



溶液中蛋白质寡聚态的表征分析

聂瑶^{1,2}, 李双利^{1,2}, 李涛^{1,2}, 朱江¹, 胡锐¹, 蒋滨¹, 张许¹, 杨运煌¹, 刘买利^{1*}

1. 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 武汉磁共振中心, 中国科学院武汉物理与数学研究所, 武汉 430071

2. 中国科学院大学, 北京 100049

*通讯作者, E-mail: ml.liu@wipm.ac.cn

收稿日期: 2017-07-13; 接受日期: 2017-09-11; 网络版发表日期: 2017-10-27

国家自然科学基金(编号: 21575155)和中国科学院“百人计划”资助项目

摘要 分析溶液中蛋白质的寡聚态, 是研究其结构和功能的必要前提和基础. 目前常用的生化实验方法有非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、体积排阻色谱、光散射法和分析超速离心法等, 基本属于定性或半定量分析, 精准性不足. 此外, 液体核磁共振和非变性质谱方法也可以对蛋白质的寡聚态进行表征分析. 为了综合分析和比较不同方法的异同, 我们应用体积排阻色谱、液体核磁共振和非变性质谱, 对研究条件下以单体和二聚体存在为主的蛋白质TGIF1-HD和SP_0782进行了寡聚态的分析. 结果表明, 体积排阻色谱和液体核磁共振可以估算蛋白质的分子量及不同寡聚态的相对比例, 液体核磁共振还可以提供蛋白质折叠及是否存在不同构象等信息, 而非变性质谱在定量分析方面独具优势.

关键词 蛋白质, 寡聚态, 体积排阻色谱, 液体核磁共振, 非变性质谱

1 引言

生物体内的蛋白质往往通过与自身或其他蛋白质相互作用形成不同的寡聚体, 从而发挥相应的生物学功能^[1]. 寡聚体的形成可以提高蛋白质的稳定性、调控蛋白质活性以及增加蛋白质功能的多样性^[2]. 例如, 半胱天冬酶-3只有在二聚体状态下才能被活化, 进而在细胞凋亡过程中发挥作用^[3]; G-蛋白偶联受体以同源二聚体形式与下游G蛋白三聚体互作而传递信号^[4,5]; 水通道蛋白则通过形成同源四聚体来选择性地转运水分子^[6]; 而II型限制性内切酶通过形成同源二聚体可以同时增加与DNA结合的亲和力和特异性^[7]. 如果蛋白质不能正常地形成寡聚体^[8], 或产生异常的聚集^[9], 则很可能会导致疾病发生. 鉴于蛋白质的寡聚形式对

其行使功能的重要性, 因此测定蛋白质的寡聚状态就显得尤为重要. 同时, 在离体条件下, 利用表达纯化得到的重组蛋白来研究蛋白质的结构和功能时, 也需要对重组蛋白的寡聚状态进行准确的分析.

目前测定溶液中蛋白质分子寡聚状态的常用生化实验方法有非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)^[10]、体积排阻色谱法(SEC)^[11]、超速离心法(UC)^[12]和光散射法(LS)^[13]等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳是一种经典的生物化学研究方法, 因其操作简单、快速和成本极低而被广泛应用. 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)可以通过与分子量标准对照来粗略判定重组蛋白的分子量^[14], 而Native-PAGE可以初步地判断重组蛋白是否存在多种寡聚状态^[15]. 体积排阻色谱法是一种无损的快速分析方法, 根据流出峰体积与标

引用格式: 聂瑶, 李双利, 李涛, 朱江, 胡锐, 蒋滨, 张许, 杨运煌, 刘买利. 溶液中蛋白质寡聚态的表征分析. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1450–1457
Nie Y, Li S, Li T, Zhu J, Hu R, Jiang B, Zhang X, Yang Y, Liu M. Characterizations of protein oligomeric states in solution. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1450–1457, doi: 10.1360/N032017-00114

准蛋白对照可以粗略估计分子量及其寡聚形式, 根据流出峰的个数和峰面积可以估算不同寡聚形式的相对比例. 然而, 由于标准蛋白与被测蛋白在分子形状上往往存在差异, 在判定寡聚形式, 尤其是五聚体以上的高级寡聚形式时准确性较差^[16]. 光散射法通常与SEC联用来研究蛋白质的粒径、不同粒径组分的分布比例以及分子形态等, 以克服SEC准确性较差的问题^[17]. 超速离心方法虽然可以比较准确地获得蛋白质寡聚形式和不同寡聚形式的相对比例, 但传统的超速离心法操作繁琐、平衡时间长, 目前已较少应用. 新一代更加高效的分析型超速离心(AUC)的分析精度更高, 但是对样品纯度要求高, 而且连续分析多个样品需要花费大量时间^[18].

