

# 重组包涵体蛋白质的折叠复性

冯小黎\*

(中国科学院遗传学研究所人类基因组中心, 北京 100101)

**摘要** 综述了减少包涵体形成、包涵体分离和溶解以及包涵体折叠复性的策略及其最新进展, 详细讨论了包涵体蛋白质折叠复性的基本原则、包涵体折叠复性促进剂和包涵体折叠复性方法。

**关键词** 包涵体, 重组蛋白质, 折叠复性

**学科分类号** Q51

外源基因在大肠杆菌中的高表达常常导致包涵体的形成。虽然包涵体具有富集目标蛋白质、抗蛋白酶、对宿主毒性小等优点, 但包涵体蛋白质的复性率一般都很低, 这大大增加了基因工程蛋白质产品的成本。解决包涵体蛋白质复性率低的问题一方面可以从上游水平进行解决, 另一方面则需要从生物工程下游技术角度去解决这一问题, 以获得具有潜在临床和工业应用价值的蛋白质。

## 1 减少包涵体形成的策略

### 1.1 降低重组菌的生长温度

降低培养温度是减少包涵体形成的最常用方法。较低的生长温度由于降低了蛋白质的合成速度、降低了无活性聚集体形成的速率和疏水相互作用, 因此可减少包涵体的形成<sup>[1]</sup>。

### 1.2 促进重组蛋白质可溶性表达的生长添加剂

培养 *E. coli* 时添加高浓度的多醇类、蔗糖或非代谢糖可以阻止分泌到周质的蛋白质聚集反应, 在最适浓度范围内这些添加剂不会影响细胞的生长、蛋白质的合成或运输<sup>[2]</sup>。多醇或蔗糖不会渗透进细胞, 它们对胞质蛋白质折叠的影响是由于它们所形成的渗透压会导致胞内抗渗物如甘氨酸甜菜碱的积累, 而这些抗渗物具有与蔗糖类似的蛋白质稳定作用。

其他促重组蛋白质可溶性表达的生长添加剂还有乙醇(诱导热休克蛋白的表达)、低分子质量的巯基或二硫化物(影响细胞周质的还原态, 从而影响二硫键的形成)和 NaCl。也有报道认为丰富的培养基有利于活性蛋白质的表达, 当培养条件不佳时如供氧不足或 pH 控制不佳时易形成包涵体<sup>[2]</sup>。

## 2 包涵体的分离及溶解

### 2.1 包涵体的分离

包涵体分离的第一步是对培养收集的重组菌细胞进行破碎, 所采用的破碎技术包括高压匀浆、超声波破碎等, 为了提高破碎率, 可以加入一定量的溶菌酶。包涵体高度抗剪切力, 用以上破碎法破碎后仍可保持完整的结构。离心除去破碎上清液后的沉淀部分用含有低浓度的变性剂如脲和盐酸胍、去垢剂如 Triton X-100、脱氧胆酸钠等化合物的缓冲液进行洗涤<sup>[3]</sup>。如果需要对包涵体进行纯化, 一般多采用蔗糖密度梯度离心法。

### 2.2 包涵体的溶解

包涵体的溶解一般都用强的变性剂如脲、盐酸胍或硫氰酸盐, 或去垢剂如 SDS、正十六烷基三甲基铵氯化物、Sarkosyl 等<sup>[4]</sup>。对于含有半胱氨酸的蛋白质, 还需加入还原剂如巯基乙醇、二巯基苏糖醇(DTT)、二巯赤藓糖醇、半胱氨酸<sup>[5]</sup>。温度一般选择在 30℃ 以促进溶解。此外, 由于金属离子具有氧化催化作用, 还常常需要加入金属螯合剂如 EDTA、EGTA 以除去金属离子。对于细胞周质内形成的包涵体, 则需采用原位溶解的方法<sup>[6]</sup>。

包涵体的溶解需要打断包涵体蛋白质分子内和分子间的各种化学键, 使多肽链伸展。各种溶解方法都各有利弊。一般来讲, 盐酸胍优于脲, 因为盐酸胍是较脲强的变性剂, 而且脲中常含有的异氰酸盐或酯会不可逆地修饰蛋白质的氨基或巯基<sup>[7]</sup>。

