

高通量全自动蛋白质晶体优化池液制备方法

Automated Protein Crystal Optimisation With TTP Labtech's Dragonfly Designer™

燕宝华, 范仕龙*

蛋白质研究技术中心, 生命学院, 清华大学, 北京市

*通讯作者邮箱: fanshilong@mail.tsinghua.edu.cn

引用格式: 燕宝华, 范仕龙. (2021). 高通量全自动蛋白质晶体优化池液制备方法. *Bio-101* e1010880. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010880.

How to cite: Yan, B. H. and Fan, S. L. (2021). Automated Protein Crystal Optimisation With TTP Labtech's Dragonfly Designer™. *Bio-101* e1010880. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010880. (in Chinese)

摘要: 蛋白质的三维结构是理解生物大机器工作机理和药物研发的基石。作为研究蛋白质三维结构的重要手段 X 射线晶体学近年来也得到了不断发展, 但得到高质量的蛋白晶体仍是研究大分子三维结构的瓶颈。对于绝大多数样品来说, 在初筛得到蛋白晶体后仍需进行大规模结晶优化工作, 其工作量较大, 效率也较低。随着科技不断发展, 目前已经在蛋白结晶优化方面引入得全自动配液系统, 其中 Dragonfly 是 TTP Labtech 公司开发的一款全自动微升级液体处理器, 它可以准确的抽吸和分配各种类型 and 不同粘度的液体。易于使用、直观的界面设计使晶体学家能够快速和容易的设置蛋白晶体优化条件, 达到快速高效的筛选目的。同时配备有非接触性的一次性 DFC 枪头和 DFC 池液槽, 也确保了样品零交叉污染。本文以一种信号通路蛋白晶体的优化方案为例, 就 Dragonfly 在蛋白结晶优化中的一般使用方法和流程进行介绍。

关键词: Dragonfly, 池液, 蛋白优化

材料与试剂

1. 各种型号枪头 (200 µl, 1 ml)
2. 0.22 µm 微孔滤器 (赛多利斯)
3. 注射器 (江苏治宇医疗器械有限公司)

4. 超纯水
5. 50 ml 离心管 (康宁)
6. Magnesium chloride hexahydrate (SIGMA, catalog number: M2393-500G)
7. HEPES (VETEC, catalog number: V900479-500G)
8. Tris (VETEC, catalog number: V900483-5KG)
9. Polyethylene glycol 3,350 (SIGMA, catalog number: 88276-1KG)
10. DFC 枪头: 4150-07100 SPT
11. DFC 池液槽: 4150-07103 SPT
12. 96 孔晶体板 (Swissci, catalog number: 3W96TUVF)
13. 48 孔晶体板 (SWISSCI MRC Maxi 48 孔板)
14. 1 M Hepes 缓冲液 (见溶液配方)
15. 1 M Tris 缓冲液 (见溶液配方)
16. 50% PEG3350 (见溶液配方)
17. 1 M Mgcl₂ (见溶液配方)

仪器设备

1. TTP Labtech's dragonfly[®]
2. 震荡式混匀器 (德国海道夫, model: Titramax 101)
3. Mosquito 蛋白结晶筛选仪 (TTP Factory, model: Mosquito)
4. 体式显微镜 (Nikon, model: SMZ18)

实验步骤

一、以一种信号通路蛋白晶体的优化方案为例来阐述 dragonfly 的用途 (Jenkins *et al.*, 2014; Pitchai *et al.*, 2016)。

该蛋白样品初筛获得的晶体生长条件有:

1. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350.
2. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350.

