

通过透析重建制备膜蛋白二维结晶

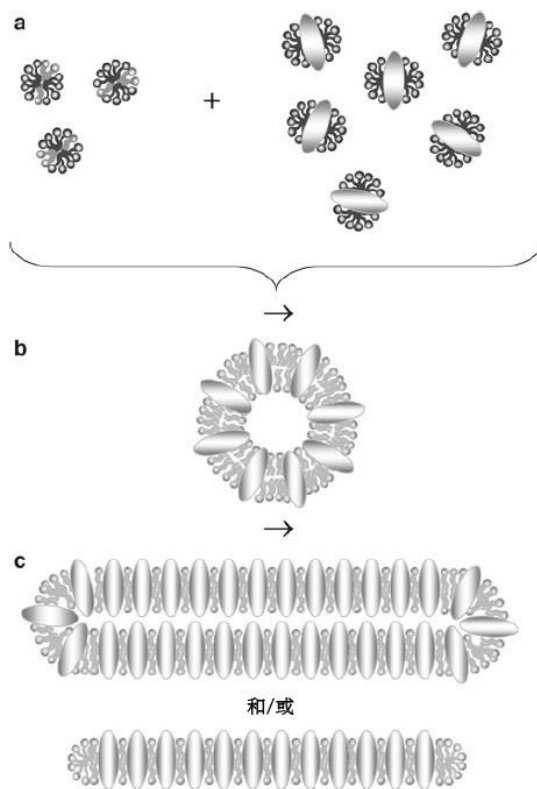
摘要

膜蛋白因“封闭”在天然脂质双分子层内，其结构和功能的研究均较复杂，而二维（2D）结晶和电子晶体学技术为此方面的研究提供了大量重要信息。本文介绍一种通过透析去除表面活性剂，从而制备 2D 晶体的技术，包括磷脂的制备、脂质的重建以及缓冲液条件。同时，实验通过对影响因素进行优化，得出制备具有最佳顺序和尺寸的 2D 晶体的条件。

1. 简介

当膜蛋白能有效纯化，并获得足够的量，2D 结晶将成为限制对其进行进一步电子晶体学研究的主要瓶颈。多个实验室都在开发快速、简单地进行 2D 结晶的新技术，包括条件的优化以及过程的自动化。从已有数据可知，低脂质/蛋白比（LPR）条件下的二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）对于获得 2D 晶体至关重要，而透析缓冲液中的盐浓度可能会影响晶体的尺寸和形态。膜蛋白高表达及纯化新技术的出现，使研究人员可获得更高的产量，以用于 2D 实验，同时结合冷冻电镜（EM）及图像处理技术，研究瓶颈正在逐渐消除。

2D 结晶的目标主要有两个方面：A) 晶体高质量；B) 晶体尺寸至少需达 $1\mu\text{m}$ 。当进行活性蛋白结晶时，可能需要添加抑制剂来诱导结晶，即可通过结晶获得结构-功能方面的信息，如 ATP 酶。



重建过程横截面示意图: a) 表面活性剂-脂质混合液加入到溶于表面活性剂的纯化蛋白中; b) 透析后形成脂蛋白体, 理想情况下不含或仅含少量表面活性剂; c) EM 下 2D 晶体横平面, 上方为 2 层排列囊泡或管状 2D 结晶, 下方为单层管状结晶。

透析介导膜蛋白插入脂质双分子层的重建过程是最常用的 2D 结晶技术。单层 2D 结晶使用较少，但已在多种蛋白质上获得成功。在无表面活性剂的缓冲液中进行透析，可使膜蛋白折叠进入连续的脂质双分子层，即模拟天然蛋白环境。该过程包括溶于表面活性剂的脂质与溶于表面活性剂的完全去脂化蛋白质在低 LPR 条件下的混合，然后透析去除表面活性剂。在优化的条件下，可重建形成脂蛋白体，并排列形成 2D 晶体。实验的目的是获得直径 1 μ m 或更大、高纯度并呈有序阵列的蛋白晶体，以用于冷冻电镜数据采集，并进一步进行 3D 重建。影响晶体尺寸和排列状态的因素很多，包括蛋白质纯度、脂质类型、LPR、表面活性剂浓度、盐类型及浓度、透析时间和温度。这种 2D 结晶过程通常以两或三个阶段进行，包括脂质双分子层形成、同时蛋白插入膜、然后重排形成有序 2D 晶格。在常规 2D 结晶实验中，如果蛋白质纯度和稳定性均较高，则影响晶体尺寸和排列的主要因素一般为 2-3 个，条件的优化过程是主要的实验时间耗费点。

