section D*, 1995, **51**(3): 271–277
- [43] McPherson A, Cudney B. Searching for silver bullets: An alternative strategy for crystallizing macromolecules. *J Structural Biology*, 2006, **156**(3): 387–406
- [44] McPherson A, Nguyen C, Larson S, *et al.* Development of an alternative approach to protein crystallization. *J Structural and Functional Genomics*, 2007, **8**(4): 193–198
- [45] Larson S B, Day J S, Cudney R, *et al.* A novel strategy for the crystallization of proteins: X-ray diffraction validation. *Acta Crystallographica Section D*, 2007, **63**(3): 310–318
- [46] Larson S B, Day J S, Nguyen C, *et al.* Progress in the development of an alternative approach to macromolecular crystallization. *Crystal Growth & Design*, 2008, **8**(8): 3038–3052
- [47] DeTitta G T, Luft J R. Rate of water equilibration in vapor-diffusion crystallization: dependence on the residual pressure of air in the vapor space. *Acta Crystallographica Section D*, 1995, **51**(5): 786–791

Progresses on Developing Screening Kits for Protein Crystallization*

ZHANG Xian-Fang, LIU Jun, GUO Yun-Zhu, MA Xiao-Liang, YIN Da-Chuan**

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

Abstract Screening of protein crystallization conditions remains the major limiting step for three-dimensional structure determination, therefore developing more efficient screening kits is essential. Up to now the methods used for designing the screening kits include the incomplete factorial design, the sparse matrix sampling and the systematic screening. Based on these three methods, researchers have developed a series of crystallization screening kits which are proved applicable in practical protein crystallization. The development in designing the screening kits and the applications of the screening kits since 20th century were reviewed, and the future prospect in this field was discussed.

Key words protein crystallization, screening kits, incomplete factorial design, sparse matrix sampling, systematic screening

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00361

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (10772150).

**Corresponding author.

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

Received: July 8, 2010 Accepted: September 13, 2010

附录

Table S1 Commercially available Screening Kits

表 S1 现有商业试剂盒

公司	网站	试剂盒名称	条件个数	筛选方法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Crystal Screen	50	稀疏矩阵筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Crystal Screen 2	48	稀疏矩阵筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Crystal Screen Cryo	50	稀疏矩阵筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Crystal Screen 2 Cryo	48	稀疏矩阵筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	SaltRx HT	96	稀疏矩阵筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	MembFac	48	稀疏矩阵筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Natrix HT	96	稀疏矩阵筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	PEG / Ion HT	96	系统筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	PEGRx HT	96	系统筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Low Ionic Strength Screen	≤ 108	系统筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Grid Screen Salt HT	96	系统筛选法
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Index HT	96	其他
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Silver Bullets HT	96	其他
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Additive Screen HT	96	其他
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	Detergent Screen HT	96	其他
Hampton Research	http://www.hamptonresearch.com	PCT	4	其他
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	JCSG-plus HT	96	稀疏矩阵筛选法
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	Structure screen I + II HT	96	稀疏矩阵筛选法
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	MemGold	96	稀疏矩阵筛选法
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	ProPlex HT	96	稀疏矩阵筛选法
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	Stura Footprint	48	系统筛选法
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	Clear Strategy Screen I	24	系统筛选法
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	Clear Strategy Screen II	24	系统筛选法
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	Morpheus HT	96	系统筛选法
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	PACT premier HT	96	系统筛选法
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	Morpheus HT	96	系统筛选法
Molecular Dimensions	http://www.moleculardimensions.com	PGA Screen HT	96	其他
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen JCSG++ HT	96	稀疏矩阵筛选法
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen Basic HT	96	稀疏矩阵筛选法
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen Nuc-Pro HT	96	稀疏矩阵筛选法
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen Classic HT I	96	系统筛选法
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen Classic HT II	96	系统筛选法
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen PEG/Salt HT	96	系统筛选法
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen Pentaerythritol HT	96	系统筛选法
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen PACT++ HT	96	系统筛选法
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen Kinase HT	96	其他
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen Membrane HT	72	其他
Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com	JBScreen PHosphatase HT	96	其他
Qiagen	http://www.qiagen.com	EasyXtal Classics Suite	96	稀疏矩阵筛选法
Qiagen	http://www.qiagen.com	EasyXtal Classics Lite Suite	96	稀疏矩阵筛选法
Qiagen	http://www.qiagen.com	EasyXtal Anions Suite	96	系统筛选法
Qiagen	http://www.qiagen.com	EasyXtal Cations Suite	96	系统筛选法
Qiagen	http://www.qiagen.com	JCSG Core Suite I	96	其他
Qiagen	http://www.qiagen.com	JCSG Core Suite II	96	其他
Qiagen	http://www.qiagen.com	JCSG Core Suite III	96	其他
Qiagen	http://www.qiagen.com	JCSG Core Suite IV	96	其他
Qiagen	http://www.qiagen.com	EasyXtal MPD Suite	96	其他
Qiagen	http://www.qiagen.com	EasyXtal AmSO4 Suite	96	其他
Qiagen	http://www.qiagen.com	EasyXtal PEGs Suite	96	其他
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Beta-Mem	96	稀疏矩阵筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Wizard I	48	稀疏矩阵筛选法

Continued				
公司	网站	试剂盒名称	条件个数	筛选方法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Wizard II	48	稀疏矩阵筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Wizard III	48	稀疏矩阵筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Wizard IV	48	稀疏矩阵筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Cubic	48	稀疏矩阵筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Cyto I	48	稀疏矩阵筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Cyto II	48	稀疏矩阵筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Ozma PEG 1K	48	系统筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Ozma PEG 4K	48	系统筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Ozma PEG 8K	48	系统筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Ozma PEG 10K	48	系统筛选法
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	ADDit	96	其他
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	Precipitant Synergy	64	其他
Emerald Biosystems	http://emeraldbiosystems.com	pHat	96	其他
博亚捷晶	http://www.xtalquest.com	BioXtal	96	其他