

电子显微镜观察 SNARE 核心复合体的结构

谢 鑫, 隋森芳

(清华大学生命科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要: 作为神经突触中介导囊泡融合的核心蛋白, SNARE (soluble NSF attachment protein receptors) 复合体由 VAMP、syntaxin 和 SNAP25 三种蛋白组成。而由其可溶性部分组成的 SNARE 核心复合体是发挥融合功能的关键部分。通过表达 SNARE 蛋白, 应用分子筛和离子交换柱等纯化方法, 重组得到了高纯度的 SNARE 核心复合体, 并分析了其在水溶液中的稳定性。最后, 采用负染电镜观察方法得到了该复合体的二维平均结构。在水溶液中, SNARE 复合体核心部分为 2.5 nm 宽、12 nm 长的棒状结构。

关键词: SNARE 核心复合体; 电子显微镜; 电镜

中图分类号: Q6

0 引 言

神经细胞突触内突触囊泡和突触前膜的融合是依靠 SNARE (soluble NSF attachment protein receptors) 复合体介导的^[1]。在神经末梢中, 钙离子引发的神经递质释放需要 VAMP (也称为 synaptobrevin)、syntaxin 和 SNAP25 三种 SNARE 蛋白介导融合过程的发生^[2,3]。VAMP 和 syntaxin 的胞质部分可以同 SNAP25 形成一个四螺旋束复合体^[4-6]。syntaxin 和 VAMP 各贡献一个螺旋, SNAP25 贡献两个螺旋^[4]。SNARE 蛋白形成的螺旋复合体被认为提供了融合需要的驱动力和能量^[4,7]。生化实验也证明了纯化的重组 SNARE 复合体可以在体外介导融合的发生^[8,9]。SNARE 蛋白的胞质部分形成的 SNARE 核心复合体在融合过程中发挥了非常重要的作用^[8]。通过快速蛋白液相色谱 (fast protein liquid chromatography, FPLC) 的分子筛和阴离子交换柱对四种 SNARE 蛋白和 SNARE 核心复合体进行了纯化, 检测其稳定性, 并利用电子显微镜 (electron microscopy, EM) 对 SNARE 核心复合体的结构进行了观察。尽管利用 X 射线晶体学方法, SNARE 核心复合体的结构已经被解出^[4], 但是 SNARE 蛋白如何与其它蛋白协同诱发囊泡融合的机制仍然不清楚^[10,11]。本工作有可能为电镜研究此复杂系统做一些铺垫。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠的全长 VAMP, SNAP25 和 syntaxin 的质粒由 E.R.Chapman 提供。VAMP(1-94), SNAP25N(1-100)和 SNAP25C(125-206)被克隆到带有 His tag 标记的 pET28a 载体中。Syntaxin(1-265)被克隆到带有 GST tag 的 pGEX 载体中。实验中使用上述四种 SNARE 蛋白。实验用缓冲液为含有 300 mmol/L 氯化钠和 2 mmol/L β - 巯基乙醇的 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲液, pH 值为 8.0。试验中所用试剂均为分析纯。

1.2 蛋白表达和纯化

四种 SNARE 蛋白均在 37°C 环境下在 *E.coli* BL21/DE3 菌株中进行表达, 当菌液 OD 值达到 0.6 时开始用 0.3 mmol/L 的 IPTG 诱导 3 h。所有 His tag 融合蛋白均用 250 mmol/L 咪唑溶液从镍亲和柱上纯化。GST tag 蛋白通过谷胱甘肽凝胶纯化, 用凝血酶切除 GST tag。所有蛋白均过夜透析并用阴离子交换柱 (Mono Q) 和分子筛 (Superdex 200 10/300 GL) 纯化。纯化后的蛋白浓度为 0.5~

收稿日期: 2007-04-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3033016)

