

分析超速离心技术在蛋白质性质研究中的应用

李文奇^{1,2,3,4}, 褚文丹^{1,2,3,4}

(1.清华大学生命科学与医学研究院, 北京 100084; 2.国家蛋白质科学研究(北京)施清华基地, 北京 100084; 3.清华大学生命科学学院, 北京 100084; 4.清华大学结构生物学高精尖创新中心, 北京 100084)

摘要: 分析超速离心(AUC)技术是一种通过检测粒子在离心作用下的沉降过程, 分析获得其沉降系数、流体力学半径、摩尔质量、结合常数等水力学和热力学性质的方法, 被广泛应用于蛋白分子溶液性质的研究中。利用分析超速离心技术的沉降速率法和沉降平衡法, 通过紫外/可见光、干涉光以及荧光检测器来记录样品池中生物大分子径向浓度分布, 以获得其生物物理学特性。本文从分析超速离心技术在可溶性蛋白质性质鉴定, 膜蛋白质性质分析以及蛋白质自聚集分析三个方面介绍了分析超速离心技术在蛋白质性质研究中的应用。

关键词: 分析超速离心; 蛋白质性质研究

Applications of Analytical Ultracentrifugation Technology in Protein Property Research

Li Wenqi^{1,2,3,4}, Chu Wendan^{1,2,3,4}

(1. Institute of Biomedicine in Tsinghua University, Beijing, 100084; 2. National Protein Science Facility (Beijing), Tsinghua University, Beijing 100084; 3. School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084; 4. Beijing Advanced Innovation Center For Structural Biology, Beijing, 100084)

Abstract: Analytical ultracentrifugation has been utilized to capture the motion of macromolecules in centrifugation field, and is widely applied in assessing protein properties in solution, especially sedimentation coefficient, stokes radius, molecular weight, and hydrodynamic and thermodynamic parameters, including binding affinity. Utilizing sedimentation equilibrium and sedimentation velocity as the major experimental methods, different detectors record the radial concentration distribution of bio-macromolecules in the sample cell, and then determine the sedimentation properties. This paper introduces the application of analytical ultracentrifugation in

the study of protein properties from three aspects: identification of soluble protein properties, analysis of membrane protein properties and analysis of protein self-association.

Keywords: Analytical ultracentrifugation, Protein property research

1 引言

分析超速离心技术 (Analytical Ultracentrifuge, AUC) 可以通过监测蛋白质分子在离心场中的沉降和扩散过程来分析其沉降系数、扩散系数、流体力学半径、摩尔质量、结合常数等水力学和热力学性质, 被广泛应用于蛋白质性质的研究^[1]。1924 年, Svedberg 设计发明了第一台分析超速离心机, 用来分析胶体的尺寸与分布情况, 因此获得了 1926 年的诺贝尔化学奖。同期, Svedberg 利用分析超速离心技术分析测定了蛋白质的沉降系数和分子量, 扩展了分析超速离心技术的应用范围, 开启了该技术在生物大分子领域中的应用^[2-3]。近年来, 随着新型分析超速离心机的出现、计算能力提高、理论模型的完善, 分析超速离心技术越来越成熟, 其在蛋白质研究中的应用如蛋白分子量精确测定、蛋白分子构象变化、蛋白分子相互作用、膜蛋白、不同制剂对蛋白药物影响等方面的研究, 得到了极大的促进和发展。

分析超速离心机主要由动力系统和光学检测系统组成。动力系统包括驱动系统、真空系统、控制系统、防护系统、转子和样品池; 光学检测系统分别为紫外/可见光吸收检测器、干涉光检测器和荧光检测器^[4]。紫外/可见光检测器是当样品在某波长内有吸收时, 记录离心过程中样品在转子径向上不同位置的吸光度, 完成检测; 干涉光检测器应用了光的干涉作用, 当光透过参比液和样品时, 由于二者的折射率不同导致光程变化, 在收集器等光程的点发生位移, 干涉条纹位移距离与溶质浓度成正比。通过监测干涉条纹位移情况, 可以获得溶质浓度在转子径向上随时间的变化。荧光检测器通过二极管激光器发射出 488nm 的激发光, 经过一系列的光学元件, 最终产生波长为 505-565nm 的发射光到达光电倍增管 (PTM), PTM 接收到的发射光信号与样品在转子径向位置的函数关系, 可以作为进一步分析处理的实验数据。

