

·综述·

DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2019.11.1217

去污剂的性质及其在膜蛋白结构生物学中的应用

宫彩霞¹⁾, 马 骋²⁾*¹⁾ 浙江大学医学院附属第一医院老年病科, 杭州 310050;²⁾ 浙江大学医学院蛋白质平台, 杭州 310050)

摘要 膜蛋白在诸多生物过程,例如呼吸作用、光合作用、信号识别和分子转运等方面发挥重要作用。近年来,去污剂的快速发展,在一定程度上极大地推动了膜蛋白研究的进展。去污剂广泛应用于膜蛋白的提取、增溶、纯化、理化性质及结构研究。然而,如何选择合适的去污剂通常是一项复杂的任务。本文从以下两个方面入手,系统地描述了去污剂的重要理化性质及其在膜蛋白结构功能研究中的应用:(1)去污剂结构及其对去污剂性质和水溶性的影响,去污剂形成胶束的条件及影响去污剂胶束形成的其他因素。希望这些关于去污剂的基本性质和参数的介绍,可以为相关科研工作者选用去污剂提供理论依据。(2)去污剂抽提膜蛋白的流程和注意细节,对膜蛋白纯化时分子量测定的影响,膜蛋白研究中去污剂的置换与去除,以及膜蛋白结构与功能研究案例的归纳。希望这些应用细节与课题研究,能为相关科研工作者研究膜蛋白结构功能时提供经验借鉴。

关键词 膜蛋白;去污剂;结构生物学

中图分类号 Q51;Q71

Detergent Properties and Their Applications in Membrane Protein Structural Biology

GONG Cai-Xia¹⁾, MA Cheng²⁾*¹⁾ Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310050, China;²⁾ Protein Facility, Zhejiang University School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310050, China)

Abstract Membrane proteins are macromolecules that play important roles in many aspects of biological procedures, such as respiration, photosynthesis, signal recognition, molecule transport, and so on. In the past decades, studies of membrane proteins have greatly advanced due to the fast development of detergents. Detergents are widely used in extraction, solubilization, purification and biochemical studies of membrane proteins. However, choosing a suitable detergent for a specific protein for one project is a complicated task. Our review covers the two following aspects. First, the general structure of detergents and how it affects the properties and water solubility of detergents, and the important conditions when detergent aggregate as micelles and other parameters that can influent micelle formation. In this way, we hope that we could provide some general guidance in choosing detergents. Secondly, we also review the mechanism of how detergents extract membrane proteins from a lipid bilayer, as well as the consequences when determining the molecular weight of purified membrane proteins in detergent solutions, the methods to perform detergent exchange and removal, and examples from other research groups using different detergents in membrane protein structural and functional studies. We hope that these details and examples

收稿日期: 2019-05-21; 修回日期: 2019-07-28; 接受日期: 2019-08-10

浙江省中医药重点学科项目(No.2017-XK-A31)

* 通讯作者 Tel: 0571-88206835; E-mail: mac4@zju.edu.cn

Received: May 21, 2019; Revised: July 28, 2019; Accepted: August 10, 2019

Supported by Key Disciplines of Traditional Chinese Medicine in Zhejiang Province (No.2017-XK-A31)

* Corresponding author Tel: 0571-88206835; E-mail: mac4@zju.edu.cn

of detergent applications in membrane protein studies could be useful for researchers interested in membrane protein structural biology.

Key words membrane proteins; detergents; structural biology

在过去的数十年间,膜蛋白的研究取得了巨大进步,这在一定程度上和去污剂(detergent)的大力发展是分不开的。去污剂在膜蛋白的抽提和纯化等方面发挥了重要作用,作为两性(amphiphilic)分子,他们可以和疏水的膜蛋白相互作用,模拟脂质双分子膜的特性,保证其水溶性。

然而,去污剂的选择和使用通常是一个复杂的任务。可溶性并不意味着蛋白质一定处于其原始构象,也不意味着它在缓冲液中能维持稳定。一个能将膜蛋白从脂质膜中有效抽提的去污剂,也许在蛋白质纯化和生化研究中并不适用。适合于某种膜蛋白的去污剂,也许并不适用于其他膜蛋白。由于未见成系列的所谓“黄金准则”来指导膜蛋白研究中去污剂的选用,因此,理解不同类别去污剂的物理化学性质,将为人们后续膜蛋白研究中选用最优去污剂提供有力的指导。

1 去污剂分子的结构和性质

去污剂是结构非常多样化的两性化合物,属于表面活性剂,可以通过吸附于混合物(如水和油)的接触面来减少交界面的表面张力。去污剂在分子生

物学及生物化学等领域有诸多应用,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳、膜蛋白质的抽提、纯化、结晶和脂筏制备等。