通讯作者: 隋森芳, 电话: (010)62784768, 传真: (010)62793367,

E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn

0.6 g/L。蛋白的浓度及纯度采用光密度法测定。

1.3 SNARE 核心复合体重组和纯化

SNARE 核心复合体是在体外将四种 SNARE 蛋白 40°C 混合 30 min 制得^[9]。然后用分子筛 (Superdex 200 10/300 GL) 去除未形成复合体的单体蛋白, 并用浓缩管 (Millipore, 截留分子量 5 kD) 将 SNARE 复合体浓度浓缩到 0.2 g/L。

1.4 SNARE 核心复合体稳定性分析

在 SNARE 核心复合体分离后, 置于 40°C 的水溶液中 12 h, 在不同时间制备样品, 跑胶测定 SNARE 核心复合体解离情况, 并对蛋白条带的光密度进行测定分析。

1.5 电镜观察及图像处理

将含有 SNARE 核心复合体的溶液 5 μ l 滴到铜网上 (已经亲水化处理), 用滤纸吸掉后, 用 1% (W/V) 的醋酸双氧铀负染 1 min 后在 Philips CM120 透射电镜下观察。电镜的工作电压为 100 kV, 放大率为 50 000, 感兴趣的区域用乐凯胶片照相记录。底片采用 D19 显影液显影 15 min。底片扫描采用 Nikon Coolscan9000ED 扫描仪, 步长为 12.7 μ m/pixel。图像计算过程采用 EMAN 软件并按照 EMAN 软件标准处理过程进行。简单地说,

首先从电镜底片中用 Boxer 程序挑选出约 400 个粒子, 接着采用对中命令进行 4 轮对中后, 直至所有粒子中心计算前后不再偏移, 然后利用 “startnr-classes” 命令采用不加任何对称性的二维平均命令对所有粒子进行计算并归为一类。

2 结 果

2.1 SNARE 蛋白提纯和 SNARE 核心复合体的重组

SNARE 核心复合体是指由 syntaxin 和 VAMP 两个蛋白的胞质部分和去掉链接肽链的 SNAP25 C 端和 N 端两部分蛋白 (SNAP25N, SNAP25C) 形成的复合体 (如图 1A)^[8,12]。SNARE 核心复合体虽然缺少跨膜区, 但其促进融合的核心功能并没有受到影响。因而常被用于生物化学和生物物理学研究。

进行电镜研究的前提, 是要得到足够纯的蛋白。为了得到高纯度的核心复合体蛋白, 四种单体蛋白在亲和柱提纯后, 又使用阴离子交换柱和分子筛进一步提纯。如图 1B 所示, 提纯后, 四种单体蛋白的浓度约 0.5~0.6 g/L, 纯度达到 98% 以上。