重建膜蛋白 2D 结晶的控制步骤是从混合胶束向脂蛋白体转化的过程，该过程很大程度上受透析时间和表面活性剂清除速度的影响，而两者又与温度高度相关。理想的结晶温度取决于所用脂质的相变温度。尽管在相变温度 (PPT) 下也可形成结晶，但常规来讲，在脂质液相中，该过程更易发生。在透析过程中，缓慢提高温度至 PPT 以上，降至 PPT 以下，通过温度的变化来实现脂质液相转化，对结晶过程非常有帮助。当然，透析的温度必需考虑到蛋白质的稳定性。

适用于 2D 结晶的技术很多，包括透析，该技术相对便宜，不需要特殊设备，可用于极少量的样品 (~100 μ l/周)。本文旨在建立通过透析进行 2D 结晶的实验步骤，并讨论开始一个新实验之前应考虑的因素。实验过程相对简单，不需要复杂的操作，但操作必需小心，并注意各参数的调节。实验步骤包括透析用磷脂的制备、透析方法的选择以及测试参数的选择等。

2. 材料

成功、可重复 2D 结晶的关键因素是清除技术的使用，特别是不需要的脂质污染物。实验过程中必需戴手套，彻底清洗玻璃器皿，清洁台面，避免灰尘颗粒污染。玻璃器皿上残留的盐会改变透析缓冲液中的盐浓度，而任何残留的表面活性剂会改变结晶条件或蛋白质结构及功能的完整性。此外，人体皮肤上存在的天然脂质也会很容易地进入透析样品或设备，改变条件。

2.1. 透析设置

1. 实验使用 MWCO 12-14kD、扁平宽度 10mm 的 Spectra/Por 透析膜，剪成 8-9cm 小段，也可根据样品和条件，选择不同的透析产品，如透析体积较小，可使用 Spectra/Por Micro Float-A-Lyzer 即用型透析装置。
2. 样品加入透析膜内腔，两端用 35mm Spectra/Por 聚丙烯透析膜夹封闭。
3. 使用恒温箱控制透析温度，方便加热或冷却，也可在温度恒定的空调房内进行实验 (18-25 $^{\circ}$ C)，此外，对于热敏感蛋白，可在冷室或冰箱内进行实验 (4-8 $^{\circ}$ C)。
4. 准备 400ml 透析用玻璃杯。
5. 可盖住玻璃杯口的铝箔、封口膜或培养皿。

6. 用于调湿透析膜的超纯水。
7. 用于调湿透析膜的 1L 烧杯。

2.2. 透析缓冲液

1. 缓冲液成分与最终蛋白纯化和储存用缓冲液相同。如样品量为 10-100 μ l, 则需 250ml 无表面活性剂缓冲液。
2. 甘油
3. 1mM NaN₃
4. 根据蛋白质性质, 选用配体或抑制剂

2.3. 蛋白质

1. 最大限度纯化的溶于表面活性剂的目的膜蛋白。调整蛋白样品浓度 (0.5-1mg/ml), 分成 75-100 μ l 小份, 液氮极速冷冻, 并储存于-80 $^{\circ}$ C, 操作时应避免缓慢冻融, 以免破坏结构完整性。如蛋白质稳定性较差, 不能储存, 应于纯化后立即进行 2D 结晶实验。
2. 清除纯化后蛋白质中任何非结构性必要的共纯化脂质。
3. 透析前, 蛋白质应溶解于表面活性剂中, 以保持蛋白质稳定。
4. 透析的最佳蛋白质浓度一般为 0.5-1mg/ml。由于 LPR 对结晶过程至关重要, 应精确测量蛋白质浓度。
5. 可根据蛋白质浓度, 补加表面活性剂。如果蛋白质浓度过高, 可在透析前补加少量缓冲液。

