

• 研究论文 •

高效弱阳离子交换色谱法对脲还原变性溶菌酶的折叠研究

刘红妮 王彦 龚波林 耿信笃*

(西北大学现代分离科学研究所 分离科学陕西省重点实验室 西安 710069)

摘要 用高效弱阳离子交换色谱(HPWCX)对脲还原变性溶菌酶(Lys)进行了复性研究. 在流动相中脲浓度固定为 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和选用对天然态蛋白有稳定作用的硫酸铵为盐或置换剂时, 在蛋白浓度为 $15.0\sim 50.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, HPWCX 法比稀释法活性回收率高. 为了提高 Lys 的质量及活性回收率对所用色谱条件进行了优化研究, 当蛋白起始浓度为 $20.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, Lys 的质量回收率和活性收率分别为 97.8% 和 95.4%. 表明此种方法简便且有可能对其他还原变性蛋白的复性具有通用性.

关键词 液相色谱; 弱阳离子交换色谱; 蛋白复性; 溶菌酶; 二硫键

Study on Refolding of Urea-Reduced/Denatured Lysozyme by High-Performance Weak-cation Exchange Chromatography

LIU, Hong-Ni WANG, Yan GONG, Bo-Lin GENG, Xin-Du*

(Institute of Modern Separation Science, Key Laboratory of Modern Separation Science of Shaanxi Province, Xi'an 710069)

Abstract The refolding of the urea-reduced/denatured lysozyme (Lys) by high-performance weak cation exchange chromatography was reported in this paper. With the presence of a fixed concentration of urea of $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and ammonium sulphate as salt or displacer having the stabilizing role to the structure of native protein molecules in the mobile phase employed, and when the Lys concentration was $15.0\sim 50.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the bioactivity recovery by the presented method was higher than that by usual dilution method. The optimization of chromatographic conditions for obtaining the high recoveries of both mass and bioactivity of Lys was investigated in detail. The recoveries of both mass and bioactivity could be raised up to 97.8% and 95.4% respectively, as the Lys concentration in sample solution was $20.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The advantages of the presented method are simple operation, and high recoveries of both mass and bioactivity of Lys refolding, and thus it may possibly become a common method for many kinds of proteins.

Keywords liquid chromatography; weak-cation exchange chromatography; protein refolding; lysozyme; disulfide bond

蛋白质折叠是生物化学中的前沿研究课题. 它不仅涉及到生命起源的重大理论问题, 而且对于基因重组蛋白的复性等应用也有十分重要的指导作用. 传统的蛋白质复性方法有稀释法和透析法. 近年来陆续报道了一些新的复性方法, 包括稀释添加剂法^[1], 固定化分子伴侣^[2], 超滤法^[3]和液相色谱法(LC)^[4,5]. 自 1991 年耿信笃等首

次将高效疏水相互作用色谱(HIC)和尺寸排阻色谱(SEC)用于重组人干扰素- γ (rhIFN- γ)的复性及同时纯化^[6,7]并获发明专利^[8]以来, 在 1994 年里就有捷克、美国和日本的科学家分别用离子交换法(IEC)^[9], SEC 法^[10]和亲和色谱法(AFC)^[11,12]成功地对变性蛋白进行了复性, 说明 LC 用于蛋白质的复性与纯化已引起科学家的广泛注意. 虽然

* E-mail: xdgen@nwu.edu.cn

Received March 12, 2004; revised October 25, 2004; accepted December 8, 2004.

国家自然科学基金(No. 20175016)资助项目.

LC 对蛋白质进行复性有许多诸如利用蛋白质在色谱柱中与介质的相互作用达到抑制聚集,从而达到了提高蛋白活性回收率的目的,并且同时还能将复性产物提纯等优点,但因 LC 法尚不能完全抑制这种因变性蛋白分子间的相互作用而产生的聚集,在一定程度上还是影响了该法的广泛应用.