如图 1 所示，初筛晶体晶核多，晶体较小，无法进行捞取衍射和数据收集。需在晶体初筛条件的基础上，对晶体条件进一步优化，以得到高质量的蛋白单晶。

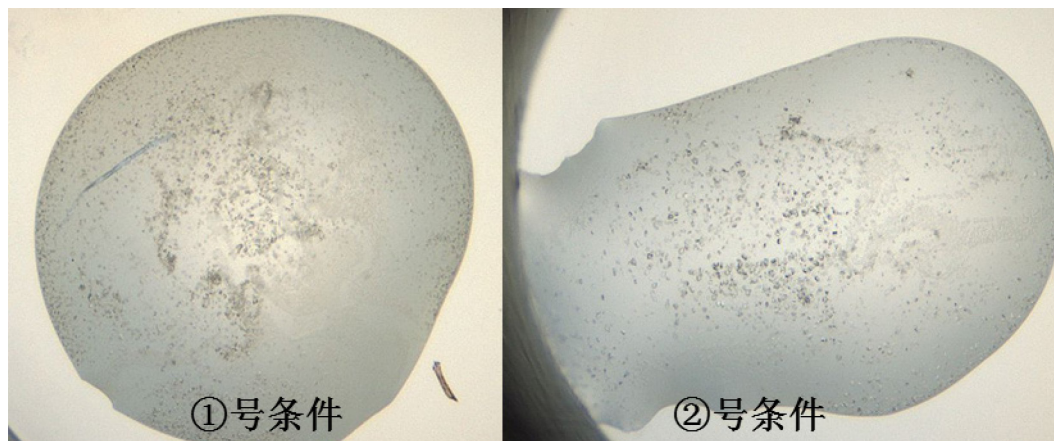


图 1.初筛获得的晶体图片

二、晶体优化方案的编辑

1. 仪器开机，打开控制软件 Dragonfly Designer，完成仪器初始化。
2. 打开编辑软件 Dragonfly Designer，软件将弹出设计窗口。首先，在图 2 红色区域“components”中添加优化组分，点击“add new”选项，依次填入晶体优化组分的名称，浓度，单位，PH 值，池液类型，结果如图 3 所示。

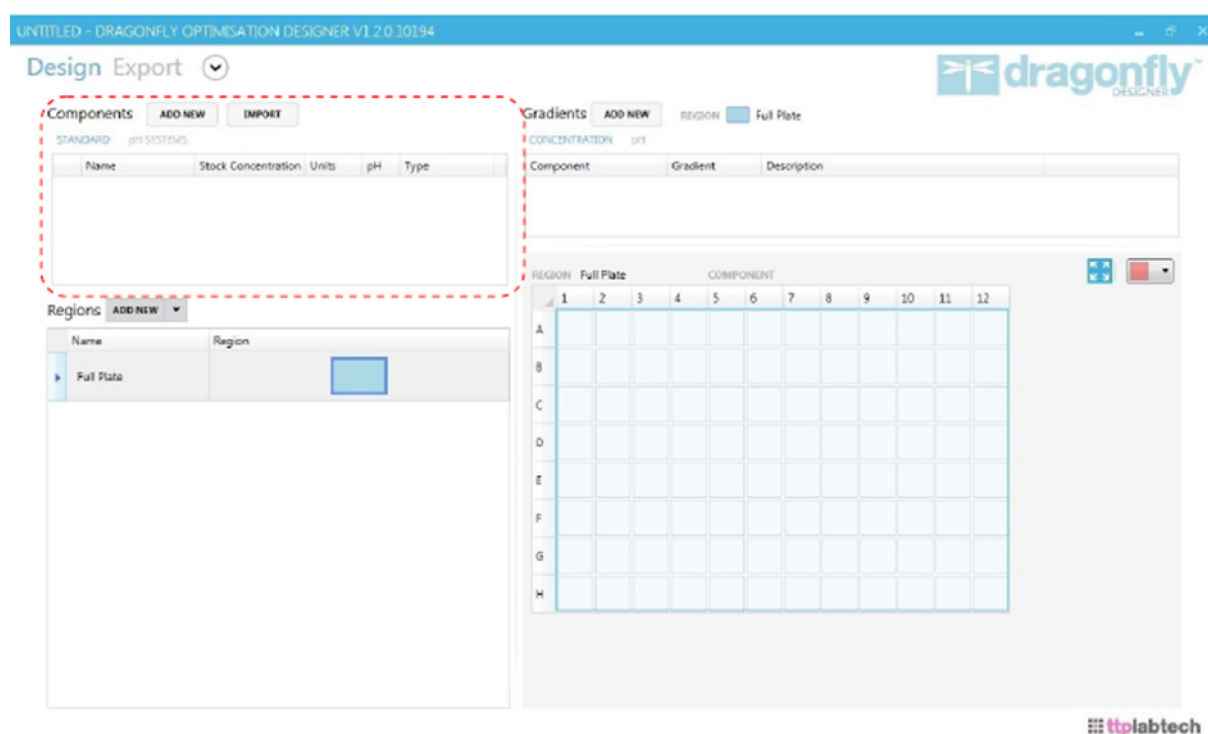


图 2.编辑窗口

Components **ADD NEW** **IMPORT**

STANDARD pH SYSTEMS

	Name	Stock Concentration	Units	pH	Type
	Mgcl2	1000	mM		Salt
	PEG3350	50	%w/v		Precipitant
	Hepes	1000	mM	7.5	Buffer
	Tris	1000	mM	8.5	Buffer

