

特约综述



本实验室的研究兴趣集中于膜蛋白结构生物学和发展与其紧密关联的脂立方相技术体系。对脂立方相结晶技术体系进行简化和优化, 建立脂立方相用于膜蛋白生化分析的新方法, 并应用于与人类健康相关膜蛋白质的结构和功能研究, 揭示功能机制, 为理解和治疗相关疾病提供理论基础。

<http://www.sibcb.ac.cn/ePI.asp?id=157>

脂立方相技术体系在膜蛋白结构与功能研究中的应用进展

姚贺帮 蔡洪敏 李典范*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 国家蛋白质科学中心, 分子生物学国家重点实验室, 上海 201210)

摘要 脂立方相是包含连续脂双层和水通道的材料。其作为跨膜蛋白质结晶的有效介质, 是一些重要和高难度膜蛋白结构解析的关键。因此, 脂立方相技术体系越来越受到结构生物学家的重视。该文就脂立方相的特性及其结晶相关技术的最新进展作一简要阐述, 并介绍该技术体系在膜蛋白生化分析与体外复性研究中的应用现状。

关键词 膜蛋白; 脂立方相; 结晶; 酶学分析; 体外复性

Lipid Cubic Phase Technology for Membrane Protein Structural and Functional Research

Yao Hebang, Cai Hongmin, Li Dianfan*

(National Center for Protein Sciences (Shanghai), State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China)

Abstract Composed of a continuous bilayer and two continuous water channels, lipid cubic phase has been proven as a promising method for membrane protein crystallization. Since its introduction into the field 19 years ago, it has contributed to the structure determination for many challenging membrane proteins, some of which has puzzled structure biologists for decades. As such it has become increasingly popular. This review aims to give a basic description to the method and to briefly summarize the advances for this technology. The application of the lipid cubic phase in membrane protein functional assays and refolding is also described.

Keywords membrane protein; lipid cubic phase; crystallization; enzymatic assay; refolding *in vitro*

*通讯作者。Tel: 021-20778212, E-mail: dianfan.li@sibcb.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-20778212, E-mail: dianfan.li@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2015-07-06 13:58

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150706.1358.003.html>

跨膜蛋白是具有一段或多段长度为20个左右氨基酸跨膜疏水区的蛋白,它们涵盖细胞表面受体、转运蛋白、离子通道、脂质代谢酶等重要家族,参与细胞的物质代谢与转运以及信号传递与转导,对维持细胞膜完整性与选择通透性等生命的基本过程,具有重要的生理意义。人类基因组中约有30%的基因编码膜蛋白,而目前约60%的药物以膜蛋白作为药物靶点^[1]。因此,了解膜蛋白的结构与功能,具有重要的生物学与健康意义。

目前,基因组学和生物信息学的迅速发展可快速提供蛋白质的一级结构序列信息,生物化学、分子生物学、细胞生物学等手段可揭示蛋白质的体内体外功能,而结构生物学则可阐明蛋白如何组装一级序列,进而形成高级结构来行使复杂的生理功能,是详细了解蛋白质作用机理不可缺少的生物学分支学科。蛋白质结构解析技术主要包括核磁共振、冷冻电镜以及晶体X射线衍射法。其中,能在原子水平上提供蛋白质精细结构的晶体学方法是目前结构生物学领域的主要方法。在Protein Data Bank(PDB)中,晶体学方法所解析的结构占有已解析蛋白结构的83%。尽管膜蛋白具有重要的生理意义,然而其结构生物学的进展远远落后于可溶蛋白。早在1958年,Kendrew等科学家就解析了第一个蛋白质——肌红蛋白的结构^[2]。然而,第一个膜蛋白光反应中心的结构却在27年后才被解析出来^[3]。目前,PDB数据库中仅有1.5%为膜蛋白。

膜蛋白结构生物学滞后的原因是多重的。其中一个主要的原因是,膜蛋白在从其天然脂双层环境中分离到由去垢剂组成的囊束结构后稳定性变差,给分离纯化、生化分析以及结晶工作造成困难。近年来发展的新材料新技术,如amphipol^[4-5]、脂立方相^[6]等,它们比囊束结构更接近天然磷脂双分子层,因而可更好地维持膜蛋白的稳定性,促进膜蛋白结构生物学的发展。其中,在不到20年间,就有243个膜蛋白因使用脂立方相技术而得以解析结构,占有方法所得膜蛋白结构的15%。而这些结构分辨率一般都较高,在3.0 Å和2.5 Å以上的比率分别为83%和58%。脂立方相所解析的膜蛋白中包括一系列重要的膜蛋白,如一系列重要的G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)^[7-11]以及2012年获诺贝尔奖的GPCR-Gs的复合物结构^[9]。另外,脂立方相是解决多个困扰结构生物学家多年的膜蛋白结晶难题

的关键,包括二酰基甘油激酶DgkA及钙/钠离子交换蛋白^[12-14]等,因此,越来越受到人们的重视。本文就脂立方相技术体系在膜蛋白结构与功能研究中的应用作一简要阐述。

1 脂立方相的组成、结构特性及膜蛋白的脂立方相重构过程

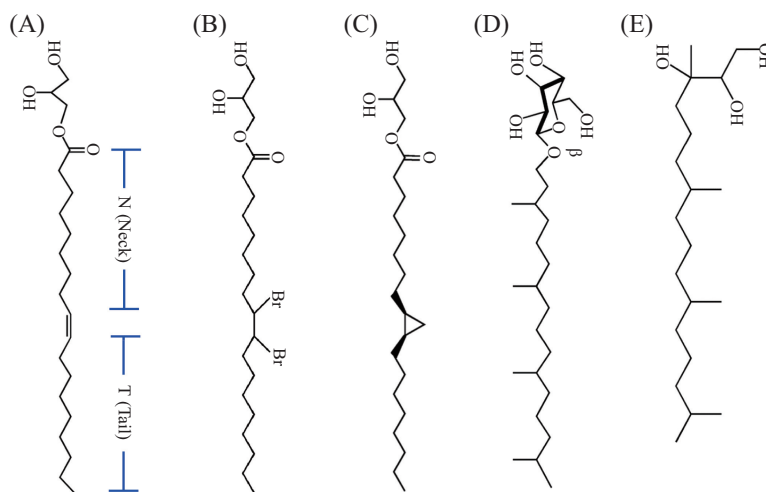
脂立方相是由脂与水按一定比例混合后得到的具有特定空间群(Pn3m)的、含一个连续脂双层以及两个连续水通道的类膜结构^[6]。与去垢剂的单层囊束结构相比,脂立方相因为含有脂双层,所以在结构与组分上都与天然磷脂双分子层更相似。目前,能够形成脂立方相的脂质有单酰基甘油酯^[15]、含糖基头部的脂质 β -XylIOC_{16:4}^[16]以及含多羟基头部与多支链脂肪酸链的phytantriol^[17]等(图1),其中以单酰基甘油酯最为普遍,是本文介绍的主要对象。最常用的单酰基甘油酯是单油酸甘油酯,是甘油与油酸酯化形成的化合物,因此得名。其脂肪酸链部分含有顺式双键,双键两侧各有9个碳原子。为了描述方便,一种N.T MAG命名方式得以采用^[18],以区分含不同脂肪酸链的单酰基甘油酯(图1A)。在此命名系统中,单油酸甘油酯为9.9 MAG,因为其脂肪酸链的Neck和Tail部分各含9个碳原子。根据小角衍射的结果,9.9 MAG形成的脂立方相水通道直径大小为39.8 Å,双分子层厚度为32.3 Å^[19],与平均跨膜区长度及天然膜厚度相近^[20-21]。这些脂立方相的微观结构特征与脂肪酸链长度相偶联^[19,22]。据报道,在7.7 MAG所形成的脂立方相中,其水通道直径与脂双层厚度分别为61.6 Å和25.8 Å^[19]。这一特征被用来作为精细化调控脂立方相微观结构以改变其中膜蛋白行为的依据。目前,绝大部分能形成脂立方相的单酰基甘油酯已经商业化(Avanti Polar Lipids),或者可以通过化学手段在实验室合成^[23]。