折叠液相色谱法中重要的一点是控制缓冲液交换过程中的变性剂浓度.当变性剂浓度合适时,例如脲,蛋白折叠中的聚集作用可以被很好地抑制^[13,14],蛋白质即可在一定程度上自发复性,从而增加蛋白正确折叠的产率.运用稀释法进行溶菌酶(Lys)的再折叠时,复性缓冲液中最佳脲浓度是 $2.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[15].在 IEC 中除了存在静电相互作用外,还存在着非特异性相互作用,因此脲常被用来消除非特异性相互作用以及增强洗脱能力.对于 IEC,高浓度脲还可以使蛋白质尽可能多地从柱中洗脱下来.然而脲又是一个强的变性剂,因此蛋白质的折叠产率又随着脲浓度的增高而降低.所以 IEC 中同样要选择合适浓度的脲,保证变性蛋白同时有高的质量回收率及活性回收率.

文献中有一些有关还原变性 Lys 的复性研究报告,其中以稀释添加剂法最多,在色谱法中, Batas^[16-18]等及谷振宇和苏志国^[15,19]采用了 SEC 法; Yoshimoto^[20,21]等用固定化脂质色谱法进行了还原变性 Lys 的折叠研究;李明和苏志国等利用非刚性基质的强阳离子交换色谱(SCX)在脲和 pH 的双梯度下提高了 Lys 折叠产率^[22].但因其所选条件复杂,加之因为 Lys 的等电点为 11,能用这种双梯度进行复性的蛋白质却不多.应研究出一种能用于诸多的还原变性蛋白的同时复性与纯化的通用性 IEC 折叠法.本文采用硅胶基质的高效弱阳离子交换色谱(HPWCX),在固定脲浓度不变的条件下,仅用盐梯度及在氧化型/还原型谷胱甘肽的存在下对于还原变性 Lys 的复性,发现可以同时增加 Lys 的质量及活性回收率.与稀释法进行了比较.结果表明本文的方法比较简便,且是具有一定通用性的 IEC 复性蛋白的方法.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 仪器

高效液相色谱仪(LC-10A,日本岛津公司),包括两台 LC-10ATVP 泵、一台 SPD-10AVP 紫外可见检测器、一台 SCL-10AVP 主机控制仪、一台 CTO-10ASVP 柱温箱、Rheodyne 7725 手动进样阀和 Class-VP 色谱工作站;KQ-250 型超声仪(上海昆山检测仪器厂);CYG-100 高压气动泵(北京西助技术服务中心);紫外-可见分光光度

计(UV-1601PC,日本岛津公司); $100 \text{ mm}\times 4.0 \text{ mm I.D.}$ 不锈钢色谱柱内装填弱阳离子交换填料.

1.1.2 试剂

溶菌酶(chicken egg white),氧化型谷胱甘肽(GSSG),还原型谷胱甘肽(GSH)(美国 Sigma 公司),DTT(华美生物工程公司,美国 Amresco 公司进口分装),Tris(分析纯,北京益利精细化学品有限公司),EDTA(分析纯,天津市功特吉尔环保技术研究所),脲(urea,分析纯,中国成都金山化工试剂厂),硫酸铵(分析纯,天津石英钟厂霸州市化工分厂),氯化钠(分析纯,沈阳化学试剂厂),考马氏亮蓝 G-250(Fluka 进口分装).

1.2 实验方法

1.2.1 HPWCX 填料的装填

按文献[23]的方法,由本实验室合成硅胶基质的弱阳离子交换填料,在 40 MPa 高压下,用匀浆法将填料装填在 $100 \text{ mm}\times 4.0 \text{ mm I.D.}$ 不锈钢柱内备用.

1.2.2 还原变性 Lys 的制备

脲还原变性 Lys 的制备方法见文献[24].

1.2.3 用 HPWCX 复性还原变性的 Lys

(a) 流动相 A: $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl + $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA + $(0\sim 5.0) \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ urea + $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH/ $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG; pH 8.0.

流动相 B: $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl + $(0\sim 5.0) \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ urea + $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA + $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH/ $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG; pH 8.0.

(b) 流动相 A: $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl + $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA + $(0\sim 5.0) \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ urea + $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH/ $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG; pH 8.0.

流动相 B: $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl + $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl + $(0\sim 5.0) \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ urea + $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA + $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH/ $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG; pH 8.0.

