



SEC-MALS分析测定膜蛋白的分子量和寡聚态

膜蛋白因其可调节兴奋性、离子稳态、信号传导和溶质转运等许多细胞功能，而成为最重要的药物靶点之一。此外，与细胞内蛋白相比，当膜蛋白位于质膜上时，更容易被小分子药物或生物制剂所获得。膜蛋白的一个重要参数是其寡聚态，以及这种寡聚态能否以纯化形式保留。但其只能在天然状态下使用去垢剂或类似去垢剂的聚合物来溶解和纯化，因此膜蛋白分子量很难通过标准程序进行表征。这些添加剂从本质上改变了纯化膜蛋白的流体动力学半径，这使得通过尺寸排阻色谱法（SEC）来估算分子量变得颇具挑战性。将SEC与多角度光散射（MALS）联用可克服这一限制，因为多角度光散射可不受保留时间影响而测定分子量。结合折射率检测器（RID），UV、MALS和RI信号足以测量SEC中洗脱颗粒的分子量，并解析各成分（表面活性剂峰和蛋白质成分）的分子量。

实验条件

该项研究分析了MtTMEM175（功能未知的跨膜蛋白175），这是一种居海杆菌的离子通道。该离子通道由布鲁塞尔VIB VUB结构生物学中心的Janine Brunner教授和Stephan Schenck博士慷慨提供。

其人类异构体是一种溶酶体钾（K⁺）通道，因独特的选择性过滤功能而从所有其他已知钾通道中脱颖而出。MtTMEM175与帕金森病的发病具有密切的联系，因而成为人们日益关注的药物靶点。

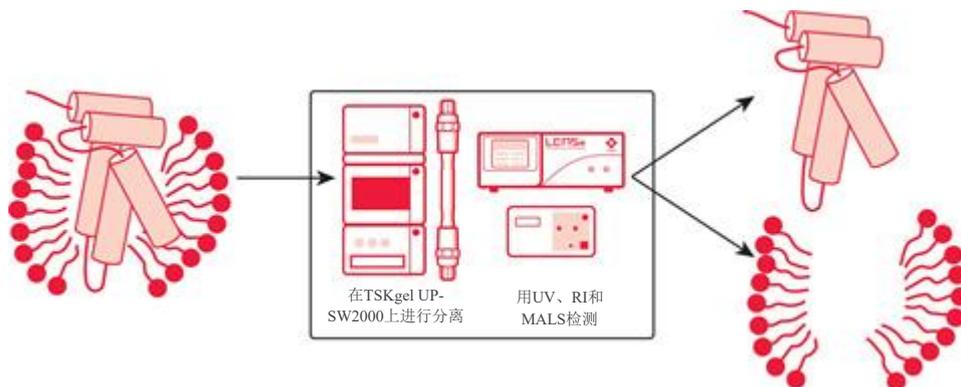
蛋白质在含有表面活性剂的缓冲液中溶解，缓冲液的成分如下：

135 mmol/L KCl、9 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠、10%甘油、0.03% n-十二烷基-β-麦芽糖苷（DDM），pH值7.5。蛋白质浓度为2 mg/mL。

仪器： Vanquish™ UHPLC
 检测： UV @ 280 nm
 折射率检测器
 LenS₃ MALS检测器
 色谱柱： TSKgel® UP-SW3000-LS（2 μm, 4.6 mmID × 30 cm）
 流动相： 0.1 mol/L磷酸钠 + 0.1 mol/L硫酸钠（pH 6.7）+ 0.03 % n-十二烷基-β-麦芽糖苷（DDM）
 流速： 0.35 mL/min
 温度： 21 °C
 数据评估： SECview™
 进样量： 10 μL
 校准标准： 牛血清白蛋白（BSA）

系统中的毛细管体积会在每个检测器响应之间产生延迟和峰展宽，这些延迟和峰展宽会在使用BSA的单一系统校准程序中得到校正。

图1 膜蛋白SEC-MALS分析流程图。



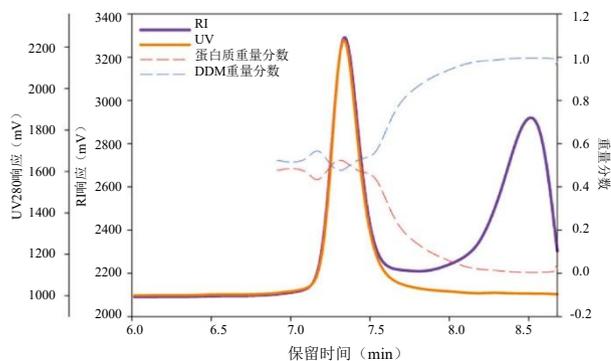
结果和讨论

分子量测定

在分析膜蛋白MtTMEM175时，采用了三种检测器：UV提供蛋白质含量，RI同时检测存在的DDM和蛋白质，MALS测定蛋白质-DDM复合物以及游离DDM的分子量。

图2显示了含有MtTMEM175膜蛋白和表面活性剂DDM的样品的RI和UV信号的叠加。

图2 MtTMEM175的UV和RI信号。



红色和蓝色虚线分别表示计算出的蛋白质和DDM重量分数。

在7.4分钟时，两个检测器信号（RI和UV）均出现了一个峰。封装在DDM表面活性剂峰中的膜蛋白在280nm的UV吸收率和RI中均产生响应，表明该峰与DDM蛋白复合物相对应。

随着保留时间的延长，UV信号下降回到基线，而在8.5分钟后，RI检测器信号上出现了第二个较大的峰。该峰代表洗脱液中的游离DDM，因DDM在280nm处不吸收UV，但可经由RI检测器测得。事实上，DDM在临界胶束浓度（CMC）以上会形成胶束。