图 3.添加不同种类优化组分

3. 定义区间

根据优化需求，需将板子划分为不同区域，优化组分可以添加在任意区域进行梯度优化。如图 4 所示，点击“add new”选项，下拉列表中选择预加载的区域，并在“region name”命名区域。本次实验选择“full plate”，“left-half”和“right-half”三个区域。区域可以随意更改和删除。

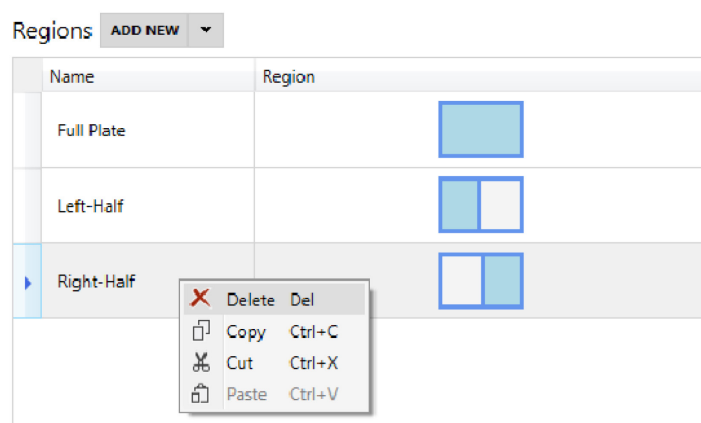


图 4.创建不同区域

4. 区域中添加优化组分，定义浓度梯度

一旦所有区域都规划好，下一步向各个区域添加优化组分，定义组分优化的梯度方向和浓度。具体步骤：

- 4.1 选中区域“Left-Half”，添加要分配到该区域的组分：Hepes pH 7.5，Gradient 保持不变，终浓度 100 mM；Magnesium chloride hexahydrate，Gradient 选择“Horizontal”横向梯度优化，浓度范围 100-300 mM；
- 4.2 选中区域“Right-Half”，添加要分配到该区域的组分：Tris pH 8.5，Gradient 保持不变，终浓度 100 mM；Magnesium chloride hexahydrate，Gradient 选择“Horizontal”横向梯度优化，浓度范围 100-300 mM；
- 4.3 选中区域“full plate”，添加要分配到该区域的组分：Polyethylene glycol 3,350，Gradient 选择“vertical”纵向梯度优化，浓度范围 10%-30%；其中，定义浓度范围也可在该区域附近的编辑栏内输入所需梯度的最低浓度和最高浓度（图 5）。