一般情况下,去污剂由极性或带电荷的亲水头部和疏水性的烃基尾部组成(Fig. 1A)。而像CHAPS和CHAPSO这类去污剂,其尾部兼具亲水与疏水两个方面。传统的去污剂单体更像一个圆锥体,其亲水头部比疏水的尾部占有更大的空间,因此倾向于聚集成球型或椭球型的胶束(micelle)。胶束的疏水尾部形成胶束的核,亲水头部与溶液界面接触(Fig.1A,B)。与去污剂类似,脂质也具有类似的特性及结构,只是其单体更像一个圆柱体,它们的两条疏水尾部占据了和亲水头部相近的空间大小,因此更倾向于排列成脂质双分子层,或者分散成脂质体(Fig.1D,E,F)。脂质的这一倾向性可以用堆积参数(packing parameter) P 来描述:

$$P = v/al$$

(1)

其中, V 为疏水链的体积, a 为极性头部的横截面积, l 为疏水链的碳链长度。一般而言,当 $P < 1/3$ 时,倾向于形成球型胶束,当 $P > 1/2$ 时,倾向于排列成层状聚合物^[1]。

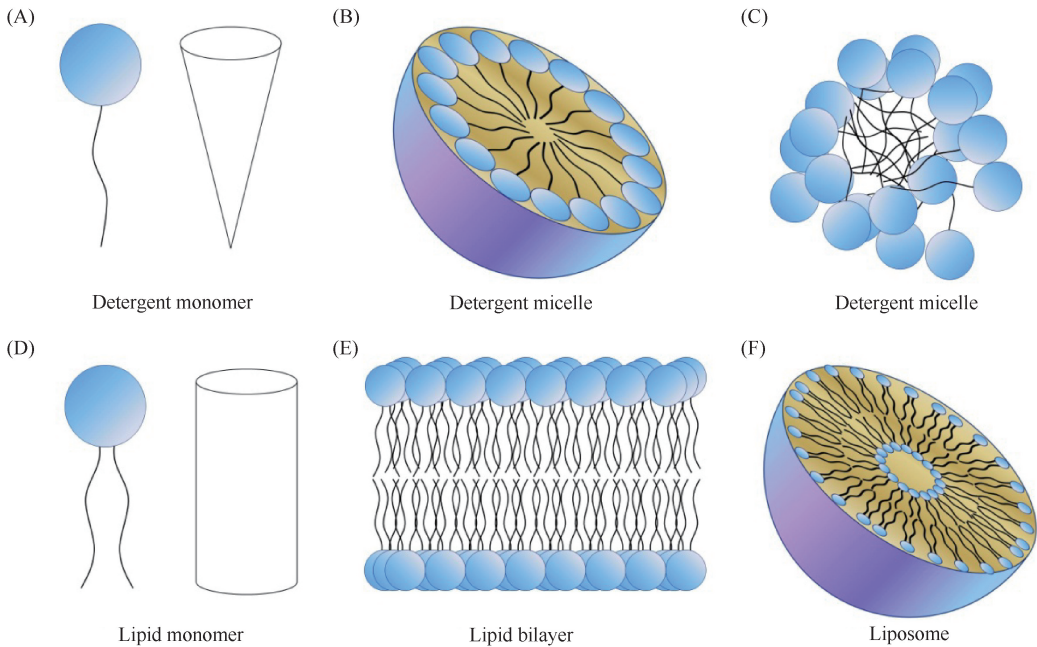


Fig.1 Detergents and lipids (A) Detergent monomer and its shape. (B) Cartoon of a detergent micelle. (C) New models of detergent micelle, showing asymmetrical structure and “rough” surfaces, which is caused by their disorganized alkyl tails that could transiently poke into the bulk solution. (D) Lipid monomer and its shape. (E) Lipid bilayer. (F) Cartoon of liposome

1.1 去污剂亲水头部和疏水尾部对其功能的影响

去污剂的水溶性是因为其亲水部分的贡献。去污剂根据其亲水性头部的带电性质可以分为离子型、非离子型和兼性离子型。离子型去污剂,其亲水头部带电荷为净电荷,包括十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)等。这些去污剂能有效地将蛋白质从脂质膜中抽提出来。然而,它们会打破蛋白质的分子内和分子间相互作用,导致蛋白质变性,是比较强力的去污剂。因此,它们在聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)和 DNA 分离中发挥重要作用,可以用来定量研究蛋白质的折叠与去折叠^[2-6]。但是,如果需要分离和纯化完好的膜蛋白,这些去污剂则较少使用。胆汁酸盐(如脱氧胆酸和胆酸钠)也是离子型去污剂,相比于 SDS 和 CTAB,它会更温和一些^[7]。

