

研究论文

渗透剂与人工伴侣耦合辅助苹果酸 脱氢酶包含体的复性

张拓宇, 董海龙, 董晓燕
(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 苹果酸脱氢酶不仅是一种重要的糖代谢酶, 而且具有较高的经济价值和理论研究价值。为了获得苹果酸脱氢酶包含体的有效体外复性方法, 本文将渗透剂(蔗糖, 甜菜碱, 海藻糖)与人工伴侣体系(CTAB/ β -CD)耦合, 进行了大肠杆菌苹果酸脱氢酶(eMDH)包含体的体外复性研究。结果发现, 人工伴侣与蔗糖或甜菜碱耦合, 可明显提高 eMDH 包含体的复性效果, 复性后产物的活性较稀释复性提高了 2 倍以上; 但未发现海藻糖与人工伴侣存在这种耦合作用。同时发现, 耦合作用还可降低人工伴侣体系中 CTAB 与 β -CD 的最佳配比(从 1:8 下降到 1:6), 从而可提升人工伴侣体系的总用量, 实现较高酶浓度条件下的有效复性。另外, 利用渗透剂对蛋白质的热保护作用, 实现了在较高温度(15 $^{\circ}$ C)下 eMDH 包含体的复性。对复性产物结构的初步分析发现, 耦合作用可使 eMDH 分子的 α -螺旋及二聚体含量明显增多, 因此复性产物的活性也显著提高。

关键词: 苹果酸脱氢酶(MDH); 复性; 渗透剂; 人工伴侣; 耦合作用

中图分类号: O 629.73; O 643.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157(2008)04-0988-07

Cooperation of osmolytes and artificial chaperone on malate dehydrogenase refolding

ZHANG Tuoyu, DONG Hailong, DONG Xiaoyan

(Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering and
Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Malate dehydrogenase (MDH) is an essential metabolic enzyme, which has high economic value in protein research. To find an efficient method for MDH IBs refolding, the cooperation of osmolytes (sucrose, betaine and trehalose) and artificial chaperone (CTAB/ β -CD) in eMDH IBs refolding was investigated. The results showed that when sucrose and betaine were added with artificial chaperone, the refolding of eMDH was facilitated and the activity was twice higher than the refolded eMDH by dilution. But trehalose did not have any influence. Then, the optimal ratio of CTAB to β -CD was decreased from 1:8 to 1:6 by the cooperation. As a result, more artificial chaperone could be used to facilitate the refolding with a higher eMDH concentration. Because of the thermo-protection of osmolytes, the refolding of eMDH at a higher temperature (15 $^{\circ}$ C) was achieved. According to structure analysis, the contents of α -helix and dimer structure in refolded eMDH were increased by the cooperation, and eMDH activity was enhanced.

Key words: MDH; refolding; osmolyte; artificial chaperone; cooperation

2007-09-12 收到初稿, 2007-11-05 收到修改稿。

联系人: 董晓燕。第一作者: 张拓宇(1982-), 男, 硕士研究生。

基金项目: 国家自然科学基金项目(20476081, 20676098); 河北省教育厅科研计划项目(2004107); 唐山市科学技术研究与
发展计划项目(04204501C-20)。

Received date: 2007-09-12.

Corresponding author: Prof. DONG Xiaoyan. E-mail: d_xy@tju.edu.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (20476081, 20676098).

引言

苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, EC 1.1.1.37, MDH) 是一种重要的糖代谢酶, 在生物体内特异性催化 L-苹果酸成为草酰乙酸, 从而完成三羧酸循环。利用 MDH 的底物专一性, 可将其用于拆分 DL-苹果酸得到 D-苹果酸——重要的非天然有机酸, 在制药行业作为手性源, 在某些手性化合物的不对称合成过程中均具有不可替代的作用^[1]。此外, MDH 是一种典型的寡聚体结构蛋白质, 具有同源二聚体分子结构。它由相同的亚基以非共价键结合而成, 但分子内维系二聚体结构的非共价键易被酸、碱、高浓度盐所破坏, 导致其分子的不稳定性。由于其特有的结构及性质, 常作为研究寡聚蛋白分子间相互作用的模型蛋白质^[2-3]。特别是 MDH 的体外复性过程需要经历亚基折叠及亚基二聚体化两个过程, 因此在蛋白质折叠平衡动力学及折叠机理的研究中也常被作为模型蛋白质^[4]。