分析超速离心技术两种经典的实验方法分别是沉降速率法和沉降平衡法。沉降速率实验是在较大的离心力作用下, 样品在较短时间内全部沉降到样品池底部, 在不同时间收集的数据可以反映该时刻在不同径向位置的溶质浓度, 通过解析 Lamm 方程和 Svedberg 方程可以得到沉降系数 (s)、扩散系数 (D) 和分子量 (M) 等信息。沉降平衡实验是在较低的转速下, 不同浓度的样品分别在不同转速下达到沉降与扩散的平衡, 对沉降平衡数据进行整体

分析 (global analysis) 后得到分子量等信息^[5-7]。分析超速离心数据处理程序较多, 如 DCDT, Ultrascan, SEDFIT/SEDPHAT 等, 由美国国立卫生研究院的 Peter Schuck 等人研发的 SEDFIT/SEDPHAT 软件, 由于其高可靠性、易操作和高效率, 成为目前应用最为广泛的分析软件之一。

2 分析超速离心技术蛋白质性质研究中的应用

2.1 分析超速离心技术在可溶性蛋白质性质鉴定中的应用

溶液中蛋白质分子量和聚合状态的测定方法主要有分析超速离心技术、多角度静态光散射技术和分子排阻层析技术, 其中分析超速离心是通过蛋白质的沉降行为, 结合蛋白和溶液的性质, 利用公式和计算推导出蛋白的分子量、沉降系数等, 得到的是蛋白质的绝对分子量^[8]。利用分析超速离心技术研究可溶性蛋白拟南芥 SnRK2.6 (sucrose non-fermenting1-related protein kinase 2.6) 的溶液性质, 分析 SnRK2.6 末端一段多聚酸性氨基酸序列对其溶液性质的影响。

采用美国 Beckman 公司的分析超速离心机 ProteomeLab XL-I, 选择 280 nm 波长对样品进行检测, 全长蛋白 SnRK2.6 和截短体蛋白 SnRK2.6 (1-332) 的吸光度均在 0.8 左右, 50000 rpm 离心 8 h 样品全部沉降于样品池底部, 收集数据, 用 SEDFIT (14.4f 版) 软件进行分析。最终得到全长蛋白 SnRK2.6 和截短体蛋白 SnRK2.6 (1-332) 的沉降系数分别为: 2.83S 和 2.9S, 拟合分子量分别为: 43.9 kDa 和 37.0 kDa, 与理论分子量比较得到两个蛋白在溶液状态下均以单体状态存在, 与 SLS 得到的结论一致, 结果见图 1。同时得到了蛋白的摩擦系数、水合半径以及轴长比等信息, 详见表 1。实验结果表明, 多聚酸性氨基酸序列可以引起蛋白分子轴长比增加, 在溶液中运动时摩擦系数增加, 水合半径明显增大, 分子排阻层析洗脱体积明显变小。

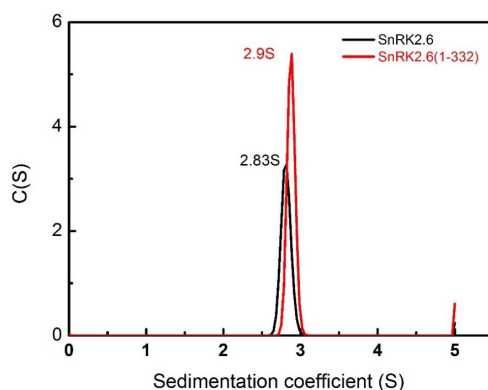


图 1 SnRK2.6 和 SnRK2.6 (1-332) 的沉降系数分析

表 1 SnRK2.6 和 SnRK2.6 (1-332) 的水力学参数结果

Protein	MW Theoretical (kDa)	MW AUC (kDa)	Sedimentation coefficient (S)	Frictional ratio (f/f ₀)	Stokes Radius (nm)	a/b (oblate)	a/b (prolate)
SnRK2.6	41.22	43.9	2.83	1.58	3.69	8.42	7.60
SnRK2.6 (1-332)	37.88	37.0	2.90	1.38	3.04	5.02	4.68