\* 通讯联系人。

Tel: 010-64871664, 010-80494199

E-mail: fengxiaoli@yahoo.com

收稿日期: 2000-09-25, 接受日期: 2000-11-03

### 3 重组蛋白质的折叠复性

#### 3.1 蛋白质折叠复性的基本原则

**3.1.1 一般原则:** 包涵体蛋白质折叠复性的效率实际上取决于正确折叠过程与聚集过程的竞争<sup>[8]</sup>. 由于蛋白质的折叠复性过程不会受到其他存在于同一复性环境中蛋白质的明显影响, 一般情况下并不需要对复性蛋白质进行纯化. 然而一些情况下, 由于非天然状态蛋白质的聚集常常会由于其中其他一些易于聚集蛋白质的存在而加强, 或一些杂蛋白在与重组蛋白质一起复性时易形成杂合分子而聚集. 因此, 复性时最好使蛋白质达到一定的纯度. 常用的纯化变性还原状态蛋白质的方法主要是还原剂和变性剂存在下的各种层析方法.

为减少聚集, 蛋白质的浓度应很低, 一般在 10~100 g/L 较好, 这是蛋白质在体外折叠复性过程中一个十分关键的因素. 变性剂去除速率在折叠中间物的积累和蛋白质聚集起着重要的作用. 复性应尽量不采用突然改变变性剂浓度的办法, 因为这样会导致折叠中间体的聚集<sup>[7]</sup>. 不同的蛋白质应采用不同的变性剂去除速率<sup>[9]</sup>.

**3.1.2 环境条件:** 应注意折叠复性的环境条件, 如温度、pH 值、离子强度、复性时间. 折叠复性的温度范围为 0~40 °C, 20~25 °C 比较常用<sup>[7]</sup>. 在这个温度范围内, 随着温度的升高, 蛋白质的复性率和复性速度也提高; 如果温度超出了这个范围, 蛋白质折叠复性的效率则降低. 同时也要考虑到较低的温度可以减少蛋白质的聚集反应. 一般来说, 碱性 pH 环境有利于蛋白质的折叠和二硫键的交换. 盐类对蛋白质的稳定作用与它对蛋白质溶解性的影响有关, 各种正负离子对蛋白质的稳定性和折叠复性的影响符合 Hofmeister 顺序.

#### 3.2 包涵体蛋白质折叠复性的促进剂

包涵体蛋白质折叠复性促进剂的促进作用可以分为<sup>[4]</sup>: 稳定正确折叠蛋白质的天然结构、改变错误折叠蛋白质的稳定性、增加折叠复性中间体的溶解性、增加非折叠蛋白质的溶解性. 但事实上很难估计在蛋白质折叠复性过程中所加入的添加剂促进折叠的准确机制<sup>[9]</sup>. 一般而言, 这些促进剂并未显示出对折叠复性过程的加速作用, 但它们确实抑制或减少了导致蛋白质无活性的聚集反应.

**3.2.1 氧化-还原转换系统:** 如蛋白质含有二硫键, 在复性缓冲液中需加入还原型及氧化型低分子量巯基试剂的混合物, 如谷胱甘肽、半胱氨酸、

半胱胺等. 其还原型 (1~3 mmol/L) 与氧化型的摩尔比为 1:1 到 10:1<sup>[8]</sup>. 这样的氧化还原系统实际上给蛋白质形成的一个还原环境. 正确形成的二硫键在这样的环境中还是有可能被还原的. 针对这种情况, 还需在后续步骤加入一步强的氧化步骤, 即加入过量的氧化型巯基试剂或采用 Cu<sup>2+</sup> 诱导的空气氧化, 以保证形成稳定的二硫键.

**3.2.2 小分子质量添加剂:** 如盐酸胍或脲, 以及其他一些化合物如烷基脲、碳酸酰胺类等, 在非变性浓度下是很有效的促进剂<sup>[10]</sup>. 蛋白质的辅因子、配基或底物亦可起到很好的促折叠作用, 如蛋白质的辅因子 Zn<sup>2+</sup> 或 Cu<sup>2+</sup> 可以稳定蛋白质的折叠中间体, 从而防止了蛋白质的聚集<sup>[9]</sup>. 加入浓度大于 0.4 mol/L Tris 缓冲液可提高包涵体蛋白质的折叠效率.

