

## 与 Uncle 一起轻松搞定膜蛋白稳定性

### 简介

膜蛋白是医学中一类最重要和最常见药物靶点。突变的膜蛋白会引发疾病，并且是癌症的生物标志物。病毒和细菌的膜蛋白是重要的疫苗候选物，野生型的膜蛋白对于寻找治疗方法也可能至关重要。纯化膜蛋白通常涉及将蛋白质从脂质双层中释放出来，并用表面活性剂包裹蛋白质的疏水区域以形成去污剂溶解的形式。这种溶解通常会使得膜蛋白不稳定，从而难以处理它们。

增强膜蛋白的稳定性可以极大地帮助处理这些样品，但仅仅表征它们的稳定性就是一个重大挑战。现有的方法，如差示扫描量热法和核磁共振 (NMR)，通常需要大量的蛋白质，并且难以实现更高的通量。由于难以纯化大量稳定的膜蛋白，这些检测方法难以进行。检测某些膜蛋白（如 G 蛋白偶联受体，GPCRs）在其去污剂溶解状态下的生物活性也非常具有挑战性。这些方法中的每一种都只提供单一的视角，导致对膜蛋白稳定性的理解不完整。

Uncle 是原创的蛋白质稳定性一体化平台，使用三种检测方法：全光谱荧光、静态光散射 (SLS) 和动态光散射 (DLS)，从 9  $\mu$ L 的样品中全面分析蛋白质稳定性（见图 1）。温度控制范围为 15–95°C，密封样品提供了更大的灵活性。可以在一次实验中从同一样品中评估多种参数，包括荧光、聚集、粒径、多分散性和热变性，从而获得关于蛋白质稳定性的正交和互补信息。Uncle 一次可以测量多达 48 个样品，使在表征膜蛋白时能够实现更高的通量和更广泛、快速的结果。无标记方法是确定蛋白质解折叠的最佳选择，例如通过蛋白质熔融时紫外光激发的内源荧光变化。但是，这种方法可能并不适用于所有膜蛋白，因为部分疏水的环境可能会使观察到的荧光变化难以辨识，而这种变化通常在可溶性蛋白中是显而易见的。



图 1: Uncle 是原创的蛋白质稳定性一体化平台

硫醇反应性荧光染料 7-二乙氨基-3-[4-(碘乙酰胺基)苯基]-4-甲基香豆素 (CPM) 可以用于监测膜蛋白的解折叠。当温度升高引起蛋白质解折叠时，暴露的半胱氨酸残基 CPM 反应后会发出更强的荧光<sup>①</sup>。CPM 热稳定性检测也被建议用于替代昂贵且耗时的基于细胞的药物筛选<sup>②</sup>。纳米盘和包膜病毒样颗粒 (VLPs) 是去污剂溶解的两种替代方法，它们能将膜蛋白纳入更类似于脂双层的环境中，可能会稳定蛋白质<sup>③④</sup>。纳米盘是从去污剂溶解的膜蛋白、磷脂微团和膜支架蛋白的混合物中自组装形成的圆盘状脂双层。VLPs 也能自组装，并在从生产细胞出芽之前在包膜表面集中膜蛋白“货物”。虽然这些膜蛋白载体有许多优点，但它们也带来了自身的稳定性表征挑战，这些挑战可以通过 Uncle 的多模态热稳定性方法来解决。

在这份应用说明中，我们展示了如何使用 Uncle 的全光谱荧光、SLS、DLS 和 CPM 染料来确定 GPRC5D (一种多发性骨髓瘤的膜蛋白生物标志物和潜在免疫疗法靶点) 以及 CD20 (一种由 Rituximab<sup>®</sup> 靶向的 B 细胞表面抗原) 在不同载体中的稳定性<sup>⑤⑥</sup>。