2.2 分析超速离心技术在研究膜蛋白质性质中的应用

膜蛋白是一类存在于生物膜内或与生物膜相互作用的蛋白质,包括锚定在生物膜内成为生物膜一部分的膜内在蛋白,以及临时附着在磷脂双分子层上或内在膜蛋白上的外周膜蛋白.内在膜蛋白镶嵌在质膜结构内且在水溶液中不稳定,在表达纯化过程中需要加入适当种类和浓度的去垢剂,与内在膜蛋白以一定比例结合形成膜蛋白-去垢剂复合物,才能稳定存在于水溶液中,AUC 沉降速率法结合大分子的沉降轨迹和热力学定律可以对膜蛋白的性质进行研究.通过紫外光与干涉光同时检测,分别解析数据,更全面和准确地了解蛋白质溶液的均一性,蛋白质的分子量,聚合状态,去垢剂与膜蛋白的摩尔比等信息^[9-10].分子排阻层析(SEC)技术可以通过与标准蛋白 Maker 曲线进行对比,依据洗脱体积对膜蛋白 TmrAB 的分子量进行拟合计算,从另一种角度了解膜蛋白的溶液性质.电镜负染技术可以比较直观地对蛋白样品进行观察,大致了解膜蛋白溶液的均一性^[11].

TmrAB 是一种药物转运蛋白,是由单体蛋白 TmrA (64.6kDa) 和 TmrB (67.9kDa) 形成异质二聚体,我们利用分析超速离心技术对 TmrAB 溶液中聚集状态进行研究.采用美国 Beckman 公司的分析超速离心机 ProteomeLab XL-I,调整样品浓度至 OD₂₈₀ = 0.7, 20°C, 45,000 rpm 的条件下进行沉降速率实验,同时进行紫外 280nm 和干涉光两种检测.超速离心 4 小时后将紫外扫描数据和干涉光扫描数据导入 Setfit 软件进行 c(s) 模型分析,运用 GUSSE 软件进一步分析膜蛋白 TmrAB 的分子量信息,得到膜蛋白 TmrAB 在 DDM 浓度为 0.08%的条件下拟合分子量为: 150.2kDa,证明膜蛋白 TmrAB 是以异二聚体的单体形式存在,与文献报道一致.

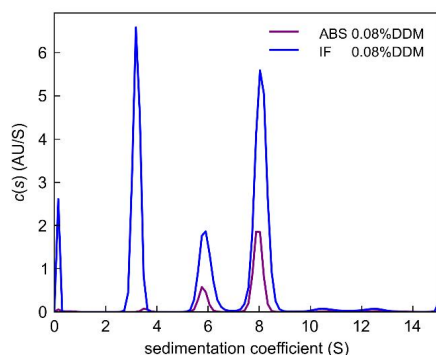


图2 0.08DDM%条件下 TmrAB 的的沉降系数分布

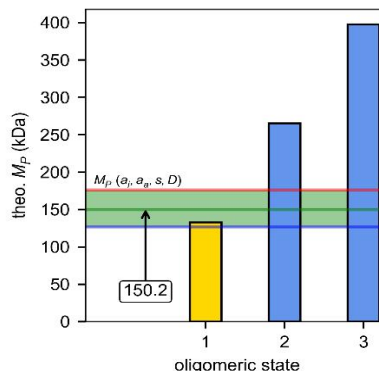


图3 GUSI 分析 TmrAB 聚合状态

经过 sedfit 分析发现，当去垢剂 DDM 浓度为 0.08% 时，膜蛋白 TmrAB 和去垢剂 DDM 的复合物沉降系数为 8.25S（如图 2），而且峰宽较窄，说明在此条件下膜蛋白 TmrAB 聚合状态非常均一。通过 GUSI 软件分析我们进一步得到（图 3），在 DDM 浓度为 0.08% 的条件下，去垢剂与蛋白质复合情况为 0.396gDDM/gTmrAB，去垢剂 DDM 与膜蛋白 TmrAB 的摩尔比为 116:1，复合物的分子量为 209.7kDa（见表 2）。