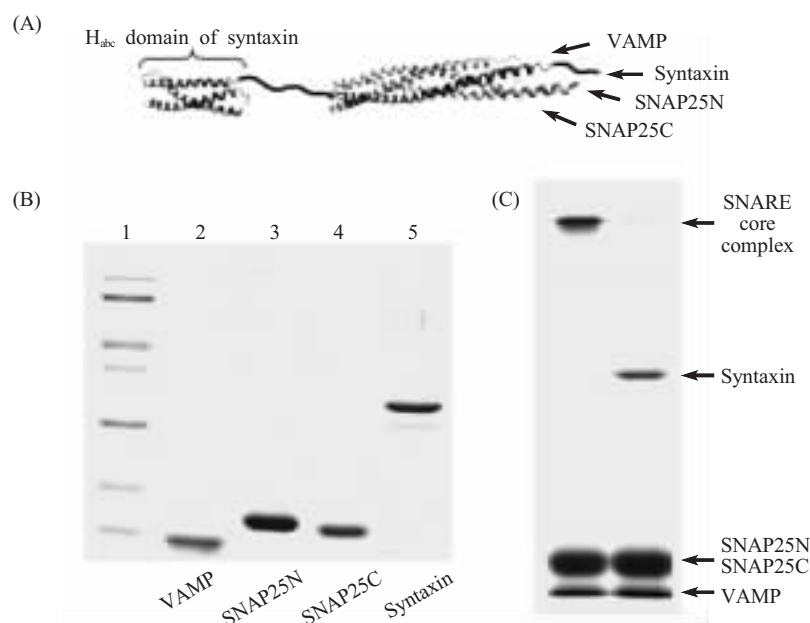


Fig.1 The SNARE proteins and SNARE core complex. (A) The SNARE proteins and SNARE core complex (SNARE core complex and syntaxin H_{abc} domain use PDB model 1SFC and 1BR0, linker is drawn randomly); (B) The four SNARE proteins (VAMP, SNAP25N, SNAP25C, syntaxin); (C) SNARE core complex reconstituted by four SNARE proteins. After heating, SNARE core complex will be separated again into four proteins, which shows that the SNARE core complex is well reconstituted

为了验证重组 SNARE 核心复合体是否可以在生理条件下发挥功能，在得到四种 SNARE 蛋白后，将四种蛋白在 4°C 混合 30 min，可以得到抗 SDS 的 SNARE 核心复合体（图 1C）。SNARE 核心复合体经过 3 min 加热后解开，又得到四种 SNARE 蛋白（其中 SNAP25N 和 SNAP25C 因为分子量几乎一致，在一个条带上）。这跟以往的研究结果一致，说明 SNARE 复合体是有活性、可以发挥功能的^[12]。

2.2 SNARE 核心复合体的分离纯化

在得到 SNARE 核心复合体后，为了防止未重组蛋白对进一步的电镜观察形成干扰，必须将 SNARE 核心复合体进行分离纯化。采用分子筛对重组 SNARE 核心复合体的溶液进行分离，SNARE 核心复合体因为分子量最大，可以成功同其他蛋白分开。如图 2A 所示，SNARE 核心复合体可以有效地同 SNARE 蛋白中分子量最大的 syntaxin 分离。为了控制溶液中完全没有 syntaxin，选择离 syntaxin 峰较远的白色箭头位置的溶液。再通过浓缩，将 SNARE 核心复合体的浓度控制在 0.2~

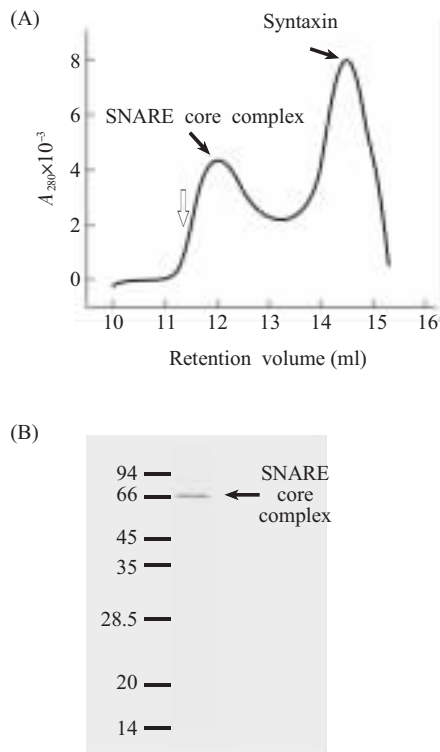


Fig.2 Size exclusion analysis of SNARE core complex. (A) Elution curve of SNARE core complex and syntaxin shows that SNARE core complex and syntaxin could be well separated. (B) The fraction (500 μ l) indicated by white arrow (in A) is concentrated to make EM sample, which is confirmed by SDS-PAGE

0.3 g/L。通过 SDS-PAGE 可以再次验证白色箭头部分的 SNARE 核心复合体可以顺利同其他蛋白分开，并且纯度可以达到 95% 以上。这部分蛋白用于电镜样品的制备。

