

www.pibb.ac.cn

# 分析超速离心技术研究膜蛋白 TmrAB\*

褚文丹<sup>1,2)</sup> 徐 扬<sup>1,2)</sup> 周翠燕<sup>1,2)</sup> 芦亚菲<sup>1,2)</sup> 于晓霞<sup>3)</sup> 张瑞轩<sup>2)</sup> 李文奇<sup>1,2)\*\*</sup> (<sup>1)</sup>清华大学生命科学与医学研究院,蛋白质研究技术中心,北京100084;<sup>3</sup>清华大学生命科学学院,北京100084; <sup>3)</sup>中国科学院生物物理研究所,北京100101)

摘要 去垢剂在膜蛋白的提取纯化过程中起到必要的作用,对膜蛋白的聚合状态、结晶条件以及理化性质等方面都有较大影响.分析超速离心技术(analytical ultracentrifuge,AUC)通过测定溶液中膜蛋白-去垢剂复合物在离心场中的沉降运动轨迹,可以分析获得其沉降系数、摩尔质量、流体力学半径、结合常数等水力学和热力学性质,进而判断膜蛋白-去垢剂复合物的均一性及聚合状态.本文以嗜热菌来源的ATP结合转运蛋白(ABC transporter)TmrAB 作为研究对象,利用分析超速离心技术结合分子排阻层析和冷冻电镜负染技术,研究其均一性、聚合状态以及去垢剂与膜蛋白的摩尔比.结果显示,在8倍临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)的 DDM 条件下,TmrAB 性质均一,并以异二聚体的单体形式存在,DDM 与TmrAB 的摩尔比为116:1.本研究表明,分析超速离心技术是一种测定膜蛋白分子质量、研究膜蛋白聚合状态的可靠手段.

关键词 分析超速离心,分子排阻层析,冷冻电镜,膜蛋白,分子质量
学科分类号 Q5
DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0200

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 部分的膜内在蛋白质,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四.药物转运蛋白是 一种内在膜蛋白,广泛存在于生物界细胞膜当中, 能够结合、水解 ATP 释放能量,将膜内外的溶质 如脂质、糖类、离子、氨基酸、多肽类、蛋白质以 及有毒化合物等进行逆浓度梯度跨膜转运,参与到 诸如介导抗药性等很多重要的生命活动当中四. TmrAB 是一种药物转运蛋白<sup>[3-4]</sup>,结构生物学研究 表明, TmrAB 由含跨膜结构域(transmembrane domain, TMDs, 主要形成跨膜通道)和核苷酸结合 结构域(nuclietide-binding domain, NBDs)的单体蛋 白质 TmrA(64.6 ku)和 TmrB(67.9 ku)形成异质二聚 体[5-7]. 目前,还没有关于 TmrAB 溶液中聚集状态

研究的相关报道.分析超速离心(AUC)技术是研究 溶液中蛋白质分子质量、聚合状态的生物物理学方 法,我们拟采用 AUC 技术对膜蛋白 TmrAB 进行 其溶液状态下的聚合状态研究.

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<sup>[8-9]</sup>,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 子质量、聚合状态、去垢剂与膜蛋白的摩尔比等信 息<sup>[10-12]</sup>.分子排阻层析(SEC)技术可以通过与标准蛋 白质分子质量标准曲线进行对比,依据洗脱体积对 膜蛋白 TmrAB 的分子质量进行拟合计算,从另一 种角度了解膜蛋白的溶液性质.电镜负染技术可以 比较直观地对蛋白质样品进行观察,大致了解膜蛋

<sup>\*</sup> 中国博士后科学基金面上资助(2014M550050),清华大学结构生物学高精尖创新中心资助项目.

<sup>\*\*</sup> 通讯联系人.

Tel: 010-62782031, E-mail: liwenqi@ tsinghua.edu.cn 收稿日期: 2018-07-08, 接受日期: 2018-09-05

白溶液的均一性[13].