2.4. 表面活性剂

1. 蛋白质纯化所用表面活性剂的类型和浓度是实验的首要考虑因素。
2. 表面活性剂的临界胶束浓度 (CMC) 决定了透析的速度和时间。
3. 如果纯化样品中的表面活性剂浓度过高 (如为 CMC 的数倍), 应降低浓度, 以避免长时间透析。但浓度的降低不应以蛋白质稳定性或活性的损耗为代价。
4. 表面活性剂可通过连续少量添加疏水性 BioBeads (Bio-Rad) 去除, 其可通过聚苯乙烯微球快速吸附高/低 CMC 表面活性剂。清除的速率可通过控制添加微球的量来调节。

2.5. 脂质

2.5.1. 脂质储液制备

1. 10-20ml 圆底烧瓶, 使用前彻底清洗, 去除残留表面活性剂和脂质。
2. 连接装有减压阀和软管的氮气或氩气罐。

3. 在软管上连接干净微量移液吸头 (100-200 μ l), 吸头尖端切掉~2mm, 另一端插入软管。
4. 根据不同表面活性剂对蛋白质稳定性和溶解性分析, 选择表面活性剂-缓冲混合液。实验发现, 0.5%脱氧胆酸钠对于脂质溶解和 2D 结晶均有良好效果。
5. 脂质溶于氯仿, 根据 LPR 范围, 一般浓度为 1-25mg/ml。
6. 使用 EP 管分装并冷冻储存。
7. 氯仿需在通风柜内操作。

2.5.2. 脂质

1. 脂质储液加入表面活性剂。

3. 方法

通过透析进行 2 维结晶需要分数步进行。为使操作更简便, 同时保证实验可重复性, 实验前需明确 4 点: 需 2D 结晶的蛋白质、用于溶解蛋白质的表面活性剂、用于重建/结晶的脂质以及透析缓冲液, 这几点将决定整个实验的设置。确定初步策略后, 制备脂质储液。确定蛋白质浓度后, 准备透析膜和透析用缓冲液。透析的设置相对简单, 包括成分的混合以及一定的透析时间 (需足以去除表面活性剂), 通常需要数天。

3.1. 制定 2D 结晶实验初步策略

3.1.1. 蛋白质

1. 可用性: 第一个需要考虑的问题是蛋白质是否可定期、定量获得, 该问题决定了 2D 结晶技术的可行性、可进行的实验次数以及可测试的实验条件。蛋白质的最小可用量取决于新蛋白的制备时间, 并决定了整个实验时间。推荐至少每 1-2 周获得 0.3ml 给定浓度的蛋白质。
2. 浓度: 通常来讲, 蛋白质浓度应尽足够高, 以保证 2D 结晶实验的顺利进行。此外, 确定蛋白质浓度也方便计算 LPR。进行一次成功的结晶实验, 蛋白质浓度一般需为 0.5-1.0mg, 浓度不是 2D 结晶的决定因素, 如蛋白生产较困难, 较低的蛋白浓度 (但不低于 0.2mg/ml) 也可开始初步实验。当然, 不同的技术因为表面活性剂的存在, 对蛋白浓度的要求会有所差异。但所有的技术都应尽量降低蛋白浓度对实验的影响, 以获得可重复的相对值。蛋白浓度的确定, 即使整体来讲只是一个相对值, 其对于确定脂质/蛋白比 (LPR)、进而确定脂质添加量至关重要。
3. 分子量及亚单位数量: 蛋白质大小是计算 LPR 的考量因素, 而 LPR 对于 2D 结晶成败又极为重要。蛋白质的分子量及亚单位数量信息可用于初步估算重建需要的最小脂质量。如果初步估算值过低, 导致蛋白质沉淀, 可测试更高的 LPR。使用摩尔 LPR 可使脂质分子的用量更为明确, 也可更为简单地描述相对单个蛋白分子, 加入了多少脂质分子。但大多数实验室仍较常使用质量比, 而非摩尔比, 所以需明确所用的计算方法。