制备脂立方相有多种方法。单酰基甘油酯与水接触后能自动形成脂立方相。因此,在该技术体系的早期阶段,人们将单酰基甘油酯置于Eppendorf管底部,再加入蛋白溶液,通过改变离心管在角转头中的摆放角度反复离心,达到混合二者的目的^[24]。另外一种适合于机器人自动化的方法是,将单酰基甘油酯溶于有机溶剂,点样至96孔板孔中,待有机溶剂挥发后再覆盖蛋白溶液,形成脂立方相^[25-26],这两种方法均比较费时。Caffrey研究组发明了一种快速混合脂和水相的设备,此设备以一个耦合器连接两个分别装有

水相和脂的注射器,可来回推动注射器达到快速混合的目的^[27]。由于混合过程中相位的变化,可肉眼观察到混合物由透明-浑浊-透明的变化过程。

在膜蛋白重构过程中,绝大多数情况下,膜蛋白在与脂混合之前是溶解在去垢剂中的。混合后,蛋白质是停留在去垢剂中,还是插入到脂立方相的脂双层中呢?一个巧妙的荧光淬灭实验为该问题提供了答案^[28,31-33]。跨膜区的色氨酸一般位于膜边界位置,其受紫外光激发后,在340~370 nm范围发射出

较强的荧光。而色氨酸荧光可受到重卤素原子如溴的淬灭,但前提是溴原子必须在色氨酸侧链基团附近。在单油酸甘油酯的脂肪酸链上添加溴原子(图1B和图2),形成的脂立方相在脂双层中即含有能淬灭色氨酸荧光的溴原子。将膜蛋白与溴代单油酸甘油酯混合后,如果膜蛋白是插入到脂双层中的,此时脂双层中的溴原子将淬灭位于跨膜区的色氨酸荧光。否则,荧光强度将不受溴代单油酸甘油酯含量的影响。实验结果表明,膜蛋白的色氨酸荧光随溴

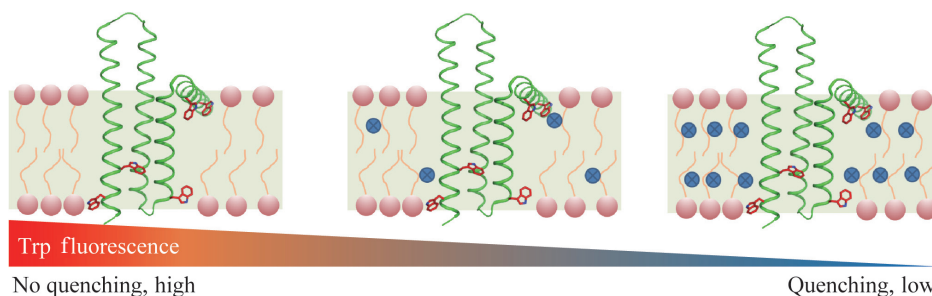


A: 具亲水甘油头部和C18:1疏水碳链的单油酸甘油酯。N.T MAG命名系统依据顺式双键两侧所含碳原子数目命名该脂质,如单油酸甘油酯即9.9 MAG; B: 单油酸甘油酯的溴代衍生物^[28]。溴原子可以淬灭色氨酸荧光^[29],因此该脂质可用于脂立方相生物物理分析; C: 含环丙基团的单酰基甘油酯,在4 °C能下形成脂立方相^[30]; D: 含糖基的脂立方相脂质^[16]; E: 脂肪酸链含多个支链的phytantriol,可形成粘稠性高的脂立方相^[17]。

A: monoolein, or 9.9 MAG, according to the N.T MAG nomenclature where the 'N' and 'T' represent the number of carbon in the indicated region; B: brominated monoolein^[28]. This lipid is useful in fluorescence measurements of protein reconstituted in LCP as Br quenches Trp fluorescence^[29]; C: a cyclopropyl analogue of monoolein can form LCP at 4 °C^[30]; D: LCP-forming lipid with a sugar head group^[16]; E: phytantriol, a LCP forming lipid with multiply branched fatty chain. The LCP formed by this lipid is much more viscous than that by monoolein^[17].

图1 形成脂立方相的主要脂质

Fig.1 LCP-forming lipids



蛋白质色氨酸荧光受到溴代单油酸甘油酯(暗蓝色圆圈标记,图1B)的浓度依赖性淬灭。脂质用圆形甘油头部与线状疏水尾部表示,阴影部分示膜位置。蛋白质为二酰基甘油激酶单体(PDB entry 3ZE3)。色氨酸侧链使用红色标出。因为溴原子淬灭的临近效应,若蛋白质不插入在脂双层,而是位于游离的去垢剂囊束中,则不能观察到色氨酸荧光随溴代单油酸甘油酯的增高而减弱的现象。

Trp fluorescence of integral membrane protein DgkA is quenched by the bromine (dark circle, Fig.1B) located in the bilayer, in a concentration-dependent manner. Monoolein is shown as a red circle (head group) connected by a thin line (carbon chain). Shaded region shows the membrane bilayer. Trp side chains are shown as red sticks. The fluorescence of Trp is quenched due to the close proximity of bromine. The quenching observed is consistent with the fact that membrane proteins are inserted to the bilayer of the membrane as the quencher bromine is located in the middle of the membrane.

图2 色氨酸荧光淬灭实验支持膜蛋白从去垢剂向脂立方相脂双层重构的结论

Fig.2 Trp fluorescence quenching experiment demonstrates the insertion of membrane protein into the lipid bilayer of LCP

代脂质浓度的升高而下降, 说明其插入到脂双层中(图2)。目前测试的膜蛋白包括 α 螺旋蛋白二酰基甘油激酶^[28]、 β 螺旋单跨膜短杆菌肽^[33]以及 β 折叠黏附素OpcA^[32]和维生素B12转运蛋白^[31], 在大小和二级结构上均具有代表性。而脂立方相中得到的晶体结构的I型堆积形式也支持膜蛋白位于脂双层的结论。

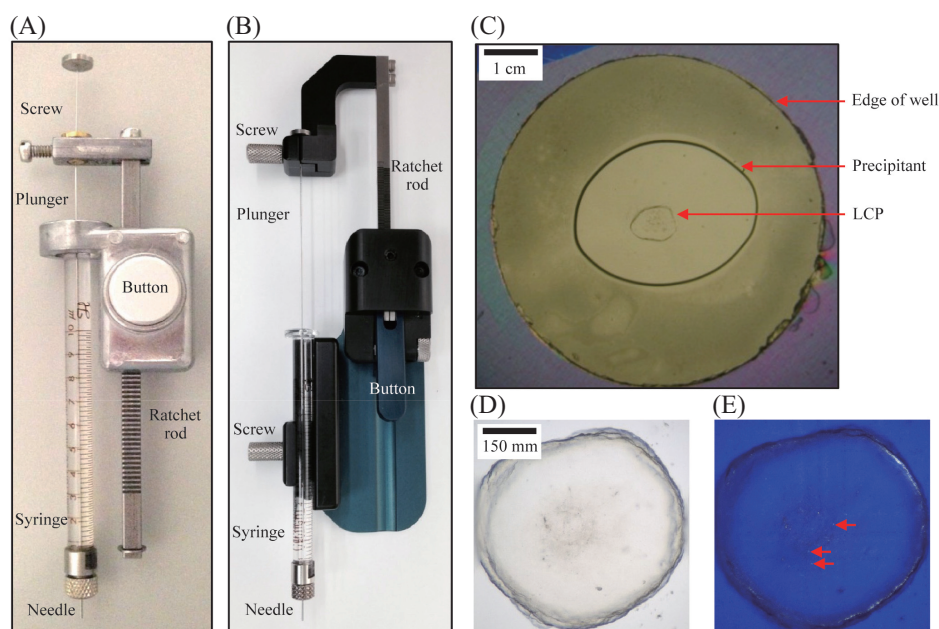
2 脂立方相是适合膜蛋白结晶的有效体系

脂立方相用于膜蛋白结晶始于1996年。Landau和Rosenbusch利用此介质结晶了细菌视紫红质蛋白^[24]。此后, 一些同源蛋白陆续得以解析, 但此方法曾被计算生物学家认为存在“仅适合结晶5个跨膜区以上的蛋白”^[34]等局限性, 并未受到科学界广泛重视。此后的十年间, 先后有一批视紫红质蛋白的近似同源物^[6]、光反应中心^[35]、光捕捉复合物^[36]、维生素B12转运蛋白^[31]及黏附素外膜蛋白OpcA^[32]等在该系统中结晶。而这段时间, 适用于该方法的自动化机器的研发与成型^[37-38]以及脂立方相与天然脂^[39]、去垢剂^[40]以及常见沉淀剂^[41]的兼容性测定等工作的开展, 给该方法日后的快速运用奠定了基础。2007年,

