

Membrane protein의 안정적인 분리를 위한 탁월한 선택 PreserveX™ Polymeric Micelles

TaKaRa Code QBI001 1 ml

본 제품은 QBI Life Science사 제품입니다.



Membrane protein은 drug discovery를 위하여 매우 중요한 요소로 주목 받고 있지만, 매우 불안정하고 활성화 상태를 유지하기 힘들어 다루기가 쉽지 않은 단점이 있다. 금번 발매된 QBI사의 PreserveX™ Polymeric Micelles는 Membrane protein의 안정성을 유지할 수 있는 환경을 제공함으로써 Membrane protein의 생리적 활성을 그대로 유지할 수 있도록 하는 제품으로 관련 연구에 큰 도움이 될 것이다.

본 고에서는 PreserveX™ polymeric micelles의 이용 여부에 따른 GPCRs, 여러가지 kinase나 약물의 생리활성에 관련된 여러 종류의 효소 등 Membrane protein의 시간에 따른 안정성과 빛의 산란 정도를 비교하였다. 그 결과 효소의 안정성과 활성이 증가되었고, 빛에 대한 산란 정도는 감소하여 Membrane protein을 이용한 실험에 긍정적인 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[PreserveX™ Polymeric Micelles의 장점]

- 각종 효소와 수용체 등 막 단백질의 활성 유지 및 증가효과
- 일반적인 실험과정이나 상온에서도 단백질 안정성 유지
- 수용성 증가효과
- 더욱 안정적으로 흡광도나 형광 측정 가능
- 다양한 추가실험에 적용 가능(including multi-well microplate assays)
- 활성화 Membrane protein의 고정화

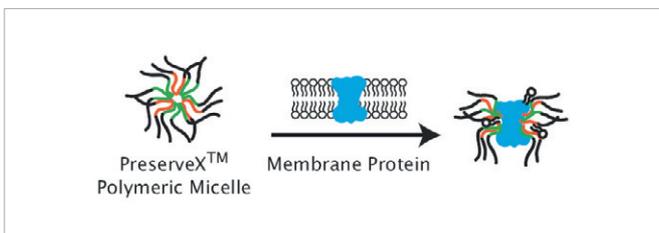


그림 1 PreserveX™ Polymeric Micelles

[실험방법]

정제한 단백질과 PreserveX™-QML를 일정한 비율로 넣고 bath-type sonicator로 약하게 sonication하여 단백질이 PreserveX의 micelle에 둘러 쌓이도록 해준다. Fluorescence resonance energy transfer(FRET)를 위하여, PreserveX™-QML Polymeric Micelles를 다시 Lissamine™ rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine(Invitrogen, λ_{ex}

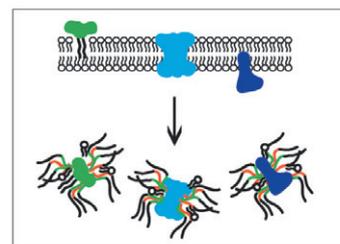
Characteristics of PreserveX™ Polymeric Micelles

- ◆ Small size (approximately 20 nm),
- ◆ Low critical micelle concentration (CMC = 0.5 μM),



A low CMC results in a more stable complex than can be achieved with low molecular weight detergents.

- ◆ Ability to incorporate proteins and lipids from membranes, and



Membrane and membrane-associated proteins and lipids are incorporated into the micelles.

- ◆ Compatible with multiple methods to incorporate proteins and lipids.

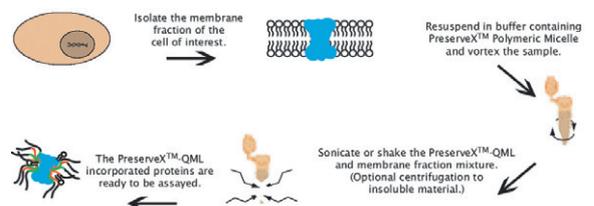


그림 2 PreserveX™ Polymeric Micelles의 특징

560 nm, λ_{em} 580 nm)으로 표시 하였다. Fluormone™ EL Red는 ER α에 대하여 5-10 nM의 K_d값을 가지는데(Invitrogen), Tecan Safire™ Fluorescence Plate Reader나 Beacon® 2000 Fluorescence Polarization Reader를 이용하여 측정할 수 있다. 모든 실험은 실온에서 진행하였다.

Step 1

Standard protocol (e.g., McNamee, M.G. "Isolation and Characterization of Cell Membranes." *BioTechniques*, 1989, 7, 465-475)을 이용하여 원하는 cell membrane fraction Isolate, Protein concentration 측정

Step 2

Buffer에서 membrane fractions Resuspend, PreserveXTM-QML: protein:의 비율을 1:20 (w/w)로 첨가하고 Vortex,
(주의): 비율은 protein의 종류에 따라 달라질 수 있다.

Step 3

Membrane/PreserveXTM-QML mixture를 Sonicate, 원심분리를 통하여 unsolubilized membrane proteins은 침전시킬 수 있다.