本文首先利用原核表达系统,融合表达并分离 纯化带有 His 标签的药物转运蛋白 TmrAB, 然后 利用电镜负染技术、分子排阻层析技术以及分析超 速离心技术综合分析膜蛋白 TmrAB 的性质,通过 电镜观察得到在去垢剂 DDM 浓度为 0.08%(8 倍 CMC)的条件下 TmrAB 的状态更为均一. 然后分 别运用分子排阻层析和分析超速离心技术测定膜蛋 白 TmrAB 在去垢剂浓度为 0.08%条件下的分子质 量和聚合状态.实验发现,通过分子排阻层析计算 得到的分子质量与蛋白质的理论分子质量相差较 大,无法判断聚合状态,而利用分析超速离心技术 可以分析得到膜蛋白的分子质量、膜蛋白-去垢剂 复合物的分子质量、去垢剂与膜蛋白的摩尔比,进 而判断膜蛋白 TmrAB 的聚合状态,得到了与文献 报道一致的分析结果. 说明分析超速离心技术是一 种测定膜蛋白分子质量、研究膜蛋白聚合状态的可 靠手段,可以得到关于膜蛋白的更准确、更全面的 信息.

## 1 材料与方法

#### 1.1 菌株与质粒

TmrAB 质粒由清华大学王廷亮副教授惠赠, 大肠杆菌感受态细胞 DH5α和 BL21(DE3)由本实验 室制备.

#### 1.2 酶与生化试剂

质粒小提试剂盒购自天根生物科技有限公司; 去垢剂 DDM 购自 ANATRACE 公司; Bradford 染 料购自伯乐公司;蛋白质分子质量标准为本实验室 自行制备;储液配制所需化学试剂购自国药集团化 学试剂有限公司;Ni-NTA 镍柱柱材购自 Qiagen 公 司; Superdex 200 层析柱购自 GE 公司.

#### 1.3 蛋白质表达与纯化

将含有目的基因的菌种接种至 100 ml 氨苄抗 性 LB 培养基中, 37℃, 220 r/min 过夜培养, 以 1:100 的比例将菌液转接至 1L 氨苄抗性 LB 培养基中,培养 3~4 h 至 A<sub>600</sub> 为 1.3~1.5,加入 0.5 mmol/L IPTG, 20℃, 220 r/min,过夜诱导. 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体后超声破碎,将 破碎后的菌液 14 000 r/min 离心 10 min 除去细胞碎 片,上清即为粗膜溶液.将粗膜溶液于 4℃条件下 41 000 r/min,超速离心 1 h,得到膜沉淀,用适量 裂解缓冲液重悬转移至新离心管中,利用匀浆机将 沉淀充分匀浆,得到的均匀膜溶液,加入 1% DDM,4℃旋转孵育抽提 2 h. 抽提液在 65℃水浴 中加热 30 min 后冷却,4℃,41 000 r/min,超速离 心 30 min.取上清与 Ni-NTA 充分结合,用 10 mmol/L 咪唑,25 mmol/L Tris,pH 8.0,150 mmol/L NaCl, 0.02% DDM 或 0.08% DDM 淋洗液去除非特异性结 合的杂蛋白质;再用 250 mmol/L咪唑,25 mmol/L Tris,pH 8.0,150 mmol/L NaCl,0.02% DDM 或 0.08% DDM 洗脱液对目的蛋白质进行洗脱. Bradford 法检测蛋白质浓度,SDS-PAGE 检测蛋白 质大小与纯度.使用 Centricon 超滤管浓缩至 2 ml 左右,用 Superdex-200 色谱柱将目的蛋白质进一 步纯化,结合紫外吸收峰位置及 SDS-PAGE 结果 得到最终纯化的目的蛋白质备用<sup>[14]</sup>.

### 1.4 Bradford 法蛋白质定量

将考马斯亮蓝 G-250 储液稀释至原体积的 5 倍,摇匀备用.移取1 ml稀释液于1.5 ml离心管 中,根据蛋白质溶液的浓度加入1~20 μl蛋白质 溶液并混合均匀.室温静置1 min 后,以考马斯亮 蓝 G-250 稀释液为参比,在 595 nm 记录吸光度数 值.最后通过公式计算蛋白质溶液的浓度,重复测 定 5 次,取平均值即为蛋白质实际浓度,计算公式 如下:

蛋白质浓度 /(g•L<sup>-1</sup>)=25×A<sub>595</sub>/(V/µl)

## 1.5 电镜负染分析

将纯化后的蛋白质定量至 1.0 g/L,分别稀释 5 倍、10 倍、20 倍、30 倍和 40 倍备用.将 300 目 铜网和碳膜支撑膜放入等离子体清洗仪中进行表面 亲水化处理,从而使蛋白质更容易与碳膜结合,然 后将 15 μl 不同浓度的蛋白质样品滴至膜上,停留 1 min 后吸走残余液,小心滴入 1% 醋酸铀染液, 与蛋白质结合 10 s 后吸干,重复染色 3 次,干燥 后即完成制样.将制备好的负染样品装入电镜样品 架,调整电镜状态后寻找样品位置,选择负染效果 最好的部分进行观察.