应用上述某一种方法, 对溶液中的蛋白质寡聚状态进行定性或半定量表征是目前的常规分析模式. 除了这些方法之外, 液体核磁共振(NMR)^[19]和非变性质谱(MS)^[20]方法也可以表征分析蛋白质寡聚态. 液体核磁共振不仅可以研究蛋白质的寡聚状态, 而且可以提供蛋白质的折叠情况以及是否存在不同的构象等信息, 是蛋白质的NMR结构研究前的常规预实验. 不过, NMR方法仍是一种估算方法, 且蛋白质样品需要进行同位素标记, 核磁谱仪价格昂贵. 蛋白质的常规质谱分析, 通常是在蛋白质的变性条件下测定蛋白质单体的分子量, 灵敏度高, 现广泛应用于生物大分子研究中^[21,22]. 这种变性条件下的质谱, 在样品处理阶段, 采用了强酸(或强碱)性条件和高有机相溶液体系, 对以非共价键结合的蛋白多聚体来说, 可能导致多聚体蛋白质解离成不同形式的寡聚体, 因此难于精确测定多聚体蛋白中的不同寡聚体的相对比例. 近年来发展的蛋白质非变性条件下的质谱(Native-MS)分析, 不会改变蛋白质的高级结构(如蛋白质的四级结构), 原因在于: (1) 样品处理时, 采用乙酸铵中性缓冲体系, 避免强酸(或强碱)性条件和高有机相溶液体系导致的蛋白质变性; (2) 离子化时避免高温及高电压条件, 采用如纳升静态喷雾等柔和的离子化方式. 因此, 非变性质谱是在蛋白天然状态下, pH接近中性时进行分析, 对以非共价键结合的蛋白质多聚体而言, 是测定它们不同寡聚形式的分子量及相对含量的有力工具^[21]. 此外, 变性质谱法采用含有乙腈的缓冲液及高温高电压的离子化条件, 导致蛋白质高级结构被破坏而伸展开来, 暴露出更多可结合H⁺的部分, 因此会携带更多的

电荷; 而非变性质谱法, 由于所带电荷数减少, 蛋白的离子信号移动到了更高的质荷比区域, 信号分布变得疏离, 减少了质谱信号的相互覆盖程度. 因此, 非变性质谱分析能够更精确地测定各个单同位素的分子量以及它们之间的相对丰度.

根据不同的研究需求, 如何应用不同的分析方法以获取蛋白质寡聚态相关特定的不同表征信息, 仍值得研究. 在此, 我们选取两个重组蛋白质TGIF1-HD和SP_0782 (Native-PAGE初步判断以单体和二聚体为主要存在形式), 应用SEC、液体NMR和Native-MS 3种不同方法, 对它们在溶液中的寡聚态进行了表征分析. TGIF1-HD蛋白为人体内转录因子TGIF1的DNA结合结构域, 可以序列特异性识别双链DNA, 其同源蛋白多以单体形式存在^[23]. SP_0782蛋白来源于肺炎链球菌, 是单链DNA结合蛋白, 其同源蛋白PC4以二聚体形式行使功能^[24]. 研究表明, 应用SEC和NMR能够估算蛋白质分子量及不同寡聚态的相对比例, NMR还可以提供蛋白质折叠及是否存在不同构象等信息, 而Native-MS在定量分析时更为精准.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

试剂: 目的基因克隆与表达载体构建所需的试剂均购自Takara公司(日本), 质粒提取及凝胶回收试剂盒购自AxyGen公司(美国), ¹⁵N标记NH₄Cl购自Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (美国), 配制各种缓冲液所需的试剂(分析纯)均购自上海沪试公司(中国), 所有缓冲液均由双蒸水配制.

仪器: Avanti J-26S XP 离心机(美国Beckman Coulter公司), Mini-PROTEANR Tetra System电泳仪(美国Bio-Rad公司), ÄKTATM purifier纯化仪(美国GE Healthcare公司), NGCTM Chromatography System纯化仪(美国Bio-Rad公司), Bruker Avance III 600 MHz核磁仪(德国Bruker公司), Agilent 1200 series液相系统(美国Agilent公司), Bruker MicroQTOF-MS质谱仪, Orbitrap Fusion Lumos质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司).