4. 灵活性/构象：蛋白质的结构灵活性，不仅是诱导 2D 结晶的决定因素，而且可提供结构-功能信息。
5. 温度敏感性：一般情况下，从蛋白质纯化数据和生物化学分析，即可获得蛋白质在不同温度条件下的稳定性。蛋白质溶液中添加脂质的量会影响其温度稳定性。

3.1.2. 表面活性剂

1. 类型：由于透析会去除表面活性剂，所以表面活性剂的类型对于 2D 结晶的影响较低。所以在起始实验中，一般推荐使用增溶表面活性剂。实验发现，更改表面活性剂，不会对结晶过程产生显著影响。但也有研究人员提出，更换表面活性剂会影响 2D 晶体的尺寸和质量。
2. 浓度和 CMC：确定了表面活性剂类型后，其 CMC 值及浓度将决定透析的时间，如使用 CMC 值较高的表面活性剂，如 CHAPS，可能需要 1-4 天去除，而使用 CMC 值较低的表面活性剂，如 Triton X-100 和 DDM，至少需要 1 周。透析时间长短的确定需考虑蛋白质在所选条件下的稳定性以及表面活性剂清除的程度。
3. 至少在第一次 2D 结晶中，增溶表面活性剂的溶度应为维持蛋白质稳定和功能的最佳浓度。之后，可根据其对 2D 晶体大小的影响，增加或降低浓度。
4. 表面活性剂与蛋白质的相容性：如果可能，在蛋白质纯化实验中应尽量测试多种表面活性剂，以免脂质增溶表面活性剂与蛋白质不相容。

3.1.3. 脂质

脂质包括蛋白质共纯化脂质和重建时添加的脂质。LPR 是主要的结晶参数，通常也是 2D 结晶的决定因素。最佳的摩尔 LPR 范围为 1-30，但不同蛋白质之间的该值差异可能较大。

脂质的选择，无论是天然的或内源性的，会显著影响 2D 结晶。一些蛋白质只能在天然脂质双分子层内原位诱导结晶，也就是说需要更具天然存在的晶体阵列进行分离和改良。使用共纯化脂质也可成功进行结晶。最常选择是混合磷脂，包括从天然膜纯化，或包括 *E.coli* 在内的其它来源，在这些异源性膜内，一般可获得合适的晶体。通过对多种脂质的筛选发现，只有一两种脂质较为通用，一些蛋白质对于脂质类型不敏感，而另一些则需要特定的脂质才能结晶，通常为天然脂质。在某些情况下，晶体包装会因为 LPR 及脂质酰基链长度的不同而不同。通常在混合磷脂制备过程中发生的多不饱和磷脂的氧化可通过使用合成单不饱和脂质来避免。引人注意的是 DMPC 的成功，其可单独添加或与其它脂质混合添加（如 POPC），在多数情况下，使用 DMPC 均可成功获得膜蛋白 2D 晶体。

1. 共纯化脂质：共纯化脂质可通过薄层层析（TLC）和质谱鉴定，也可在不添加外源脂质的条件下通过简单透析蛋白质鉴定。在后一种情况下，样品与过量共纯化脂质透析后，进行电镜（EM）筛选，会发现多种不同形态的脂质体或膜结构，即需进行进一步的纯化，如用表面活性剂漂洗去除脂质。改变蛋白质纯化过程中添加的共纯化脂质量，可能需要相应地调整 2D 结晶实验的 LPR。共纯化脂质的添加量应尽量低，过量的脂质会将蛋白质“稀