#### 1.6 分子排阻层析分析

将 Superdex 200 层析柱用 pH 8.0, 25 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl 缓冲液平衡,分别将 6 ku、 43 ku、75 ku、158 ku 的标准蛋白以 500  $\mu$ l 的体积 上样,设定流速 0.5 ml/min,限压 1.2 MPa,记录 洗脱体积,以蛋白质分子质量对数为横坐标,分配 系数 Kav 为纵坐标,建立标准曲线(Kav=( $V_e$ - $V_0$ )/ ( $V_t$ - $V_0$ ),凝胶总体积  $V_t$ 、外水体积  $V_0$ 、洗脱体积  $V_e$ ). 将 Superdex-200 层析柱用 pH 8.0, 25 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 0.08% DDM 缓冲液平衡. 将分离纯化得到的目的蛋白用 Bradford 法定量至 1.0 g/L, 上样 500  $\mu$ l, 以相同的实验程序进行分子 排阻层析分析, 记录目的蛋白质洗脱体积, 收集紫 外吸收峰位置样品, 0.5 ml/管, 对收集的样品进 行 SDS-PAGE 分析.

#### 1.7 分析超速离心分析

AUC 技术可以利用分析超速离心机检测样品 在溶液中的运动轨迹,分析样品的水力学参数、分 子质量等性质. AUC-沉降速率实验选择的转速较 高,是在一个较大的离心力作用下使样品在较短时 间内全部沉降到样品池底部,并在不同时间收集的 数据反映该时刻在不同径向位置的溶质浓度,然后 利用 Lamm 方程和 Svedberg 方程得到沉降系数、 扩散系数以及分子质量等信息<sup>[10]</sup>.本实验采用美国 Beckman 公司的分析超速离心机 ProteomeLab XL-I, 调整样品浓度至 $A_{280} = 0.7$ , 参比缓冲液成 分为 pH 8.0, 25 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl. 使用2孔铝合金离心池和蓝宝石窗口组成的样品 池,将样品及参比液分别上样 396 µl 和 400 µl, 选择 An-50 Ti 的 8 孔转子在 20℃, 45 000 r/min 的 条件下进行沉降速率(SV)实验,同时选择紫外波长 280 nm 和干涉光两种检测方式,每 6min 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 (14.4f 版)软件分析数据, 分别处理紫外扫描结果和干涉光扫描结果,再通过 GUSSI软件分析计算<sup>[15]</sup>.利用紫外光进行检测,可 以分析膜蛋白的信号;利用干涉光进行检测,可以 分析膜蛋白-去垢剂复合物的信号;综合分析紫外 和干涉光检测的数据可以得到去垢剂与膜蛋白的摩 尔比、复合物微分比容、复合物分子质量等信息.

## 2 结 果

## 2.1 蛋白质的表达与纯化

将构建好的质粒 pQlink-TmrAB 转化至大肠杆 菌 DH5α 扩增,小量提取质粒后测序,比对结果无 误.将上述表达质粒转化至大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3),经过诱导表达、DDM 抽提、超速离 心、亲和层析和分子筛纯化,得到高纯度的膜蛋白 TmrAB. 聚丙烯酰氨凝胶电泳显示蛋白质纯度大 于 95%(图 1),适合进行下一步实验.



**Fig. 1** Analysis of the purified proteins by SDS-PAGE The purified proteins were subjected to 15% SDS-PAGE. Lane *1*: Protein marker; Lane 2: The purified membrane protein TmrAB. SDS-PAGE result shows that the membrane protein TmrAB purity is over 95%.

### 2.2 电镜观察结果

将纯化后的膜蛋白 TmrAB 按照电镜负染的处理方法,对去垢剂 DDM 浓度分别为 0.02%和 0.08%的膜蛋白质样品进行电镜观察,本实验最终选择 0.05 g/L 的蛋白质样品浓度,电镜放大倍数为 49 000 倍,得到结果如图 2 所示.电镜观察结果显示膜蛋白 TmrAB 与去垢剂形成的复合物在去垢剂 DDM 浓度为 0.08%条件下更为均一,因此我们选择去垢剂 DDM 浓度为 0.08%的条件,对膜蛋白 TmrAB 进行下一步分析.