(c) 流动相 A: $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl + $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA + $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ urea + $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH/ $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG; pH 8.0.

流动相 B: $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl + $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ urea + $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA + $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH/ $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG; pH 8.0.

在实验中具体使用何种流动相见文中的说明.还原变性的 Lys 直接进样至已平衡好的弱阳离子交换色谱柱中,洗脱后收集含有 Lys 的洗脱液,在室温下放置 4 h,测量收集液的酶活性.所有色谱过程均在室温下进行.没有特别说明外梯度为 20 min 线性梯度(0~100B%),流速为 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长均为: 280 nm.

1.2.4 稀释法

将变性蛋白直接加入到复性缓冲液中进行稀释复性. 为了便于比较, 收集与用 HPWCX 复性时 Lys 出峰收集液条件一致的流动相溶液为复性缓冲液. 所有的复性实验均在室温进行.

1.2.5 蛋白含量的测定

用 Bradford 法测定蛋白含量^[25].

1.2.6 活性的测定

Lys 活性测定法参见文献^[26].

2 结果与讨论

2.1 流动相组成对 Lys 质量回收率的影响

无论用哪一种 LC 法对蛋白复性, 必须具备的三个先决条件: 一是变性蛋白必须能在所设定的色谱条件下保留; 二是要使复性后的蛋白完全能从色谱柱上洗脱下来; 三是创造能使变性蛋白复性的最佳色谱条件. 这样才能保证欲复性蛋白有高的质量回收率. 当固定相选定后, 流动相组成就是首先要解决的问题. 氯化钠是 IEC 中最常用的洗脱剂, 而在阳离子交换中硫酸铵是一个比氯化钠更强的洗脱剂. 图 1 比较了当流动相中含有不同浓度的脲时使用氯化钠与硫酸铵作为洗脱剂对还原变性 Lys 色谱行为的影响, 由图 1 看出, 当流动相中脲浓度相同时, 尤其是在低浓度脲时, 硫酸铵作为洗脱剂时

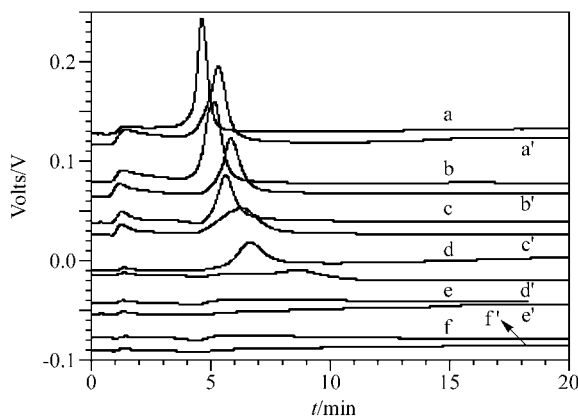


图 1 氯化钠和硫酸铵作为洗脱剂时对还原变性 Lys 在 HPWCX 柱上洗脱行为的影响

a~f 代表洗脱剂为硫酸铵, a'~f' 代表洗脱剂为氯化钠; a, 5.0 mol·L⁻¹ 脲; b, 4.0 mol·L⁻¹ 脲; c, 3.0 mol·L⁻¹ 脲; d, 2.0 mol·L⁻¹ 脲; e, 1.0 mol·L⁻¹ 脲; f, 0.0 mol·L⁻¹ 脲. 色谱条件: 见 1.2.3 (a), (b)

Figure 1 Comparison of elution profiles in HPWCX of reduced Lys using sodium chloride and ammonium sulfate as eluting agent a~f and a'~f' represent the chromatogram obtained when ammonium sulfate and sodium chloride were in mobile phase, respectively. a, 5.0 mol·L⁻¹ urea; b, 4.0 mol·L⁻¹ urea; c, 3.0 mol·L⁻¹ urea; d, 2.0 mol·L⁻¹ urea; e, 1.0 mol·L⁻¹ urea; f, 0 mol·L⁻¹ urea. Chromatographic conditions: See 1.2.3 (a), (b)

还原变性溶菌酶在 WCX 柱上的保留要小于氯化钠, 同时经定量分析, 用硫酸铵作为洗脱剂时的质量回收率要高于氯化钠作为洗脱剂的质量回收率(详见表 1).