释”成脂蛋白体，抑制大尺寸晶体的形成。

2. 重建脂质的选择：多数成功的膜蛋白 2D 结晶都使用 DMPC，所以在初步实验时，推荐使用该磷脂。特定的蛋白可能需要使用多种脂质混合液或天然源性脂质，可以在随后的实验中进行测试。
3. 脂质/蛋白质比：对于初步结晶实验，可将摩尔 LPR 设为 0、3、15 和 30。LPR 0 可方便快捷鉴定可能的共纯化脂质；LPR 3 诱导 2D 结晶的成功率最高；LPR 15 可用于较大的膜蛋白，其与 LPR 30 结合，可作为对照，确保在所用缓冲和透析条件下形成脂蛋白体。另外一个需要考虑的因素是，最终 2D 晶体中的 LPR 测量值可能与起始结晶条件会有些许差别，因脂质未完全进入晶体或溶液中残留有未结晶蛋白。结晶和未结晶脂质之间的亚稳定性可能导致晶体长期稳定性的下降，可以使用磷脂酶或表面活性剂鸡尾酒法去除。LPR 应按溶于氯仿的脂质储液计算，因为干脂质的吸湿性较强，导致称量错误。

3.1.4. 透析缓冲液

透析缓冲液的成分和特性会影响膜蛋白的 2D 结晶。在起始实验中，缓冲液可选择最终纯化步骤所用缓冲液，因蛋白质在其中稳定并可保持活性。

1. 缓冲液选择：初步试验阶段所用缓冲液应于最终纯化步骤所用缓冲液一致或接近，以最大限度地保证蛋白质的稳定性。
2. 缓冲液成分改良：如有可能，应尽量去掉或更换缓冲液中较为昂贵的成分。
3. 甘油：一般情况下，添加 20% 的甘油有助于获得较大尺寸的蛋白晶体。所以，在给定条件下，甘油对脂蛋白体尺寸的影响也是值得研究的内容之一。
4. 盐：盐的选择和数量会显著影响 2D 晶体的尺寸和形态。通常，可先试验蛋白纯化缓冲液中所用的盐，也可以考虑多种盐离子的组合，包括单价及二价阳离子盐。
5. 温度：除非蛋白质对高温高度敏感，一般在 24°C 条件下，可成功获得大多数膜蛋白的 2D 结晶，且此温度高于 DMPC 的相变温度。即使是温度敏感性膜蛋白，也可在此温度下，进行初步实验，因为脂质可起到一定的蛋白质稳定作用。

3.2. 透析前操作

3.2.1. 脂质-表面活性剂储液的制备

实验过程中应配套手套，以避免皮肤表面残留脂质对实验的影响。步骤 1-6 应在通风良好的通风橱内进行。

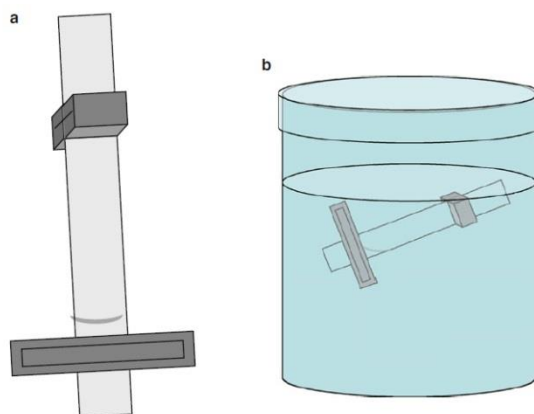
1. 制备表面活性剂缓冲溶液，用于溶解脂质。一般实验下，2ml 溶液即足够，但实际配制总量应根据 2D 结晶实验所选 LPR 范围而定。脂质终浓度定为 1mg/ml 可方便移液，即使摩尔 LPR 低于 1。本文介绍制备 1ml 1mg/ml 储液的方法。当 LPR 为 15，且蛋

白浓度为 1mg/ml 或以上时，脂质储液浓度定为 25mg/ml 较为理想，特备是用于蛋白质和脂质的增溶性表面活性剂差别较大时，这样可降低所需的移液量，避免对反应系统造成显著影响。