2.3 SNARE 核心复合体的稳定性验证

SNARE 核心复合体在水溶液中能够稳定地存在是能够进行电镜观察的另外一个前提条件。有文献报导，SNARE 核心复合体在溶液中放置会发生解离^[12]。在制备电镜样品前，高纯度的 SNARE 核心复合体需在纯化和浓缩过程中单独存在 2 h，必须确认 SNARE 核心复合体是否能够稳定地存在于水溶液中。将提纯的 SNARE 核心复合体在 4°C 放置不同时间，并跑胶验证 SNARE 核心复合体的解离情况。如图 3A 所示，复合体大部分并没有发生解离。为了更精确地确定复合体的稳定性，检测不

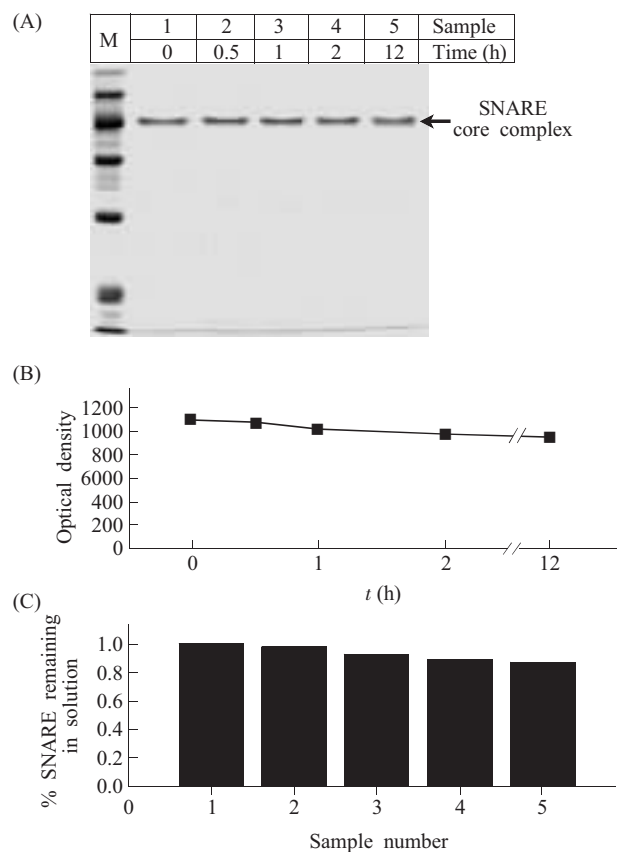


Fig.3 The stability test of SNARE core complex in buffer solutions. (A) The SDS-PAGE of pure SNARE core complex in buffer solution during different time; (B) The optical density (OD) of each SNARE core complex band ; (C) The ratio of OD comparing with zero time. It is shown that in 12 hours, nearly 85% SNARE core complex remains its stability, and in 2 hours, over 95%. SNARE core complex remains during the concentration time