基于苹果酸脱氢酶的潜在经济价值和理论研究价值, 本文将利用含有重组质粒 pBV220-eMDH 的基因工程菌表达的大肠杆菌苹果酸脱氢酶 (eMDH) 包含体, 研究开发有效的 eMDH 体外复性方法。

在蛋白质的复性研究中, 高浓度包含体蛋白质的复性是研究的焦点。由于蛋白质的复性包含着分子内折叠和分子间聚集的竞争动力学过程, 抑制分子间聚集成为提高复性收率的关键。研究表明, 广泛存在于生物体内的渗透剂可有效保护蛋白质等生物大分子, 对多种蛋白质的体外复性有很好的促进作用^[5-6]; 并发现在复性过程中加入甜菜碱、海藻糖等渗透剂, 可以进一步提高分子伴侣辅助 MDH 复性的效果^[7-8]。人工伴侣是模拟分子伴侣构建的复性体系, 对多数蛋白质有很好的辅助复性作用^[9], 并因其稳定性高、价格便宜和易于分离除去等优点而备受关注。但研究发现, 虽然人工伴侣对 eMDH 也有很好的促进复性作用, 但当复性体系的酶浓度较高时, 促进复性效果明显下降^[10]。为了开发更有效的包含体蛋白质的复性方法, 本文将蔗糖、甜菜碱和海藻糖与人工伴侣体系 (CTAB/ β -CD) 耦合, 考察了不同复性条件下的复性效果, 并对较高浓度的 eMDH 包含体进行了复性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大肠杆菌苹果酸脱氢酶包含体由本实验室构建的含有重组质粒 pBV220-eMDH 的基因工程菌表达; 甜菜碱, L-苹果酸购自 Sigma 公司; 海藻糖, 二硫苏糖醇 (DTT), 脲 (urea), Tris, EDTA Na_2 购自 Genview 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 eMDH 包含体的制备及溶解变性

用超声波细胞粉碎机将诱导表达后^[10]的基因工程菌冰上超声破菌, 于 4 °C 下 12000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min 收集沉淀。将沉淀分别用含 1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA、2 mol \cdot L⁻¹ 脲的 20 mmol \cdot L⁻¹ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液 (pH 7.2) 和含 10 mmol \cdot L⁻¹ EDTA 的 0.5% Triton X-100 溶液反复洗涤后即得到 eMDH 包含体 (图 1)。

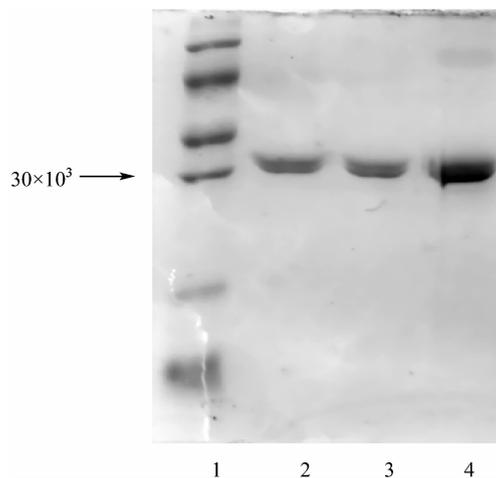


图 1 eMDH 包含体纯化产物 SDS-PAGE 图

Fig. 1 SDS-PAGE profile of purification of eMDH
1—Marker; 2—eMDH purified by urea; 3—eMDH purified by Triton X-100; 4—purified eMDH