2.2 实验方法

2.2.1 蛋白样品制备

将测序正确的含有目的基因的重组质粒pET32m-

TGIF1-HD和pET32m-SP_0782分别转化至大肠杆菌BL21(DE3)细胞。从转化成功的平板中挑取单菌落接种于5 mL含有氨苄青霉素的LB培养基中, 在37℃、220 r/min的摇床中培养过夜。取1 mL过夜培养物接种于100 mL含有氨苄青霉素的LB培养基中继续在37℃、220 r/min的摇床中培养至OD₆₀₀大于1。之后将100 mL菌液全部转入1 L含有氨苄青霉素的LB培养基中, 在37℃、220 r/min的摇床中培养至OD₆₀₀为0.6~0.8, 此时向菌液中加入终浓度为0.2 mmol/L的异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)进行诱导, 并在17℃、220 r/min的摇床中培养20 h后离心收集菌体。随后将菌体进行超声破碎并收集上层清液, 利用Ni²⁺柱HisTrap IMAC HP™ (美国GE Healthcare公司)对目的蛋白进行初步的分离纯化, 之后利用体积排阻色谱柱HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (美国GE Healthcare公司)进行进一步纯化。¹⁵N标记的蛋白样品通过将LB培养基替换为M9培养基(添加1 g/L ¹⁵N标记的NH₄Cl), 经相同过程制备。将纯化得到的¹⁵N标记的TGIF1-HD和SP_0782分别浓缩到0.4和1.2 mmol/L进行NMR实验。TGIF1-HD和SP_0782所用的核磁共振实验的缓冲液为20 mmol/L NH₄OAc、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L二硫苏糖醇(DTT)、5 mmol/L CaCl₂、0.02% NaN₃、10% D₂O/90% H₂O (v/v), pH 4.5。

2.2.2 蛋白在体积排阻色谱中洗脱体积的测量

将2~5 mL蛋白样品上样到Superdex 75 pg色谱柱, 流速为1 mL/min, TGIF1-HD和SP_0782的流动相分别为20 mmol/L PBS、300 mmol/L NaCl, pH 7.0; 20 mmol/L磷酸盐缓冲溶液(PBS)、300 mmol/L NaCl, pH 7.8。紫外检测波长为280 nm, 实验温度为298 K, 洗脱时间为120 min (一个柱体积为120 mL)。

2.2.3 旋转相关时间(τ_c)的测量

采用一维¹H-¹⁵N HSQC测定TGIF1-HD和SP_0782中¹⁵N骨架的纵向弛豫时间(T_1)和横向弛豫时间(T_2)。对于TGIF1-HD和SP_0782, T_1 和 T_2 的测定实验均选取10个不同的弛豫恢复时间, 分别为0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.60、0.80、1.00、1.50和2.00 s (T_1); 0.01、0.03、0.05、0.07、0.09、0.11、0.13、0.17、0.21和0.25 s (T_2)。用于弛豫时间拟合的谱峰积分区间为δ 7.50~δ 9.00 (¹H)。旋转相关时间(τ_c)的计算公式如下^[25]:

$$\tau_c \approx \left(\sqrt{\frac{6T_1}{T_2} - 7} \right) / 4\pi\nu_N \quad (1)$$

其中, T_1 和 T_2 分别为TGIF1-HD和SP_0782的¹⁵N骨架的纵向弛豫时间和横向弛豫时间, ν_N 为NMR实验时¹⁵N的进动频率(Hz), 上述实验温度均为298 K。

2.2.4 二维¹H-¹⁵N异核单量子相关谱

二维¹H-¹⁵N异核单量子相关谱(HSQC)直接和间接维谱宽分别为δ 15.00和δ 30.0, 二维中心分别位于δ 4.70 (¹H)和δ 118.0 (¹⁵N), 采样数据点阵t₂×t₁=1024×96, 累加次数4。采集的NMR实验数据用NMRPipe软件进行变换处理^[26], 然后用Sparky软件进行分析^[27]。

2.2.5 质谱测定方法

液相色谱-质谱联用检测: Agilent 1200 series色谱条件为样品浓度为50 μmol/L, 采用流动注射进样(FIA), Waters C18色谱柱, 柱温为40℃, 流速为100 μL/min, 流动相为含0.05%甲酸的双蒸水(A)和乙腈(B), 梯度洗脱至90%乙腈, 进样量为10 μL。Bruker MicroQTOF-MS质谱条件为采用电喷雾正离子化方式, 毛细管电压为2.5 kV, 雾化气流速为70 L/h, 干燥气流速为360 L/h, 干燥气温度为200℃, 采集质量范围(m/z)为0~3000, 分子量由仪器软件计算得到。

微量注射泵-静态纳喷源直接进样质谱检测: Orbitrap Fusion Lumos质谱条件为样品溶于pH 7.0的NH₄OAc缓冲液(20 mmol/L), 使蛋白浓度为1 mg/mL, 采取静态源直接进样, 分辨率设定为500 K@ m/z 200, 毛细管电压为2.3 kV, 毛细管加热温度为300℃, 扫描质量范围(m/z)为800~6000, 采集数据使用Protein Deconvolution软件(美国Thermo Fisher Scientific公司)进行去卷积处理后, 得到样品的精确分子量。