表 2 TmrAB 的分子量分析结果

Concentration of DDM	molar ratio DDM: Pro	Theoretical Mw of TmrAB	Calculated Mw of TmrAB	Theoretical Mw of TmrAB-DDM	Calculated Mw of TmrAB-DDM
0.08%	116:1	132.5 kDa	150.2 kDa	194.3 kDa	209.7(kDa)

2.3 分析超速离心技术在蛋白质自聚集研究中的应用

蛋白质特异性自聚集形成同源二聚体或更高聚合态的寡聚体是生物系统中的一种普遍现象，是生命活动中重要的调节机制。二聚体或寡聚体的形成可以增加蛋白质不同的结构和功能优势，如提高稳定性，调节活性等^[12]。分析超速离心技术可以通过监测蛋白质分子在离心场中的沉降和扩散过程来表征其相互作用结果，多种光学检测系统可以对蛋白质单体及其复合物的信号进行定量分析，提供了一种解析蛋白质复合物化学计量比和确定蛋白质结合情况的有效途径，已被广泛应用于亲和力在 pM 到 mM 之间的蛋白质自聚集系统研究^[13-14]。

本文首先以常见商用蛋白 β -lactoglobulin (β LGB) 的同型二聚作为模型，建立应用沉降速率法研究蛋白质自聚集的标准方法。采用美国 Beckman 公司的分析超速离心机 Optima AUC，将 β LGB 浓度调整至 230 μ M，100 μ M，50 μ M，20 μ M，10 μ M，2 μ M，1 μ M 和 0.5 μ M，在 20 $^{\circ}$ C，50,000 rpm 的条件下进行沉降速率（SV）实验，同时选择紫外波长 280 nm 和 230 nm 两种检测方式，每 6 min 采集一次数据，待样品全部离心至样品池底部时停止扫描，收集数据。运用 SEDFIT（16-1c 版）软件对不同浓度下样品进行数据分析，得到最佳拟合曲

线,然后将拟合数据导入 GUSSE 软件,标记不同浓度,生成 sw-isotherm 文件,最后将 isotherm 文件导入 SEDPHAT,运用“Monomer-Dimer Self-Association”模型进行拟合(图 4)得到 β LGB 的自聚集解离常数为 $K_d = 1.82 \pm 0.31 \mu\text{M}$,与文献报道基本一致^[15],说明实验方法可靠。

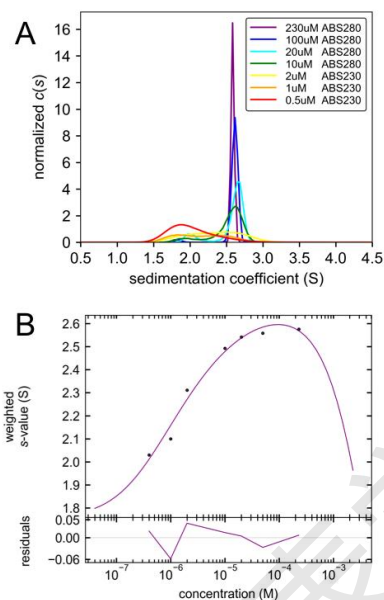


图 4 β LGB. 的自聚集分析

本文进一步利用该方法对脱落酸(ABA)受体蛋白 PYL3, 以及结合 ABA 的 PLY3 的自聚集平衡常数进行了测定。经过预实验最终选择 PYL3 蛋白浓度梯度为 128 μM , 64 μM , 32 μM , 16 μM , 4 μM 和 2 μM , 分别利用 280 nm 紫外吸收数据和干涉光数据对各浓度下实验结果进行 c(s)分布拟合, 再用 SEDPHAT 软件进行自聚集常数分析, 两种检测方式得到的结果相近, 溶液中 PYL3 蛋白自聚集平衡常数 $K_d=2.06 \mu\text{M}$ (见图 5)。对 PYL3+ABA 复合物进行相同的沉降速率实验分析, 结果显示与 ABA 结合的 PYL3 蛋白自聚集平衡常数 $K_d=82.90 \mu\text{M}$, 说明 ABA 的加入, 促进了 PYL3 二聚体的解离, 与文献研究结果一致, 进一步说明了用 AUC-SV 方法测定蛋白质自聚集亲和力的准确性。