## 方 法

人源 GPRC5D 去污剂溶液、纳米盘和 VLP (目录号分别为 GPD-H52D3、GPD-H52D4 和 GPD-H52P5)，CD20 去污剂溶液、纳米盘和 VLP (目录号分别为

CD0-H52H3、CD0-H52H1 和 CDP-H52P6) 以及 VLP 对照 (目录号为 VLP-N5213) 由 ACROBiosystems 慷慨提供。GPRC5D 和 CD20 样品分别在适当的缓冲液中调至约 0.15 和 0.25 mg/mL。

去污剂溶解的蛋白质悬浮在 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% DDM, 0.01% CHS, pH 7.5, 含 10%甘油的溶液中。GPRC5D 纳米盘的配方为 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5, 含 20%甘油。CD20 纳米盘的配方为 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5, 含 10%海藻糖。所有 VLP 都在含有 10%海藻糖的磷酸盐缓冲盐水 (PBS), pH 7.4 的溶液中。

CPM (Thermo Fisher Scientific) 溶解至 5 mg/mL 的二甲基亚砜中, 分装并储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 。使用前, 将染料储备液的一个等分试样在室温下解冻, 并稀释至 0.2 mg/mL 到相应的蛋白质样品配方缓冲液中。根据蛋白质中非二硫键半胱氨酸残基的数量, 将 CPM 添加到蛋白质样品中, GPRC5D 的最终摩尔比为 17:1, CD20 的为 3:1<sup>⑦</sup>。

每次实验中将每个样品的 9  $\mu\text{L}$  加载到一个 Uni (包含 16 个 9  $\mu\text{L}$  石英比色皿, 由硅胶垫片密封) 中, 每个样品重复三次。样品在 Uncle 中以  $0.6^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$  的速度从  $15^{\circ}\text{C}$  加热到  $95^{\circ}\text{C}$ , 并由 266 和 473 nm 激光器一起或单独使用 266 nm 激光器激发含 CPM 的样品。荧光发射和静态光散射 (SLS) 同时监测。

Uncle 分析软件通过 300–430 nm 的荧光发射的重心平均 (BCM) 确定没有 CPM 的样品的  $T_m$ 。基于 CPM 的  $T_m$  通过 400–525 nm 染料荧光的增加确定。 $T_m$  在荧光图上显示为垂直线, 取三次测量的平均值。在加热前后, 通过动态光散射 (DLS) 测量平均流体动力学直径, 每次测量 4 次, 每次 5 秒。

## 结 果

Uncle 的 266 nm 激光激发蛋白质中的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基, 这些残基在大约 330 nm 处有一个荧光峰 (图 2A)。随着蛋白质解折叠, 内源荧光通常会减弱并向 350 nm 移动, 这是因为芳香族氨基酸暴露在更水相的环境中。Uncle 通过跟踪内源荧光的变化来监测解折叠过程。如果蛋白质在热梯度中聚集, 样品的静态光散射强度会增加, 这可以与荧光一起监测。

膜蛋白在解折叠过程中由于其溶解性并不总是表现出内源荧光的变化。为了能够表征它们的解折叠，Uncle 的紫外激光可以激发 CPM，一种与蛋白质中自由半胱氨酸残基的巯基反应的染料，从而在 400–600 nm 之间增加其荧光发射（图 2B）。随着蛋白质解折叠，这些半胱氨酸残基变得更容易接触到染料。