表 1 流动相中含有不同浓度脲时氯化钠和硫酸铵作为洗脱剂对还原变性 Lys 的质量回收率的影响

Table 1 Effects of sodium chloride and ammonium sulfate used on the mass recovery of Lys in the presence of different urea concentration

脲浓度/(mol·L ⁻¹)	氯化钠/%	硫酸铵/%
0	0±0	0±0
1.0	0±0	11.4±1.4
2.0	26.0±2.8	64.5±1.2
3.0	44.4±1.0	83.1±2.7
4.0	84.3±3.5	86.8±1.8
5.0	89.0±1.3	91.5±2.0

Chromatographic conditions are indicated in 1.2.3 (a), (b).

由图 1 看出, 无论洗脱剂采用氯化钠还是硫酸铵, 随着脲浓度的增加, 还原变性 Lys 的保留减小, 并且 Lys 的峰面积随着脲浓度的减小而减小. 当脲浓度低于 2.0 mol·L⁻¹ 时, 甚至看不到明显的 Lys 峰. 一般来说, 脲的存在会减小 Lys 的保留, 在 IEC 中脲还能增强流动相的洗脱能力. 这可能是由于当流动相中存在脲时, 溶液的介电常数增大, 或者是脲的存在引起流动相发生了其他一些变化, 如粘度、离子溶剂化等性质的改变^[27]. 另一方面, 脲还可以作为一种有效的蛋白溶解剂^[28], 当还原变性 Lys 进入到色谱柱时, 在折叠过程中当脲与固定相起到抑制聚集的作用的同时, 脲与盐一起又起到了洗脱剂的作用.

由表 1 看出, Lys 的质量回收率随着流动相中脲浓度的增加而增加, 这个趋势对于无论氯化钠还是硫酸铵作为洗脱剂结果都是一致的. 但由于硫酸铵是一种比氯化钠更强的洗脱剂, 所以当流动相中脲浓度相同时, 特别是当脲浓度比较低的时候, 用硫酸铵作为洗脱剂时的质量回收率要高于氯化钠, 这个结果与图 1 色谱图的结果是一致的.

2.2 洗脱剂种类及变性剂浓度对还原变性 Lys 活性回收率的影响

虽然在 LC 复性时目标蛋白高的质量回收率是获得高的生物活性回收率的先决条件, 然而高的质量回收率并不意味着一定有高的生物活性回收率, 而后者要取决于蛋白复性的条件, 所以流动相组成还必须满足这一条件.

由表 2 和表 3 看出, 用 HPWCX 对 Lys 进行折叠时, 当脲浓度低于 4.0 mol·L⁻¹ 时, 蛋白活性回收率的变化随

脲浓度的增加而增加, 这个趋势与表 1 中质量回收率随脲浓度的变化是相似的. 所以当脲浓度低于 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 无论洗脱剂为氯化钠还是硫酸铵, 其活性回收率的损失主要来源于质量回收率. 而当脲浓度高于 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 还原变性的 Lys 用 WCX 复性时的活性回收率随脲浓度增加而降低, 这个趋势与稀释法相似. 这是因为当脲浓度高于 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 脲的双重作用中的变性作用起到了主导作用, 并且在高的脲浓度条件下, 也不适合于 Lys 中的双硫键的对接.

然而比较表 2 和表 3, 可看出当用 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲时, 用 WCX 复性还原变性的 Lys 时的活性回收率均达到最高值, 但在 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲和硫酸铵的存在下, 还原变性的 Lys 的最终折叠产率比用氯化钠作为洗脱剂时的活性回收率要高出很多, 这是因为作为在热力学上起着稳定天然 Lys 作用的硫酸铵^[29]在 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲存在下对于增加还原变性 Lys 的折叠产率是有利的.