## 2.3 分子排阻层析结果

通过标准蛋白质样品的分子排阻层析分析得到 计算蛋白质分子质量的标准曲线(图 3a).将经过亲 和柱、分子筛纯化得到的处于 DDM 终浓度为 0.08%的膜蛋白 TmrAB,体积定量为 0.5 ml 并上样 至 Superdex-200 层析柱进行分子排阻层析分析, 通过 SDS-PAGE 检测.在去垢剂 DDM 浓度为 0.08%的缓冲液中,膜蛋白 TmrAB 均一性均较好,





The result of Cryo-SEM showed that the complex formed by the detergent and protein molecules was more homogeneous in the buffer containing 0.08% DDM than in the buffer containing 0.02%DDM. (a) The analysis of membrane protein TmrAB in 0.02%DDM by SEM. (b) The analysis of membrane protein TmrAB in 0.08% DDM by SEM.

目的蛋白质出峰位置在 11.6 ml(图 3b),通过标准 蛋白质分子质量标准建立的标准曲线计算得到目的 蛋白质分子质量为 298.03 ku,与其理论分子质量 132.5 ku 相差较大,并且由于检测到的目的蛋白是 膜蛋白 TmrAB 与去垢剂 DDM 形成的复合物,更 加无法判断蛋白质的聚合状态.



#### Fig. 3 Analysis of membrane protein TmrAB by SEC

The membrane protein TmrAB was analyzed by size exclusion chromatography (SEC), and the elution volume was 11.6 ml. According to the standard curve, the molecular mass of the protein was 298.03 ku, significantly larger than the theoretical molecular mass 132.5 ku. (a) Standard proteins on Superdex 200. (b) The analysis of membrane protein TmrAB in 0.08%DDM by SEC and SDS-PAGE.

## 2.4 分析超速离心结果

为了进一步分析膜蛋白 TmrAB 在 0.08% DDM 缓冲液中的分子质量和聚合状态,本文采用美国

Beckman 公司的分析超速离心机 ProteomeLab XL-I 在 45 000 r/min 条件下对样品进行沉降速率(*SV*)实验,测得样品 *A*<sub>280</sub>=0.8, *IF*=4.5. 离心 4 h 后将样品

的 35 个紫外扫描数据和干涉光扫描数据分别导入 Setfit 软件进行分析.选定边界和处理范围,以空 气与样品的界面为 meniscus,以 7.15 mm 处为 bottom,采用 c(s)模型,设定实验参数进行计算和 拟合,得到紫外拟合结果 RMSD 在 0.006 左右,干 涉光拟合结果 RMSD 在 0.01 左右,说明结果真实 可靠.

经过 Setfit 软件处理后,运用 GUSSI 软件进一步分析膜蛋白 TmrAB 的分子质量信息、聚合状态 以及膜蛋白 - 去垢剂复合物的组成.在 GUSSI 软件中,导入紫外和干涉光的数据分析结果,选择 Fitted *ff*<sub>0</sub>计算模式,依次填写实验参数,其中蛋白质的相关参数如消光系数(*ɛ*)、微分比容(*v*)、理论 分子质量(*M*)以及比折光指数增量(dn/dc)通过已知的蛋白序列在 Setfit 软件中获得,去垢剂 DDM 的

相关参数查阅文献获得, *ff*<sub>6</sub>为分析紫外光和干涉 光检测得到的数据,分析得到膜蛋白 TmrAB 在 DDM 浓度为 0.08%的条件下拟合分子质量为: 150.2 ku,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<sup>[5]</sup>.

经过 SETFIT 软件的 c(s)模型分析发现,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(图 4a),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 GUSSI 软件分析进一步得到: 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 质量为 209.7 ku,和 c(s)模型分析的结果相一致. GUSSI 分析结果详见表 1.