3 结果与讨论

应用SEC、液体NMR和Native-MS方法, 对重组蛋白质TGIF1-HD (理论单体分子量11094.58 Da)和SP_0782 (理论单体分子量9568.66 Da)的实验结果分别进行讨论。

3.1 SEC分析

体积排阻色谱不仅能够分离、纯化蛋白质, 还可

以分析其在溶液中的聚集状态. 将His6-tag标记的蛋白质TGIF1-HD和SP_0782经过镍柱纯化后, 进一步经过SEC分离、分析的色谱检测结果如图1所示. 蛋白质TGIF1-HD的SDS-PAGE胶(图1(a))显示其分子量介于6.5~14.3 kDa, 几乎没有杂蛋白质, 相对纯度高. 该样品进一步经过Superdex 75色谱柱的洗脱(一个柱体积, 120 mL), 观测到在流出体积为83 mL时出现强的紫外吸收峰($\lambda=280$ nm), 其他地方并无明显的吸收信号(图1(a)), 结果表明该蛋白质纯度高. 参照标准样品的洗脱体积与分子量的线性拟合曲线估算, SEC图中的TGIF1-HD的分子量约为10 kDa, 接近单体的理论分子量(11094.58 Da). 因此, 蛋白TGIF1-HD在研究条件下主要以单体形式存在. 类似的分析表明, 蛋白质SP_0782在流出体积为73 mL时呈现强的紫外吸收峰, 其他地方无明显信号, 估算分子量约为20 kDa, 接近二聚体的理论分子量(~ 19.2 kDa). 因此, 蛋白SP_0782在研究条件下主要以二聚体形式存在. 综上分析表明, SEC方法可以估算天然状态下的蛋白质的分子量, 据此判断其寡聚体形式. 然而, 由于标准蛋白与被测蛋白在分子形状上往往存在差异, 所用的缓冲溶液也不完全一致, 虽然SEC估算的分子量可用于判断寡聚体的形式, 但不够精确. 此外, 依据不同的流出时间或流出体积, 判断相对含量较低的其他寡聚体形式, 灵敏度相对较低, 定量分析不够精准.

3.2 液体NMR分析

应用核磁共振解析可溶性蛋白质结构或进行功能研究之前, 通常会对同位素 ^{15}N 标记的蛋白质进行一些预实验, 达到以下目的: (1) 通过测定其在溶液中的旋转相关时间(τ_c), 判断其在研究条件下的寡聚形式;

(2) 通过二维 ^1H - ^{15}N HSQC谱, 判断蛋白质是否折叠以及是否存在不同的构象等关键信息.

蛋白质TGIF1-HD和SP_0782在溶液中的旋转相关时间的测定结果如图2所示. 在298 K、600 MHz核磁谱仪上的实验数据分析表明, 蛋白TGIF1-HD的骨架 ^{15}N 的纵向弛豫时间和横向弛豫时间分别为631和90 ms(图2(a, b)), 经式(1)计算其旋转相关时间 τ_c 为7.4 ns. 当蛋白质的分子量在25 kDa以下时, τ_c 与其理论分子量(MW)呈线性相关^[19]. 通过 τ_c 和MW对应关系曲线(图2(c)), 得到TGIF1-HD的分子量约为11.1 kDa, 与单体分子量吻合, 表明TGIF1-HD在研究状态下以单体为主要存在形式. 类似的分析表明, 蛋白质SP_0782的 ^{15}N 的纵向弛豫时间和横向弛豫时间分别为582和53 ms(图2(d, e)), 计算的旋转相关时间 τ_c 为12.3 ns(图2(f)), 对应的分子量约为19.1 kDa, 接近二聚体的分子量, 表明SP_0782在研究状态下主要以二聚体形式存在. 上述两个蛋白的分析结果较好地符合了 τ_c -MW线性曲线, 与SEC分析结果一致. 如果计算所得的 τ_c 值, 偏离 τ_c -MW拟合曲线, 表明在该条件下所研究的蛋白质, 是不同寡聚体的混合体, 所测的表观旋转相关时间来自多种不同寡聚形式的贡献. 此外, 实验研究表明, 该经验方法只适用于分子量在25 kDa以下的蛋白质的寡聚态分析.