表 2 当含有不同浓度脲时氯化钠作为洗脱剂对还原变性溶菌酶活性回收率的影响

Table 2 Effects of sodium chloride as eluting agent on the re-
naturation of Lys in the presence of different urea concentrations

脲浓度/($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	WCX 法/%	稀释法/%
0	0 ± 0	73.7 ± 1.6
1.0	0 ± 0	79.9 ± 2.2
2.0	0 ± 0	81.5 ± 3.8
3.0	13.7 ± 4.2	80.2 ± 2.7
4.0	53.2 ± 1.4	52.4 ± 1.4
5.0	28.9 ± 4.4	29.2 ± 5.0

Chromatographic conditions: See 1.2.3 (a), (b).

表 3 当含有不同浓度脲时硫酸铵作为洗脱剂对还原变性溶菌酶活性回收率的影响

Table 3 Effects of ammonium sulfate as eluting agent on the
renaturation of Lys in the presence of different urea concentra-
tions

脲浓度/($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	WCX 法/%	稀释法/%
0	0 ± 0	80.9 ± 1.0
1.0	0 ± 0	81.6 ± 2.8
2.0	41.8 ± 3.6	87.0 ± 3.6
3.0	71.5 ± 1.0	76.0 ± 2.4
4.0	83.61 ± 2.4	78.1 ± 2.6
5.0	35.3 ± 0.9	30.0 ± 1.1

Chromatographic conditions: See 1.2.3 (a), (b).

众所周知, 盐对于蛋白的溶解度及稳定性的影响一般遵循 Hofmeister 序列^[30]: $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{Ac}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{SCN}^-$, 特别是阳离子为单价离子时情况更是如

此. 阳离子的 Hofmeister 效应没有阴离子明显. Hofmeister 序列反映了小分子溶质通过溶质-水的相互作用对生物大分子的影响. 从 Hofmeister 序列得知, SO_4^{2-} 对蛋白的稳定能力强于 Cl^- , 从表 1 看出, 在本研究中, 用氯化钠作为洗脱剂时还原变性 Lys 的折叠效果并不佳, 说明对于天然蛋白的稳定性起不到积极的作用, 然而硫酸铵则可以. 同样的结果, 硫酸脲能够稳定蛋白, 而盐酸脲却是一个通用的蛋白失活剂也能很好地说明这一点^[31]. 因此在 IEC 中, 与氯化钠相比, 硫酸铵不仅在低浓度脲存在下可以提高蛋白的质量回收率, 而且在高浓度脲存在的条件下可以提高蛋白质的活性回收率. 因此可得出结论, 实验中应当选择硫酸铵作为洗脱剂进行 Lys 的 IEC 复性.

2.3 流动相流速对复性的影响

虽然在用色谱法复性时, 固定相可以抑制聚集体的产生, 但它也可以诱导天然蛋白的构象变化甚至变性, 因此蛋白质与固定相的作用时间不同, 其复性效率也会不同. 在其它条件固定时, 流动相流速不同, 蛋白分子与固定相接触时间就不同. 流速大, 目标蛋白完全折叠时间短; 流速小, 可使蛋白完全与固定相接触, 但增加了聚集的可能性, 而且流速小, 花费时间较长. 因此有必要研究流动相流速对 Lys 复性的影响.

图 2 为流速与活性回收率关系图. 为了保证在不同流速时洗脱液中硫酸铵的浓度一致, 以流速为 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时梯度时间为 20 min 为参考, 当流速减小或增大时, 相应延长或缩短梯度时间, 从而保证洗脱体积相同. 考虑到色谱体系的耐压能力, 在本实验中所用色谱柱的流速最高达到 $3.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. 由图 2 看出, 活性回收率随着流速的增加略有升高, 大约在流速为 $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时 Lys 复性效率最高, 之后基本保持不变. 这个结果与 Fahey 和 Chaudhuri 用凝胶色谱对尿激酶血纤维蛋白溶酶原活化剂的复性时, 折叠产率随流速的增加而增加的结果是一致的^[32], 并且这个结果与人工分子伴侣用于复性有某些相似之处^[33]. 人工分子伴侣复性分为两步, 第一步是去污剂与变性蛋白结合的捕获阶段, 第二步是环糊精的剥离阶段. 用色谱法复性也可以理解为分两步进行, 首先是固定相与变性蛋白分子作用并形成蛋白质-配基络合物, 从而防止了变性蛋白分子形成聚集或沉淀. 其次, 通过加入其它化学试剂或改变环境以使变性蛋白分子从该络合物中释放出来而折叠. Gellman 发现用人工分子伴侣的方法复性碳酸酐酶^[34]和 Lys^[35], 环糊精要尽可能快地加入到蛋白-去污剂的复合物中, 较慢地从蛋白-去污剂中去除去污剂对于正确的折叠是不利的.