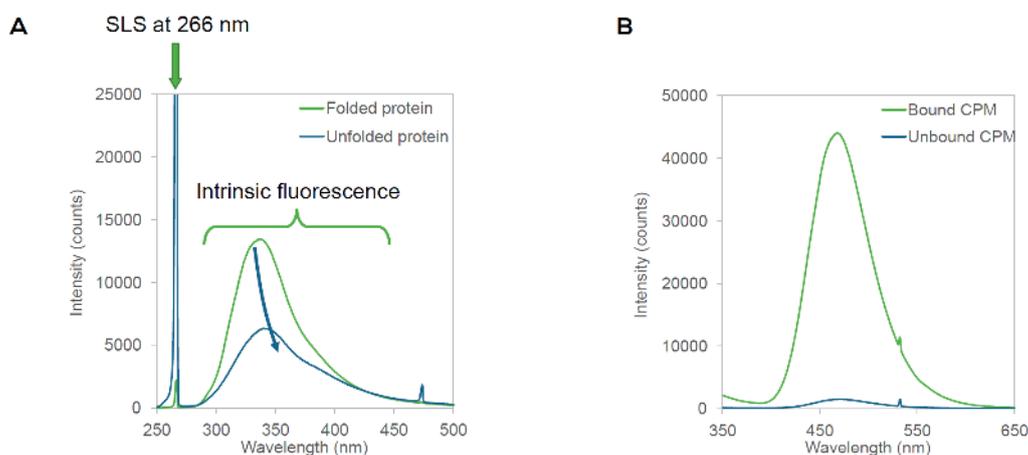


图 2：蛋白质的内源荧光在解折叠时通常会减弱并移向更长的波长；随着其聚集，散射的光更多。Uncle 同时监测 SLS 的增加和内源荧光的变化以评估热稳定性 (A)。染料 CPM 在热梯度中溶解时暴露的自由半胱氨酸残基反应，从而增加 CPM 的荧光，可用于评估膜蛋白的稳定性 (B)

即使是去污剂溶解的膜蛋白，其热稳定性也可以根据解折叠温度进行排名。Uncle 的全光谱荧光检测允许您使用不同的方法检测解折叠，为找到最合适的工具提供了灵活性。

去污剂溶解的 GPRC5D 的 CPM  $T_m$  为  $46.2^{\circ}\text{C}$ ，而其内源荧光  $T_m$  为  $48.8^{\circ}\text{C}$  (图 3A)。  $T_m$  之间  $2.5^{\circ}\text{C}$  的差异很小，而且完全在预期之内，考虑到这两种不同的方法可能监测的是蛋白质的不同成分和结构域。

嵌入纳米盘中的 GPRC5D 具有  $56.6^{\circ}\text{C}$  的 CPM  $T_m$ ，但没有明显的内源荧光  $T_m$  (图 3B)。纳米盘支架蛋白 MSP1D1 没有任何半胱氨酸残基，因此 CPM  $T_m$  可以仅归因于 GPRC5D。然而，MSP1D1 确实含有芳香族残基，这些残基会对内源荧光信号有贡献。由于纳米盘中 GPRC5D 的 CPM  $T_m$  比去污剂溶解形式的高出  $10^{\circ}\text{C}$ ，很可能纳米盘对膜蛋白有稳定作用。