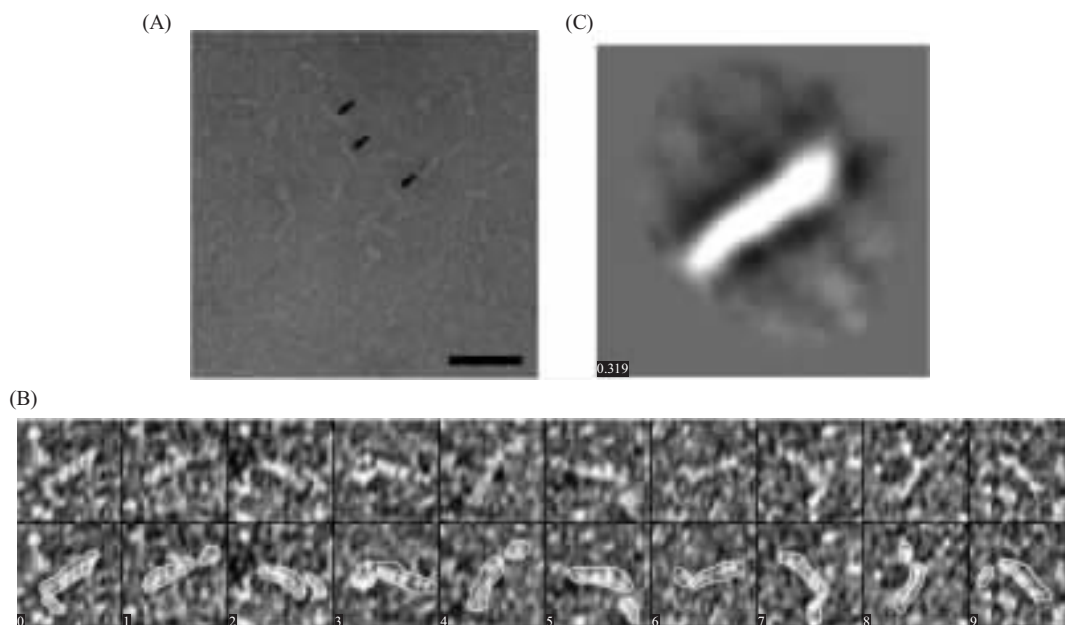


Fig.4 The SNARE core complex visualized by electron microscopy. (A) Electron microscopy image of SNARE core complex in buffer solution; (B) Ten selected single particles (line 1) with marked random tails (line 2); (C) The result of calculation shows that SNARE core complex is a rod-like structure, which is 2.5 nm in width and 12 nm in length. The bar is 50 nm (A) and the box (B, C) is 20 nm

同时间的 SNARE 核心复合体在胶中的光密度 (图 3B) 并将各个时间的光密度与初始值 (0 min) 进行比较 (图 3C), 发现经过两小时的时间, 98% 的 SNARE 核心复合体可以稳定存在于水溶液中。

2.4 SNARE 核心复合体的电镜观察

电镜观察显示 SNARE 核心复合体呈现棒状结构 (图 4A)。图 4B 为从底片中挑出的 10 个 SNARE 核心复合体 (图 4B, 第一行)。组成 SNARE 核心复合体的 syntaxin 还含有一个结构域 (Habc 结构域) 位于四螺旋束外面 (图 1A), 仔细观察, 在电镜底片中依然可以看到这个结构域 (图 4B, 第二行)。总共挑选了近 400 个 SNARE 核心复合体粒子, 并对这些粒子进行不加任何对称性的二维平均计算。计算结果显示 SNARE 核心复合体为宽 2.5 nm、长 12 nm 的棒状结构。这个结果同 X 衍射结果一致^[4]。平均结果中并没有 syntaxin 位于四螺旋束外的结构, 因为这个结构有动态的肽链进行连接, 其位置不固定 (图 4B)^[13], 所以二维平均计算的结果中没有显示出来。

3 讨 论

许多研究已经阐释了 SNARE 复合体是神经

胞囊泡融合过程中起关键作用的蛋白^[1-3]。SNARE 复合体的形成可以拉近囊泡和突触前膜, 同时, 复合体形成所提供的能量可以促进融合孔的形成^[2,3]。虽然融合过程已经有很多研究, 但是迄今为止对于融合孔是否存在、是由哪几个蛋白介导并形成的还没有定论。无论是生物化学的方法, 还是电子晶体学的结构计算, 都只能从侧面证明融合孔的存在和 SNARE 复合体的重要性。从这个角度来讲, 电子显微镜是唯一一种可以真正看到并确认融合孔的实验技术。

SNARE 核心复合体是 SNARE 复合体的胞质部分。由于其分子量只有 63 kD, 并且成棒状结构, 这意味着杂蛋白的干扰会导致在电镜下很难分辨其结构, 因此, 必须要求高纯度的样品和干净的碳膜背景。对重组 SNARE 核心复合体的蛋白均进行了反复提纯, 并在重组后对 SNARE 核心复合体进行再次分离提纯, 保证了样品的单一性和纯度。同时, 又对 SNARE 核心复合体单独存在于水溶液中的稳定性进行了分析, 其目的是要知道在分离和浓缩的两个多小时里面, 单独存在的 SNARE 核心复合体是否会发生解离, 以免造成复杂的蛋白背景。另外, 对所有用到的缓冲液、蛋白溶液和空碳膜均严格保持纯净, 这两点保证了碳膜背景的干