非离子型去污剂,其不带电的亲水头部包括麦芽糖苷和葡萄糖苷等。这些去污剂通常只是破坏脂质与脂质以及蛋白质与脂质间的相互作用,而非蛋白质与蛋白质的相互作用,因此比较温和,通常不会造成蛋白质变性。对这类去污剂而言,烃链较长的(C12~C14)比烃链较短的(C7~C10)更加温和,更不易变性蛋白质或者破坏蛋白质复合物^[7-9]。非离子型去污剂是膜蛋白纯化及结构研究中最常用的一类,例如十二烷基-β-D-麦芽糖苷(n-dodecyl β-D-maltoside, DDM),被广泛用于单颗粒冷冻电镜解析膜蛋白的结构,新开发的新戊二醇类(neopentyl Glycol, NG)去污剂也被广泛用于膜蛋白研究。

兼性离子型去污剂,例如 Fos-Cholines 和 CHAPS/CHAPSO 等,在它们的亲水头部同时带有正电荷和负电荷,这类化合物像非离子去污剂一样本身是电中性的,但又可以像离子型去污剂那样打破蛋白质与蛋白质的相互作用。膜蛋白,例如钾离子通道 KcsA^[10]和外膜蛋白复合物 BtuB: TonB^[11]的研究,便用到十二烷基二甲基氧化铵(n, n-dimethyldodecylamine n-oxide, LDAO),而大量是基于 NMR 的膜蛋白结构解析,用到了例如 Fos-Choline 12 等兼性离子去污剂^[12-14]。

去污剂能够插入非极性的脂质双分子层辅助膜蛋白的溶出,是由于其疏水尾部的贡献。膜蛋白的疏水部分和去污剂的疏水尾部相接触,被去污剂分子覆盖,防止溶出的膜蛋白在溶液中聚集沉淀。去污剂尾部所占空间的大小是由其烃链长度、烃链的

饱和度、以及去污剂拥有 1 条烃链还是 2 条烃链所决定的。去污剂疏水尾部的理化性质,例如链长、支链数目多少、芳香环的存在与否等会影响到去污剂分子的化学性质,以及其在水溶液中的聚集状态。举例来说,增加疏水链的长度会降低去污剂单体的水溶性,并导致其在胶束中聚集得更加紧密,而增加支链数目和链的不饱和度,会让去污剂单体在胶束中堆叠的更加疏松^[15]。

1.2 去污剂亲水头部和疏水尾部的共同作用的评价指标——亲水亲油平衡值

去污剂亲水头部和疏水尾部对去污剂分子的影响各不相同。它们共同的影响则由亲水亲油平衡值(hydrophilic-lipophilic balance, HLB)来描述^[1]。表面活性剂的 HLB 值一般为 0~40。HLB<10 表示该去污剂难溶于水,HLB 在 10~20 之间表示该去污剂拥有较好的水溶性^[16]。

值得一提的是,HLB 是根据去污剂的分子结构计算得出的,并非实验测量的参数;在比较非离子去污剂和离子型去污剂时并非那么适用,而在筛选非离子型去污剂时通常是一个有用的参数。Berger 等^[17]在对人腺苷受体 A3 的研究中发现,HLB 为 15 的去污剂能选择性地从膜中抽提 A3 受体,并在纯化后有很高的活性。有研究表明,HLB 在 12.4~13.5 之间的去污剂,可以有效抽提枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的 D-丙氨酸羧肽酶和藤黄微球菌(*M. luteus*)磷酸乙酰基戊酰五肽转位酶,并维持其稳定性^[18]。

HLB 和去污剂的堆积参数(*P*)也有一定的相关性,当某个去污剂的 HLB 值降低时,它的堆积参数 *P* 会增大^[19]。也即是说,如果一个去污剂的疏水性增大,它的单体则更倾向于堆叠成层状聚集体(lamellar aggregate),这种形状的变化对膜蛋白的增溶效果也会产生影响。

2 聚集成簇的去污剂分子——胶束

前文提到,传统的去污剂单体倾向于聚集成球型或椭球型的胶束。胶束是在疏水作用的推动下,表面活性剂分子的疏水基团彼此靠近,在溶液中聚集成簇。一般认为,胶束是球型的,然而现研究认为,去污剂胶束是非对称性的且表面并不“平滑”,去污剂的烃基尾并非有序的堆叠,而是穿插进溶液中^[19](见 Fig.1C)。

2.1 胶束形成与否的依据为临界胶束浓度

去污剂形成胶束是其重要的现象,每种去污剂

的特性可以用其临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC) 来描述。在给定温度下, 当去污剂浓度大于某个特定浓度时, 去污剂单体自发聚集成胶束, 这一浓度即为该去污剂的临界胶束浓度。