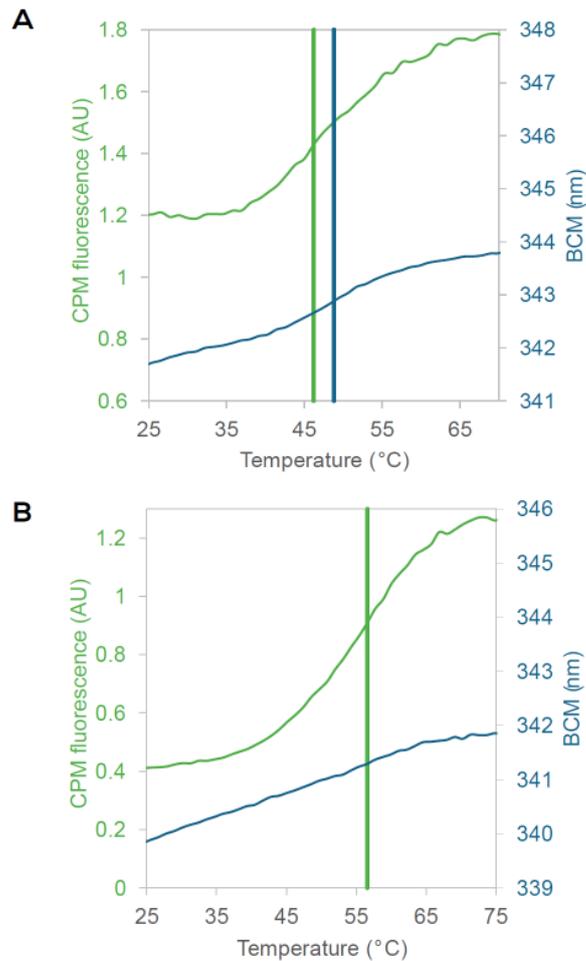


图 3: 去污剂中的 GPRC5D (A) 基于 CPM 荧光增加 (绿色) 和内源荧光变化 (蓝色) 显示出单一的  $T_m$ 。嵌入纳米盘中的 GPRC5D (B) 的 CPM  $T_m$  比在去污剂中的高约  $10^\circ\text{C}$ 。对于纳米盘中的蛋白质, 无法确定内源荧光的  $T_m$ 。图中显示了三次重复的代表图谱

CD20 的自由半胱氨酸残基比 GPRC5D 少 (3 个 vs.17 个), 且这些残基位于胞质或细胞外结构域, 而 GPRC5D 的半胱氨酸残基位于其跨膜  $\alpha$  螺旋中。这种氨基酸排列的不同可能解释了为什么去污剂溶解的 CD20 具有两个 CPM  $T_m$  (而 GPRC5D 只有一个), 分别为  $43.2^\circ\text{C}$  和  $50.9^\circ\text{C}$  (图 4A)。尽管去污剂中的 CD20 在热梯度中内源荧光发射发生了变化, 但无法确定  $T_m$ 。

嵌入纳米盘的 CD20 在  $44.2^\circ\text{C}$  和  $51.9^\circ\text{C}$  处有两个 CPM  $T_m$  (图 4B)。这些  $T_m$  比去污剂中的  $T_m$  高约  $1^\circ\text{C}$ , 这表明与 GPRC5D 类似, 纳米盘可能会稳定 CD20。在纳米盘中的 CD20 具有  $82.4^\circ\text{C}$  的内源荧光  $T_m$ 。在 GPRC5D 纳米盘配方中没有这样的  $T_m$  存在, 表明该  $T_m$  属于 CD20, 而不是纳米盘支架蛋白。Uncle 的全