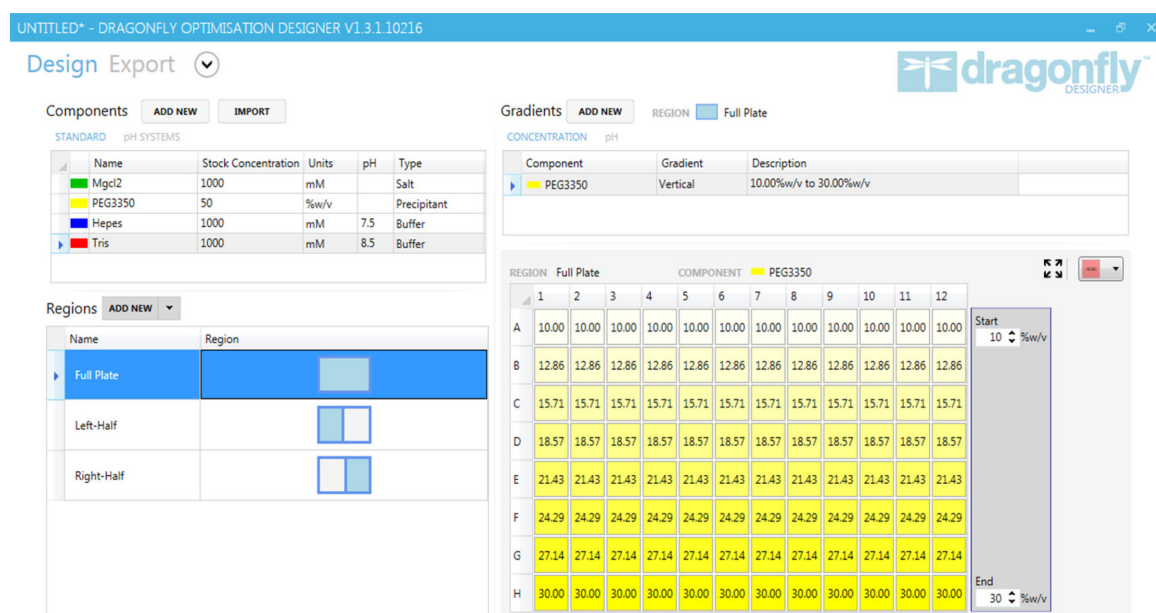


图 5.选中某一个区域，选择优化组分，定义浓度梯度

5. PH 梯度优化 (此部分根据优化判断是否需求，如图 6 所示，此处以 Tris 为例阐述 PH 优化方案编辑)

5.1 Components 选择“pH SYSTEMS”模式；点击“IMPORT”选项，import 会弹出一个用于导入 PH 系统的特定对话框，在“Buffer search”中输入缓冲液关键词“TRIS”，下拉选项中选择所需 buffer 种类“TRIS”。选择完毕，“buffer stocks”会显示 TRIS 缓冲液所有可能的 PH 值；选择两个缓冲液梯度，一个最高 PH 值 8.5，一个最低 PH 值 7.5。这两种储存形成了“pH 缓冲系统”。