当去污剂浓度低于 CMC 时, 溶液中只有去污剂单体存在, 而高于 CMC 时, 溶液中的去污剂单体与胶束处于动态平衡。假设溶液中去污剂分子的总浓度 $C_0 > \text{CMC}$, 则溶液中去污剂单体的浓度即为 CMC。去污剂胶束的浓度计算还与聚集数相关 (详见 2.3)。在膜蛋白研究中, 通常使用的去污剂浓度的经验值是 2 倍于 CMC, 且去污剂和蛋白质的质量比至少为 4:1。当从脂质双分子膜中抽提膜蛋白时, 则会使用到更高浓度的去污剂, 且去污剂和脂质的摩尔比至少为 10:1。当去污剂浓度比较高时, 也通常会形成不与水混溶的非胶束相, 这些非胶束相通常是六角或者层状的液晶 (liquid-crystalline); 而在较高温度下, 去污剂胶束也可能无序地聚集, 这种相型被称作相分离 (phase separation)。

通常情况下, 去污剂的 CMC 值随着去污剂的疏水性增强而降低。因为胶束中相邻去污剂的头部同电性相斥, 拥有离子头部的去污剂的 CMC 值通常大于非离子型去污剂的^[15]; 拥有兼性离子头部的 CMC 值则通常小于离子型去污剂的 CMC。去污剂的疏水尾部对其 CMC 有着不同的影响。对于拥有直链烷基尾的去污剂, 当碳链长度低于 16~18 时, 随着碳链的增长, 其 CMC 逐渐降低; 但当碳链大于 18 时, 随着碳链增长, 去污剂变得更像脂质, 而难以形成分散的胶束。根据通常的实验经验, 在离子型去污剂的疏水尾添加亚甲基基团, 其 CMC 减半; 在兼性离子型去污剂和非离子去污剂的尾添加亚甲基, 其 CMC 降低 20%; 在支链上添加或者减少 1 个碳原子, 其对 CMC 的影响通常只有主链上添加或者减少 1 个碳原子的一半^[15]。

溶液的电解质也会对去污剂的 CMC 造成较大的影响。以 SDS 为例, 其在水中的 CMC 是 6 mmol/L, 在 150 mmol/L NaCl 的溶液中, CMC 是 1.4 mmol/L^[20], 在 350 mmol/L 的 NaCl 溶液中, 它的 CMC 降至 0.9 mmol/L。添加电解质会造成 CMC 值降低, 在其他的离子型去污剂中均有报道^[20, 21]。电解质对非离子型去污剂的影响则略显复杂。在溶液中添加 NaCl 通常也会造成非离子型去污剂, 例如 Triton X-100 的 CMC 值降低^[22], 但像添加 I^- , SCN^- 这类电荷小、半径大的离子, 则可能造成非离子型去污剂 CMC 值增高。

2.2 温度对胶束的影响——克拉夫特点和浊点

温度对溶液中去污剂的溶解度有着巨大的影响。克拉夫特点 (Krafft point) 是一个特定的温度。当温度高于克拉夫特点时, 去污剂的溶解度大于其 CMC 值, 当温度低于克拉夫特点时, 去污剂无法形成胶束。浊点 (cloud point) 也是一个特定的温度, 在这个温度下, 胶束开始聚集且不溶于水, 去污剂溶液变得浑浊^[15, 19]。随着温度的增高, 去污剂更倾向形成胶束, 并且随着胶束间的相互作用增多, 去污剂胶束更易形成较大的颗粒从水溶液中分离; 而这种相分离是可逆的。一般来说, 非极性的添加剂会增大去污剂的浊点, 极性的添加剂和盐会降低去污剂的浊点。因为膜蛋白通常需要在去污剂胶束的帮助下增加其溶解度, 因此, 了解去污剂胶束形成的温度和浓度条件是非常重要的。

2.3 胶束中去污剂分子的数目——聚集数

一个胶束中去污剂单体分子的数目即聚集数 (aggregation number), 其也是描述去污剂性质的重要参数。生化实验中经常使用的去污剂, 其聚集数一般在 50~100 之间^[8], 而像 CHAPS 和 CHAPSO 则是例外, 它们的聚集数在 10 左右。理想状态下, 在知晓一个去污剂 CMC 和聚集数 (N_A) 情况下, 在不含蛋白质的去污剂溶液中, 胶束的浓度 (C_M), 去污剂的总浓度 (C_0), 这几个参数遵从以下公式:

$$C_M = (C_0 - \text{CMC}) / N_A \quad (2)$$

与此同时, 对于一个单体分子量为 M 的去污剂, 其不含蛋白质的去污剂胶束的理论分子量 (MW_M) 也可以用以下公式确定:

$$MW_M = N_A \times M \quad (3)$$

3 去污剂在膜蛋白抽提和纯化中的应用

膜蛋白研究中, 首要的一步是将膜蛋白从脂质膜中抽提出来, 并保证它在溶液中的可溶性和具有功能。在膜蛋白的抽提过程中, 一般认为, 去污剂的单体先插入脂质双分子层中, 去污剂分子之间以及其与脂质间的相互作用, 让脂质双分子膜不再稳定, 形成去污剂和脂质混合物的碎片; 随着去污剂的添加, 最终脂质双分子膜完全解离。蛋白质由去污剂—脂质混合物的胶束包裹着, 溶解在水溶液中^[8, 23]。可以用相对较弱的去污剂抽提膜蛋白质, 从而令一部分原始的脂质仍然结合在蛋白质上; 也可以用相对较强的去除剂, 在抽提中尽可能地去除脂质; 如果后续基于功能或者稳定性的需要, 也可以再向蛋白质溶液中添加不同比例的脂质。