2. 小心打开脂质瓶。注意保护手指，避免划伤。
3. 为避免氯仿蒸发，导致脂质浓度变化，使用 Hamilton 注射器快速吸取 1ml 溶液至圆底烧瓶。确保氯仿-脂质混合液处于烧瓶底部固定位置，避免只有部分脂质重溶，导致 LPR 偏差。
4. 检测氮气气流，将气流对准烧瓶内混合液，注意不要改变混合液位置，增强气流，提高氯仿蒸发速度。避免溶液移动或摊开。
5. 蒸发所有氯仿。
6. 停止通气。
7. 取 1ml 表面活性剂缓冲溶液，加入圆底烧瓶，覆盖脂质。注意，移液量需准确，以避免最终脂质浓度偏差，而妨碍 LPR 一致性、结晶条件及脂质储液制备重复性。
8. 烧瓶内的表面活性剂缓冲液将溶解干化脂质，可盖上瓶盖，加快溶解进程，或置于超声水浴中 5min，但需注意溶液升温。
9. 完全溶解后，溶液呈完全清亮透明。特定脂质/脂质混合液外观可能呈透明彩色。
10. 脂质-表面活性剂混合液溶解后，以每份 10 μ l 加入 EP 管，于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 储存。可根据每次结晶实验设置、脂质浓度及 LPR 调整每份的量。

3.2.2. 透析设置

以下为使用透析膜管进行透析实验的操作步骤。



两个透析夹互呈 90 $^{\circ}$ 夹闭膜管，以防止透析膜管与气液界面接触；膜管长度应为 9cm 以上，以防止膜管过短，造成样品损失；膜夹旋转，可保持膜管浸没于缓冲液中。

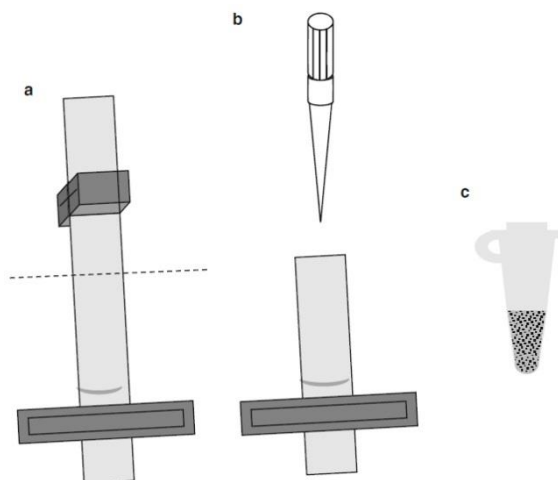
1. 剪一段 $\geq 9\text{cm}$ 透析膜管，置于缓冲液或超纯水中水化 30min。实验过程中，应佩戴手套，避免表面接触，以防止污染，特别是皮肤及实验室环境中存在的不必要脂质。
2. 制备 250ml 缓冲液，置于已彻底清洗并完全去除残留表面活性剂的 400ml 玻璃容器内。
3. 在冰上将荣誉表面活性剂的纯化蛋白悬液与所选脂质储液混合，使样品终体积为 75-100 μl ，置于 EP 管内，涡旋 5s。
4. 样品置于冰上孵育 10min，再次涡旋 5s。
5. 透析膜管一段用透析膜夹夹闭，握住夹闭端，轻弹膜管，去除膜内可能残留的水和缓冲液。吸取蛋白质-表面活性剂-脂质混合液加入膜管，夹闭膜管另一端（与第一个膜管呈 90° ）。膜夹的角度可确保膜管浸入透析缓冲液中。然后，吸取蛋白质-脂质悬液直接加入膜管较低一端，靠近底部膜夹。
6. 将密封的透析膜管置于适量透析缓冲液内，盖住烧杯，置于恒温环境内。