#### Fig. 4 Analysis of membrane protein TmrAB by AUC

The membrane protein TmrAB was analyzed by UV and interference light at the same time, the amount of the protein was determined by UV detection while the total amount of the complex was determined by interfering light. The properties of the protein, detergent and the molecular mass of the complex could be analyzed by GUSSI. (a) The analysis of membrane protein TmrAB in 0.08%DDM by Setfit. (b) The analysis of membrane protein TmrAB in 0.08%DDM by GUSSI.

| Table 1     Molecular mass analysis of TmrAB by GUSSI |             |                |               |                |               |
|---|-------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
| Concentration   | Molar ratio | Theoretical Mw | Calculated Mw | Theoretical Mw | Calculated Mw |
| of DDM  | DDM: Pro    | of TmrAB       | of TmrAB      | of TmrAB-DDM   | of TmrAB-DDM  |
| 0.08%   | 116:1       | 132.5 ku       | 150.2 ku      | 194.3 ku       | 209.7 ku      |

## 3 讨 论

本文研究的药物转运蛋白 TmrAB 是一种典型的膜蛋白. 膜蛋白质是生物体中一类非常重要的蛋

白质,约占蛋白质组成的 30%,几乎存在于所有 生物体中. 膜蛋白在生物体内具有广泛而且重要的 生物学功能,有很多疾病以及治疗方法都与之相 关,例如约有 60%的药物靶点为膜受体和离子通 道,同时一些膜蛋白质还对病原体的毒力与耐药性 有重要影响.因此,膜蛋白质结构测定对于研究其 作用与功能和以之为靶点的药物设计都有非常重要 的生物学意义和临床意义<sup>[16]</sup>.

本文首先通过直观的电镜负染分析得到,膜蛋 白 TmrAB 在去垢剂 DDM 浓度为 0.08% (8 倍 CMC)的溶液中均一性明显优于2倍CMC;通过分 子排阻层析方法分析膜蛋白 TmrAB 得到复合物表 观分子质量为 298.03 ku, 无法确定聚合状态; 通 过分析超速离心技术分析得到膜蛋白-去垢剂复合 物的拟合分子质量为 194.3 ku、去垢剂 DDM 与膜 蛋白 TmrAB 的摩尔比为 116:1, 蛋白质拟合分子 质量为 150.2 ku, 是以 TmrA 和 TmrB 结合形成的 异质二聚体的单体形式存在.综合分析实验结果我 们认识到, 分子排阻层析方法测定膜蛋白质分子质 量和判断聚合状态具有一定的局限性,一方面是由 于去垢剂与蛋白质的结合具有一定的比例,复合物 的理论分子质量难以计算,另一方面是由于膜蛋白 质分子与去垢剂结合后的形状会影响其在分子排阻 层析上的洗脱位置,导致计算得到的分子质量与实 际分子质量有很大出入.分析超速离心技术却可以 从以下两方面解决膜蛋白分子质量和聚合状态的测 定问题: 首先, 分析超速离心技术 - 沉降速率法对 于分子质量的测定是根据粒子的沉降过程,利用 Svedberg 方程和 Lamm方程进行计算得到的绝对分 子质量,不需要标准蛋白质校正;其次,在进行膜 蛋白分子质量的测定时,分析超速离心技术可以同 时检测紫外光信号和干涉光信号,分析得到去垢剂 和膜蛋白的摩尔比, 计算膜蛋白以及复合物的分子 质量,进而判断膜蛋白的聚合状态,且分析超速离 心技术实验方法更为简便快捷.

实验中我们发现, TmrAB 的溶液均一性在 DDM 浓度为 0.08%(8 倍 CMC)条件下明显优于 DDM 浓度为 0.02%(2 倍 CMC). 而在膜蛋白的提 取纯化、结晶条件筛选以及理化性质研究中,一般 选择去垢剂浓度为 2 倍 CMC,在此条件下,去垢 剂不一定能与膜蛋白形成稳定均一的复合物.通过 本研究我们认为,去垢剂的浓度对膜蛋白-去垢剂 复合物的形成存在较大的影响,在分析膜蛋白的性 质时,应充分考虑去垢剂浓度的影响.