在膜蛋白的研究中,很多烷基糖苷类去污剂则被常用,例如拥有较短尾链的烷基麦芽糖苷和葡萄糖苷类去污剂,被成功地用于膜蛋白结晶^[24-30]。拥有较长尾链的十二烷基麦芽糖苷(DDM),能稳定不同聚合状态的 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)及视紫红质^[31]。近几年,也有很多离子通道及蛋白质复合物,例如 SK4, Slo2.2 等钾离子通道, Nav1.2, Nav1.7 等钠离子通道, TRPM4 等钙离子通道, PKD1/PKD2 复合物等,均使用 DDM 抽提纯化,最终通过单颗粒冷冻电镜技术解析了结构^[32-37]。膜蛋白也可以重构到脂质—去污剂的混合胶束中,模拟脂质双分子膜的环境,细菌的视紫红质就曾在多种脂质—去污剂的混合系统中研究它的重折叠^[38, 39]。

在膜蛋白研究中,使用去污剂有许多重要的细节需要考虑。根据实验需求的不同,需要选择不同纯度和均一度的去污剂。例如,用于结晶和结构解析的去污剂,其纯度要求会更加严格,需要尽可能去除乙醇、酰胺类化合物、巯基类、过氧化物、盐以及羰基化合物等杂质。因为杂质中的氧化剂、过氧化物会与蛋白质的氨基酸相互作用,进而改变蛋白质的初级结构和分子量,甚至会抑制蛋白质与蛋白质的相互作用。与此同时,这类实验对去污剂的均一度也要求极高,需要去污剂尽可能地只含有一种组分。常用的去污剂 n-dodecyl β -D-maltoside (DDM) 纯度

高达 99% 甚至 99.5% 以上,但是它的组分中通常混有少量的 n-dodecyl α -D-maltoside, Triton 和 Tween 的纯度也可以达到很高。但它们的组分中存在聚氧乙烯链的差异导致的非均一性,使它们在结晶研究中并不适用。

当测量去污剂溶液中膜蛋白的分子量时也需注意,膜蛋白由去污剂胶束包裹并形成蛋白质-胶束的复合体(见 Fig.2),因此需要考虑胶束的分子量。理想状态下,如果膜蛋白比较小,且一个胶束包裹一个膜蛋白,那么蛋白质-胶束复合体的分子量等于蛋白质分子量和胶束理论分子量(见公式 3)的和。但实际情况通常更加复杂,而且大的膜蛋白更倾向于结合更多的去污剂分子。因此,通过分子排阻层析(size exclusion chromatograph, SEC)纯化蛋白质时,水溶性蛋白质的分子量可以通过其出峰时间/出峰体积,并结合标准样进行相对准确的计算,但该方法对于膜蛋白并不适用;这样根据出峰时间/出峰体积计算获得的仅是蛋白质-胶束复合物的分子量,需要进一步结合其他检测,例如多向光散射等,来判断蛋白质、去污剂胶束对复合物分子量的贡献分别是多大,进而确定层析中某个峰对应膜蛋白的聚合状态。这种分子排阻层析和多向光散射的联用的方法,称作 SEC-MALLS(size exclusion chromatograph-multiangle laser light scattering)。