3.3. 透析

1. 定期观察透析膜内透析混合液是否有沉淀形成。在初步测试重建条件时，定期观察有助于实验条件的确立；当初始实验条件稳定后，只需稍微调整时，可适当延长观察时间间隔。

3.4. 透析后操作

1. 从缓冲溶液中取出膜管。拿住膜管一端，在样品液面上方剪开膜管。



竖直握住膜管，与两个膜夹之间含空气处剪开膜管，用移液枪吸出样品。

2. 用移液枪吸取透析膜管内样品，加入微量离心管。
3. 保存透析缓冲液。特备是在结晶条件筛选阶段，表面活性剂去除时间未知时，有必要检测表面活性剂的存在状态。如样品中仍存在表面活性剂，可将其置于新的透析膜管内，放入缓冲液继续透析。
4. 用于 2D 晶体筛选的样品可以 3 中方法进行储存。2D 晶体的长期储存取决于所研究蛋白质的特定性质，但总体来讲，重建与膜双分子层的膜蛋白较表面活性剂溶解状态稳定，可于室温下储存。储存管应用封口膜密封，以控制蒸发造成的长期水分损失。较为脆弱的膜蛋白 2D 晶体可于 4°C 储存。高度敏感的样品可能需要保存于 -80°C 或液氮冻干储存。
5. 理想情况下，每种实验条件制备的样品应立即进行 EM 检测，因为样品可能随时间发生变化，特别是当表面活性剂未完全去除时。

3.5. 后续透析实验

2D 结晶很大程度上仍是“步进式”方法，依赖于 EM 对负染样品评估的反馈，由于样品可得性、EM 筛选时间等影响因素的变化，实验方案会有很大不同。

1. 透析时间的长度应足以有效去除表面活性剂。
2. 重建是后续实验的基础。如未充分或无重建，可使用更高的 LPR，以观察蛋白质在所选脂质及缓冲液条件下是否重建。如重建失败，可更换脂质或使用脂质混合液，如有足够的蛋白质，可测试不同脂质的混合液。起始实验建议使用天然膜成分，即尽可能简化成两种主要脂质成分。
3. 温度：温度过高或过低都有可能影响重建、透析时长、膜尺寸以及蛋白质结构和功能的完整性。如起始测试温度降低（4-20°C）、大多数膜小于 10nm、表面活性剂去除时间超过 7-10d 或使用任何脂质都不能成功形成重建，建议在后续实验中测试较高的温度。而如在高温条件下仍未形成重建、膜呈现“皱褶”或活性无法维持，可再适当降低温度。除非温度显著高于或低于室温，实验中可先测试其它相关影响因素。
4. 共纯化脂质：如使用 LPR=0，蛋白质内不添加脂质，可指示即使很小量的共纯化脂质。可使用薄层层析鉴定共纯化脂质。在此情况下，纯化时可能要进行一定的去脂操作。
5. LPR：如果在首次 2D 结晶实验中未观测到脂质或仅有极少量的脂质，且在较高 LPR 条件下，可观测到脂蛋白体，二次实验可测试不同的 LPR，如 LPR 0、3、15 和 30。如在高 LPR（15 和 30）条件下，出现大量脂蛋白体，LPR=0 时只有沉淀，下一步测试的 LPR 值应为 3 左右。如 LPR=3 时，不出现或只有少量脂蛋白体，可测试 LPR 3-15 之间的值，如 3、6、9、12 或 3、7、11、15。如 LPR=3 时，出现大尺寸的膜，可测试 LPR 0-3 之间的值，如 0.3、0.75、1.5、3。当存在共纯化脂质时，摩尔 LPR 即使低至 0.1-0.25，也可形成 2D 晶体。