光谱荧光检测使得能够更彻底地调查不同载体中膜蛋白 CD20 和 GPRC5D 的解折叠行为。

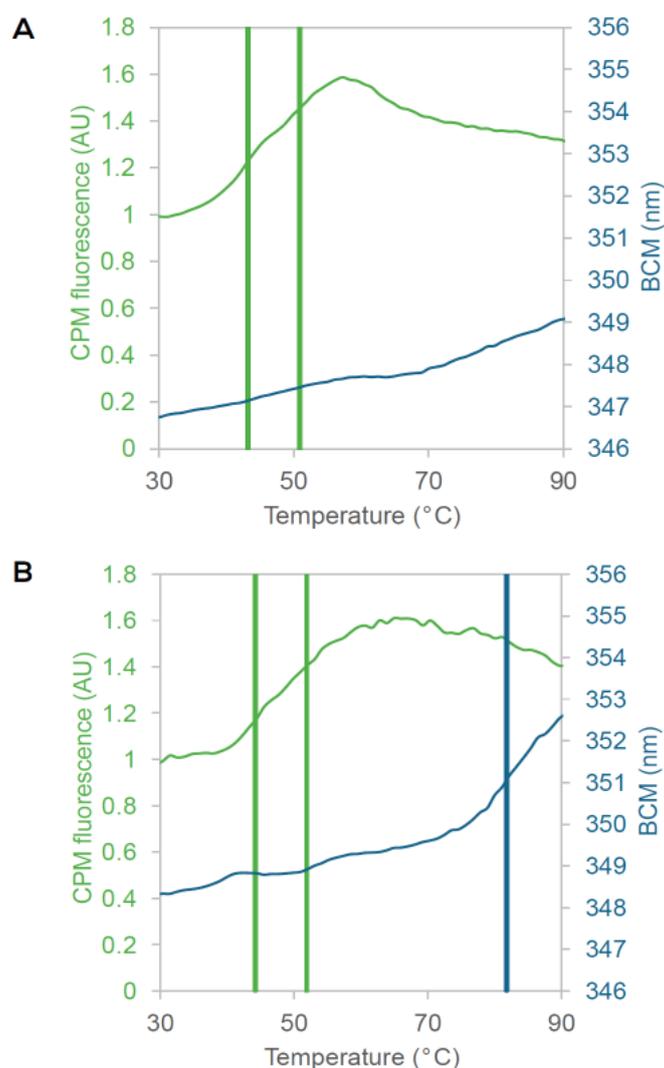


图 4: CD20 在其去污剂配方中 (A) 基于 CPM 荧光增加 (绿色) 具有 2 个  $T_m$ ; 根据其内源荧光 (蓝色), 无法确定  $T_m$ 。嵌入纳米盘的 CD20 (B) 具有 2 个 CPM  $T_m$  (绿色)

和一个单一且明显更高的内源荧光  $T_m$  (蓝色)。显示了三次样品测量的代表图谱

VLP 是膜蛋白非常好的载体, 因为病毒包膜来源于细胞膜的脂质双层。然而, 解释 VLP 的内源荧光信号是复杂的, 因为每种病毒蛋白都有自己的信号, 可能会掩盖膜蛋白的信号。VLP 的 CPM 荧光也存在类似的问题。在这种情况下, 可以访问同位素对照样品, 将该样品的信号与 GPRC5D 和 CD20 VLP 的数据进行比较, 以尝试将解折叠事件分配给每个样品 (图 5)。VLP 对照在 37.9°C、48.5°C 和 59°C 处有 3 个  $T_m$ 。GPRC5D VLP 在 40.7°C 和 59.6°C 处有 2 个  $T_m$ 。CD20

VLP 在 46.4°C 和 56°C 处有 2 个  $T_m$ 。这些样品中最高的  $T_m$  很可能代表相同的病毒蛋白解折叠事件。在没有额外实验的情况下，无法将特定的解折叠事件与特定的蛋白质联系起来，但可以对 VLP 总体的稳定性做出结论：GPRC5D VLP 似乎比 VLP 同位素对照更稳定。CD20 也使得相同的 VLP 在较低温度下更不容易解折叠。

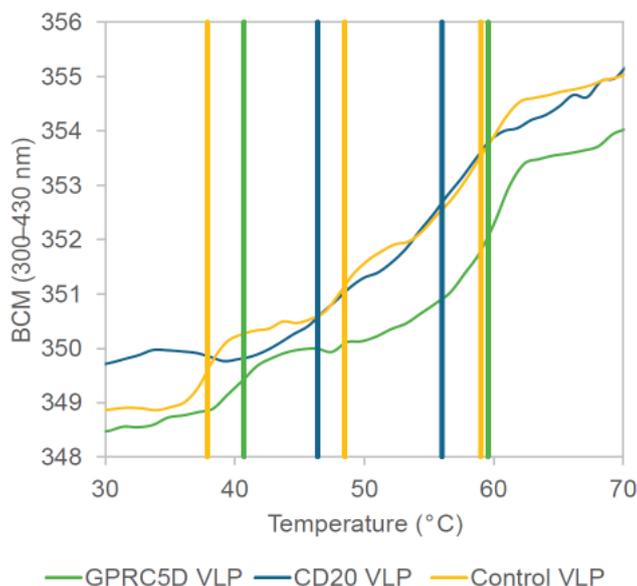


图 5：内源蛋白荧光可以用来表征复杂蛋白质载体的稳定性，包括 VLPs。基于其内在荧光的变化，GPRC5D (绿色)、CD20 (蓝色) 和对照 VLPs (黄色) 显示出多个  $T_m$ ，这可能是病毒蛋白和蛋白负载物的多个解折叠事件的结果。展示了三次重复测量的代表图谱