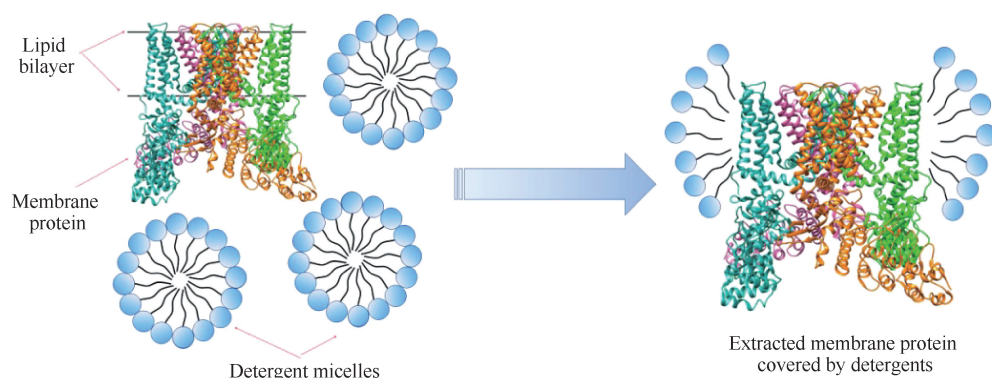


Fig.2 Diagram of a membrane protein extracted from lipid bilayers by detergents

在膜蛋白研究中,根据实验的需要,有时也需移除或者置换溶液中的去污剂。根据去污剂 CMC 值的不同,采取不同的方案进行。对于 CMC 值较大的去污剂,可以通过透析法移除或置换成别的去污剂^[7]。对于 CMC 值相对较小的去污剂,则需要借助疏水填料的吸附作用达到移除的目的,吸附了去污

剂的填料再通过离心或者过滤移除^[40]。根据我们的经验,使用疏水填料吸附去污剂时,通常会造成大量蛋白质损失,因此在设计实验时,如果已知后续操作是需要移除去污剂的(比如构建脂质体),本文更倾向于从最初就选用 CMC 较大的去污剂,然后用透析法加以移除。

4 问题与展望

膜蛋白的重要性不言而喻,在呼吸作用、光合作用、冷热光痛感觉感受和信号转导等各个方面都发挥了无法替代的作用,而去污剂又是膜蛋白研究中不可或缺的试剂。因为去污剂的两性特征,它们可以插入生物膜中,抽提并维持膜蛋白的可溶性。它们在生化及分子生物学领域也有诸多应用。然而,至今为止未见一个万能的方法用于挑选适合自己课题研究的去污剂。本综述总结了去污剂的理化性质和各种参数,介绍了诸多去污剂在膜蛋白研究中成功应用的实例,总结了前人对比较研究各类去污剂对膜蛋白可溶性、活性及结构影响的经验^[41-45]。这些信息可以为相关科研工作者在日后研究中,为去污剂的筛选提供借鉴和帮助。

在实际研究中,我们所遇到的问题以及去污剂的应用范围,远不止本文中所提到的这些。例如,去污剂的浓度以及不同去污剂的选用,会影响纯化后的蛋白质的折叠和结构。在本文研究一个 Nramp 家族金属离子转运蛋白质时,圆二色谱结果显示,其在 DM (decyl maltoside), LMNG (lauryl maltose neopentyl glycol), LDAO 等不同去污剂溶液中, α -螺旋和 β -折叠的比例是不同的。类似的, Masoud Jelokhani-Niaraki 等人^[46]在研究线粒体解偶联蛋白-1 (Ucp-1) 时,也发现其在 β -OG (octyl β -D-glucopyranoside), LDAO, DDM 中的 α -螺旋和 β -折叠的比例不同,而 Ucp-1 作为一个跨膜蛋白, β -折叠比例过大则意味着蛋白质在这种去污剂环境中已部分变性。这种因为去污剂选用造成的蛋白质结构改变或蛋白质变性,给结构和功能研究带来更多不确定因素,而这个问题不仅仅是“选用更温和的去污剂”就能简单解决的。再例如,在结构研究中,即使是用最近比较热的冷冻电镜技术,对蛋白质的浓度要求一般也比较高。因此,通常需要使用超滤膜对蛋白质进行浓缩。而在膜蛋白浓缩过程中,无法避免的,是去污剂也被极大地浓缩了;这些存在于溶液中的高浓度的去污剂成分,会影响晶体以及冷冻制样时玻璃态冰的形成,亦会影响冷冻电镜检测时图像的衬度。前文已提到,CMC 较高的去污剂相对比较容易去除。那么,对于 CMC 比较低去污剂呢? Holger Stark^[47]等人发展出的 GraDeR 方法,就是利用了 LMNG 的 CMC 值比较低的特性,结合甘油密度梯度离心,温和地去除样品中过量的去污剂分子。再例如,单颗粒冷冻电镜研究蛋白质结构时,蛋白质

样品吸附到气液界面而变性,是一个非常常见且难以解决的问题。之前的研究经验发现,在样品中添加极低浓度的去污剂,一定程度上可以改善这种状况;这个方法在膜蛋白和非膜蛋白样品中都有应用。最近的研究中,颜宁组^[48]的 Na^+ 离子通道 Nav1.4 通过添加 0.001% SDS 改善了样品状态, Seth A. Darst 组^[49]报道称,添加 1 CMC 浓度的 CHAPSO 可以最大程度地减少细菌 RNA 聚合酶颗粒吸附至气液界面而变性。