第一个G蛋白偶联受体的高分辨率结构采用脂立方相方法得以解析^[11,42], 随即引发了人们对该方法的巨大兴趣。迄今为止, 在PDB数据库中, 已有243个膜蛋白结构采用该方法得以解析, 占总膜蛋白结构数目的15%。而近三年来, 采用脂立方相所获得的晶体结构占有所有膜蛋白结晶方法所获结构的21%。所解析的蛋白种类多样, 在蛋白来源上, 既有人类蛋白也有细菌源蛋白; 在高级结构上, 既有单体蛋白^[31-32]也有多聚体复合物^[9,36,43]; 在跨膜区大小上, 既有单跨膜短肽^[44-46], 也有多达23个跨膜螺旋的复合物^[43]; 在蛋白功能上, 包括离子通道^[47]、转运蛋白^[48-51]、脂代谢酶^[14,28,52]、受体蛋白^[10-11,42,53-55]、光合作用复合物^[36]和胞间紧密连接蛋白claudin^[56]等。在蛋白折叠上, 包括 α 螺旋^[42]、 β 折叠^[32]和 β 螺旋^[44]等。这些数据表明, 脂立方相方法是膜蛋白结晶的有效技术体系, 有成为膜蛋白结晶主要方法的趋势。

3 脂立方相结晶、晶体收获和晶体浸泡方法

结晶的过程需要将蛋白质与沉淀剂混合。通



A: 手动脂立方相上样设备(Hamilton)。刻度金属棒共有50个刻度, 因此, 按钮每按一次, 即带动活塞向下移动1/50体积。在使用10 μ L注射器的情况下, 每按一次可挤出200 nL脂立方相样品; B: 手动上样设备(Art Robbins)。与A的主要不同点在于其刻度金属棒更加精细, 共200个, 因此在使用同样注射器的情况下, 可以每次上样50 nL; C: 一个结晶孔视图。各部分用箭头标出; D: 一个膜蛋白在脂立方相中的结晶情况, 示明视野下很难观察到微小的晶体; E: 与D同, 但在偏振光下观察, 可见到如箭头所示的微小晶体。

A: manual dispenser from Hamilton. One press takes 1/50 of the total volume of the syringe. For a 10- μ L syringe the volume is 200 nL per a click; B: manual dispenser from Art Robbins. It differs from (A) in that it takes 200 clicks to empty a syringe; C: an overview of a typical LCP crystallization well; D: small crystals that can be barely seen under light microscope; E: cross-polarizer helps the visualization of microcrystals grown in LCP.

图3 脂立方相结晶实验需要的基本设备及典型结果

Fig.3 Manual dispenser for LCP crystallization and typical initial crystallization hits

常, 两者均为液态, 采用微型移液器进行吸取。脂立方相具有粘稠的物理特性, 呈凝胶状, 不能采用常规的移液器进行取样, 因此, 结晶操作时需要特殊的设备。手动加样的设备如图3所示^[57-58]。注射器中预装有含膜蛋白的脂立方相, 当按下按钮后, 带刻度的金属杆带动固定于其上的活塞向下移动一格, 推动注射器中的脂立方相从针孔排出, 点样于96孔板, 一般为50 nL。之后, 用移液器取1 μ L左右的沉淀剂覆盖脂立方相, 加以密封。因为脂立方相中初筛的晶体往往很小, 经常要用到偏振光来观察相位和晶体(图3D和图3E), 而且整体结晶体系小, 易受挥发的影响, 因此, 建议使用光学性质和密闭性都非常好的玻璃作为96孔板的底和盖。另外, 因为体系的体积小, 因此两层玻璃之间的双面胶隔层相应也需要比较薄, 一般为0.15 mm左右^[59]。

玻璃材料给晶体观察提供便利, 但其脆而硬的特性给密闭于其中的晶体收获工作带来了很大困难。收获时, 需要在不影响到易碎晶体的前提下, 小心地用玻璃刀划开表面(厚度为0.1~0.2 mm), 然后在严重蒸发发生之前迅速地在显微镜下捞出晶体并进行速冻^[60-61]。值得提出的是, 脂立方相含有60%的脂质, 是天然的速冻保护剂(cryo protectant), 因此不需要添加额外的试剂进行保护。

在晶体学中, 对于无相似结构而不能用分子替代方法解析相位的新结构, 常常需要对晶体进行重金属浸泡来进行相位解析, 或者需要使用配体、底物等浸泡以获得复合物进行结构分析。同样, 脂立方相体系中所用到的玻璃材质给这项工作带来很大困难。与收获不同的是, 浸泡需要打开结晶孔后再进行密闭数小时甚至数天, 因此在切割玻璃表面时要尽量保持结晶孔的完整性。在近中心附近先划一条“防震带”以减轻远中心切割时产生的震动, 能有效地降低破损率^[60,62]。因为在这一步骤一般都是较大的晶体, 不需要使用玻璃这种光学特性好的材料进行晶体观察, 因此可以考虑采用易于切割的材料进行密封, 方便后续的晶体操作过程。具体材料有待今后的设计与测试。

4 脂立方相中的晶体优化策略

脂立方相技术初筛获得的晶体往往较小, 在2~10 μ m, 需要优化至较大的晶体方可得到足够分辨率的衍射数据进行结构解析。最常见的结晶条件优

化方法是对沉淀剂的组成、浓度、pH值等进行调整, 根据晶体大小以及衍射分辨率而不断细化这些条件, 得到最优的沉淀剂。另外一个优化的因素是低温。除少数冷变性蛋白外^[63-64], 蛋白质在低温下会更加稳定, 而且低温可以减缓扩散, 降低结晶过程中分子堆积速度, 从而减少堆积过程中的错误, 增加晶体的有序性, 有利于获得更好的衍射数据。但是, 这一常规方法在脂立方相技术体系中的应用直到2013年才得以报道^[65]。根据相位特性, 单油酸甘油酯与水形成的脂立方相在17 $^{\circ}$ C以下将形成非连续性脂双层的 $L\alpha$ 相位^[15], 蛋白质无法在 $L\alpha$ 相位中实现三维移动, 从而无法实现晶体堆积。这一点阻碍了人们对低温脂立方相结晶的尝试。但两个脂质代谢酶(二酰基甘油激酶与前列腺素E2合成酶1)在低温脂立方相中成功结晶的报道打破了这一禁区^[14,52,62,65]。单油酸甘油酯形成的脂立方相能在低温下维持的原因可能有以下两种。首先, 脂立方相具有一定的稳定性。低温下脂与水混合得到 $L\alpha$ 相位, 但是, 如果先在20 $^{\circ}$ C将二者混合再置于17 $^{\circ}$ C以下, 预先形成的脂立方相仍能在一定程度维持^[15]。是否转换为 $L\alpha$ 相位此时取决于相位转换需要能量及维持立方相需要能量之间的平衡。在平衡未打破的情况下, 立方相会得到维持。其次, 文献中的相位测定是在单油酸甘油酯与水的体系中完成的, 结晶实验体系中所含有的盐^[36]、去垢剂^[40]、跨膜蛋白质本身、天然脂^[39]、聚乙二醇及2-甲基-2,4-戊二醇^[66]等沉淀剂存在下, 可改变相位特性。根据条件不同可降低立方相临界温度。值得提出的是, 相位特性根据脂质的脂肪酸链长度及双键位置而不同。比如, 7.9 MAG与水混合后可在4 $^{\circ}$ C形成稳定的脂立方相^[6,67]。又如, 将单油酸甘油酯的顺式双键替换为封闭的环丙基基团后的脂质也能在4 $^{\circ}$ C形成稳定的脂立方相^[30](图1)。因为跨膜蛋白质的热稳定性一般较差, 低温是增强脂立方相技术体系应用性的一个重要方面。