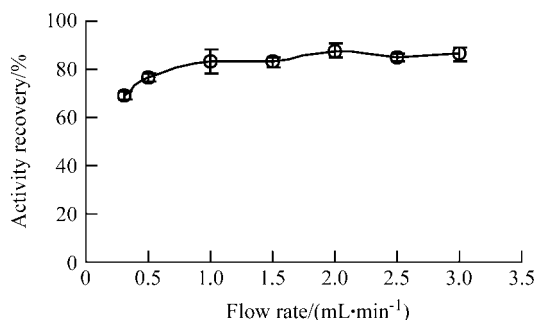


图2 流速对还原变性 Lys 复性的影响
色谱条件: 见 1.2.3 (c)

Figure 2 Effects of elution flow-rate on the activity recovery of Lys

Chromatographic conditions: see 1.2.3 (c)

2.4 蛋白浓度对还原变性 Lys 复性的影响

一般来讲,随着蛋白浓度的增加,活性回收率逐渐增加.图3所示情况也是如此,在蛋白浓度为 $20.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时达到最高 95.4%,此时它的质量回收率为 97.8%.之后活性回收率随着蛋白浓度的增加而下降.从图中还可看出一个明显的趋势,当蛋白浓度大于 $15.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,用 IEC 法进行折叠复性时,活性回收率比稀释法高.

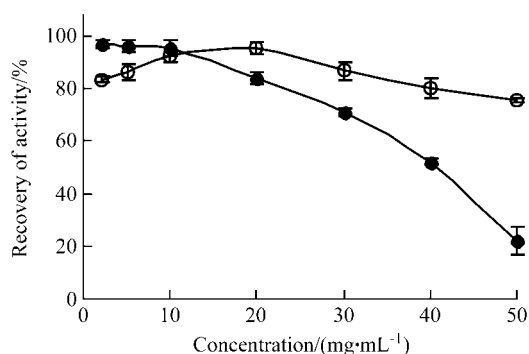


图3 蛋白浓度对还原变性溶菌酶复性效率的影响

○, WCX 法; ●, 稀释法, 色谱条件: 见 1.2.3 (c), 流速: $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量: $30 \mu\text{L}$

Figure 3 Effects of concentration of loaded Lys on its refolding

○, WCX method; ●, dilution method; chromatographic conditions: see 1.2.3 (c); flow-rate: $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; the loading volume was $30 \mu\text{L}$

由于折叠与聚集之间的竞争反应,当蛋白质浓度很高时,聚集反应是主导性的反应,因此在体外的折叠通常都是在一个很低的蛋白浓度下进行,一般为 $10\sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.当用 IEC 进行折叠时,带有负电荷的还原变性 Lys 分子通过静电相互作用键合于阳离子交换基团上,由于它们固定于不同的位点上,展开的多肽链没有多少机会相互作用,所以聚集被消除.

当 Lys 被还原变性后,疏水氨基酸完全暴露,其与

WCX 固定相接触几率增大,当还原变性 Lys 进样量较少时,对于变性蛋白来说它有足够的吸附位点来键合并再折叠;展开的肽链也没有多少机会相互作用,因为它们固定于不同的位点,没有分子间相互作用,再折叠过程将完成,此时活性损失仅来自于不可逆吸附所造成的质量损失,可获得较高的活性回收率.当进样量逐减增加时,在这种情况下不可逆吸附所造成的绝对质量损失与前者是一样的,但是相对质量损失却低,所以活性回收率达到最高.然而,当进样量进一步增加时,蛋白质的分子数目将会远远超出固定相上键合位点的数目,分子间相互作用是不可避免的,这将影响正确折叠,导致聚集,折叠产率减小.而稀释法在蛋白质浓度较高时,易形成聚集体,因而活性相对较低.所以用 IEC 法相比较稀释法来说,更适宜于高浓度蛋白的复性.