浓度为 0.5 mol/L 的 L-盐酸精氨酸可大幅度提高包涵体蛋白质的折叠效率<sup>[6, 11]</sup>. 精氨酸可使得不正确折叠的蛋白质结构以及不正确连接的二硫键变得不稳定, 而使折叠过程向正确方向进行. 但也有研究表明精氨酸略使蛋白质不稳定并可能干扰寡聚体蛋白质的缔合<sup>[4]</sup>.

**3.2.3 聚乙二醇 (PEG):** Cleland 等<sup>[12]</sup> 在研究 PEG 对包涵体蛋白质折叠复性的影响中发现, PEG 的存在能减少一些蛋白质的聚集. 蛋白质的折叠通过一疏水融球态中间体, 这种中间体的聚集将导致蛋白质回收率的降低. PEG 通过与中间体特异地形成非聚集的复合物而阻止了疏水中间体的聚集. 所有的折叠反应在 PEG 存在下具有相同的速率, 复性率与 PEG 的分子量及浓度相关. PEG 对蛋白质折叠复性的促进作用与分子伴侣的作用机理相似.

**3.2.4 非离子型去垢剂尤其是离子型或两性离子去垢剂或表面活性剂:** 如 CHAPs、Triton X-100、磷脂、laurylmaltosid、Sarkosyl、磺基甜菜碱 (NDSB) 等对蛋白质复性有促进作用<sup>[13]</sup>. 使用去垢剂和表面活性剂的一个不利之处是由于它们能与蛋白质结合或形成胶束, 故很难将它们完全除去.

**3.2.5 单克隆抗体:** 待折叠复性的蛋白质的抗体可有效协助其复性, 但仅该蛋白质特异的抗体具有明显的助折叠作用<sup>[14]</sup>. 研究发现, 特异性抗体可以与待折叠蛋白的远离蛋白质活性中心的疏水区结合, 从而有效地阻止了无活性聚集体形成.

**3.2.6 分子伴侣和折叠酶等:** 这类蛋白质主要包括硫氧还蛋白、二硫键异构酶 (PDI)、肽酰-脯氨

酰顺反异构酶 (PPI)、分子伴侣、FK506 结合蛋白、Cyclophilin 等。分子伴侣和折叠酶等不仅可在细胞内调节蛋白质的折叠和聚集过程的平衡,而且可在体外促进蛋白质的折叠复性<sup>[15]</sup>。由于分子伴侣和折叠酶在蛋白质折叠复性后要除去,而这类蛋白质又十分昂贵,因此采用可回收利用的方法如固定化方法为好。

**3.2.7 人工伴侣:**为了模仿分子伴侣 GroEL-GroES 的作用, Rozema 和 Gellman<sup>[16]</sup>将变性蛋白质首先加入到含去垢剂的溶液以防止聚集,然后用环糊精 cyclodextrin 除去去垢剂以促进折叠复性。这种方法被称作人工分子伴侣促折叠技术。

**3.2.8 其他:**多聚离子化合物如肝素不仅可以促进蛋白质的复性<sup>[11]</sup>,而且具有稳定天然蛋白质的作用。Builder 等<sup>[6]</sup>在折叠复性类胰岛素生长因子 I 方法中,除了加入金属铜离子和镁离子、2 mol/L 脲、盐类如 1 mol/L NaCl、DTT 外,还加入了乙醇、甘油等。短链醇类、高渗物等可以有效降低聚集体的形成,这可能归结为它们对蛋白质的稳定作用。

### 3.3 包涵体蛋白质折叠复性方法

一个有效的、理想的折叠复性方法应具备以下几个特点: a. 活性蛋白质的回收率高; b. 正确复性的产物易于与错误折叠蛋白质分离; c. 折叠复性后应得到浓度较高的蛋白质产品; d. 折叠复性方法易于放大; e. 复性过程耗时较少<sup>[17]</sup>。就商业应用而言,要求折叠复性过程必须快速、低成本、高效。虽然蛋白质的折叠复性已有很多方法,但针对每一种蛋白质仍需通过实验摸索出最佳的方法。