如前所述, 跨膜蛋白质插入在脂立方相的脂双层中, 脂双层的物理性质如厚度、曲度等, 是影响膜蛋白的直接环境因素, 因此, 脂双层的细微改变可能影响膜蛋白的结晶。小角衍射的结果表明, 当单酰基甘油酯的脂肪酸链长度及双键位置改变后, 其形成的脂立方相在脂双层厚度和曲度以及水通道大小等特性上都有改变^[19]。系统地测试这些单酰基甘油酯对 β 折叠糖转运蛋白OprB结晶的影响表明,

晶体大小对脂肪酸链长度非常敏感。OprB的晶体在单油酸甘油酯(9.9 MAG)脂立方相中通过多轮优化后仅能达到 $30 \times 2 \times 2 \mu\text{m}^3$ 大小,但在脂肪酸链链长为15个碳的7.8 MAG和6.9 MAG脂质中能分别达到 $300 \times 10 \times 10 \mu\text{m}^3$ 和 $100 \times 40 \times 5 \mu\text{m}^3$ [22]。虽然两种脂的碳链长度均为15,但是晶体形态迥异,而衍射分辨率也以7.8 MAG中的晶体更优。这一结果充分表明,脂肪酸链组成在优化脂立方相晶体中的潜力。短链脂优化策略被应用于二酰基甘油激酶DgkA中,得到了类似的结果。该激酶在9.9 MAG中得到的晶体仅为 $30 \mu\text{m}$ 左右的双棱锥形,衍射至 3.7 \AA ,但在7.8 MAG中大小为 $80 \mu\text{m}$,能衍射至 3.0 \AA [65]。提示短链脂优化策略可能具有广泛应用性。之后,这一策略被应用于人类前列腺素E2合成酶1的结构解析工作中,8个月即优化微小晶体为衍射至 2.08 \AA 的大晶体[52],并以其获得单晶衍射数据用于结构解析[68]。值得提出的是,在OprB和DgkA的结晶实验中,7.8 MAG是最优的脂。但在前列腺素E2合成酶1的实验中,该脂质不支持其结晶[52],而一个比其多一个甲基的8.8 MAG表现最优。受到该优化策略的影响,短链脂获得人们重视,在没有经过链长筛选的情况下即有多个膜蛋白成功地在这些短链脂中结晶并最终获得结构,包括2012年获得诺贝尔化学奖的GPCR-Gs复合物结构(7.7 MAG)[9]、呼吸电子传递链复合物(7.7 MAG)[43]、短肽转运蛋白(7.8 MAG)[49]、单跨膜短肽(7.7 MAG)[44]以及菌膜形成过程中重要类多糖转运蛋白(7.8 MAG)[69]等。目前的结果表明,具体到特定蛋白质的结晶实验时,在脂质的选择上仍有很强的不可预见性,仍需要通过实验来确定。随着成功例子的增加和经验的积累,今后可望缩小筛选范围或通过动态模拟等方式预测最优的脂质用于结晶实验。

此外,在脂立方相中加入天然脂质也是常用的晶体优化方法。比如,目前利用该体系解析的所有G蛋白偶联受体结构均在单酰基甘油酯基础上添加了8%~10%摩尔比的胆固醇[8,67]。又如,磷脂酰胆碱对于人源前列腺素E2合成酶1的成功结晶起到关键作用,且晶体质量与其浓度相关[52]。

5 脂立方相体系在自由电子激光前沿技术中的运用

即便使用第三代高能同步辐射光源,体积小的微晶仍不能衍射至结构解析所需分辨率,而优化以

获得膜蛋白大晶体是耗时过程。以二酰基甘油激酶DgkA为例,脂立方相微晶($1 \times 1 \times 40 \mu\text{m}^3$)在光通量很高的瑞士SLS光源($85 \times 10 \mu\text{m}^2$ 光束下 2×10^{12} 光子每秒),采用 $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ 光束仅衍射至 30 \AA ,经3年时间优化方获得大晶体($20 \times 50 \times 200 \mu\text{m}^3$)解析结构[65]。但是,自由电子激光前沿技术使得利用微晶解析膜蛋白高分辨率结构成为可能,基于此的串行飞秒晶体学“开启了结构生物学新时代”[70]。

作为2012年Science期刊评出的十大科学技术突破之一,自由电子激光[70-72]利用极短脉冲(50 fs)的高辐射(10^{12} 光子)微束($1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$)硬X射线(1.3 \AA)对纳米尺度晶体进行衍射,得到室温下高分辨率数据。极短的脉冲使得衍射发生于晶体受损之前(diffraction before destruction),因此所得数据无辐射损伤。但是,晶体在每脉冲数据收集后因为高辐射剂量而瞬间蒸发,因而需要持续晶体流以提供新鲜样品。目前的自由电子激光设备一般以60~120 Hz的频率释放X射线,为了提高效率,需要自动化设备输送样品。Weierstall等[73]研究者设计了一种液体喷射器,将微小晶体重悬在沉淀剂中,源源不断地经过光束进行衍射。该报道中,纳米级的晶体即可得到结构解析所需要的衍射数据,很好地说明了自由电子激光技术的优势和潜力。但是,样品的用量是一个限制因素。虽然X射线以每秒120次高频率穿过样品流,但由于保持样品持续流动需要的速度达到 10 m/s ,晶体被X射线有效击中的几率很低,每25 000个晶体仅有一个,收集整套数据需数十毫克晶体[70]。对于难以纯化的膜蛋白来说,如此大的样品消耗限制了该方法的普遍性应用。

保持固定形状的液流需要较大流速,是样品消耗大的主要原因。但对于粘稠物质来说,保持固定形状所需的速度可以大大减缓。因此,具粘稠特性的脂立方相被尝试用来作为输送膜蛋白晶体的介质。以Cherezov教授为首的研究团队2013年在斯坦福大学直线加速器中心的直线加速相干光源(LCLS)中开展了这方面的实验。Weierstall等[74]设计了一个可以在压力下输送脂立方相的装置,其前端嵌置直径为 $10 \sim 50 \mu\text{m}$ 的毛细管,后端连接高压液体泵,脂立方相在压力的作用下,以约 1.4 mm/s 的速度送进真空的样品腔,自由电子激光X射线对其中随机排列的晶体进行衍射。此次试验获得了数个GPCR及二酰基甘油激酶DgkA的结构[10,67,74],更重要的是,极