以含 8 mol \cdot L⁻¹ 脲、10 mmol \cdot L⁻¹ DTT 的 100 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.6) 作为包含体的变性缓冲液。取一定质量的 eMDH 包含体, 用变性缓冲液溶解后, 置于 37 °C 恒温 0.5 h 变性。以 Bradford 法测定变性液的蛋白质浓度。

1.3 eMDH 复性

1.3.1 人工伴侣辅助复性 将变性蛋白液与含一定量 CTAB 的复性缓冲液 (50 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, 5 mmol \cdot L⁻¹ DTT, pH 7.6) 混合, 使其与 CTAB 结合 15 min; 然后加入 β -CD 开始复性。

CTAB 与 β -CD 的用量根据实验需要进行调整；脲浓度和蛋白浓度根据实验需要改变。将复性体系置于一定温度下，经过一段时间（90 min，此时间是通过复性动力学实验结果确定的反应达到平衡的时间，下同。）复性后，取样测活。

1.3.2 渗透剂与人工伴侣耦合作用辅助复性 在复性液中除添加一定量的人工伴侣外，还添加一定浓度的渗透剂（蔗糖，甜菜碱，海藻糖）。渗透剂的添加分两种方式：一是在捕获过程中添加，即先让变性蛋白与含一定量渗透剂的 CTAB 溶液混合，结合 15 min 后加入 β -CD 剥离；二是在剥离过程中添加，即先使变性蛋白与 CTAB 结合 15 min 后，再加入 β -CD 并同时加入相应量的渗透剂。复性在一定温度下进行，复性 120 min 后取样测活。实验对照组为自发复性（稀释复性，复性 60 min）、人工伴侣及渗透剂单独复性（均为最佳的添加浓度，复性 90 min）。

1.4 复性产物的分析

1.4.1 活性分析 MDH 活性通过测定 L-苹果酸氧化反应的过程得到^[11]。即向 940 μ l 底物混合物（90 mmol \cdot L⁻¹ 焦磷酸钠，1.5 mmol \cdot L⁻¹ NADH 和 40 mmol \cdot L⁻¹ L-苹果酸，pH 8.75）内加入 eMDH 溶液 10 μ l 混匀后开始反应，并测量 340 nm 波长下吸光度的增加值（由反应过程中 NAD 转化成 NADH 引起）。设定 NADH 的摩尔吸光常数为 6300 L \cdot mol⁻¹ \cdot cm⁻¹，计算得到 eMDH 的活性（1 个酶活性单位定义为每分钟生成 1 μ mol NADH 所需要的酶量）和比活（每 mg 蛋白对应的酶活性单位）；其中蛋白质的浓度通过 Bradford 法测量得到。整个活性测量过程在 25 $^{\circ}$ C 条件下进行。

1.4.2 圆二色（CD）光谱分析 使用圆二色（CD）光谱仪 JASCO J-810 测量 eMDH 分子的二级结构。选取光程为 5 mm，数据采集间隔为 0.5 nm。样品浓度为 0.1 mg \cdot ml⁻¹，扫描波长范围为 250~200 nm。所有 CD 值通过相同缓冲液的背景吸收修正，采用 5 次测量求平均值消除仪器噪声，平均残基分子量取 312，实验温度为 25 $^{\circ}$ C。截取 250~210 nm 之间的数据做出 CD 曲线；使用 CDPro 软件对此部分数据进行拟合计算，得到不同二级结构在蛋白中的百分含量，取平行实验样品的计算结果算出平均值与偏差，作为最终结果。

1.4.3 体积排阻色谱 使用高效液相色谱仪和体

积排阻色谱柱 Superdex 75 10/300GL（球蛋白的分辨范围是 3000~70000）进行分析。色谱流动相为 0.1 mol \cdot L⁻¹ 磷酸钠 pH7.6。流速为 0.2 ml \cdot min⁻¹，上样量为 100 μ l。通过洗脱色谱图分析复性蛋白质的分子量。

2 结果与讨论

2.1 渗透剂与人工伴侣耦合辅助 eMDH 复性

为了考察渗透剂与人工伴侣的耦合作用及不同耦合方式的作用效果，实验设计以不同的添加方式（如 1.3.2 所述）加入蔗糖、甜菜碱和海藻糖，观察它们与人工伴侣共同辅助 eMDH 的复性，结果示于表 1，此时复性液中蛋白质的终浓度为 0.1 mg \cdot ml⁻¹。

由表 1 可以看到，除海藻糖外，在剥离阶段加入渗透剂，其复性效果均明显高于自发复性和单独辅助复性。说明在本实验条件下，蔗糖和甜菜碱与人工伴侣耦合可有效提高 eMDH 的复性效果。但在捕获阶段添加渗透剂后，耦合复性效果很小（甜菜碱）甚至没有体现（蔗糖和海藻糖）。

研究表明，蔗糖的主要作用是增大溶液黏度，减少蛋白质分子间的相互作用^[12]；而海藻糖和甜菜碱则主要体现在对变性蛋白和折叠中间体的保护，同时甜菜碱还有与蛋白疏水结合的作用^[13-14]。由此分析，如在剥离阶段添加适量的渗透剂，即可减少 β -CD 在剥离 CTAB 启动蛋白折叠过程中折叠中间体之间的聚集，从而进一步提高蛋白质的复性收率。相反，若在捕获阶段添加渗透剂，由于渗透剂对变性蛋白质分子的作用限制了 CTAB 对其的捕获，因此就使得人工伴侣不能发挥正常的辅助复性作用。另外，海藻糖无论在什么条件下，均没有体现出与人工伴侣的耦合作用，甚至对人工伴侣有抑制作用（在捕获阶段添加），这一结果与前人对海藻糖与分子伴侣耦合的研究^[7]结果相似，说明海藻糖也不具有与人工伴侣的耦合作用，其原因将在 2.2 中分析讨论。由于捕获阶段添加渗透剂并不能有效提高人工伴侣的作用，因此本文仅对剥离阶段添加渗透剂的作用做进一步探讨。

2.2 复性产物的结构分析

为了观察复性后产物的结构特征，将人工伴侣单独作用，以及耦合辅助复性的产物进行了 CD 光谱的扫描，结果示于图 2，其中图 2（b）为天然态 eMDH 的圆二色谱图^[15]。由于添加甜菜碱后的样

表1 不同复性方法所得产物的活性

Table 1 Specific activity of refolded eMDH

Methods	Specific activity /U · mg ⁻¹
dilution	43.7 ± 1.8
1 mol · L ⁻¹ sucrose	71.6 ± 2.9
0.75 mol · L ⁻¹ betaine	75.5 ± 4.6
1 mol · L ⁻¹ trehalose	56.1 ± 1.6
artificial chaperone (arti-chap)	102.2 ± 6.3
arti-chap+0.5 mol · L ⁻¹ sucrose	
capturing step	103.7
stripping step	137.5 ± 4.3
arti-chap+0.5 mol · L ⁻¹ betaine	
capturing step	116.2
stripping step	132.5 ± 1.4
arti-chap+1.0 mol · L ⁻¹ trehalose	
capturing step	96.3
stripping step	104.5 ± 4.6

品信号干扰严重, 未能得到可靠的实验数据, 因此没有给出数据。

可以看到, 与对照相比 (自发复性和人工伴侣单独作用), 蔗糖与人工伴侣耦合后, 复性产物在 222 nm 左右的峰值更加明显, 而这一部分谱带正对应了与 eMDH 生物活性相关的 α -螺旋结构^[16]。但加入海藻糖 CD 曲线明显不同, 222 nm 左右的峰值变化不大, 但在 216 nm 的峰值却有增多。进一步对结果进行拟合计算, 分析二级结构的相对含量发现, 蔗糖的存在使产物中 α -螺旋的含量显著提高 (从 22% 提高至 39%), 而海藻糖的存在只是更多地生成了 β -折叠 (从 28% 到 38%)。由于 α -螺旋结构对于 eMDH 酶活性的表现有重要的意义, 虽然海藻糖的存在可以稳定蛋白质分子结构并抑制聚集, 但并不能促进复性产物折叠生成更多的合理结构 (α -螺旋结构), 所以也就不能体现出其对 eMDH 的促进复性作用, 甚至抑制人工伴侣发挥作用 (表 1)。

为了观察复性产物中二聚体的生成情况, 通过高效液相体积排阻色谱, 对自发复性以及耦合辅助复性的复性产物进行了分析 (图 3)。在相同的色谱条件下, 由于 BSA (分子量 67×10^3) 的出峰时间为 86 min, 因此在图 3 中的峰 1 为 eMDH 二聚体 (65×10^3), 其后的峰为 eMDH 的单体 (32×10^3)。可以看到, 自发复性产物中, 二聚体的含量很少, 单体分子也出现很少 [图 3 (a)], 这是因为在此条件下大量蛋白质形成无活性聚集沉淀, 无法通过色谱柱而造成。事实上实验中也观察到肉眼

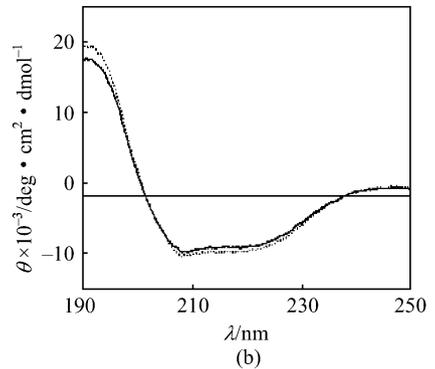
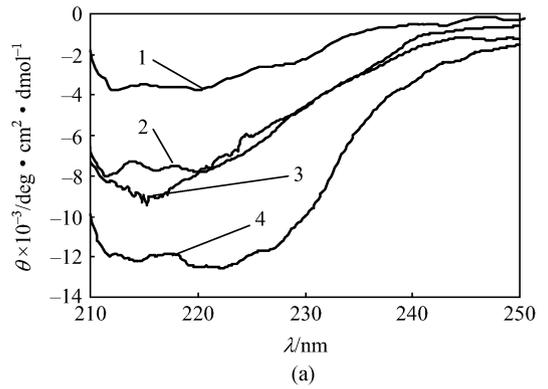


图2 复性产物的 CD 光谱

Fig. 2 CD spectra for refolded eMDH

1—dilution; 2—artificial chaperone; 3—artificial chaperone and 1 mol · L⁻¹ trehalose;
4—artificial chaperone and 0.5 mol · L⁻¹ sucrose

可见的沉淀 (无结果显示)。但在耦合作用的复性产物中二聚体的含量明显增加 [图 3 (b)、(c)]。这进一步说明, 在耦合作用下, 变性蛋白更容易折叠并组合形成二聚体结构, 从而表现出更大的生物活性。

2.3 耦合作用对人工伴侣配比的影响

研究表明, 人工伴侣辅助单体蛋白 (溶菌酶) 复性时, CTAB 与 β -CD 的浓度比通常为 1 : 4^[9,17]; 但辅助 eMDH 复性时, 所需的最佳配比提高至 1 : 8, 这是由于 eMDH 的折叠速率较快, 需要更多的 β -CD 将结合在变性蛋白上的 CTAB 剥离才能及时启动肽链折叠^[10]。

但从图 4 的结果可以看出, 渗透剂的加入不仅可以显著提高复性效果, 而且改变了人工伴侣单独作用时的配比。当固定 CTAB 用量为 0.6 mmol · L⁻¹, 添加 0.5 mol · L⁻¹ 甜菜碱后, 达到最佳复性效果所需的 β -CD 浓度降低, 使 CTAB 与 β -CD 的浓度比降至 1 : 6。添加蔗糖时, 虽然人工伴侣体

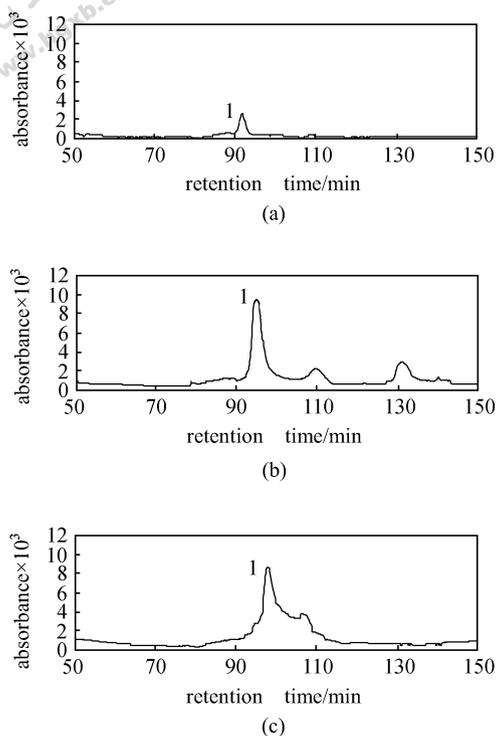


图 3 复性产物的体积排阻色谱分析
Fig. 3 IFC of refolded eMDH assisted by cooperation of osmolytes and artificial chaperone
(a) dilution; (b) $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose and arti-chap; (c) $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ betaine and arti-chap

系的最佳配比仍在 1 : 8, 但最佳值的范围明显加大 (1 : 6 ~ 1 : 9)。此结果说明, 蔗糖和甜菜碱的加入减少了 β -CD 对 CTAB 剥离的用量, 使 eMDH 在较低的人工伴侣浓度配比下, 即可得到很好的复性收率。这是由于甜菜碱可通过与变性蛋白质分子疏水基的结合^[14], 在 β -CD 剥离 CTAB 的过程中发挥作用, 因此使剥离过程更加容易。而蔗糖是通过调节溶液的黏度抑制蛋白质分子间的聚集, 因此即使 β -CD 用量稍低, 也可使剥离过程中的肽链得到有效保护。

上述结果无疑对工业应用大有裨益。因为制约人工伴侣使用的一个关键问题就是 β -CD 的溶解度 (在水中的溶解度仅为 $16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。通过人工伴侣与渗透剂的耦合, 一方面可进一步提高复性效果, 另一方面可降低 β -CD 的用量, 提升人工伴侣总体用量, 对实现较高浓度的 eMDH 复性非常有利。

2.4 耦合作用对较高温度下 eMDH 复性的影响

温度是影响 eMDH 复性的一个重要因素^[10]。研究表明, eMDH 的折叠速度很快^[18], 较高的温

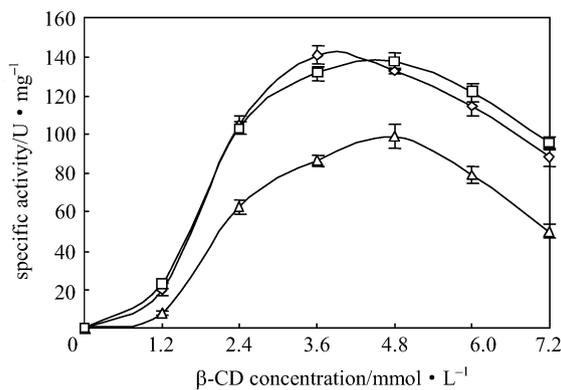


图 4 渗透剂的加入对于人工伴侣配比的影响
Fig. 4 Effect of β -CD concentration with $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB, cooperated with osmolyte
 \triangle no osmolyte; \diamond betaine and artificial chaperone;
 \square sucrose and artificial chaperone

度不利于其正确的折叠, 因此一般将复性温度控制在 4°C 下进行。但这样的温度显然不利于实际生产的操作。实验中发现, 若将复性后的 eMDH 放在含有一定浓度的蔗糖和甜菜碱溶液中, 即使在较高温度 (15°C) 下, 活性的降低也非常缓慢 (未将结果列出), 这与其他人对蛋白质的热保护实验结果相同^[13]。为了观察在较高温度下耦合作用对 eMDH 复性的影响, 在此, 将复性体系分别置于不同温度下进行复性, 并对最终产物的活性进行测定, 结果示于图 5。

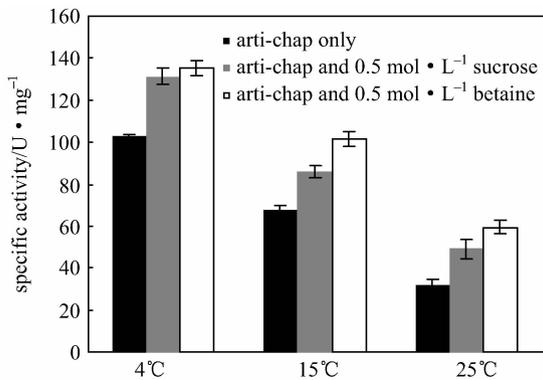


图 5 不同温度下 eMDH 的复性效果
Fig. 5 Refolding of eMDH under different temperature

可以看到, 随着复性温度的升高, 虽然 eMDH 的活性均明显下降, 但添加了渗透剂的复性产物, 活性随温度降低的趋势受到了明显的抑制, 特别是加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甜菜碱, 可使 15°C 复性条件下的复性产物活性维持在 $100 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 以上。这不仅证明了渗透剂对蛋白质具有热保护作用, 而且也

显示了耦合作用对较高温度条件下 eMDH 复性的可能。

2.5 渗透剂与人工伴侣耦合辅助较高浓度 eMDH 的复性

在复性过程中, 蛋白质的聚集随着酶浓度的升高而增强。为了抑制这种聚集作用, 加大人工伴侣的浓度可获得一定效果, 然而受 β -CD 溶解度的影响, 这种方法往往会受到限制^[17]。由于 2.3 的结果显示, 耦合作用可一定程度上减少 β -CD 的用量, 提升人工伴侣总体用量, 因此研究了两种人工伴侣的用量 [即低用量 (lower): $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 高用量 (higher): $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $12.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$] 对不同酶浓度 (0.1 、 0.5 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 复性的影响, 结果如图 6 所示。添加甜菜碱时, 人工伴侣的低用量和高用量则分别为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $3.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $12.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

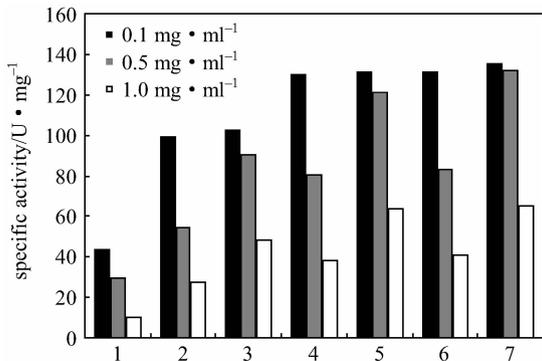


图 6 人工伴侣浓度对不同浓度酶复性效果的影响

Fig. 6 Effect of artificial chaperone on eMDH refolding, with different eMDH concentration

1—dilution; 2—arti-chap (lower); 3—arti-chap (higher);
4—arti-chap+sucrose (lower); 5—arti-chap+sucrose (higher);
6—arti-chap+betaine (lower); 7—arti-chap+betaine (higher)

可以看到, 当酶浓度较低 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 时, 无论在单独作用还是耦合作用的复性条件下, 人工伴侣浓度对复性效果均没有明显影响; 但当酶浓度升高至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上时, 人工伴侣浓度对复性效果有明显影响。如酶浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 将人工伴侣用量提高 3 倍左右后, 复性产物的酶活即可接近于低酶浓度 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 时的结果。然而当酶浓度提高到 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 提高人工伴侣的用量却未获得理想的复性效果。考虑此时复性液中由于脲含量 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{ml}^{-1}$) 相对不足, 会引起蛋白质分子间的聚集而影响人工伴