**3.3.1 透析、稀释和透滤复性法:**这三种方法是最传统的也是应用最普遍的蛋白质折叠复性方法,这三种方法各具特点<sup>[4]</sup>。透析法耗时长,易形成无活性蛋白质聚集体。透滤是借助超滤实现复性的方法。该法速度较快,但由于蛋白质在超滤过程中易在膜上聚集变性(膜污染),从而限制了这种方法的应用。稀释法简单,也较透析、透滤法有效,但处理的料液量大,不利于复性方法的工业放大。目前稀释法主要有一次性稀释、分段稀释和连续稀释三种方式。分段稀释法和连续稀释法的复性回收率要高于一次性稀释法。分段稀释法一般采用两步稀释法,即先将变性剂的浓度降至一个中间浓度,最后再完全除去;或者是将强变性剂改为弱变性剂,最后再完全除去变性剂。

**3.3.2 已变性多肽的二硫键形成方法:**对于具有

二硫键的蛋白质,由于在包涵体中其二硫键(分子内或分子间)多有错配,复性时还涉及正确二硫键的重建。目前,正确二硫键的形成方法主要有以下几种<sup>[5]</sup>: a. 空气氧化法,一般是利用空气中的氧气在折叠期间氧化巯基,痕量金属离子如  $\text{Cu}^{2+}$  的存在可具有催化作用<sup>[10, 14]</sup>。此法简单,成本低,但复性率低且氧化过程难以准确控制。b. 加入氧化-还原转换试剂,如还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽等。c. 复性前,加入氧化型谷胱甘肽,可使氧化型谷胱甘肽与还原的蛋白质半胱氨酸之间形成二硫复合物,然后通过复性过程中除去谷胱甘肽和变性剂,并加入低浓度的半胱氨酸取代蛋白质-S-S-谷胱甘肽中的谷胱甘肽而使二硫键正确形成。d. 用还原试剂或亚硫酸钠/连四硫酸钠使变性蛋白质磺化以保护巯基,复性时加入少量的还原试剂即可移去保护基团而使二硫键正确配对。e. 加入 DTT 等还原剂。

**3.3.3 吸附复性法:**将变性蛋白质吸附到某种介质上可以有效地抑制蛋白质分子间的非特异性相互作用,从而提高蛋白质的复性率。肝素琼脂糖层析法、金属螯和层析法等是实现吸附复性的有效方法。将单抗、分子伴侣等蛋白质的亲和配基固定在凝胶介质上促进蛋白质的折叠复性<sup>[14, 15]</sup>,也是一种吸附复性法,只不过介质上固定的配基单独也具有促进折叠的作用。也有将变性的蛋白质吸附到 CNBr 活化的琼脂糖凝胶 Sepharose 上而实现蛋白质的复性的报道,只是洗脱条件苛刻,难以保证蛋白质的回收率且步骤繁琐。离子交换层析、疏水相互作用层析等吸附纯化技术亦是很有有效的吸附折叠复性法。

**3.3.4 凝胶过滤层析复性法:**凝胶过滤层析除了可进行缓冲液交换式的蛋白质复性外,亦可对蛋白质进行一定程度的纯化<sup>[18]</sup>。凝胶过滤层析已成功用于许多蛋白质的复性。但在柱中进行缓冲液交换时,蛋白质可能会发生聚集现象。

**3.3.5 高蛋白质浓度下的复性方法:**在高蛋白质浓度下实现蛋白质折叠的高产率,目前有几种成功的例子。一种是缓慢地连续或不连续地将变性蛋白质加入到复性缓冲液中<sup>[19]</sup>,使得蛋白质在加入过程中或加入阶段之间有足够的时间进行折叠复性。一种是采用温度跳跃式复性,即让蛋白质先在低温下折叠复性以减少蛋白质聚集体的形成,当形成聚集体的中间体已经减少时,迅速提高温度以促进蛋白质折叠复性<sup>[1]</sup>。另外,还可以通过优化方法选

择稀释法中变性剂的终浓度。凝胶过滤层析也可以实现高蛋白质浓度下的蛋白质的折叠复性,此外,吸附法、反胶束法和双水相萃取法等都可用于高浓度蛋白质的复性。

**3.3.6 反胶束复性法<sup>[20]</sup>:** 由于蛋白质在反胶束内水相中可以保持其构象和活性,运用相转移技术可以将蛋白质分子包于反胶束中,由于这样可使得蛋白质分子相互分离,减少了蛋白质折叠过程的聚集作用,通过逐渐降低变性剂的浓度和加入氧化-还原剂,则可使变性蛋白质复性。但表面活性剂对蛋白质具有变性作用。