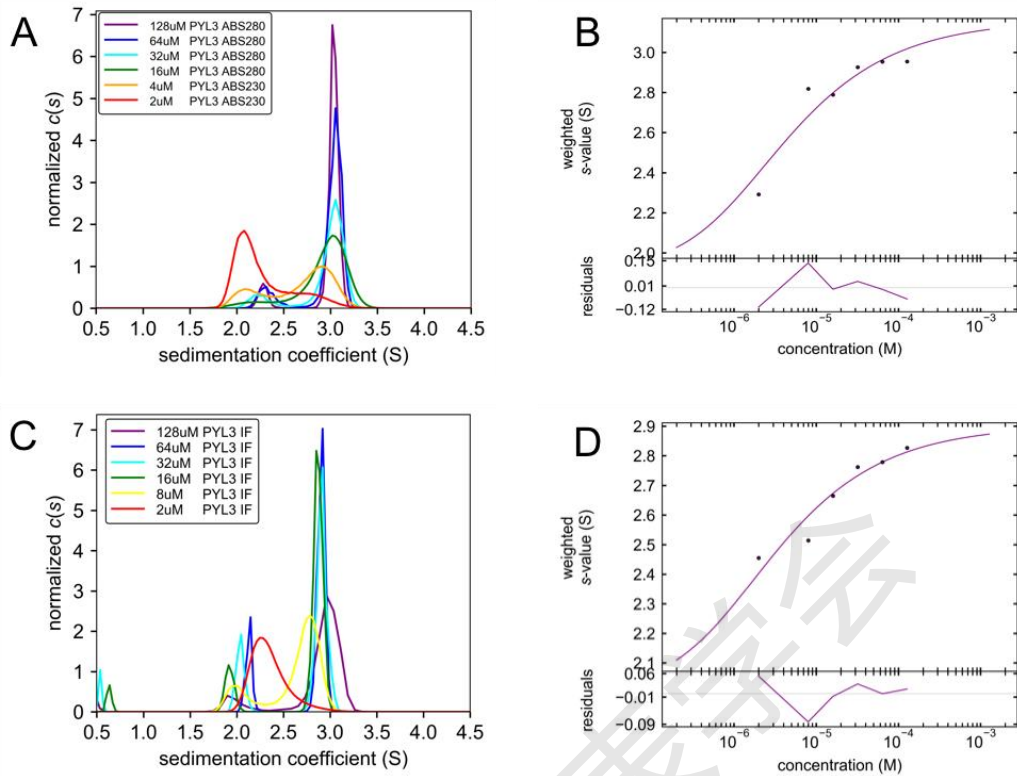


图5 PYL3的自聚集分析

3 结论与展望

溶液中蛋白质分子量和聚合状态的测定方法主要有分析超速离心技术、多角度静态光散射技术和分子排阻层析技术，多角度静态光散射技术是通过样品分离过程中对紫外信号、光散射信号、示差信号的综合分析，无需标准品作参照，即可得到准确的样品分子量及其分布。分子排阻层析是根据样品的大小和形状对样品进行分离，测定过程中需要用已知分子量的标准品做标准曲线，对于样品的形状、带电性等要求较高，更适于近球形的蛋白样品测定。其中分析超速离心是通过蛋白质的沉降行为，结合蛋白和溶液的性质，利用公式和计算推导出蛋白的分子量、沉降系数等，得到的是蛋白质的绝对分子量。

传统测定膜蛋白质质的方法都具有一定的局限性，比如 SDS-PAGE 能从一定程度上判断蛋白的纯度，粗略估算分子量，分子排阻层析可以通过出峰情况大致判断膜蛋白均一性，由于去垢剂的存在无法准确计算分子量，电镜负染仅可以直观确定蛋白质均一情况。而采用分析超速离心方法既可以根据 $C(s)$ 分布判断膜蛋白的均一性和纯度，也可以运用 setfit 和 GUSI 软件分析得到膜蛋白分子量、聚合状态、膜蛋白-去垢剂复合物的组成情况等多种信息，是一种研究膜蛋白质质的可靠手段。