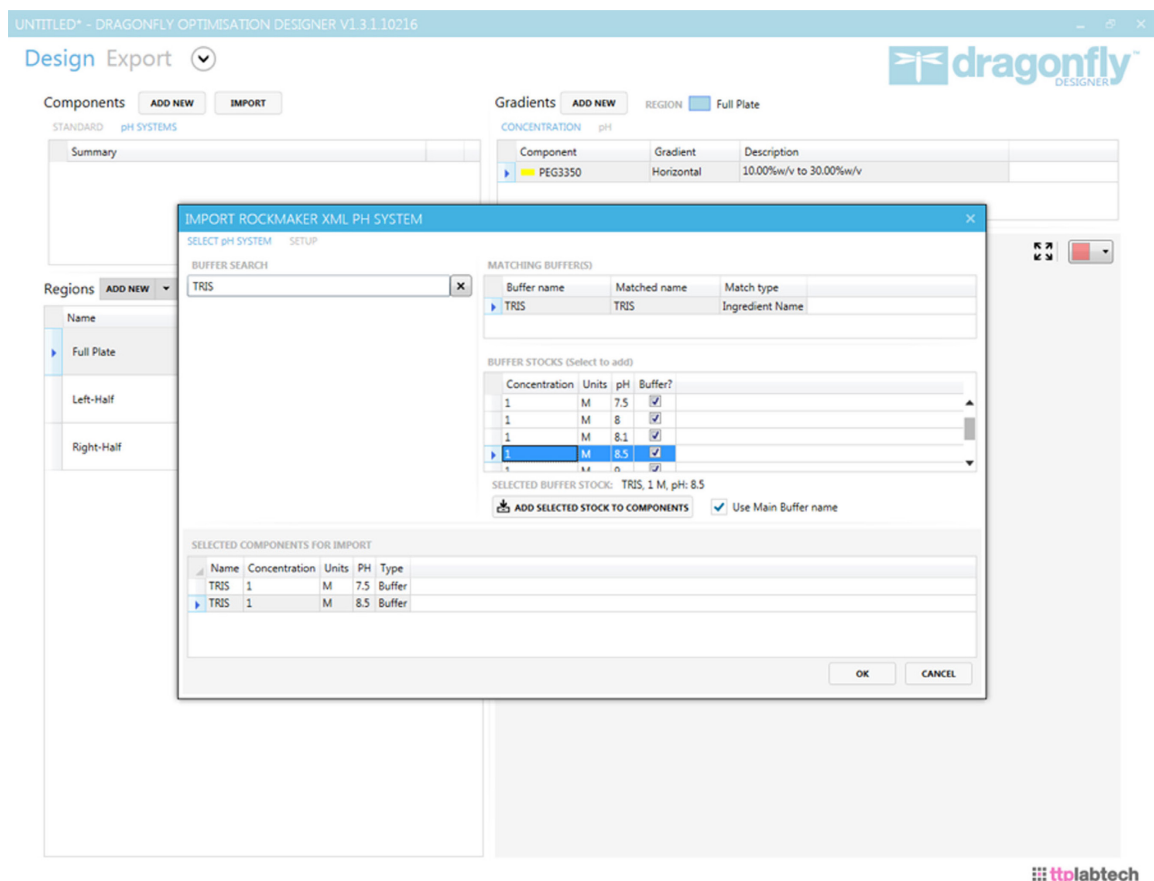


图 6.“pH SYSTEMS”模式下，以 tris 为例，设置 buffer 缓冲范围

5.2 点击 OK，将 PH 系统导入 PH 系统列表中。

5.3 创建好 PH 系统列表后，在“regions”下拉列表选择区域“full plate”。

5.4 选中区域“full plate”后，“gradients”选择 PH 模式，点击“add new”选项，确认 PH System 被选中。Gradient 选择“vertical”纵向梯度优化，PH 范围 7.5 - 8.5 (选择的 pH 值不能超过 pH 系统的范围)，终浓度 0.1 M。

6. 一旦所有的组分，区域和渐变都定义好了，切换到 export 选项卡。首先，“well volume”输入优化体积 30 μ l，输入最小分配体积，该值仅用于检测；如配发粘度极高的液体，如 40% peg8000，则最小配发量应设置为 1 μ l，否则应保持在 0.5 μ l。点击“CALCULATE OPTIMISATION”，软件会自动计算出每种组分所需体积；
7. 最后，保存编辑好的文件。选择“dragonfly CSV”文件类型以适用 dragonfly。文件还可以“PDF”文件和“Text”文件形式保存。

三、池液分装

1. 打开控制软件 Dragonfly，点击“OPEN”，打开提前保存好的 CSV 文件。“Plate Type”

下拉列表选择所需板型 **Swiss 96** 孔板 (此处可任意选择提前定义好的板型, 如图 7 所示), “Well Volume”输入单孔所需池液体积 **30 μ l**。“Use Plate-mask”为板子上方加载的防护罩, 可防止液体外溅, 本实验选择不加。

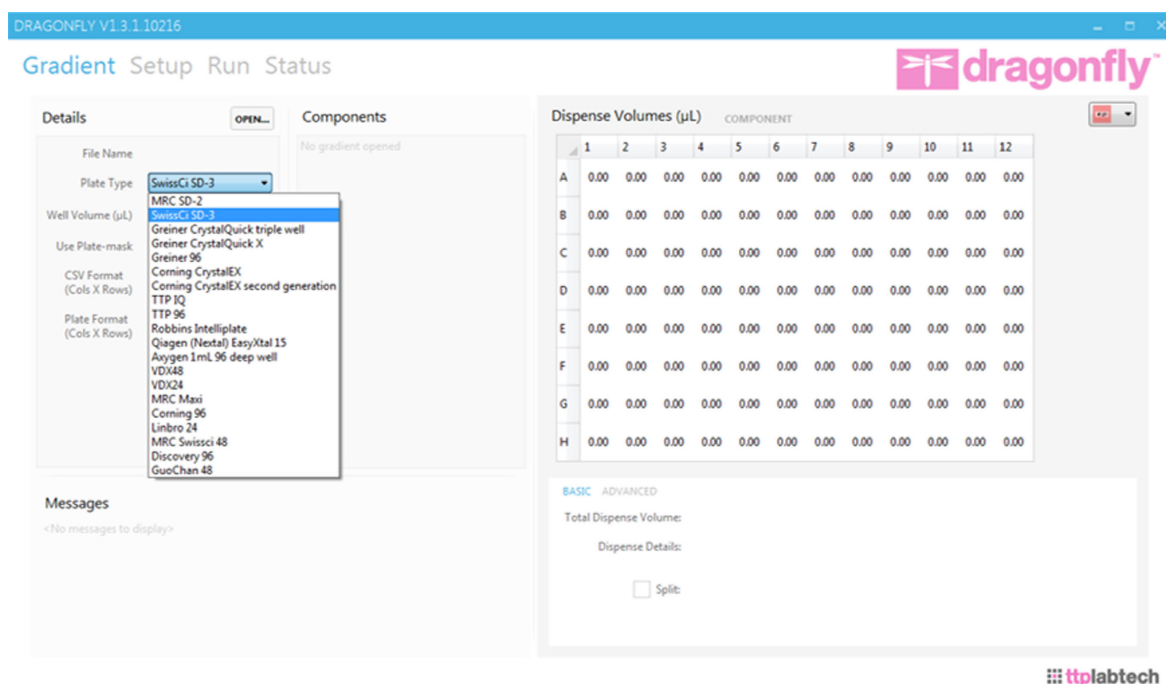


图 7.选择板型

2. 进入“set up”界面;