**3.3.7 双水相法复性法<sup>[17]</sup>:** Forciniti 用硫氰酸钠、氯化钠、溴化锂与聚乙二醇构成的双水相系统使得包涵体的溶解与蛋白质的折叠复性在一步双水相技术操作中完成。由于 PEG 具有稳定蛋白质构象的作用、高浓度盐则具有去稳定的作用,这样正确折叠的蛋白质会不断进入到另一相中,直到蛋白质的折叠与去折叠达到一个平衡。

### 参 考 文 献

- Xie Y, Wetlaufer D B. Control of aggregation in protein refolding: the temperature-leap tactic. *Protein Sci*, 1996, **5** (3): 517~ 523
- Georgious G, Valax P. Expression of correctly folded proteins in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1996, **7** (2): 190~ 197
- Rudolph R, Bohm G, Lilie H, *et al.* Folding proteins. In: Creighton T E ed. *Protein Function: A Practical Approach*, 2nd. New York: IRL, 1997, 57~ 99
- de Bernardez C E. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9** (2): 157~ 163
- Fischer B, Sumner I, Goodenough P. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *E. coli* as inclusion bodies. *Biotech Bioeng*, 1993, **41** (1): 3~ 13
- Builder S, Hart R, Lester P, *et al.* Refolding of misfolded insulin-like growth factor I. US patent, PN 5 663 304, 1997-09-02
- Guise A D, West S M, Chaudhuri J B. Protein folding *in vivo* and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies. *Mol Biotech*, 1996, **6** (1): 53~ 64
- Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proeins produced in *E. Coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9** (5): 497~ 501
- Rudolph R, Lilie H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J*, 1996, **10** (1): 49~ 56
- Fischer S, Rudolph R, Mattes R. Process for the activation of gene-technologically produced, heterologous eukaryotic proteins after expression in prokaryotes. European Patent, 00 393 725 A 1, 1986-10-23
- Dabora J M, Sanyal G, Middaugh C R. Effect of polyanion on the refolding of human acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*, 1991, **266** (35): 23637~ 23640
- Cleland J L, Builder S E, Swartz J R, *et al.* Polyethylene glycol enhanced protein refolding. *Bio/Technol*, 1992, **10** (9): 1013~ 1019
- Wetlaufer D B, Xie Y. Control of aggregation in protein refolding: a variety of surfactants promote renaturation of carbonic anhydrase II. *Protein Sci*, 1995, **4** (8): 1535~ 1543
- Sadana A. Protein refolding and inactivation during bioseparation: bioprocessing implications. *Biotech Bioeng*, 1995, **48** (5): 481~ 489
- Thomas J G, Ayling A, Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins fom *E. coli*: to fold or refold. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, **66** (3): 197~ 238
- Rozema D, Gellman S H. Artificial chaperone-assisted refolding of denatured reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry*, 1996, **35** (49): 15760~ 15771
- Forciniti D. Protein refolding using aqueous two-phase systems. *J Chromatography A*, 1994, **668** (1): 95~ 100
- Werner M H, Clore G M, Gronenborn A M, *et al.* Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett*, 1994, **345** (2): 125~ 130
- Rudolph R. Renaturation of recombinant, disulfide bonded proteins from inclusion bodies. In: Tschesche H ed. *Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Research*. New York: Walter de Gruyter, 1990. 149~ 172
- Hagen A J, Hatton T A, Wang D I C. Protein refolding in reverse micelles. *Biotech Bioeng*, 1989, **35** (4): 955~ 965

## Refolding of Recombinant Inclusion Body Proteins

FENG Xiao-Li\*

(Human Genome Center, Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** Strategies for decreasing the formation of inclusion bodies, isolation and resolution of inclusion bodies, and refolding of inclusion body proteins were included. The advances in the principle of refolding, assisting cosolvent and refolding processing were reviewed in detail.

**Key words** inclusion body, recombinant protein, refolding

\* Corresponding author. Tel: 86-10-64871664, 86-10-80494199, E-mail: fengxiaoli@yahoo.com

Received: September 25, 2000 Accepted: November 3, 2000