^{15}N 同位素标记的蛋白质TGIF1-HD和SP_0782的二维 ^1H - ^{15}N HSQC谱如图3所示. 一方面, 两个蛋白的核磁共振信号在 ^1H 和 ^{15}N 二维分散很开, 可以达到 δ 6.0~11.0 (^1H)和 δ 105.0~132.0 (^{15}N), 明显不同于典型的由天然无规氨基酸形成的肽段的核磁共振信号特征(二维核磁共振信号集中在较窄范围内), 表明它们具有折叠的三维空间结构; 另一方面, 图中的核磁共振交

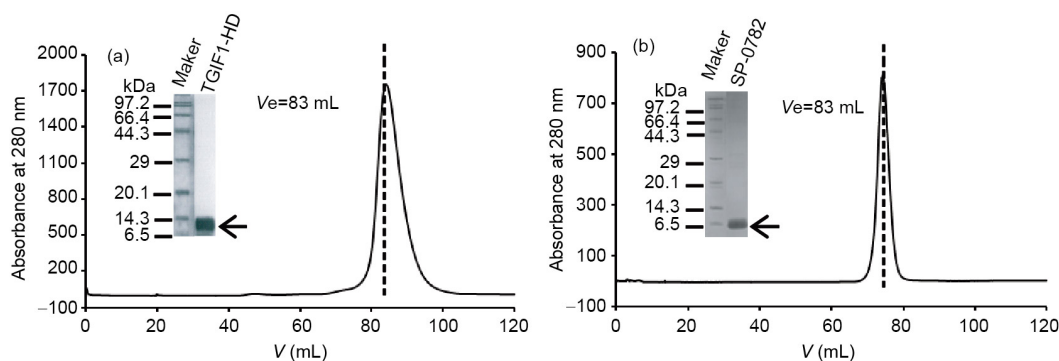


图1 蛋白质TGIF1-HD (a)和SP_0782 (b)的SEC谱图(插图为经镍柱分离、纯化, 用于SEC分析的TGIF1-HD和SP_0782的SDS-PAGE电泳图)

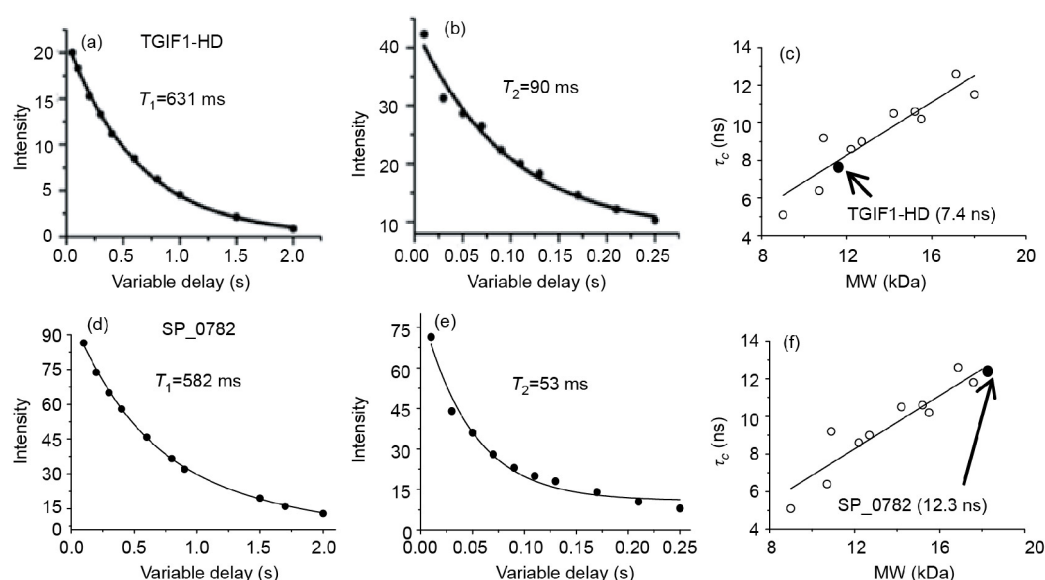


图2 蛋白TGIF1-HD和SP_0782的旋转相关时间测定. (a, d) T_1 弛豫时间, (b, e) T_2 弛豫时间, (c, f) 旋转相关时间 τ_c -MW关系曲线. 用于 τ_c -MW的线性关系曲线的10种蛋白质数据来源于美国东北结构基因组^[19]

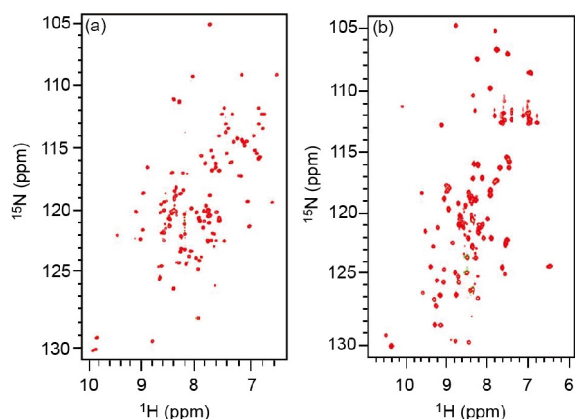


图3 蛋白质TGIF1-HD (a)和SP_0782 (b)的二维 ^1H - ^{15}N HSQC谱(网络版彩图)

叉峰信号强度相对均一, 预期的蛋白质主链的 ^1H - ^{15}N 核磁谱峰个数(不包含侧链的一些 ^1H - ^{15}N 信号)和氨基酸个数吻合(排除脯氨酸个数), 并无明显多余的峰. 当蛋白质具有稳定不同的构象时, 由于不同构象时观测的原子核的磁环境不同, 常会出现两个不同的交叉峰. 因此, 图3的结果表明这两个蛋白在研究状态下均具有单一稳定的构象.