另外,本文的结果与采用其它色谱法进行还原变性 Lys 的复性研究相比较,也有很大优势, Batas 等采用 SEC 对于蛋白浓度虽然可做到 $41.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,但其花费时间长,且活性回收率只达 58%;谷振宇等的脲梯度 SEC 法蛋白浓度也仅做到 $16.9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Yoshimoto 等的固定化脂质色谱对还原变性 Lys 复性,虽然复性收率可达 100%,但 Lys 浓度则很低,这对于我们的实验条件来说也是很容易实现的.所以本文的结果有一定的独到之处.

文献报告的双梯度法对脲变的 Lys 获得高的质量及活性回收率,对 Lys 而言,的确是一种好的复性方法.与我们的结果相比较,因两种方法所用固定相种类不同^[22],对复性效果会产生不同的影响是可以理解的.然而该 SCX 所采用的双梯度实际上是一种包括脲梯度、pH 梯度、盐梯度的三种梯度法,且所用梯度洗脱的流动相体积都必须与柱床体积相等,只有同时满足这些严格控制的实验条件才能获得好的结果.而本文提出的方法是在脲浓度固定的条件下,只选择单一的盐梯度,也获得了高的活性回收率,但本研究的实验条件要简单的多.此外,用与本文类似的,在流动相中有一定脲浓度存在的条件下,对核糖核酸酶^[36]和重组人治疗蛋白药物,重组人粒细胞刺激因子(rhG-GSF)^[37]进行复性均取得了好的结果.因用 WCX 对选择性的分离蛋白较 SCX 强的这一优势,使得本方法有着很大的潜力,可能应用于更多的实际样品和可推广至基因工程中重组蛋白的复性及同时纯化.

3 结论

通过 IEC 色谱法,考虑到固定相与蛋白的相互作用以及 IEC 辅助还原变性 Lys 氧化折叠,可得出下面结论:

1. 用 HPWCX 对还原变性 Lys 复性时, 适合浓度的脲可提高质量及生物活性回收率.

2. 由于硫酸铵对于天然蛋白有稳定作用, 所以用硫酸铵作洗脱剂时, Lys 的活性回收率要高于用氯化钠时的活性回收率.

3. 固定相通过静电相互作用辅助还原变性 Lys 的氧化折叠, 同时有效地消除了聚集体的形成, 特别是在蛋白浓度比较高时, 复性效率比稀释法高.

4. 用 HPWCX 对 Lys 复性, 方法简单, 预计会适用于其它蛋白复性, 使其更具有通用性.

5. 运用 IEC 折叠是一个很有吸引力的方法, 因为失活的蛋白仅仅只经过一步色谱就可以得到活性蛋白. 目标蛋白不仅可以得到折叠, 而且可以实现分离纯化. 因此, 这是一种很有发展潜力的方法, 有可能用于基因工程中重组蛋白的复性研究, 并能成为一种通用型的变性蛋白折叠的新方法.