少的样品用量提高了自由电子激光在膜蛋白结构生物学研究中的可行性。以DgkA为例, 仅用0.22 mg蛋白所得到的晶体即获得了2.18 Å的结构(PDB entry 4UYO), 丰度达到3 500的衍射数据^[74]。脂立方相—自由电子激光实验的成功至少得益于以下方面。首先, 该团队克服了获得大量脂立方相晶体的技术难题。由于该实验需要微升级的大量晶体, 前述的96孔板只能容纳纳升级的晶体而需要改进。通过实验, 得到了一种在微型注射器中生长晶体的方法^[67,75]。该方法利用脂立方相相位在有多余水相时仍稳定存在的特性, 将少量脂立方相与大量沉淀剂混合, 待晶体生长后再与水相分离, 得到足够量并保持粘稠特性的含晶体的脂立方相。其次, 输送脂立方相的喷射器是一个成功的工程设计。因为喷射的脂立方相直径很小, 且因为粘稠的缘故会反向卷曲而粘在喷射口, 在出口的位置设计有四个通气孔, 围绕脂立方相、与其推进方向一致的高速气流能保持其流向, 并精准地引导其通过直径不到2 μm的X射线光束。第三, 长期积累的单酰基甘油酯相位科学也在该实验中得到充分应用。因为样品被喷射到真空腔中后迅速蒸发, 散热造成脂立方相温度下降, 导致相位变化为Lα相。该相位在X射线下产生非常强的衍射背景, 可损坏探测器, 因此, 需要一种在低温下保持立方相的脂质。如前所述, 7.9 MAG符合这一条件。此外, 这项技术的成功有赖于第四代光源的建设、快速反应的低噪音检测器(每秒120帧衍射图谱)^[76-78]、大数据处理能力^[79]以及适应于自由电子激光衍射数据处理软件的发展^[71,80-82]。目前, 硬件方面, 日本、瑞士、德国等国家在积极建设自由电子激光设施, 是今后晶体学的一个重要方向^[83]。软件方面, 后精细化技术等算法的发展也朝数据少量化方向发展。之前的数据处理方法需要用到数百万张衍射图谱, 但改进后的方法只需要几十至几百张衍射图谱^[84-85], 与同步辐射需要的数据量差别不大。

6 膜蛋白在脂立方相中维持蛋白质天然活性

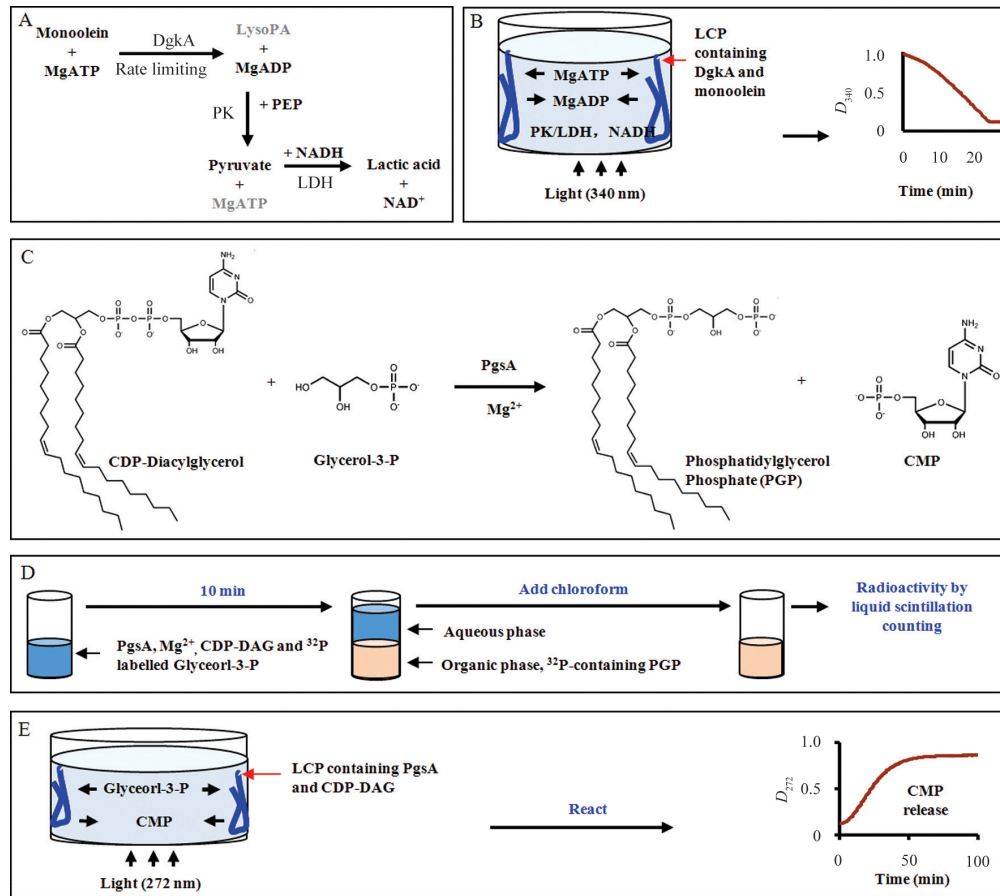
除了少数病理条件^[86]和一些重组过量表达系统中可能发生蛋白质体内结晶外^[86-89], 一般的结晶过程都是在体外进行, 与生理环境条件迥异, 因此, 晶体结构是否代表功能构象, 是结构生物学家需要回答的问题。同样, 作为结晶介质, 脂立方相是否及

怎样支持膜蛋白活性、膜蛋白在从去垢剂向脂立方相重构的过程中是否有活性丧失等, 是科学家们关心的问题。两个跨膜脂质代谢酶, 二酰基甘油激酶DgkA和磷脂酰甘油磷酸合成酶PgsA^[28]在脂立方相中的活性测定实验表明脂立方相支持膜蛋白活性(图4)。在DgkA的实验中, 酶-偶联法实验结果表明, DgkA在反应过程中将ATP转换成ADP, 同时薄层层析方法检测到其磷酸化单油酸甘油酯后的产物溶血磷脂酸, 说明脂立方相支持跨膜酶活性。另外, 一个在95 °C下半衰期为3 h的热稳定突变^[14]与野生型DgkA在脂立方相中的活性相同^[28]。可以假设, 去垢剂向脂立方相重构的过程比热处理相对温和, 因此提示重构的过程中没有活性丢失。脂立方相对膜蛋白活性的支持还从PgsA的实验中获得证据。PgsA催化胞苷二磷酸甘油二酯CDP-DAG上的磷脂酰基团转移至甘油3-磷酸, 形成磷脂酰甘油磷酸和胞苷单磷酸CMP(图4)。利用精心设计的脂立方相酶学分析方法(图4), 使用吸光检测手段发现, 脂立方相中有CMP释放, 且其释放严格依赖于酶、脂底物、甘油3-磷酸及镁离子的存在, 表明位于脂立方相中的PgsA能够催化上述反应^[28]。

此外, 上述两个脂质代谢酶在脂立方相中的活性随酶浓度、底物浓度等的升高而增高, 而且其对底物的浓度依赖表现出经典的米氏常数规律, 说明脂立方相是支持膜蛋白天然活性的基质。对于一些在去垢剂中不稳定的蛋白质, 脂立方相提供了体外活性分析的新途径。另外, 对于一些需要强疏水底物或者配体的膜蛋白, 脂立方相因能提供更高的溶解度而可能是更佳的活性分析体系。

7 脂立方相支持膜蛋白的体外复性

蛋白质的体外复性为获得大量活性蛋白进行生物化学、生物物理和结构分析等提供了可能的高效途径^[91], 但因为技术上的原因, 膜蛋白复性远远落后于可溶性蛋白。膜蛋白复性的膜性介质包括去垢剂^[92-93]、liposome^[94]、nanodisc^[95]、bicelle^[96-98]等。最近, 脂立方相被用于复性膜蛋白^[99]。在该报道中, 二酰基甘油激酶DgkA在去除去垢剂后, 用酸性尿素溶液溶解, 与单酰基甘油酯混合后形成脂立方相。得到的脂立方相用不含尿素的溶液进行洗涤。变性剂尿素在此过程中浓度逐渐下降, 而膜蛋白则缓慢复性并插入到脂双层中。复性的激酶与体内表达纯化