净。实验证明, SNARE 核心复合体的稳定性是相当好的。这两点保证了在电镜下面看到的蛋白就是 SNARE 核心复合体。另外, 由于 synaptotagmin、Munc18、complexin 等介导融合过程的关键蛋白都会同 SNARE 核心复合体结合^[14-17], SNARE 核心复合体的电镜观察结果, 对后面这些复合物结构的研究会有很大帮助。

参考文献:

- [1] Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 1994,372:55~63
- [2] Chen YA, Scheller RH. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001,2:98~106
- [3] Jahn R, Sudhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem*, 1999,68:863~911
- [4] Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1998,395:347~353
- [5] Poirier MA, Xiao W, Macosko JC, Chan C, Shin YK, Bennett MK. The synaptic SNARE complex is a parallel four-standed helical bundle. *Nat Struct Biol*, 1998,5:765~769
- [6] Lin RC, Scheller RH. Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron*, 1997,19:1087~1094
- [7] Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*, 1997,90:523~535
- [8] Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 1998,92:759~772
- [9] McNew JA, Weber T, Engelman DM, Sollner TH, Rothman JE. The length of the flexible SNAREpin juxtamembrane region is a critical determinant of SNARE-dependent fusion. *Mol Cell*, 1999,4:415~421
- [10] Hohl TM, Parlati F, Wimmer C, Rothman JE, Sollner TH, Engelhardt H. Arrangement of subunits in 20S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes. *Mol Cell*, 1998,2:539~548
- [11] Rickman C, Hu K, Carroll J, Davletov B. Self-assembly of SNARE fusion proteins into star-shaped oligomers. *Biochem J*, 2005,388:75~79
- [12] Dirk F, William KE, Axel TB, Reinhard J. Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry*, 1998, 37:10354~10362
- [13] Margittai M, Fasshauer D, Jahn R, Langen R. The Habc domain and the SNARE core complex are connected by a highly flexible linker. *Biochemistry*, 2003,42:4009~4014
- [14] Bhalla A, Chicka MC, Tucker WC, Chapman ER. Ca²⁺-synaptotagmin directly regulates t-SNARE function during reconstituted membrane fusion. *Nat Struct Biol*, 2006, 4:323~330
- [15] Giraudo CG, Eng WS, Melia TJ, Rothman JE. A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. *Science*, 2006,313(5787):676~680
- [16] Shen J, Tareste DC, Paumet F, Rothman JE, Melia TJ. Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell*, 2007,128(1):183~195
- [17] Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, Sudhof TC, Rizo J. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006,104(8):2697~2702

ROD-LIKE STRUCTURE OF SNARE CORE COMPLEX REVEALED BY ELECTRON MICROSCOPY

XIE Xin, SUI Sen-fang

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: As the key player which mediated the vesicle fusion in neuronal synapsome, SNARE (soluble NSF attachment protein receptors) complex consists of syntaxin, SNAP25, and VAMP. The SNARE core complex, which forms by the soluble part of SNARE proteins, plays the key part in fusion process. Using many purification methods, including ion exchange column, size exclusion column, SNARE core complex of high purity was got and its stability was analyzed in water solution. At last, the structure of SNARE core complex was determined using two-dimensional average method by electronic microscopy. SNARE core complex is a rod-like structure, about 2.5 nm in width and 12 nm in length.

Key Words: SNARE core complex; Electronic microscopy; EM

This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30330160)

Received: Apr 16, 2007

Corresponding author: SUI Sen-fang, Tel: +86(10)62784768, Fax: +86(10)62793367,

E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn