

# 反相色谱法研究人粒细胞集落刺激因子的 离子交换色谱复性和稀释复性

罗天乐, 丁虹, 李京京, 苏志国

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京, 100080)

**摘要:** 以反相色谱分析为主要手段, 结合活性测定, 研究了以包含体形式表达的重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)的稀释复性和离子交换色谱复性. 建立了L-精氨酸离子交换复性蛋白质的方法, 将变性、还原的rhG-CSF吸附到高浓度变性剂平衡的离子交换色谱柱上, 用L-精氨酸作洗脱剂进行梯度洗脱并同时脱除变性剂, 实现了rhG-CSF的复性. 与稀释复性相比, 色谱复性的rhG-CSF处于一种中间状态, 呈现快速而不同步的动力学特点, 这与色谱复性的梯度洗脱及固定相的吸附有关. 同时发现了对复性峰进一步稀释并且温育则可以提高其活性的新现象.

**关键词:** 重组人粒细胞集落刺激因子; 精氨酸; 包含体; 复性; 反相色谱; 离子交换色谱; 稀释

**中图分类号:** Q503/O658.1+3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1009-606X(2005)02-0213-04

## 1 前言

蛋白质复性是指去折叠的蛋白质在移除变性剂后自发折叠形成天然结构的过程. 稀释复性是目前应用最普遍的复性方法, 但存在聚集沉淀严重、复性蛋白浓度低的缺陷. 色谱复性是人们正在探索的一种很有潜力的方法, 但离子交换色谱用于复性的例子还很少, 已有研究的如金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)<sup>[1]</sup>、猪生长激素<sup>[2]</sup>、SOD<sup>[3]</sup>及溶菌酶<sup>[4]</sup>等.

*E. coli* 表达的重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)是由175个氨基酸组成的单肽链蛋白质, 相对分子质量为18.8 kD, pI为6.1<sup>[5]</sup>, 以包含体形式存在. 目前生产上一般采用稀释复性, 也有用透析复性<sup>[6]</sup>的报道, 但未见用色谱复性的报道. L-精氨酸可以有效地提高蛋白质稀释复性的效果<sup>[7]</sup>, 而且本身又是一种离子型试剂, 因此尝试用离子交换色谱结合精氨酸来复性rhG-CSF. 本工作用反相色谱作为主要手段, 结合活性测定, 研究了rhG-CSF在脲-精氨酸溶液体系中稀释复性和离子交换色谱柱上复性的不同特点.

## 2 实验

### 2.1 材料和试剂

rhG-CSF包含体和NFS-60细胞株来自本实验室, 盐酸胍购自Fluka公司, L-精氨酸(日本进口分装)购自北京经科宏达公司, 乙腈购自Fisher公司, 三氟乙酸购自Dikma公司, DEAE Sepharose Fast Flow介质和Hitrap Desalting柱及ProRPC柱购自Amersham公司, 增压色

谱柱(1.2 cm×20 cm)购自上海锦华公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 马血清购自Gibco公司, G-CSF测活标准品购自中国药品生物制品检定所. 其他试剂均为分析纯.

### 2.2 离子交换色谱复性及复性峰的再稀释

2.2.1 以L-精氨酸为洗脱剂的离子交换色谱梯度洗脱复性  
色谱柱为自装填的DEAE Sepharose Fast Flow柱(1.2 cm×13.5 cm). 流动相由A、B两种缓冲液组成, A液含6 mol/L脲, 50 mmol/L Tris-HCl, 40 μmol/L CuSO<sub>4</sub>; B液含0.5 mol/L Arg, 0.1 mol/L Tris-HCl, 40 μmol/L CuSO<sub>4</sub>. pH均为8.5. 将低温保存的包含体融解后用Hitrap Desalting柱脱盐, 流动相含8 mol/L脲, 2 mmol/L 2-巯基乙醇, 25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5. 然后取1 mL到预先用A液平衡的DEAE柱上, 用A液淋洗1.2倍柱体积, 再用梯度洗脱, 梯度长度为0.4倍柱体积, 从100% A液到100% B液, 流速为1 mL/min. 色谱系统为AKTA Purifier 10 (Amersham公司). 收集复性峰, 立即用含0.1 mol/L Tris-HCl及0.2 mmol/L EDTA, pH 8.5的复性缓冲液稀释后温育于25℃水浴中.

#### 2.2.2 以L-精氨酸为洗脱剂的离子交换色谱透过复性

相同的DEAE柱预先以B液平衡, 取1 mL脱盐后的rhG-CSF, 用B液淋洗, 流速1 mL/min.