A: DgkA活性的偶联酶方法。丙酮酸激酶利用PEP为磷供体, 将DgkA转磷后产物ADP磷酸化, 脱磷后的丙酮酸被乳酸脱氢酶还原为乳酸, 伴随NADH的氧化而失去340 nm处吸光的性质; B: 脂立方相涂布在96孔板内侧, 因为酶标仪光径小于孔径, 不会照射到脂立方相, 且粘稠的脂立方相不移动到光径区域, 无吸光干扰。加入反应液后, ATP扩散到脂立方相后, 反应开始, 产生ADP。后者扩散到水相溶液, 引发偶联反应, 可监测到340 nm处吸光度持续下降; C: PgsA反应示意图; D: PgsA将 ^{32}P 从标记的水溶性G3P上转移到脂溶性PGP。氯仿抽提得到的有机相放射性反映酶活性^[90]。此方法需要同位素标记, 不具连续性, 且需要特殊设备; E: 在脂立方相中进行PgsA活性分析。与B相似, LCP中虽带有紫外吸光的蛋白和底物, 但不会产生吸光背景。所加入的G3P扩散到脂立方相中, 引发反应, 生成CMP, 继而释放到光径范围的反应液, 在紫外波长造成可连续监测的强吸收。该分析方法具有灵敏、简单、连续和高通量等特点。

A: principle of the coupled assay for the kinase activity of DgkA. ADP is re-phosphorylated by pyruvate kinase using PEP as the phosphor-donor. The product pyruvate is reduced to lactic acid by lactate dehydrogenase at the cost of the oxidation of NADH, a process that causes the loss of absorbance at 340 nm; B: DgkA- and monoolein- containing LCP is dispensed at the wall of a 96-well plate. The sticky LCP stays where it is put and avoids been seen by the beam. This geometry ensures no interference from light scattering. Reaction begins upon diffusion of ATP into LCP from added mixture. As a result, ADP is produced and released to the coupled assay mixture, where it initializes the consequent reaction causing reduction of A340; C: the PgsA reaction; D: conventional assay for PgsA activity requires multiple steps including chloroform extraction and measurement of radioactivity; E: PgsA assay in LCP. The same geometry as in (B) avoids UV absorbance background from PgsA and CDP-DAG. Reaction begins upon addition of G3P. The water soluble CMP is then produced and released to the soaking solution where it can be detected by the light beam. The one-step assay is simple, continuous, sensitive and suitable for high-throughput.

图4 两个脂质代谢跨膜酶在脂立方相中的活性分析

Fig.4 Enzymatic assay for two membrane bound enzymes involved in lipid metabolism

后的激酶具有相同的活性, 并能结晶, 得到2.55 Å的结构。该结构与非变性蛋白的结构一致, 支持“一级结构决定高级结构”的经典理论。Sanders研究组曾对DgkA在不同体系中做过复性研究, 发现在去垢剂和liposome中复性效率分别为46%和26%^[100]。脂立方相的100%复性效率显示该介质在膜蛋白复性研究中具有很大的潜力。其高效的复性效率可能与脂

立方相的两个特点相关。第一, 脂立方相含有2 mol/L浓度的脂质, 高含量疏水物质的存在提供了稳定跨膜区的环境。第二, 脂立方相中脂双层的表面积非常大, 提高了其与跨膜蛋白的碰撞几率, 减少了变性蛋白之间因非特异疏水相互作用而聚集的可能性, 利于复性。在最常见的表达系统大肠杆菌中表达时, 膜蛋白往往表现为包涵体而需要复性, 但复性效率

往往非常低或者不成功。脂立方相复性技术的发展将拓展这一表达系统的应用。

8 展望

因为研究困难,膜蛋白科学进展相对可溶蛋白来说,比较缓慢。但随着新技术的发展,这一局面正在发生改观。具有短短十几年历史的脂立方相技术已经为许多重要或高难度的膜蛋白结构解析做出了贡献,其日益广泛的应用将推动这一技术体系的成熟。目前主要的脂质是单酰基甘油酯,设计新脂质以形成更接近天然膜结构与成分的脂立方相,是值得探索的方向之一。此外,将脂立方相结晶技术简易化,如原位收集数据以避免繁琐的晶体操作步骤等,以及发展适合脂立方相结晶的沉淀剂类型,也将推广该重要体系的应用。脂立方相应用于膜蛋白生化与生物物理分析具有较大潜力,对稳定性较差的蛋白可能非常有利。脂立方相用于膜蛋白复性的研究目前仅有一例成功报道,其普遍性仍有待测试,若能广泛应用,将对表达和纯化均困难的膜蛋白的获取提供一个新的有效途径。

参考文献 (References)

- 1 Yildirim MA, Goh KI, Cusick ME, Barabasi AL, Vidal M. Drug-target network. *Nat Biotechnol* 2007; 25(10): 1119-26.
- 2 Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature* 1958; 181(4610): 662-6.
- 3 Deisenhofer J, Epp O, Miki K, Huber R, Michel H. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas-viridis* at 3 Å resolution. *Nature* 1985; 318(6047): 618-24.
- 4 Tribet C, Audebert R, Popot JL. Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(26): 15047-50.
- 5 Popot JL. Amphipols, nanodiscs, and fluorinated surfactants: Three nonconventional approaches to studying membrane proteins in aqueous solutions. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 737-75.
- 6 Caffrey M, Li D, Dukkupati A. Membrane protein structure determination using crystallography and lipidic mesophases: Recent advances and successes. *Biochemistry* 2012; 51(32): 6266-88.
- 7 Kobilka B. The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 52(25): 6380-8.
- 8 Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013; 53: 531-56.
- 9 Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, *et al.* Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 2011; 477(7366): 549-55.
- 10 Liu W, Wacker D, Gati C, Han GW, James D, Wang D, *et al.* Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors. *Science* 2013; 342(6165): 1521-4.
- 11 Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, *et al.* GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β_2 -adrenergic receptor function. *Science* 2007; 318(5854): 1266-73.
- 12 Lorch M, Faham S, Kaiser C, Weber I, Mason AJ, Bowie JU, *et al.* How to prepare membrane proteins for solid-state NMR: A case study on the alpha-helical integral membrane protein diacylglycerol kinase from *E. coli*. *Chembiochem* 2005; 6(9): 1693-700.
- 13 Liao J, Li H, Zeng W, Sauer DB, Belmares R, Jiang Y. Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science* 2012; 335(6069): 686-90.
- 14 Li D, Lyons JA, Pye VE, Vogeley L, Aragao D, Kenyon CP, *et al.* Crystal structure of the integral membrane diacylglycerol kinase. *Nature* 2013; 497(7450): 521-4.
- 15 Qiu H, Caffrey M. The phase diagram of the monoolein/water system: Metastability and equilibrium aspects. *Biomaterials* 2000; 21(3): 223-34.
- 16 Borshchevskiy V, Moiseeva E, Kuklin A, Büldt G, Hato M, Gordeliy V. Isoprenoid-chained lipid β -XyIOC₁₆₊₄—a novel molecule for in meso membrane protein crystallization. *J Cryst Growth* 2010; 312(22): 3326-30.
- 17 Barauskas J, Landh T. Phase behavior of the phytantriol/water system. *Langmuir* 2003; 19(23): 9562-5.
- 18 Misquitta Y, Caffrey M. Rational design of lipid molecular structure: A case study involving the C19:1c10 monoacylglycerol. *Biophys J* 2001; 81(2): 1047-58.
- 19 Misquitta LV, Misquitta Y, Cherezov V, Slattery O, Mohan JM, Hart D, *et al.* Membrane protein crystallization in lipidic mesophases with tailored bilayers. *Structure* 2004; 12 (12): 2113-24.
- 20 Lombard J. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Bio Direct* 2014; 9: 32.
- 21 Goñi FM. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer-Nicolson model. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1838(6): 1467-76.
- 22 Li D, Lee J, Caffrey M. Crystallizing membrane proteins in lipidic mesophases. A host lipid screen. *Cryst Growth Des* 2011; 11(2): 530-7.
- 23 Yang D, Cwynar VA, Hart DJ, Madanmohan J, Lee J, Lyons J, *et al.* Preparation of 1-monoacylglycerols via the Suzuki-Miyaura reaction: 2,3-dihydroxypropyl (Z)-tetradec-7-enoate. *Organic Synth* 2012; 89: 183-201.
- 24 Landau EM, Rosenbusch JP. Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(25): 14532-5.
- 25 Conn CE, Darmanin C, Mulet X, Le Cann S, Kirby N, Drummond CJ. High-throughput analysis of the structural evolution of the monoolein cubic phase in situ under crystallogensis conditions. *Soft Matter* 2012; 8(7): 2310-21.
- 26 Darmanin C, Conn CE, Newman J, Mulet X, Seabrook SA, Liang YL, *et al.* High-throughput production and structural characterization of libraries of self-assembly lipidic cubic phase materials. *ACS Comb Sci* 2012; 14(4): 247-52.
- 27 Cheng A, Hummel B, Qiu H, Caffrey M. A simple mechanical mixer for small viscous lipid-containing samples. *Chem Phys Lipids* 1998; 95(1): 11-21.