6. 膜尺寸和形态：除非膜形态不能清晰呈现 50nm 以上塌陷状囊泡、平坦管状膜、薄片状或管状结构，实验应更关注如何诱导有序排列形成，而非增加膜尺寸或改变膜形态。某些情况下，膜尺寸增加可增加晶体尺寸。高 LPR 可形成小的、非晶状膜，而低 LPR 可优化排列和膜尺寸。如果膜始终低于 50nm，可在优化 LPR 前，变换测试盐浓度、不同浓度下的盐组成及温度。
7. 单位脂蛋白体的蛋白数量：在诱导排列前，即使是较大的膜蛋白，也很难通过 EM 辨别此参数。冷冻-断裂可为优化 LPR 提供一定信息。冷冻-断裂样品的成像分析，可清楚显示一个膜是仅包含少量膜蛋白或紧致包封。但大多数实验室都不具备该实验条件，所以在诱导排列前，重建的相对数量都是未知的。

后续实验的开展，取决于筛选的结果，可对排列状态、2D 晶体尺寸或膜尺寸进行优化。

如果重建成功，共纯化脂质极少或没有，膜满足最低形态要求，后续实验应集中关注 LPR 的优化。如果在测试了大量不同的 LPR 后，仍不能诱导晶体形成，可变换测试不同的盐、抑制剂或温度梯度。

一旦 2D 晶体形成，晶体和膜尺寸可很容易进行优化。通过选择合适的盐、甘油浓度、温度、脂质、表面活性剂及其浓度，可增加尺寸。

需要指出的是，筛选鉴定过程必需仔细，即使 2D 晶体的百分比极低（2%），以快速确定最佳实验条件。

4. 注意

1. 透析袋内的空气并非必需去除。事实上，在透析管内一端存在的空气，可方便样品回收。
2. 除传统透析膜管（袋）外，也可使用 Spectra/Por 即用型微量透析装置，对于 500 μ l 以下的样品，使用该装置可有效避免样品损失，提高回收率。
3. 缓冲液的 pH 值应能最大限度地维持蛋白稳定和酶活性，该值可接近生理 pH 值。
4. 添加甘油可破坏溶解蛋白微球周围的水合层，使其合并形成 2D 阵列，从而增加晶体尺寸。
5. 在较高温度条件下（ $\geq 24^{\circ}\text{C}$ ）透析较长时间（ $\geq 2\text{w}$ ），透析体系可能受细菌性污染，可添加一定量的 NaN_3 ，但此时盐的状态亦发生变化。
6. 添加酶配体或抑制剂，可通过稳定蛋白质结构域或关键亚单位，辅助结晶，也可获得一定的结构及功能信息。
7. 实验用蛋白质纯度应尽可能高，一般情况下，纯度需至少达 95%，增加纯度，可增加晶体尺寸和质量。

8. 低 LPR 可诱导形成高度有序的晶体。部分共纯化脂质可通过漂洗或磷脂酶处理去除；而另一些脂质可能是维持蛋白质单体结构完整性或亚单位与单体接触所必需的，去除这部分脂质，可能形成单体化，妨碍 2D 晶体形成。可在不添加脂质的条件下进行结晶实验，如形成脂蛋白体，及说明有过量的脂质共纯化，需要进一步纯化。
9. 对于跨膜蛋白，可能需要更换表面活性剂，以优化 2D 晶体。
10. 表面活性剂的存在会显著影响蛋白浓度的测量，且因测量方法的差异而不同，应尽量使用一种测量方法，以保证测量数据的一致性和实验的可重复性。
11. 表面活性剂浓度需高于临界胶束浓度（CMC）。对于传统膜蛋白纯化，大多数非离子型表面活性剂可成功诱导 2D 晶体。
12. CMC 是微球形成的最低浓度。结晶前膜蛋白纯化和溶解性的维持都要求表面活性剂浓度高于 CMC。此外，CMC 值可指示结合强度，CMC 较高，说明结合较弱，需要的透析时间较短；CMC 较低，说明结合较强，需延长透析时间。
13. 大多数脂质具有吸湿性，使粉末的操作和称量非常困难。打开容器后，应立即加入氯仿，以保证脂质储液制备的可重复性。

文献来源：

Johnson, M.C., Dreaden, T.M., Kim, L.Y., et al., Two-Dimensional Crystallization of Membrane Proteins by Reconstitution Through Dialysis. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 955:31-58.