### 2.3 脲-精氨酸体系中的稀释复性

样品为脱盐的rhG-CSF包含体, 复性均在25℃水浴中进行. 在搅拌下将rhG-CSF包含体按1:40的体积比滴加到含有一定浓度精氨酸和脲、40 μmol/L CuSO<sub>4</sub>

的 pH 8.5 的缓冲液中。

### 2.4 RPC 分析

色谱柱为 ProRPC 15 HR 柱, 1.0 cm×20 cm. 流动相 A 为 0.1%三氟乙酸, 99.9%水; B 为 90%乙腈, 0.1%三氟乙酸, 99.9%水. 色谱方法为: 色谱柱用 100% A 平衡, 100% A 淋洗 5 min(流速 2 mL/min); 100%~45% A 淋洗 5 min(流速 1 mL/min); 45%~25% A 淋洗 36 min(流速 1 mL/min). 色谱系统为 Waters 600E Multisolvant Delivery System(Waters 公司).

rhG-CSF 生物活性的测定按照国家标准方法<sup>[8]</sup>.

## 3 结果与讨论

### 3.1 RPC 分析 rhG-CSF 在脲-精氨酸溶液中的稀释复性

图 1 是在 0.5 mol/L 精氨酸中稀释复性过程中, 在不同时间取样进行 RPC 分析的结果. 可见刚开始时绝大部分 rhG-CSF 处于无活性的状态 3, 随着时间的推移, 逐渐出现了 1, 2 和 3 三个主峰, 其中只有峰 2 的产物有活性. 在完全变性还原的 rhG-CSF 中还有部分处于峰 1, 它可能是在较高 pH 下 rhG-CSF 发生了降解造成的,

在温育过程中会有少部分 rhG-CSF 向峰 1 转化, 但最后还是有着活性的峰 2 得到了明显的增加.

图 2 是 rhG-CSF 在一系列浓度的脲-精氨酸混合体系中稀释复性 17 h 后的 RPC 监测结果, 可见脲的引入不改变稀释复性 rhG-CSF 的 RPC 特征, 但脲浓度对 rhG-CSF 复性速度影响很大, 脲浓度越高向状态 2 的转化越慢, 脲浓度为 6 mol/L 时基本上不能复性.

### 3.3 RPC 分析 rhG-CSF 的离子交换色谱复性

图 3(a)是脲-精氨酸梯度离子交换色谱复性的色谱图. 图 3(b)是色谱复性的 rhG-CSF 和穿过复性的 rhG-CSF 在温育相同时间的比较. 结合图 2 可见, 穿过复性和稀释复性的 rhG-CSF 都表现为类似的三主峰特征, 而柱复性 rhG-CSF 表现为宽而平的峰, 3 个主峰不明显, 这说明柱复性峰中, 在同一时间点 rhG-CSF 存在多个折叠平衡状态, 在动力学上是不同步的, 而稀释复性和穿过复性的折叠状态则表现同步的动力学, 这显然与色谱的吸附作用和脲梯度有关. 同时可见刚下柱时峰 3 的 rhG-CSF 已经减少到 40%以下, 温育 17 h 后峰 3 基本已经消失, 说明柱复性可以加速 rhG-CSF 的折叠.

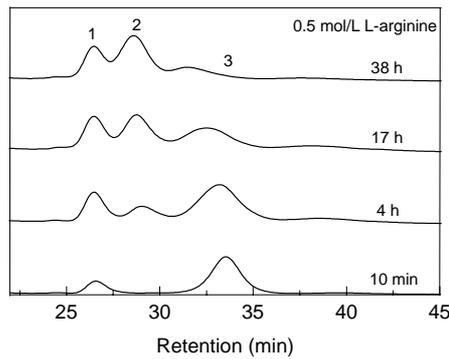


图 1 RPC 监测 rhG-CSF 包含体稀释复性的过程  
Fig.1 RPC profiles for the kinetic monitoring of denatured rhG-CSF diluted 20 folds

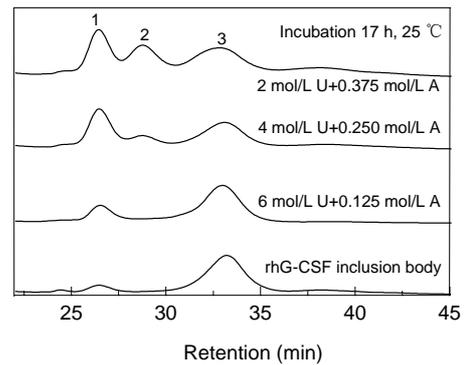


图 2 rhG-CSF 在脲-精氨酸混合溶液中稀释的 RPC 图谱  
Fig.2 RPC profiles of denatured rhG-CSF diluted in buffers containing urea (U) and L-arginine (A)

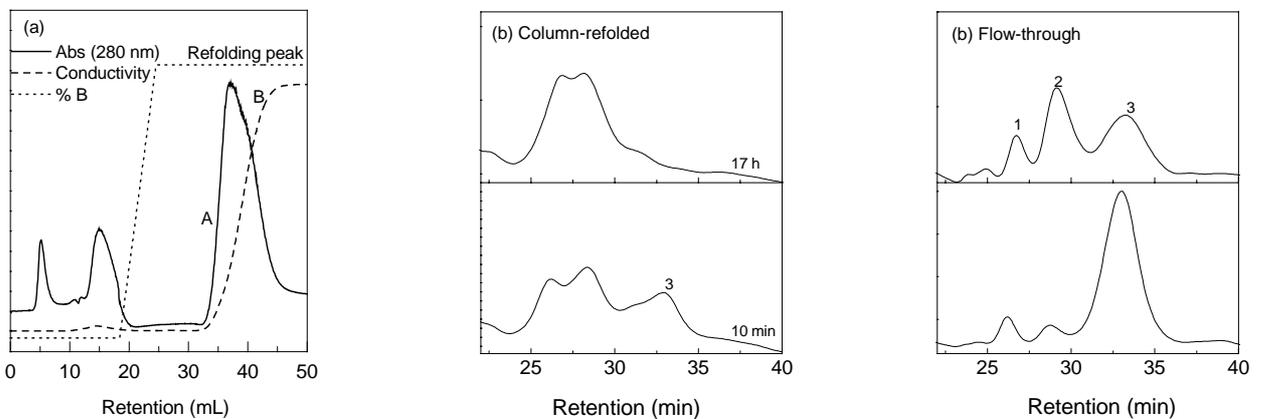


图 3 (a) DEAE 柱复性 rhG-CSF 色谱图 (b) 色谱复性峰温育 10 min 和 17 h 后的 RPC 分析图及与穿过复性的 rhG-CSF 的比较  
Fig.3 (a) Refolding of rhG-CSF on DEAE column (b) Comparison of RPC profiles of the on-column refolded rhG-CSF and rhG-CSF diluted by flow-through after 10 min and 17 h of incubation  
(A, B: taken from the ascending and descending slope of R)

图 4 显示了取样 A 和取样 B 温育后用 RPC 分析的结果. 可见与保留时间较小的 A 点相比, 保留时间较大的 B 点在位置 2 显示出比较明显的主峰, 这进一步证明了色谱复性造成 rhG-CSF 的不同步性. 前面已经发现复性体系中脲浓度对于折叠速度有明显影响, 因此保留时间不同的点脲浓度的差异造成的折叠速度的差异可能是产生这种不同步性的原因.

图 4 还显示了将色谱复性峰下柱后再稀释 2 倍并温育 17 h 后的 RPC 图谱. 可见色谱复性的 rhG-CSF 经过柱后再稀释和温育发生了结构变化, 较之不稀释的色谱复性 rhG-CSF, 其位置 2 也出现了明显的主峰.

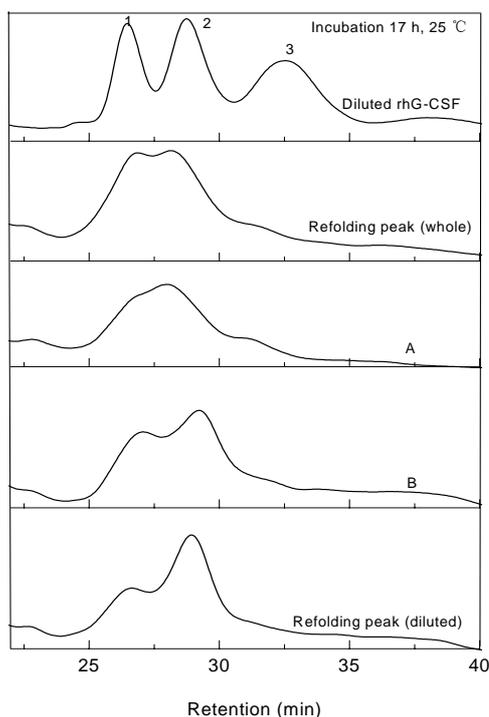


图 4 复性峰、A、B 点及稀释 2 倍的复性峰 RPC 分析图谱及温育 17 h 后的稀释复性上清

Fig.4 RPC profiles of the whole refolding peak, sample A, sample B, the refolding peak that is further diluted 2 folds, and rhG-CSF diluted in 0.5 mol/L arginine

表 1 部分样品的生物活性测定结果

Table 1 Result of bioactivity assay of related samples (IU/mg)

Sample	Specific activity
Refolding peak (gradient elution)	$7.0 \times 10^5$
Refolding peak (flow-through)	$1.1 \times 10^7$
Supernate of L-arg (0.5mol/L)-assisted dilution	$1.2 \times 10^7$
A	$3.2 \times 10^5$
B	$8.0 \times 10^6$
Refolding peak (gradient elution) diluted 2 folds	$2.3 \times 10^6$
Refolding peak (gradient elution) diluted 4 folds	$4.4 \times 10^6$
Refolding peak (gradient elution) diluted 8 folds	$7.9 \times 10^6$

表 1 为活性测定的结果, 可见 B 点的活性明显高于 A 点, 而柱复性 rhG-CSF 的比活经过再稀释后明显增

高, 且稀释倍数越高比活增高越多. 这是色谱复性峰的折叠不同步性以及柱后稀释使复性 rhG-CSF 构象变化在活性上的反映.

## 4 讨论

离子交换色谱复性的 rhG-CSF 处于与稀释复性不同的中间状态, 表现为折叠不同步性, 这与色谱柱的吸附和脲梯度造成的色谱峰上各点折叠速度不同有关. 色谱复性的 rhG-CSF 经过再稀释后构象会继续变化, 活性也可进一步提高. 此现象未见文献报道.

与稀释复性和穿过复性相比, 色谱复性的优点在于色谱的吸附具有浓缩作用, 因此复性后的蛋白体积小, 浓度高, 而且折叠更快. 但色谱的吸附和浓缩作用又增加了复性中间体相互作用的机会, 尤其是因为 rhG-CSF 具有一个不成对巯基, 在较高 pH 值下可能产生分子间错配二硫键. 此外 rhG-CSF 是一个比较疏水的蛋白, 且变性后表面电荷基团更少, 故在离子交换色谱上的保留作用比较弱, 梯度洗脱时变性剂还没有降到允许完全复性的低浓度就被洗脱下来了. 这两方面可能是色谱复性蛋白比活较稀释复性和穿过复性低的原因.

色谱复性后再稀释可以提高其比活的发现为解决此问题提供了思路. 由于色谱复性的浓度比稀释复性高很多(一般 15 倍以上), 经过一定的再稀释, 降低变性剂的浓度, 不但提高了复性后蛋白的比活, 蛋白浓度也不会降得很低. 而对于二硫键错配的问题, 可以通过在缓冲液中加入氧化还原对或引入 pH 梯度解决.

### 参考文献:

- [1] Li M, Su Z, Janson J C. *In vitro* Protein Folding by Chromatographic Measures [J]. *Protein Express. Purif.*, 2004, 33(1): 1-10.
- [2] Creighton T E. Process for the Production of a Protein [P]. US Patent: 4977248, 1990-12-11.
- [3] Li M, Su Z. Refolding Human Lysozyme Produced as an Inclusion Body by Urea Concentration and pH Gradient Ion Exchange Chromatography [J]. *Chromatographia*, 2002, 56(1-2): 33-38.
- [4] Li M, Su Z. Refolding of Superoxide Dismutase by Ion-exchange Chromatography [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2002, 24(11): 919-923.
- [5] 饶春明, 赵阳, 张翊, 等. 重组人粒细胞集落刺激因子活性测定标准品的研制 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2001, 14(4): 225-227.
- [6] 张军权, 陈惠鹏, 王清明, 等. 重组人粒细胞集落刺激因子构象异构体生物学性质的研究 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2001, 25(3): 177-179.
- [7] Arakawa T, Tsumoto K. The Effect of Arginine on Refolding of Aggregated Proteins: Not Facilitate Refolding, but Suppress Aggregation [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 304(1): 148-152.
- [8] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 412.

## Study on Dilution and Ion Exchange Chromatographic Refolding of Recombinant Human Granulocyte Colony-stimulating Factor by Reversed Phase Chromatography

LUO Tian-le, DING Hong, LI Jing-jing, SU Zhi-guo

*(State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)*

**Abstract:** A novel way to refold rhG-CSF by combining ion exchange chromatography (IEC) and L-arginine was developed: denatured rhG-CSF from inclusion body was attached to a DEAE column and eluted by a gradient from 6 mol/L urea to 0.5 mol/L L-arginine. Refolding of rhG-CSF was also done by dilution and by passing the rhG-CSF inclusion body through the DEAE column perfused with 0.5 mol/L arginine without adsorption. RPC analysis and bioactivity assay showed that rhG-CSF refolded by IEC had different pattern from those of the rhG-CSFs refolded by dilution and flowing-through, representing fast but asynchronous kinetics, due to the adsorption of the DEAE medium to the rhG-CSF and the gradient of denaturant. It was also found that subsequent dilution and incubation of the IEC-refolded rhG-CSF furthered its refolding and enhanced its bioactivity up to 10 folds.

**key words:** rhG-CSF; inclusion body; ion exchange chromatography; refolding; arginine; dilution; reversed phase chromatography