2.1 安装枪头。蓝色突出部分为需要安装枪头的位置, 每个枪头对应相应的池液类型和所需体积, 按照位置逐一安装枪头 (由内到外)。仪器有五个插槽, 每个插槽装有两个注射器。后排注射器从左至右对应位置 **A1-A5**, 前排注射器从左至右对应位置 **B1-B5**。注射器是通过将它们滑动到机器前面的插槽来装载的。对于后排注射器, 滑动注射器直到停止, 然后向上推, 并按下图所示的方向旋转 **90 度** (图 8)。如果是前排注射器, 则向上推, 同时将注射器推入槽中, 当注射器推入孔中时, 旋转如下 (图 8), 安装完毕右上角绿色指示灯变为绿色。

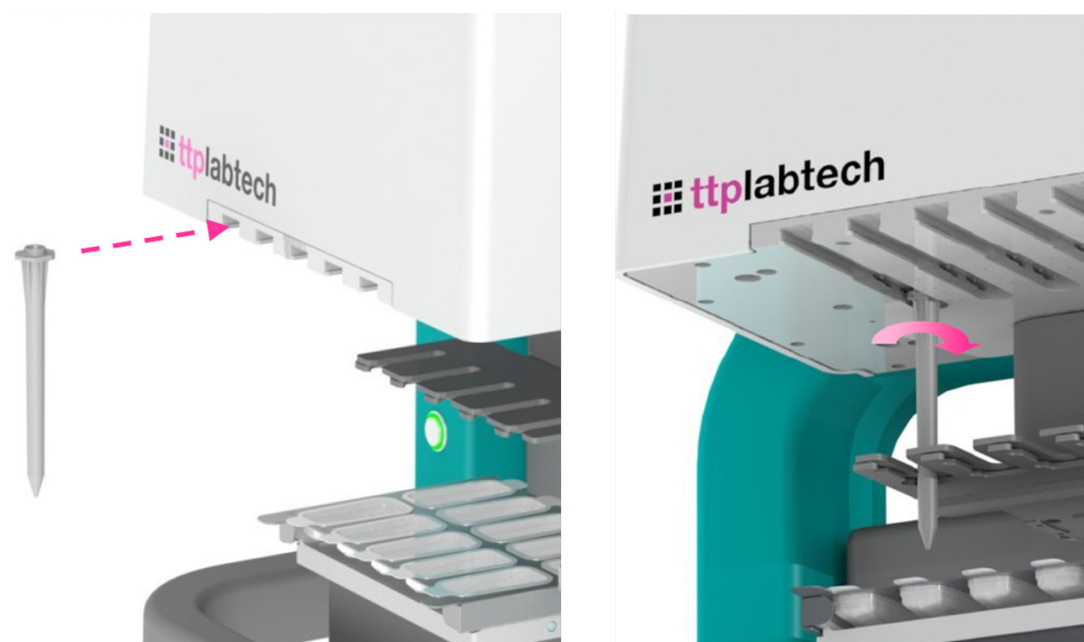


图 8.安装枪头

2.2 A1-A3,B1-B2 位置放入新的 DFC 池液槽，池液槽中加入对应体积的池液 (图 9)；操作完毕，点击“**Aspirate**”按钮，吸取池液至枪头。

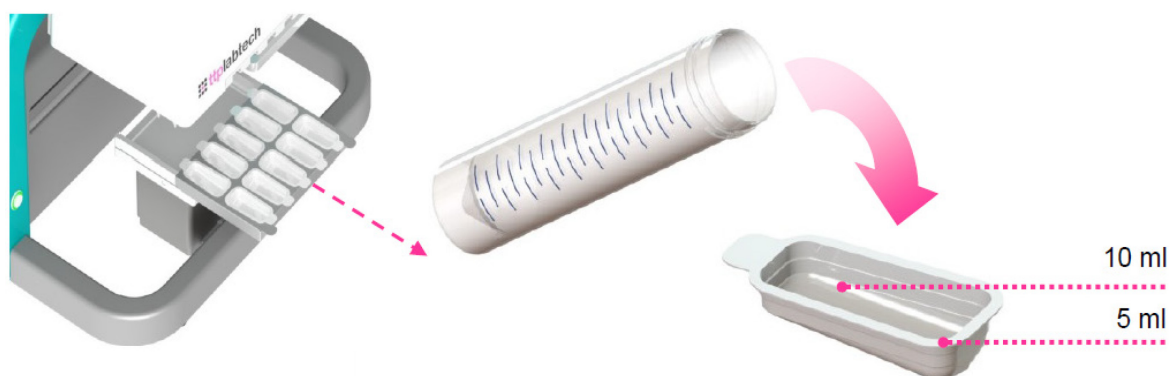


图 9.放置 DFC 池液槽

3. 将板子放置架子上，A1 在左上角方向；
4. 切换至 **Run** 界面，点击“**Run**”按钮，开始分液；
5. 池液分装完毕，切换至 **Set up** 界面，点击“**Remove**”，待枪头吐出剩余液体，机器回到初始状态，拔出枪头；
6. 关闭仪器；

四、二次优化

第一次优化采用坐滴 96 孔板，96 孔板优化的优势：可一次性配制筛选 96 种不同浓度梯度条件，缺点是液滴体积小，晶体体积相对较小，不易捞取；第二步采用 48 孔坐滴板进行优化，以获得质量更高更大的蛋白质晶体。具体优化步骤同上。

结果与分析

1. 96 孔板用微孔板振动筛 (750 x g, 1 分钟) 混匀池液，用 mosquito (200 nl 蛋白 + 200 nl 池液) 完成结晶重复。两天后观察液滴，对含有晶体的液滴拍照；