#### 参考文献

[1] Le Maire M, Champeil P, Moller J V. Interaction of membrane

proteins and lipids with solubilizing detergents. Biochim Biophys Acta, 2000, **1508**(1-2): 86-111

- [2] Wang T, Fu G, Pan X, et al. Structure of a bacterial energy-coupling factor transporter. Nature, 2013, 497(7448): 272–276
- [3] Bechara C, Noll A, Morgner N, *et al.* A subset of annular lipids is linked to the flippase activity of an ABC transporter. Nat Chem, 2015, 7(3): 255–262
- [4] Kaur H, Lakatos-Karoly A, Vogel R, et al. Coupled ATPaseadenylate kinase activity in ABC transporters. Nat Commun, 2016, 7:13864–13888
- [5] Zutz A, Hoffmann J, Hellmich U A, et al. Asymmetric ATP hydrolysis cycle of the heterodimeric multidrug ABC transport complex TmrAB from Thermus thermophilus. J Biol Chem, 2011, 286(9): 7104–7115
- [6] Hohl M, Briand C, Grutter M G, *et al.* Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation. Nat Struct Mol Biol, 2012, **19**(4): 395–402
- [7] Kim J, Wu S, Tomasiak T M, et al. Subnanometre-resolution electron cryomicroscopy structure of a heterodimeric ABC exporter. Nature, 2015, 517(7534): 396–400
- [8] Ebel C. Sedimentation velocity to characterize surfactants and solubilized membrane proteins. Methods, 2011, 54(1): 56–66
- [9] Lebowitz J, Lewis M S, Schuck P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. Protein Sci, 2002, 11(9): 2067–2079
- [10] Zhao H, Brautigam C A, Ghirlando R, et al. Overview of current methods in sedimentation velocity and sedimentation equilibrium analytical ultracentrifugation//John E Coligan, et al. Current Protocols in Protein Science. USA: John Wiley & Sons, 2013: Chapter 20
- [11] Morris M B, Ralston G B. Biophysical characterization of membrane and cytoskeletal proteins by sedimentation analysis. Subcell Biochem, 1994, 23: 25–82
- [12] Le Roy A, Wang K, Schaack B, et al. AUC and small-angle scattering for membrane proteins. Methods Enzymol, 2015, 562: 257–286
- [13] 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
- [14] Noll A, Thomas C, Herbring V, et al. Crystal structure and mechanistic basis of a functional homolog of the antigen transporter TAP. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(4): E438–E447
- [15] Brown P H, Schuck P. Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. Biophys J, 2006, 90(12): 4651–4661
- [16] Wallin E, Von Heijne G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. Protein Sci, 1998, 7(4): 1029–1038

# Study of Membrane Protein TmrAB by Analytical Ultracentrifugation<sup>\*</sup>

CHU Wen-Dan<sup>1,2)</sup>, XU Yang<sup>1,2)</sup>, ZHOU Cui-Yan<sup>1,2)</sup>, LU Ya-Fei<sup>1,2)</sup>,

YU Xiao-Xia<sup>3</sup>, ZHANG Rui-Xuan<sup>2</sup>, LI Wen-Qi<sup>1,2)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup> School of Biomedicine in Tsinghua University, National Protein Science Facility, Beijing 100084; <sup>2)</sup> School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084; <sup>3)</sup> Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract Detergent is critical for membrane protein purification, impacting the state of oligomerization, crystallization conditions and other physicochemical properties. Analytical ultracentrifugation (AUC), by characterizing the sedimentation of membrane protein-detergent complex in centrifugal fields, is able to measure various hydrodynamic and thermodynamic properties, including sedimentation coefficient, molar mass, hydrodynamic radius, binding coefficient, thus defining the homogeneity and oligomerization state of membrane protein-detergent complex. This study focuses on an ABC transporter from thermophilic bacteria, TmrAB, and utilizes AUC coupled to size-exclusion chromatography and negative staining electron microscopy to determine its homogeneity, oligomerization, and stoichiometry of membrane protein and detergent molecules. The results indicate that TmrAB complex exists as homogeneous monomer of heterodimers of TmrA and TmrB, in the condition of 8× Critical Micelle Concentration (CMC) DDM, having a ratio of DDM/TmrAB equal to 116 : 1. This study suggests, AUC is a reliable method to analyze the molecular mass of membrane protein.

**Key words** analytical ultracentrifugation, membrane protein, size exclusion chromatography, Cryo-SEM, protein molecular mass

**DOI**: 10.16476/j.pibb.2018.0200

Tel: 86-10-62782031, E-mail: liwenqi@ tsinghua.edu.cn

Received: July 8, 2018 Accepted: September 5, 2018

<sup>\*</sup> This work was supported by grants from China Postdoctoral Science Foundation (2014M550050), Advanced Innovation Center for Structural Biology. \*\*Corresponding author.