- 28 Li D, Caffrey M. Lipid cubic phase as a membrane mimetic for integral membrane protein enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(21): 8639-44.
- 29 Bolen EJ, Holloway PW. Quenching of tryptophan fluorescence by brominated phospholipid. *Biochemistry* 1990; 29(41): 9638-43.
- 30 Salvati Manni L, Zabara A, Osornio YM, Schoppe J, Batyuk A, Pluckthun A, *et al.* Phase behavior of a designed cyclopropyl analogue of monoolein: Implications for low-temperature membrane protein crystallization. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015; 54(3): 1027-31.
- 31 Cherezov V, Yamashita E, Liu W, Zhalnina M, Cramer WA, Caffrey M. In meso structure of the cobalamin transporter, BtuB, at 1.95 Å resolution. *J Mol Biol* 2006; 364(4): 716-34.
- 32 Cherezov V, Liu W, Derrick JP, Luan B, Aksimentiev A, Katritch V, *et al.* In meso crystal structure and docking simulations suggest an alternative proteoglycan binding site in the OpcA outer membrane adhesin. *Proteins* 2008; 71(1): 24-34.
- 33 Liu W, Caffrey M. Gramicidin structure and disposition in highly curved membranes. *J Struct Biol* 2005; 150(1): 23-40.
- 34 Grabe M, Neu J, Oster G, Nollert P. Protein interactions and membrane geometry. *Biophys J* 2003; 84(2): 854-68.
- 35 Katona G, Andreasson U, Landau EM, Andreasson LE, Neutze R. Lipidic cubic phase crystal structure of the photosynthetic reaction centre from rhodospirillum rubrum at 2.35 Å resolution. *J Mol Biol* 2003; 331(3): 681-92.
- 36 Cherezov V, Clogston J, Papiz MZ, Caffrey M. Room to move: Crystallizing membrane proteins in swollen lipidic mesophases. *J Mol Biol* 2006; 357(5): 1605-18.
- 37 Li D, Boland C, Walsh K, Caffrey M. Use of a robot for high-throughput crystallization of membrane proteins in lipidic mesophases. *J Vis Exp* 2012; 67: e4000.
- 38 Cherezov V, Peddi A, Muthusubramanian L, Zheng YF, Caffrey M. A robotic system for crystallizing membrane and soluble proteins in lipidic mesophases. *Acta Crystallogr D* 2004; 60(Pt 10): 1795-807.
- 39 Cherezov V, Clogston J, Misquitta Y, Abdel-Gawad W, Caffrey M. Membrane protein crystallization in meso: Lipid type-tailoring of the cubic phase. *Biophys J* 2002; 83(6): 3393-407.
- 40 Ai X, Caffrey M. Membrane protein crystallization in lipidic mesophases: Detergent effects. *Biophys J* 2000; 79(1): 394-405.
- 41 Cherezov V, Fersi H, Caffrey M. Crystallization screens: Compatibility with the lipidic cubic phase for in meso crystallization of membrane proteins. *Biophys J* 2001; 81(1): 225-42.
- 42 Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, *et al.* High resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 2007; 318(5854): 1258-65.
- 43 Lyons JA, Aragao D, Slattey O, Pliaskov AV, Soulimane T, Caffrey M. Structural insights into electron transfer in *caa3*-type cytochrome oxidase. *Nature* 2012; 487(7408): 514-8.
- 44 Höfer N, Aragão D, Caffrey M. Crystallizing transmembrane peptides in lipidic mesophases. *Biophys J* 2010; 99(3): L23-5.
- 45 Knoblich K, Park S, Lutfi M, van't Hag L, Conn CE, Seabrook SA, *et al.* Transmembrane complexes of DAP12 crystallized in lipid membranes provide insights into control of oligomerization in immunoreceptor assembly. *Cell Rep* 2015; 11(8): 1184-92.
- 46 Joh NH, Wang T, Bhate MP, Acharya R, Wu Y, Grabe M, *et al.* *De novo* design of a transmembrane Zn²⁺-transporting four-helix bundle. *Science* 2014; 346(6216): 1520-4.
- 47 Santos JS, Asmar-Rovira GA, Han GW, Liu W, Syeda R, Cherezov V, *et al.* Crystal structure of a voltage-gated K⁺ channel pore module in a closed state in lipid membranes. *J Biol Chem* 2012; 287(51): 43063-70.
- 48 Doki S, Kato HE, Solcan N, Iwaki M, Koyama M, Hattori M, *et al.* Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(28): 11343-8.
- 49 Lyons JA, Parker JL, Solcan N, Brinth A, Li D, Shah ST, *et al.* Structural basis for polyspecificity in the POT family of proton-coupled oligopeptide transporters. *EMBO Rep* 2014; 15(8): 886-93.
- 50 Xu Y, Tao Y, Cheung LS, Fan C, Chen LQ, Xu S, *et al.* Structures of bacterial homologues of SWEET transporters in two distinct conformations. *Nature* 2014; 515(7527): 448-52.
- 51 Wang J, Yan C, Li Y, Hirata K, Yamamoto M, Yan N, *et al.* Crystal structure of a bacterial homologue of SWEET transporters. *Cell Res* 2014; 24(12): 1486-9.
- 52 Li D, Howe N, Dukkupati A, Shah ST, Bax BD, Edge C, *et al.* Crystallizing membrane proteins in the lipidic mesophase. Experience with human prostaglandin E2 synthase 1 and an evolving strategy. *Cryst Growth Des* 2014; 14(4): 2034-47.
- 53 Lee SM, Booe JM, Pioszak AA. Structural insights into ligand recognition and selectivity for classes A, B, and C GPCRs. *Eur J Pharmacol* 2015; doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.013.
- 54 Zhang D, Gao ZG, Zhang K, Kiselev E, Crane S, Wang J, *et al.* Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y1 receptor. *Nature* 2015; 520(7547): 317-21.
- 55 Zhao Q, Wu BL. Ice breaking in GPCR structural biology. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33(3): 324-34.
- 56 Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, *et al.* Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* 2014; 344(6181): 304-7.
- 57 Caffrey M, Eifert R, Li D, Howe N. The lipid cubic phase or method for crystallizing proteins. Bushings for better manual dispensing. *J Appl Crystallogr* 2014; 47(Pt 5): 1804-6.
- 58 Cherezov V, Caffrey M. A simple and inexpensive nanoliter-volume dispenser for highly viscous materials used in membrane protein crystallization. *J Appl Crystallogr* 2005; 38: 398-400.
- 59 Cherezov V, Caffrey M. Nano-volume plates with excellent optical properties for fast, inexpensive crystallization screening of membrane proteins. *J Appl Crystallogr* 2003; 36(6): 1372-7.
- 60 Li D, Boland C, Aragao D, Walsh K, Caffrey M. Harvesting and cryo-cooling crystals of membrane proteins grown in lipidic mesophases for structure determination by macromolecular crystallography. *J Vis Exp* 2012; 67: e4001.
- 61 Cherezov V, Abola E, Stevens RC. Recent progress in the structure determination of GPCRs, a membrane protein family with high potential as pharmaceutical targets. *Methods Mol Biol* 2010; 654: 141-68.
- 62 Li D, Pye VE, Caffrey M. Experimental phasing for structure determination using membrane-protein crystals grown by the lipid cubic phase method. *Acta Crystallogr D* 2015; 71(Pt 1): 104-22.
- 63 Privalov PL. Cold denaturation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1990; 25(4): 281-305.
- 64 Privalov PL, Griko Yu V, Venyaminov S, Kutysheiko VP. Cold