去污剂在膜蛋白研究中的应用广泛而复杂多变,希望随着研究不断的深入和研究内容的逐步积累,让人们能从这些看似头绪纷杂的应用经验中,总结出更有规律性与系统性的应用建议。另一方面,虽然去污剂种类繁多,现在比较广泛用于膜蛋白结构研究的去污剂分子,最新的也是 8~10 年前发展的应用^[45, 50],也许日后,会有更多的适用于膜蛋白结构与功能研究的去污剂分子有待我们挖掘。

致谢 感谢浙江大学医学院公共技术平台、浙江大学冷冻电镜中心及浙江省中医药重点学科项目 (2017-XK-A31) 提供的支持和帮助。

参考文献 (References)

- [1] Neugebauer JM. Detergents: an overview[J]. *Methods Enzymol*, 1990, **182**: 239-253
- [2] Allen SJ, Curran AR, Templer RH, *et al.* Folding kinetics of an alpha helical membrane protein in phospholipid bilayer vesicles [J]. *J Mol Biol*, 2004, **342**(4): 1279-1291
- [3] Compton EL, Farmer NA, Lorch M, *et al.* Kinetics of an individual transmembrane helix during bacteriorhodopsin folding [J]. *J Mol Biol*, 2006, **357**(1): 325-338
- [4] Lau FW, Bowie JU. A method for assessing the stability of a membrane protein[J]. *Biochemistry*, 1997, **36**(19): 5884-5892
- [5] Otzen DE. Folding of DsbB in mixed micelles: a kinetic analysis of the stability of a bacterial membrane protein[J]. *J Mol Biol*, 2003, **330**(4): 641-649
- [6] Sehgal P, Mogensen JE, Otzen DE. Using micellar mole fractions to assess membrane protein stability in mixed micelles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1716**(1): 59-68
- [7] Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1666**(1-2): 105-117
- [8] le Maire M, Champeil P, Moller JV. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1508**(1-2): 86-111
- [9] Prive GG. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins[J]. *Methods*, 2007, **41**(4): 388-397
- [10] Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, *et al.* Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors[J]. *Nature*, 2001, **411**(6838): 657-661
- [11] Shultz DD, Purdy MD, Banchs CN, *et al.* Outer membrane active transport: structure of the BtuB: TonB complex [J]. *Science*, 2006, **312**(5778): 1396-1399
- [12] Evanics F, Hwang PM, Cheng Y, *et al.* Topology of an outer-membrane enzyme: Measuring oxygen and water contacts in solution NMR studies of PagP[J]. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**(25): 8256-8264
- [13] Hwang PM, Choy WY, Lo EI, *et al.* Solution structure and