3.3 Native-MS分析

在进行Native-MS实验前, 对蛋白TGIF1-HD和

SP_0782进行变性条件下的一级质谱(MicroQTOF-MS)分析, 其结果表明TGIF1-HD分子量为11094.4979 Da, 与理论分子量(11094.58 Da)一致, 但该结果不能表明TGIF1-HD是否存在其他的寡聚体形式; SP_0782样品中检测到两个分子量, 9573.7319和19147.4639 Da, 非常接近理论上单体(9568.66 Da)和二聚体(19137.32 Da)的分子量, 由于在质谱分析过程中二聚体可能发生解离, 因此实验结果不能准确定量分析两种聚合体的相对含量.

对上述两个蛋白进一步进行Native-MS实验, 采用微量注射泵-静态纳喷雾源直接进样的质谱检测(Orbitrap Fusion Lumos). 蛋白SP_0782的Native-MS实验的原始数据显示了很高的灵敏度与分辨率, 基线可以很好地分离(图4(a)). 在pH 7.0的中性状态下, 被检测到的蛋白质的分子离子峰主要来自二聚体(m/z 2000~2800), 也有少量单体(m/z 1000~1500)和极低量的四聚体(m/z 3000~4000). 对二聚体 m/z 2394.64930 ($z=8$)的一簇峰放大分析, 可准确识别其价态并实现同位素峰分离(图4(a)), 意味着Native-MS可精确测得该样品的单同位素分子量. Orbitrap Fusion Lumos超高分辨质谱, 可以精确获得每个组分的分子量及其在样本中的相对含量(表1, 35个单同位素分子量).