- denaturation of myoglobin. *J Mol Biol* 1986; 190(3): 487-98.
- 65 Li D, Shah ST, Caffrey M. Host lipid and temperature as important screening variables for crystallizing integral membrane proteins in lipidic mesophases. *Trials with diacylglycerol kinase. Cryst Growth Des* 2013; 13(7): 2846-57.
- 66 Wohri AB, Johansson LC, Wadsten-Hindrichsen P, Wahlgren WY, Fischer G, Horsefield R, *et al.* A lipidic-sponge phase screen for membrane protein crystallization. *Structure* 2008; 16(7): 1003-9.
- 67 Caffrey M, Li D, Howe N, Shah ST. 'Hit and run' serial femtosecond crystallography of a membrane kinase in the lipid cubic phase. *Phil Trans B* 2014; 369(1647): 20130621.
- 68 Weinert T, Olieric V, Waltersperger S, Panepucci E, Chen L, Zhang H, *et al.* **Fast native-SAD phasing for routine macromolecular structure determination** 2015; 12(2): 131-3.
- 69 Tan J, Rouse SL, Li D, Pye VE, Vogeley L, Brinth AR, *et al.* A conformational landscape for alginate secretion across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr D* 2014; 70(Pt 8): 2054-68.
- 70 Fromme P, Spence JC. Femtosecond nanocrystallography using X-ray lasers for membrane protein structure determination. *Curr Opin Struct Biol* 2011; 21(4): 509-16.
- 71 Kirian RA, Wang X, Weierstall U, Schmidt KE, Spence JC, Hunter M, *et al.* Femtosecond protein nanocrystallography-data analysis methods. *Opt Express* 2010; 18(6): 5713-23.
- 72 Neutze R, Wouts R, van der Spoel D, Weckert E, Hajdu J. Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses. *Nature* 2000; 406(6797): 752-7.
- 73 Weierstall U, Spence JC, Doak RB. Injector for scattering measurements on fully solvated biospecies. *Rev Sci Instrum* 2012; 83(3): 035108.
- 74 Weierstall U, James D, Wang C, White TA, Wang D, Liu W, *et al.* Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography. *Nat Commun* 2014; 5: 3309.
- 75 Liu W, Ishchenko A, Cherezov V. Preparation of microcrystals in lipidic cubic phase for serial femtosecond crystallography. *Nat Protoc* 2014; 9(9): 2123-34.
- 76 Hatsui T, Graafsma H. X-ray imaging detectors for synchrotron and XFEL sources. *IUCrJ* 2015; 2(Pt 3): 371-83.
- 77 Blaj G, Garagiulo P, Carini G, Carron S, Dragone A, Freytag D, *et al.* X-ray detectors at the Linac Coherent Light Source. *J Synchrotron Radiat* 2015 22(Pt 3): 577-83.
- 78 Hatsui T, Graafsma H. X-ray imaging detectors for synchrotron and XFEL sources. *IUCrJ* 2015; 2(3): 371-83.
- 79 Sauter NK, Hattne J, Grosse-Kunstleve RW, Echols N. New Python-based methods for data processing. *Acta Crystallogr D* 2013; 69(Pt 7): 1274-82.
- 80 Sauter NK. XEFL diffraction: Developing processing methods to optimize data quality. *J Synchrotron Radiat* 2015; 22(Pt 2): 239-48.
- 81 Barty A, Kirian RA, Maia FR, Hantke M, Yoon CH, White TA, *et al.* Software for high-throughput reduction and analysis of serial femtosecond X-ray diffraction data. *J Appl Crystallogr* 2014; 47(Pt 3): 1118-31.
- 82 White TA, Kirian RA, Martin AV, Aquila A, Nass K, Barty A, *et al.* Crystfel: A software suite for snapshot serial crystallography. *J Appl Crystallogr* 2012; 45(2): 335-41.
- 83 Altarelli M. From 3rd- to 4th-generation light sources: Free-electron lasers in the X-ray range. *Crystallogr Rep* 2010; 55(7): 1145-51.
- 84 Uervirojnangkoorn M, Zeldin OB, Lyubimov AY, Hattne J. Enabling X-ray free electron laser crystallography for challenging biological systems from a limited number of crystals. *eLife* 2015; doi: 10.7554/eLife.05421.
- 85 Larochelle S. Structural biology: Solving XFEL's image problem. *Nat Methods* 2015; 12(5): 392.
- 86 Araujo JT, Batissoco AC, Bodemeier L. "In vivo" and "in vitro" demonstration of hemoglobin c crystals in non-splenectomized patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1999; 41(4): 235-8.
- 87 Gallat FX, Matsugaki N, Coussens NP, Yagi KJ, Boudes M, Higashi T, *et al.* **In vivo** crystallography at X-ray free-electron lasers: The next generation of structural biology? *Phil Trans B* 2014; 369(1647): 20130497.
- 88 Sawaya MR, Cascio D, Gingery M, Rodriguez J, Goldschmidt L, Colletier JP, *et al.* Protein crystal structure obtained at 2.9 Å resolution from injecting bacterial cells into an X-ray free-electron laser beam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(35): 12769-74.
- 89 Redecke L, Nass K, DePonte DP, White TA, Rehders D, Barty A, *et al.* Natively inhibited *Trypanosoma brucei* cathepsin B structure determined by using an X-ray laser. *Science* 2013; 339(6116): 227-30.
- 90 Dowhan W. Phosphatidylglycerophosphate synthase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 1992; 209: 313-21.
- 91 Burgess RR. Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol* 2009; 463: 259-82.
- 92 Nagy JK, Lonzer WL, Sanders CR. Kinetic study of folding and misfolding of diacylglycerol kinase in model membranes. *Biochemistry* 2001; 40(30): 8971-80.
- 93 Nagy JK, Sanders CR. A critical residue in the folding pathway of an integral membrane protein. *Biochemistry* 2002; 41(29): 9021-5.
- 94 Gorzelle BM, Nagy JK, Oxenoid K, Lonzer WL, Cafiso DS, Sanders CR. Reconstitutive refolding of diacylglycerol kinase, an integral membrane protein. *Biochemistry* 1999; 38(49): 16373-82.
- 95 Shenkarev ZO, Lyukmanova EN, Butenko IO, Petrovskaya LE, Paramonov AS, Shulepko MA, *et al.* Lipid-protein nanodiscs promote *in vitro* folding of transmembrane domains of multi-helical and multimeric membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1828(2): 776-84.
- 96 Plesniak LA, Mahalakshmi R, Rypien C, Yang Y, Racic J, Marassi FM. Expression, refolding, and initial structural characterization of the *Y. pestis* Ail outer membrane protein in lipids. *Biochem Biophys Acta* 2011; 1808(1): 482-9.
- 97 Durr UH, Gildenberg M, Ramamoorthy A. The magic of bicelles lights up membrane protein structure. *Chem Rev* 2012; 112(11): 6054-74.
- 98 Kiefer H. *In vitro* folding of alpha-helical membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1610(1): 57-62.
- 99 Li D, Caffrey M. Renaturing membrane proteins in the lipid cubic phase, a nanoporous membrane mimetic. *Sci Rep* 2014; 4: 5806.
- 100 Nagy JK, Sanders CR. Destabilizing mutations promote membrane protein misfolding. *Biochemistry* 2004; 43(1): 19-25.