解折叠是评价蛋白质热稳定性的常用方法，但分析聚集也是另一种选择。就像它有多种检测解折叠的方式一样，Uncle 还有两种正交和互补的检测聚集的方法：DLS 和 SLS。DLS 对于确定蛋白质样品中的颗粒的平均大小或大小分布在加热后是否增加非常有用，这是聚集的常见指标。与大多数蛋白质不同，去污剂中的 GPRC5D 的流体动力学直径在热处理后保持在约 100 nm 左右 (图 6A)。由于该样品中 DDM 的浓度高于临界胶束浓度，这些 100 nm 的颗粒很可能代表去污剂胶束中的 GPRC5D，而不是单独的蛋白质。加热后，GPRC5D 和 CD20 VLP 的大小都有所减小。GPRC5D VLP 的大小从 236 nm 减小到 186 nm，而 CD20 VLP 的大小从 158 nm 减小到 136 nm。加热是灭活病毒的常见方法，根据 DLS

和内源荧光数据，很可能 VLP 在热处理中发生了主要的结构变化，影响了膜蛋白的载体。

SLS 是在热梯度期间检测聚集的一种极其敏感的方法，Uncle 同时测量 SLS 与荧光。当溶液中的颗粒质量增加时，例如由于蛋白质聚集，SLS 强度将增加，而当它们收缩或解体时，SLS 强度将减小。去污剂中的 GPRC5D 的 SLS 强度在热梯度中保持不变。相反，CD20 VLP 的 SLS 强度在约 69°C 开始显著下降。

GPRC5D VLP 在约 58°C 处有 SLS 强度下降 (图 6B)。这种 SLS 强度下降表明整体 VLP 结构发生了变化，而不是特定蛋白质的变化。结合 Uncle 的各种热稳定性工具，能够比单一技术更深入地了解 VLP 等复杂载体的生物物理特性。