对原始数据进行去卷积处理后, 更清楚地发现样品中主要成分为二聚体, 也有少量单体和极微量的四

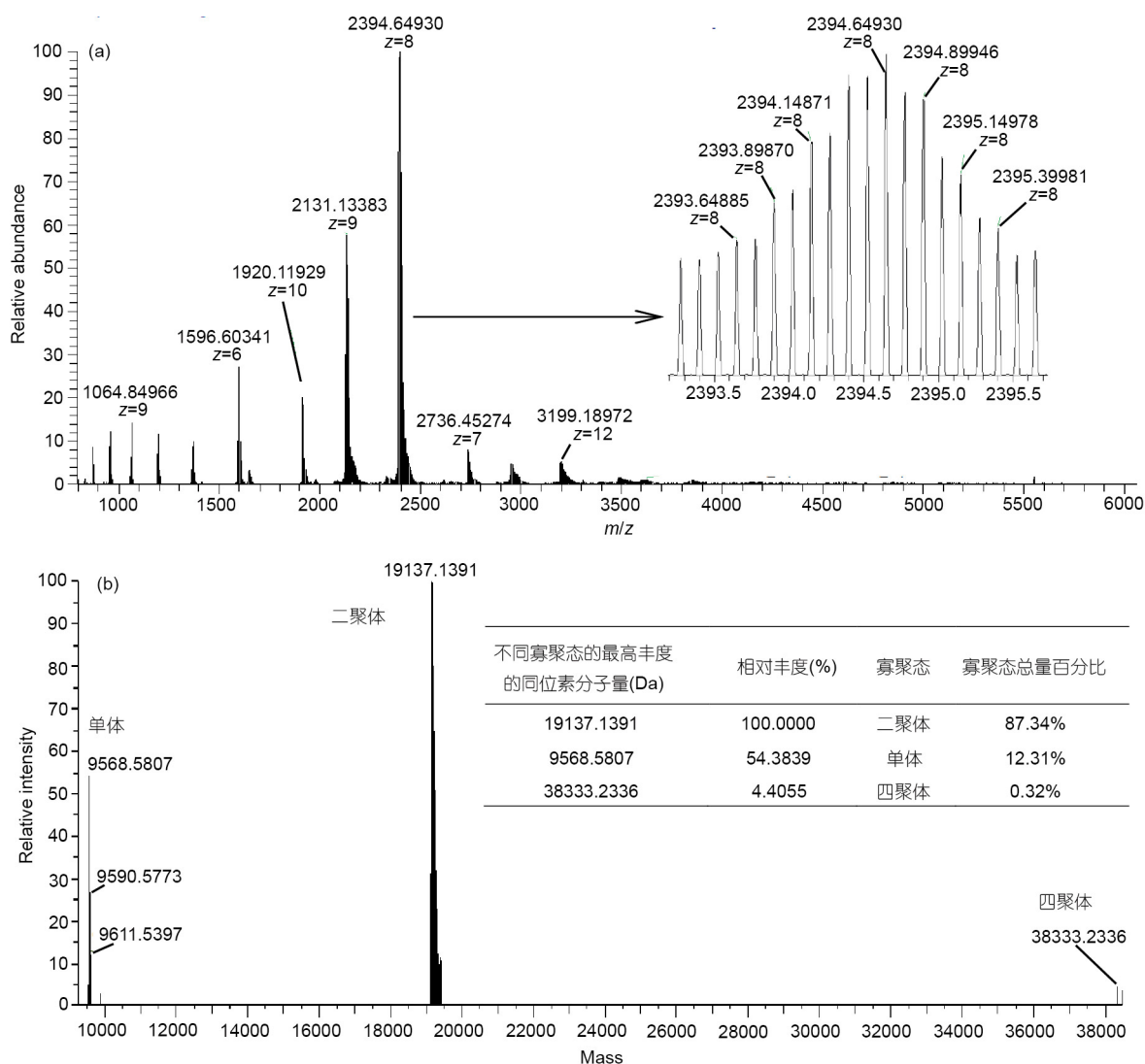


图 4 SP_0782的非变性质谱图(a)及去卷积分析(b)

聚体(图4(b)). 通过对表1中的所有二聚体、单体和四聚体的相对丰度进行定量分析, 得到三者的相对含量分别为87.34%、12.31%和0.32% (图4(b)). 与前面的SEC和液体NMR方法相比, SP_0782的单体含量明显偏高, 可能原因有: (1) SEC和NMR方法偏重于定性分析, 微量成分的定量分析精度不足; (2) 质谱分析中要求对蛋白质样品的脱盐处理, 也可能是造成SP_0782中单体成分上升的潜在因素. 当然, 多聚体蛋白质的浓度与其解离常数的大小, 是决定其不同寡聚态相对含量的决定性因素.

类似地, 对蛋白质TGIF1-HD的非变性质谱分析,

检测到104个不同的单同位素峰, 而且都来自于单体形式. 其中, 天然丰度最高(100%)的单同位素峰分子量为11087.4230, 天然丰度最低(0.43%)的单同位素峰分子量为10629.1790. 显然, TGIF1-HD在研究条件下几乎全部以单体形式存在.

4 结论

本研究应用SEC、液体NMR和Native-MS 3种方法系统研究了蛋白质TGIF1-HD和SP_0782在溶液中的寡聚状态. 结果发现, 3种方法都可以判定TGIF1-HD主要为单体, 而SP_0782以二聚体为主要存在形式. 与

表 1 35个单同位素的分子量及相对丰度(由大往小排列)

编号	单同位素分子量 (Da)	聚合体	相对丰度 (%)	编号	单同位素分子量 (Da)	聚合体	相对丰度 (%)
1	19137.1391	二聚体	100.0000	19	19299.0004	二聚体	22.9716
2	19159.1334	二聚体	99.8269	20	19308.0133	二聚体	17.4965
3	19174.0840	二聚体	86.9363	21	9559.5732	单体	16.6837
4	19196.0690	二聚体	80.1632	22	19316.9855	二聚体	15.1732
5	19183.0806	二聚体	67.9388	23	19338.9845	二聚体	12.2581
6	19216.0902	二聚体	64.8908	24	9611.5397	单体	12.0616
7	19150.1086	二聚体	55.0900	25	19395.1351	二聚体	11.4832
8	9568.5807	单体	54.3839	26	9582.5739	单体	10.8842
9	19206.0626	二聚体	51.9927	27	19348.0001	二聚体	9.7496
10	19239.0757	二聚体	50.8432	28	19366.0014	二聚体	8.7524
11	19226.0482	二聚体	47.8764	29	9603.5488	单体	7.2259
12	19257.0638	二聚体	38.6909	30	9550.5517	单体	5.0189
13	19266.0569	二聚体	32.1725	31	9633.5136	单体	4.6691
14	19248.0339	二聚体	31.7733	32	38333.2336	四聚体	4.4055
15	19126.1272	二聚体	31.3686	33	38467.1169	四聚体	3.5483
16	19276.0488	二聚体	30.0417	34	9625.5385	单体	2.1411
17	9590.5773	单体	26.8396	35	9540.5669	单体	0.7656
18	19285.0106	二聚体	25.1261				

传统SEC方法相比, 液体NMR方法还可以初步判断蛋白质是否折叠, 以及是否存在不同的构象; 而非变性质谱, 不仅可以检测到多聚体蛋白质的多种并存的寡聚态, 更能够精确地测得蛋白质样品中的单同位素分

子量、相对丰度以及各种寡聚态的相对含量. 因此, 为获取溶液中蛋白质的不同寡聚态定性或定量信息, 应采用相应合理的分析方法.