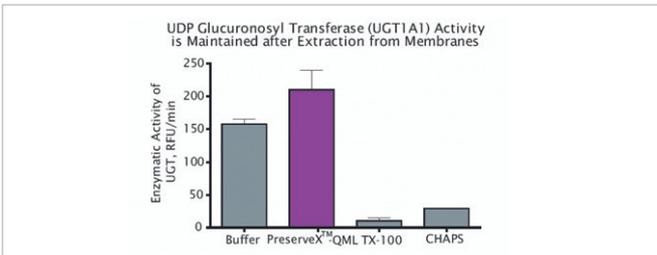
Step 4

시료의 Protein농도를 측정하고, biological activity를 위한 assay

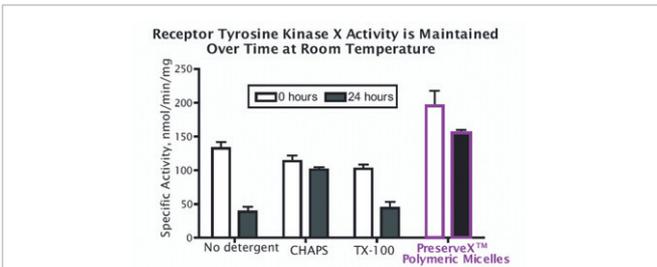
그림 3 PreserveX™-QML을 이용한 실험 방법

[실험결과]

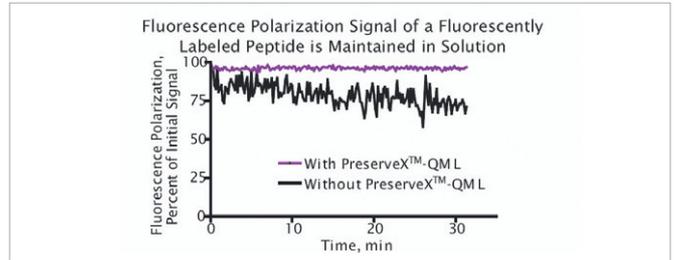
1. 분리된 단백질의 생리활성 유지효과: UGT1A1(UDP glucuronosyl Transferase) 활성이 유지되고 있음을 확인하였다.



2. 분리된 효소 단백질의 안정성 유지효과: Receptor Tyrosine Kinase X의 활성이 상온에서도 유지됨을 알 수 있다.



3. 분리된 결합 단백질의 안정성 유지효과: 형광으로 표식된 펩타이드의 안정성을 확인할 수 있다.



PreserveX™-QML을 BODIPY-motilin(a fluorescently-labeled 22 residue peptide)과 혼합한 후, 30분 동안 연속적으로 fluorescence polarization을 측정하였다. PreserveX™-QML를 사용한 경우에 더 안정적인 형광 시그널을 확인할 수 있었다. 다른 종류의 형광 ligand를 이용하였을 경우에도 유사한 효과를 확인하였다(data not shown).

4. 향상된 친수성: UGT1A1 혼합물의 수용성 정도가 증가하였음을 확인할 수 있다.

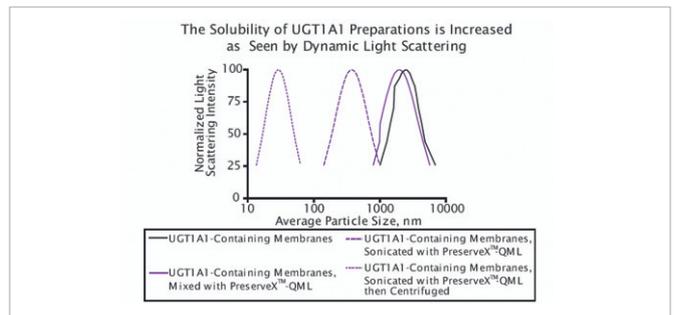


그림 4 PreserveX™-QML 이용 시 ligation 결합력 저하 유무 비교결과

Ligand for ERα	Without PreserveX™-QML	With PreserveX™-QML
	EC50	EC50
Tamoxifen Citrate	61 nM	71 nM
Estradiol	12 nM	10 nM
Estrone	147 nM	125 nM
4-Dhydroandrosterone	>1 mM	>1 mM

[참고문헌]

- www.probes.invitrogen.com/media/publications/355.pdf
- http://www.bdbiosciences.com/discovery_labware/genest/products/pdf/S01T044R2.pdf
- http://www.invitrogen.com/content/sfs/panvera/L0504.pdf
- http://las.perkinelmer.com/Content/RelatedMaterials/finalcampfire.pdf
- http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/L0893.pdf
- Feighner, SD, Tan CP, et al. *Science*. 1999, 284, 2184-8.

[표 1 PreserveX™ Polymeric Micelles의 다양한 적용 예]

ype of Protein	Protein Name	Type of Assay	Results
Cyclooxygenase (COX)	COX-2	Fluorometric & Colorimetric	Improved stability in solution
Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor (GPCR)	Human Motilin Receptor Human Adrenergic Receptor	Fluorescent Polarization	BODIPY-motilin Stabilization Maintain Rank Order of Ligand Binding
Cytochrome P450 (CYP)	CYP1A2 CYP3A4	ELISA Spectral Characterization	Immobilization of Functional Protein Reduction in Light Scattering
UDP Glucuronosyl Transferase (UGT)	UGT1A1 UGT1A6	Fluorescent Ratiometric Assay	Increased Biological Activity Improved Stability (dilution, freeze/thaw)
Membrane-Associated Kinase	Receptor Tyrosine Kinase	Affinity Purification Fluorescent Polarization	Affinity Column Purification Increased Enzymatic Activity Improved Stability (freeze/thaw)
Nuclear Receptor	Estrogen Receptor α	Fluorescence Polarization	Maintain Rank Order of Ligand Binding
Membrane Fragments	Model Proteins and Lipids	Surface Plasmon Resonance	Immobilization and Microarray Development
Plant Membrane Protein Complexes	Fatty Acid Synthase	Thin Layer Chromatography	Purification of Protein Complexes
Prokaryotic Membrane Proteins	Plasma Membrane Proteins	General Protein Purification	Breaking Membranes