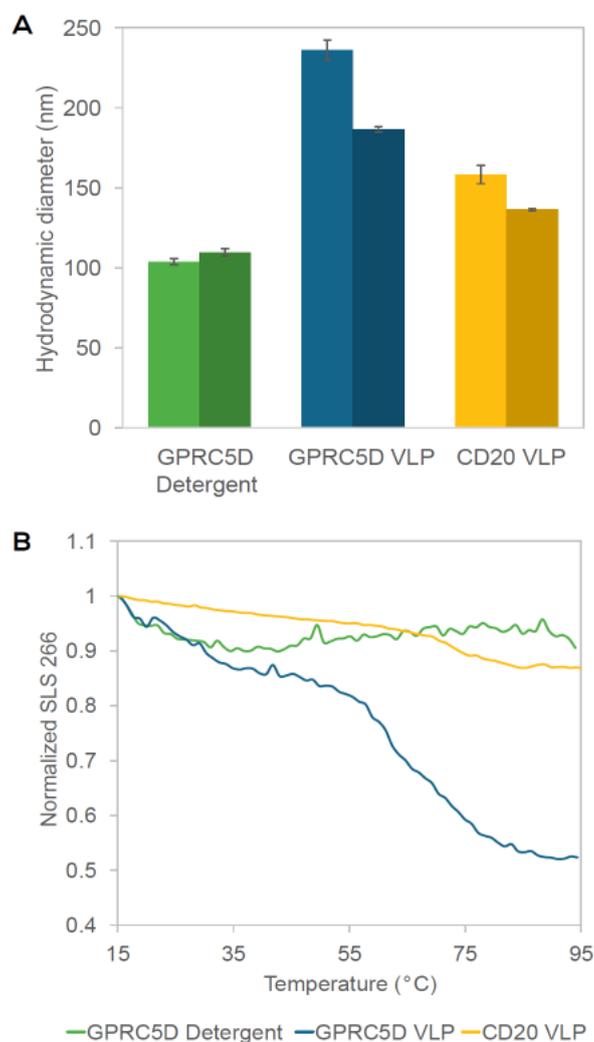


图 6: (A) 去污剂中的 GPRC5D 在加热前 (浅绿色) 和加热后 (深绿色) 的流体动力学直径相当。加热后 (浅色对比深色), VLPs 中的 GPRC5D (蓝色) 和 CD20 (黄色) 变小。GPRC5D 在去污剂中的 SLS 强度。(B) 在热梯度期间保持稳定, 而 GPRC5D 和

CD20 VLPs 的 SLS 强度下降。三次重复测量的流体动力学直径的平均值以误差棒（等于 1 个标准差）表示。展示的 SLS 曲线已标准化初始 SLS 强度值

## 结 论

过度表达的膜蛋白通常不稳定，去污剂的溶解处理可能加剧这个问题。在这些条件下稳定膜蛋白将简化并加速救命药物的发现和开发，但传统的稳定性工具消耗大量样品，难以适应高通量过程。Uncle 通过追踪多个稳定性参数（荧光、SLS 和 DLS），能够处理膜蛋白的复杂载体，包括去污剂、纳米盘或 VLPs。全光谱荧光使您能够灵活地探索并找到检测蛋白质的最佳方法，即使涉及使用 CPM 等染料。Uncle 所需的样品体积较小，使您能够比以往更高效地进行测试。SLS 和 DLS 是检测聚集或大小变化的正交方法，通过在 Uncle 中结合大小和解折叠信息，可以理解热量对膜蛋白的所有生物物理影响。有了这些数据，您不仅可以了解蛋白质发生了什么，还可以得出原因并制定应对策略。

## 特别鸣谢

此次实验中使用的样品均由 ACROBiosystems 提供。



**ACROBiosystems, Inc.**  
1 Innovation Way, Newark, DE 19711  
US/Canada: +1 800-810-0816  
Asia & Pacific: +86 400-682-2521  
Email: techsupport@acrobiosystems.com

## 参考文献

- 1 Microscale Fluorescent Thermal Stability Assay for Membrane Proteins. AI Alexandrov, et al. Structure. 2008; 16(3):351–359.
- 2 Recent strategic advances in CFTR drug discovery: An overview. M Rusnati, et al. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21(7).
- 3 Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. IG Denisov, et al. Nature Structural & Molecular Biology. 2016; 23(6):481–486.
- 4 Chapter 7 – Challenges and Approaches for Assay Development of Membrane and Membrane–Associated Proteins in Drug Discovery. S Gridley, et al. In: Lunn CA, ed. Progress in Molecular Biology and Translational Science. Vol 91. Membrane Proteins as Drug Targets. Academic Press; 2010:209–239.

- 5 GPRC5D as a novel target for the treatment of multiple myeloma: a narrative review. P Rodriguez–Otero, et al. Blood Cancer Journal. 2024; 14(1):24.
- 6 Antibody Structure, Instability, and Formulation. W Wang, et al. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2007; 96(1):1–26.
- 7 UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. The UniProt Consortium. Nucleic Acids Research. 2023; 51(D1):D523–D531.



**Unchained Labs**  
4747 Willow Road  
Pleasanton, CA 94588  
Phone: 1.925.587.9800  
Toll-free: 1.800.815.6384  
Email: [info@unchainedlabs.com](mailto:info@unchainedlabs.com)

© 2024 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo, Uncle, and the Uncle logo are trademarks and/or registered trademarks of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A