2. 48 孔板用震荡混匀器混匀池液，用 mosquito (500 nl 蛋白 + 500 nl 池液) 完成结晶重复。三天后观察液滴，对含有晶体的液滴拍照；

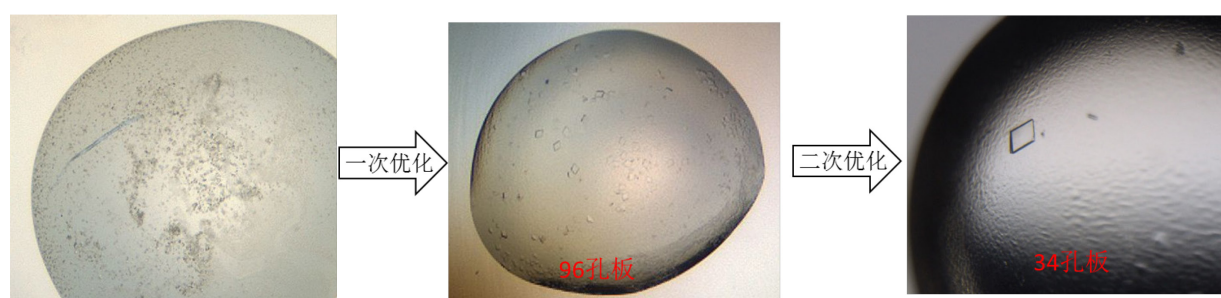


图 10.优化获得的晶体图片

溶液配方

1. 1 M Hepes 缓冲液
6.057 g 粉末溶于 50 ml ddH₂O, PH 调制 7.5, 0.22 μM 滤器过滤除菌, 存放 4 °C
2. 1 M Tris 缓冲液
11.9 g 粉末溶于 50 ml ddH₂O, PH 调制 8.5, 0.22 μM 滤器过滤除菌, 存放 4 °C
3. 50% PEG3350
25 g 粉末溶于 50 ml ddH₂O, 0.22 μM 滤器过滤除菌, 存放 4 °C
4. 1 M Mgcl₂
4.76 g 粉末溶于 50 ml ddH₂O, 0.22 μM 滤器过滤除菌, 存放 4 °C

致谢

本文得到清华大学国家蛋白质研究技术中心的资助。

参考文献

1. Jenkins and Cochrane,(2014). [Automated protein crystal optimisation with TTP Labtech's dragonfly](#). *Acta Crystallogr A* 70, C1743-C1743.
2. Pitchai et al.,(2016). [Characterization of the NTPR and BD1 interacting domains of the human PICH-BEND3 complex](#). *Acta Crystallogr F* 72, 646-651.