References

- Cleland, J. L.; Builder, S. E.; Swartz, J. R.; Winker, M.; Chang, J. Y.; Wang, D. I. C. *Biotechnol. Adv.* **1992**, *10*, 1013.
- Altamirano, M. M.; Golbik, R.; Zahn, R.; Buckle, A. M.; Fersht, A. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 3576.
- West, S. M.; Chaudhuri, J. B.; Howell, J. A. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 590.
- Guo, L.-A. *Theory and Technology of Protein Purifying by HPLC*, Shaanxi Publication of Science & Technology, Xi'an, **1993**, pp. 131~325 (in Chinese).
(郭立安, 高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术, 陕西科学技术出版社, 西安, **1993**, pp. 131~325.)
- Liu, T.; Geng, X.-D. *J. Chromatogr.* **2000**, *18*(1), 30 (in Chinese).
(刘彤, 耿信笃, 色谱, **2000**, *18*(1), 30.)
- Geng, X.-D.; Feng, W.-K.; Chang, J.-H. *High Technol. Lett.* **1991**, *1*(7), 1.
- Geng, X.-D.; Chang, X.-Q. *J. Chromatogr.* **1992**, *599*, 185.
- Geng, X.-D.; Feng, W.-K.; Bian, L.-J.; Ma, F.; Chang, J.-H. *CN 92102727.3* (in Chinese).
(耿信笃, 冯文科, 边六交, 马凤, 常建华, 中国专利, 92102727.3.)
- Suttner, J.; Dyr, J. E.; Hamsikova, E.; Novak, J.; Vonka, V. *J. Chromatogr. B* **1994**, *656*(1), 123.
- Werner, M. H.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Kondoh, A.; Fisher, R. J. *FEBS Lett.* **1994**, *345*(2~3), 123.
- Taguchi, H.; Nakino, Y.; Yoshida, M. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8529.
- Phadtare, S.; Fisher, M. T.; Yarnrough, L. R. *Biochem. Biophys. Acta* **1994**, *1208*(1), 189.
- Hagen, A. J.; Hatton, T. A.; Wang, D. I. C. *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *35*, 955.
- De Bernardes Clark, E.; Hevehan, D.; Szela, S.; Maachupalli-Reddy, J. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 47.
- Gu, Z.-Y.; Su, Z.-G.; Janson, J. C. *J. Chromatogr. A* **2001**, *918*, 311.
- Batas, B.; Chaudhuri, J. B. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *50*(1), 16.
- Batas, B.; Jones, H. P.; Chaudhuri, J. R. *J. Chromatogr. A* **1997**, *766*, 109.
- Batas, B.; Chaudhuri, J. B. *J. Chromatogr. A* **1999**, *864*, 229.
- Gu, Z.-Y.; Su, Z.-G. *J. Chem. Ind. Eng.* **2000**, *51*(Suppl.), 325 (in Chinese).
(谷振宇, 苏志国, 化工学报, **2000**, *51*(增刊), 325.)
- Yoshimoto, M.; Shimanouchi, T.; Umakoshi, H.; Kubio, R. *J. Chromatogr. B* **2000**, *734*, 93.
- Yoshimoto, M.; Kuboi, R. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 480.
- Li, M.; Zhang, G.-F.; Su, Z.-G. *J. Chromatogr. A* **2002**, *959*, 113.
- Alpert, A. J. *J. Chromatogr.* **1983**, *266*, 23.
- Berg, B. V. D.; Chung, E. W.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M. *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*(3), 781.
- Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- Goldberg, M. E.; Rudolph, R.; Jaenicke, R. *Biochemistry* **1991**, *30*(11), 2790.
- Parente, E. S.; Wetlaufer, D. B. *J. Chromatogr.* **1984**, *314*, 337.
- Parente, E. S.; Wetlaufer, D. B. *J. Chromatogr.* **1984**, *288*, 389.
- Maeda, Y.; Yamada, H.; Ueda, T.; Imoto, T. *Protein Eng.* **1996**, *9*(5), 461.
- Li, W.; Ouyang, F. *Biotechnol. Bull.* **2004**, (4), 37 (in Chinese).
(李伟, 欧阳藩, 生物技术通报, **2004**, (4), 37.)
- Arakawa, T.; Timasheff, S. N. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5924.
- Fahey, E. M.; Chaudhuri, J. B.; Binding, P. *Sep. Sci. Technol.* **2001**, in press.
- Geng, X.-D.; Bai, Q. *Sci. China, Ser. B* **2002**, *32*(5), 460 (in Chinese).
(耿信笃, 白泉, 中国科学 B 辑, **2002**, *32*(5), 460.)
- Rozema, D.; Gellman, S. H. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3478.
- Rozema, D.; Gellman, S. H. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15760.
- Li, M. *M.S. Thesis*, Northwest University, Xi'an, **2003** (in Chinese).
(李敏, 硕士论文, 西北大学, 西安, **2003**.)
- Wang, C.-Z. *Ph.D. Dissertation*, Northwest University, Xi'an, **2004** (in Chinese).
(王超展, 博士论文, 西北大学, 西安, **2004**.)