由于蛋白质自聚集系统中是同一种蛋白质以不同聚合状态存在，蛋白质自聚集亲和力分析具有一定的难度，常见的表面等离子体共振技术 (SPR)、微量热泳动技术 (MST)、生物

膜干涉技术 (BLI) 等生物分子相互作用分析方法主要用来检测不同蛋白质之间的相互作用。分析超速离心技术 (Analytical Ultracentrifuge, AUC) 可以通过监测蛋白质分子在离心场中的沉降和扩散过程来表征其相互作用结果,多种光学检测系统可以对蛋白质单体及其复合物的信号进行定量分析,提供了一种解析蛋白质复合物化学计量比和确定蛋白质结合情况的有效途径。

基于扎实的热力学和流体力学理论,分析超速离心技术在蛋白质研究中得到越来越广泛的应用,但也存在一定的局限性。分析超速离心技术要求被检测样品纯度高、浓度适宜,对于细胞裂解液、血浆、尿液等含有高浓度、复杂成分的样品无法直接测量,但随着荧光检测器的发展和数据处理软件的优化,有望实现对高浓度样品或复杂成分样品的有效检测。目前已有部分应用案例如对高浓度的单克隆抗体以及模拟的人血浆样品的测试分析。分析超速离心机还可以进一步整合其他检测手段,如光散射检测法,扩展分析超速离心技术的应用范围。此外,目前的分析超速离心数据处理软件操作繁杂,进一步优化数据处理过程,也是未来的发展方向之一。

参考文献:

- [1] Zhao H, Brautigam C A, Ghirlando R, et al. Overview of current methods in sedimentation velocity and sedimentation equilibrium analytical ultracentrifugation. *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al], 2013, Chapter 20(Unit20 12.)*
- [2] The Svedberg H R. THE ULTRA-CENTRIFUGE, A NEW INSTRUMENT FOR THE DETERMINATION OF SIZE AND DISTRIBUTION OF SIZE OF PARTICLE IN AMICROSCOPIC COLLOIDS. *JAmerChemSoc, 1924, 46): 2677-2693.*
- [3] Svedberg T, Fahraeus R. A new method for the determination of the molecular weight of the proteins. *Journal of the American Chemical Society, 1926, 48(1): 430-438.*
- [4] Uchiyama S, Arisaka F, Stafford W F, et al. Analytical Ultracentrifugation. Instrumentation, Software, and Applications. *Anticancer Res, 2016, 36(8): 4376.*
- [5] Cole J L, Lary J W, T P M, et al. Analytical ultracentrifugation: sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. *Methods Cell Biol, 2008, 84(143-179.*
- [6] Schuck P, Macphee C E, Howlett G J. Determination of sedimentation coefficients for small peptides. *Biophys J, 1998, 74(1): 466-474.*

- [7] Schuck P, Perugini M A, Gonzales N R, et al. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys J*, 2002, 82(2): 1096-1111.
- [8] Gabrielson J P, Arthur K K. Measuring low levels of protein aggregation by sedimentation velocity. *Methods*, 2011, 54(1): 83-91.
- [9] Ebel C. Sedimentation velocity to characterize surfactants and solubilized membrane proteins. *Methods*, 2011, 54(1): 56-66.
- [10] Morris M B, Ralston G B. Biophysical characterization of membrane and cytoskeletal proteins by sedimentation analysis. *Subcell Biochem*, 1994, 23: 25-82.
- [11] Fabre L, Bao H, Innes J, et al. Negative Stain Single-particle EM of the Maltose Transporter in Nanodiscs Reveals Asymmetric Closure of MalK2 and Catalytic Roles of ATP, MalE, and Maltose. *J Biol Chem*, 2017, 292(13): 5457-5464.
- [12] Marianayagam N J, Sunde M, Matthews J M. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(11): 618-625.
- [13] Schuck P. On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Anal Biochem*, 2003, 320(1): 104-124.
- [14] Howlett G J, Minton A P, Rivas G. Analytical ultracentrifugation for the study of protein association and assembly. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10(5): 430-436.
- [15] Zhao H, Li W, Chu W, et al. Quantitative Analysis of Protein Self-Association by Sedimentation Velocity. *Curr Protoc Protein Sci*, 2020, 101(1): e109.