致谢 感谢赛默飞世尔科技(中国)有限公司张晓夕工程师进行了非变性质谱数据的采集工作.

参考文献

1 Matthews JM. *Protein Dimerization and Oligomerization in Biology*. New York: Springer, 2012. 747
2 Marianayagam NJ, Sunde M, Matthews JM. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29: 618–625
3 Bose K, Clark AC. *Biochemistry*, 2001, 40: 14236–14242
4 Ferré S, Casadó V, Devi LA, Filizola M, Jockers R, Lohse MJ, Milligan G, Pin JP, Guitart X. *Pharmacol Rev*, 2014, 66: 413–434
5 Terrillon S, Bouvier M. *EMBO Rep*, 2004, 5: 30–34
6 Gonen T, Walz T. *Quart Rev Biophys*, 2006, 39: 361–396
7 Pingoud A. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 3705–3727
8 Serag AA, Altenbach C, Gingery M, Hubbell WL, Yeates TO. *Nat Struct Biol*, 2002, 9: 734–739
9 Chiti F, Dobson CM. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 333–366
10 Correia JJ, Williams RC Jr.. *Arch Biochem Biophys*, 1985, 239: 120–129
11 Ackers GK. *Adv Protein Chem*, 1970, 24: 343–446
12 Yphantis DA. *Ann New York Acad Sci*, 1960, 88: 586–601

- 13 Doty P, Edsall JT. *Adv Protein Chem*, 1951, 6: 35–121
- 14 Brunelle JL, Green R. *Method Enzymol*, 2014, 541: 151–159
- 15 Rhodes DG, Bossio RE, Laue TM. *Guide to Protein Purification*. 2nd ed. 2009. 691–723
- 16 Goetz H, Kuschel M, Wulff T, Sauber C, Miller C, Fisher S, Woodward C. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, 60: 281–293
- 17 Wen J, Arakawa T, Philo JS. *Anal Biochem*, 1996, 240: 155–166
- 18 Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P. *Protein Sci*, 2002, 11: 2067–2079
- 19 Rossi P, Swapna GVT, Huang YJ, Aramini JM, Anklin C, Conover K, Hamilton K, Xiao R, Acton TB, Ertekin A, Everett JK, Montelione GT. *J Biomol NMR*, 2010, 46: 11–22
- 20 Strupat K. *Molecular Weight Determination of Peptides and Proteins by ESI and MALDI*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc., 2005. 1–36
- 21 Heck AJR. *Nat Meth*, 2008, 5: 927–933
- 22 van den Heuvel RHH, Heck AJR. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8: 519–526
- 23 Bürglin TR, Affolter M. *Chromosoma*, 2016, 125: 497–521
- 24 Werten S, Moras D. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13: 181–182
- 25 Kay LE, Torchia DA, Bax A. *Biochemistry*, 1989, 28: 8972–8979
- 26 Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. *J Biomol NMR*, 1995, 6: 277–293
- 27 Goddard TD, Kneller DG. *SPARKY 3*. San Francisco: University of California, 2008

Characterizations of protein oligomeric states in solution

Yao Nie^{1,2}, Shuangli Li^{1,2}, Tao Li^{1,2}, Jiang Zhu¹, Rui Hu¹, Bin Jiang¹, Xu Zhang¹, Yunhuang Yang¹, Maili Liu^{1*}

¹ State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics, Wuhan Center for Magnetic Resonance, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding author (email: ml.liu@wipm.ac.cn)

Abstract: Protein oligomeric state characterization is a prerequisite for its structural and functional studies. Many methods are currently used in wet labs for this characterization including native polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE), size exclusion chromatography (SEC), light scattering (LS), and analytical ultracentrifugation. These methods are sometimes carried out qualitatively or semi-quantitatively to give only imprecise information. In addition to these techniques, solution nuclear magnetic resonance (NMR) and native mass spectrometry (Native-MS) are also capable of analyzing protein oligomeric states. In order to compare results of SEC to results from these last two techniques, we studied the oligomeric states of two proteins, the monomeric protein TGIF1-HD and the dimeric protein SP_0782. Our research results indicated that SEC and NMR can be used to estimate the molecular weight of the dominant oligomer, and also to roughly estimate the relative contents of additional oligomeric forms. Native-MS was able to complementary quantitative assessment of the amounts of each oligomeric state based on their mass to charge (m/z) ratio for many proteins.

Keywords: protein, oligomeric state, SEC, solution NMR, Native-MS

doi: [10.1360/N032017-00114](https://doi.org/10.1360/N032017-00114)