- dynamics of the outer membrane enzyme PagP by NMR[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**(21): 13560-13565
- [14] Oxenoid K, Chou JJ. The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(31): 10870-10875
- [15] Rosen MJ, Kunjappu JT. Surfactants and interfacial phenomena. 4th Ed[M]. Hoboken NJ: Wiley, 2012
- [16] Krugliakov PM. Hydrophile-lipophile balance of surfactants and solid particles: physicochemical aspects and applications. 1st Ed [M]. Amsterdam; New York: Elsevier Science B V, 2000
- [17] Berger BW, Garcia RY, Lenhoff AM, *et al.* Relating surfactant properties to activity and solubilization of the human adenosine a3 receptor[J]. *Biophys J*, 2005, **89**(1): 452-464
- [18] Umbreit JN, Strominger JL. Relation of detergent HLB number to solubilization and stabilization of D-alanine carboxypeptidase from *Bacillus subtilis* membranes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973, **70**(10): 2997-3001
- [19] Garavito RM, Ferguson-Miller S. Detergents as tools in membrane biochemistry[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(35): 32403-32406
- [20] Corrin ML, Harkins WD. The effect of salts on the critical concentration for the formation of micelles in colloidal electrolytes[J]. *J Am Chem Soc*, 1947, **69**(3): 683-688
- [21] Feitosa E, Brazolin MR, Naal RM, *et al.* Structural organization of cetyltrimethylammonium sulfate in aqueous solution: The effect of Na₂SO₄[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2006, **299**(2): 883-889
- [22] Ray A, Nemethy G. Effects of ionic protein denaturants on micelle formation by nonionic detergents[J]. *J Am Chem Soc*, 1971, **93**(25): 6787-6793
- [23] Almgren M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1508**(1-2): 146-163
- [24] Raman P, Cherezov V, Caffrey M. The Membrane Protein Data Bank[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, **63**(1): 36-51
- [25] Wiener MC. A pedestrian guide to membrane protein crystallization[J]. *Methods*, 2004, **34**(3): 364-372
- [26] Pebay-Peyroula E, Garavito RM, Rosenbusch JP, *et al.* Detergent structure in tetragonal crystals of OmpF porin[J]. *Structure*, 1995, **3**(10): 1051-1059
- [27] Rosenow MA, Brune D, Allen JP. The influence of detergents and amphiphiles on the solubility of the light-harvesting I complex[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, **59**(Pt 8): 1422-1428
- [28] Istvan ES, Hasemann CA, Kurumbail RG, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of fructose 6-phosphate, 2-kinase: fructose 2, 6-bisphosphatase[J]. *Protein Sci*, 1995, **4**(11): 2439-2441
- [29] Hirsch A, Wacker T, Weckesser J, *et al.* Purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray results from *Paracoccus denitrificans* porin[J]. *Proteins*, 1995, **23**(2): 282-284
- [30] Allen JP. Crystallization of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* in a new tetragonal form[J]. *Proteins*, 1994, **20**(3): 283-286
- [31] Jastrzebska B, Fotiadis D, Jang GF, *et al.* Functional and structural characterization of rhodopsin oligomers[J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**(17): 11917-11922
- [32] Pan X, Li Z, Huang X, *et al.* Molecular basis for pore blockade of human Na(+) channel Nav1.2 by the mu-conotoxin KIIIA[J]. *Science*, 2019, **363**(6433): 1309-1313
- [33] Shen H, Liu D, Wu K, *et al.* Structures of human Nav1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins[J]. *Science*, 2019, **363**(6433): 1303-1308
- [34] Su Q, Hu F, Ge X, *et al.* Structure of the human PKD1-PKD2 complex[J]. *Science*, 2018, **361**(6406).pii: eaat9819
- [35] Lee CH, MacKinnon R. Activation mechanism of a human SK-calmodulin channel complex elucidated by cryo-EM structures[J]. *Science*, 2018, **360**(6388): 508-513
- [36] Hite RK, MacKinnon R. Structural Titration of Slo2.2, a Na⁺-Dependent K⁺ Channel[J]. *Cell*, 2017, **168**(3): 390-399. e11
- [37] Guo J, She J, Zeng W, *et al.* Structures of the calcium-activated, non-selective cation channel TRPM4[J]. *Nature*, 2017, **552**(7684): 205-209
- [38] Chen GQ, Gouaux E. Probing the folding and unfolding of wild-type and mutant forms of bacteriorhodopsin in micellar solutions: evaluation of reversible unfolding conditions[J]. *Biochemistry*, 1999, **38**(46): 15380-15387
- [39] London E, Khorana HG. Denaturation and renaturation of bacteriorhodopsin in detergents and lipid-detergent mixtures[J]. *J Biol Chem*, 1982, **257**(12): 7003-7011
- [40] Rigaud JL, Mosser G, Lacapere JJ, *et al.* Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins[J]. *J Struct Biol*, 1997, **118**(3): 226-235
- [41] Aeed PA, Sperry AE, Young CL, *et al.* Effect of membrane perturbants on the activity and phase distribution of inositol phosphorylceramide synthase; development of a novel assay[J]. *Biochemistry*, 2004, **43**(26): 8483-8493
- [42] Avelandano MI, Diaz RS, Regueiro P, *et al.* Solubilization of myelin membranes by detergents[J]. *J Neurochem*, 1991, **57**(1): 250-257
- [43] Banerjee P, Joo JB, Buse JT, *et al.* Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents[J]. *Chem Phys Lipids*, 1995, **77**(1): 65-78
- [44] Casey JR, Reithmeier RA. Detergent interaction with band 3, a model polytopic membrane protein[J]. *Biochemistry*, 1993, **32**(4): 1172-1179
- [45] Chae PS, Rasmussen SG, Rana RR, *et al.* Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins[J]. *Nat Methods*, 2010, **7**(12): 1003-1008
- [46] Hoang T, Smith MD, Jelokhani-Niaraki M. Expression, folding, and proton transport activity of human uncoupling protein-1 (UCP1) in lipid membranes: evidence for associated functional forms[J]. *J Biol Chem*, 2013, **288**(51): 36244-36258
- [47] Hauer F, Gerle C, Fischer N, *et al.* GraDeR: Membrane Protein Complex Preparation for Single-Particle Cryo-EM[J]. *Structure*, 2015, **23**(9): 1769-1775
- [48] Pan XJ, Li ZQ, Zhou Q, *et al.* Structure of the human voltage-gated sodium channel Na(v)1.4 in complex with beta 1[J]. *Science*, 2018, **362**(6412).pii: eaau2486
- [49] Chen J, Noble AJ, Kang JY, *et al.* Eliminating effects of particle adsorption to the air/water interface in single-particle cryo-electron microscopy: Bacterial RNA polymerase and CHAPSO[J]. *J Struct Biol*, February 2019, DOI: 10.1016/j.jsbx.2019.100005
- [50] Chae PS, Rasmussen SG, Rana RR, *et al.* A new class of amphiphiles bearing rigid hydrophobic groups for solubilization and stabilization of membrane proteins[J]. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 2012, **18**(31): 9485-9490