利用RI与UV信号的比率以及蛋白质与DDM的比消光系数（ dA/dc ）和折射率增量（ dn/dc ），可根据公式1和2所示的原理来确定各成分的重量分数。表1列出了使用的 dA/dc 和 dn/dc 值。

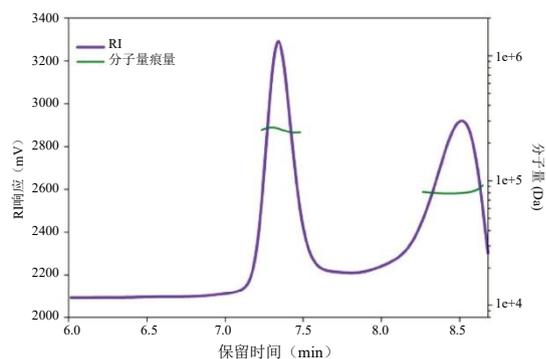
$$UV\ signal \propto dA/dc_{Protein} * Conc_{Protein} + dA/dc_{DDM} * Conc_{DDM} \quad (1)$$

$$RI\ signal \propto dn/dc_{Protein} * Conc_{Protein} + dn/dc_{DDM} * Conc_{DDM} \quad (2)$$

计算出的重量分数痕量也显示在图3中。蛋白质/表面活性剂复合物峰的蛋白质重量分数平均为48.9%，而游离DDM峰的蛋白质重量分数平均为0%。

利用算出的重量分数痕量，可得到整个色谱图的可变 dn/dc 痕量。该 dn/dc 痕量是准确测定此类双组分样品的分子量的必要数据。图3显示了得出的分子量分布：

图3 含有DDM的缓冲液中MtTMEM175的分子量分布。



膜蛋白复合物的总分子量测定为255.1 kDa。利用蛋白质重量分数平均值48.9%，可计算出蛋白质分子量为124.8 kDa。DDM带对总分子量的贡献为剩余的130.3kDa。这一结果与文献值具有较强的相关性¹。

将计算出的复合物中蛋白质的分子量除以单体的理论分子量，即可确定蛋白质的寡聚态：

$$\frac{124.8\ kDa}{29.5\ kDa} = 4.23 \quad (3)$$

该结果表明，在表面活性剂内，蛋白质形成了四聚体，这与所报告的一致，另外从晶体结构中也可明显看到这一点。

表1 所用分子 dn/dc 和 dA/dc 的文献值。

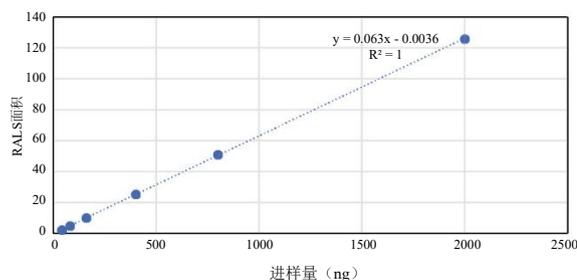
分子	dn/dc	dA/dc
MtTMEM185	0.185	1.404
DDM	0.144	0

灵敏度研究

为了在保持计算精度的同时评估检测器的灵敏度，研究人员通过改变进样量并将2 mg/mL的原液稀释至80 µg/mL，以降低进样量的方式注入样品。

RALS信号的主峰面积根据进样量绘制。图4显示了这项研究的粗略结果：

图4 RALS面积与进样量的关系。



事实证明，RALS响应是完全线性的，即使进样量低至40 ng亦然。因此，即使注入的样品中蛋白质含量较低，也可用于计算分子量。表2显示了根据不同进样量计算出的蛋白质/表面活性剂复合物的分子量。相应的相对标准偏差根据一式三份进样计算得出。

表2 根据不同进样量计算出的分子量和相应的相对标准偏差。

进样量[ng]	复合物平均分子量[kDa]	相对标准偏差[%]
10,000	255.1	0.05
4,000	255.0	0.09
800	252.1	0.04
80	252.8	0.26

产品信息

货号	产品描述
0040000	LenS ₃
0023546	TSKgel UP-SW3000-LS, 2 µm, 4.6 mm ID × 30 cm

有关分子量测定的结果表明，改变蛋白质进样量时所致的偏差微乎其微。10,000 ng与800 ng进样量之间的差异最大，差值为1.2%。此外，一式三份进样和每种进样量的相应分子量计算结果也很低。正如预期，80 ng进样量的相对标准偏差最大，但仍低至0.26%。综上，证明可将使用所述装置的SEC-MALS视为一种非常可靠的膜蛋白分子量测定方法，即使进样量低至80 ng也不例外。

结论

将SEC与MALS、UV和RI检测器结合使用，可以在表面活性剂存在的情况下准确测定膜蛋白的分子量，以及复合物中各成分对总分子量的贡献。此外，还能确定蛋白质与表面活性剂峰结合时的寡聚态。

TSKgel UP-SW3000-LS色谱柱能够有效地将复合物从游离DDM胶束中分离出来，并有助于降低噪声，发挥LenS₃ MALS检测器高灵敏度的特性。

参考文献

¹ Brunner JD、Jakob RP、Schulze T、Neldner Y、Moroni A、Thiel G、Maier T、Schenck S. Structural basis for ion selectivity in TMEM175 K⁺channels. *Elife*. 2020 Apr 8;9:e53683. doi: 10.7554/eLife.53683

TSKgel和Tosoh Bioscience是Tosoh Corporation的注册商标。
LenS和SECview是Tosoh Bioscience LLC的商标。
Vanquish是Thermo Fisher Scientific的商标