侣发挥作用^[9], 为此进一步提高了复性体系内脲的含量, 考察了人工伴侣以及人工伴侣与渗透剂耦合辅助复性的效果, 结果如图 7 所示。可见, 无论是人工伴侣单独作用还是与渗透剂耦合作用, 均出现最佳的脲浓度使复性效果最佳, 这与一般的研究结果相一致。值得注意的是当脲浓度达到最佳值 ($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 耦合辅助复性可使 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 酶的复性产物活性达到 $80 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 左右, 明显高出其他复性方法的结果^[7,10], 这对于高浓度的 eMDH 包含体蛋白的复性而言是可喜的收获。

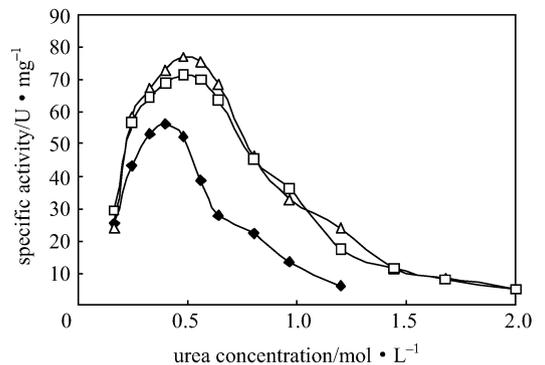


图 7 脲浓度对复性效果的影响

Fig. 7 Effect of urea on eMDH refolding (eMDH $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

◆ no osmolyte; □ $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose and arti-chap;
△ $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ betaine and arti-chap

3 结 论

人工伴侣和蔗糖或甜菜碱耦合, 可明显提高对 eMDH 包含体的复性效果; 但未发现海藻糖与人工伴侣的这种耦合作用。另外, 耦合作用可降低人工伴侣体系的配比, 为进一步提高人工伴侣的总体用量提供了空间, 从而可实现较高浓度 eMDH 的有效复性。在耦合复性中, 由于渗透剂对蛋白质的热保护作用, 实现了在较高温度 (15°C) 下的 eMDH 包含体的复性。对所得复性产物结构的初步分析发现, 耦合作用可使 eMDH 分子的 α -螺旋及二聚体含量明显增多, 因此复性产物的活性也显著提高。

References

- [1] Asano Y, Ueda M, Yamada H. Microbial production of D-malate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 1110-1113
- [2] David C W, Stewart R J, Jeffrey C G, *et al.* Subunit interactions in mitochondrial malate dehydrogenase kinetics

- and mechanism of reassociation. *Journal of Biological Chemistry*, 1981, **256**: 2377-2382
- [3] Sanchez S A, Hazlett T L, Brunet J E, *et al.* Aggregation states of mitochondrial malate dehydrogenase. *Protein Science*, 1998, **7**: 2184-2189
- [4] Suparna C S, Debasish B, Chanchal D G. The folding of dimeric cytoplasmic malate dehydrogenase—equilibrium and kinetic studies. *Eur. J. Biochem.*, 2002, **269**: 3856-3866
- [5] Xia Y, Park Y D, Zhou H M. The protective effects of osmolytes on arginine kinase unfolding and aggregation. *Journal of Biological Macromolecules*, 2007, **40**: 437-443
- [6] Ou W B, Park Y D, Zhou H M. Effect of osmolytes as folding aids on creatine kinase refolding pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, **34**: 136-147
- [7] Sophia D, Noa E, David R, *et al.* Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276** (43): 39586-39591
- [8] Sophia D, David R. Dicarboxylic amino acids and glycine-betaine regulate chaperone-mediated protein-disaggregation under stress. *Molecular Microbiology*, 2003, **49** (2): 401-410
- [9] Dong Xiaoyan (董晓燕), Shi Jinhui (史晋辉), Sun Yan (孙彦). Cooperative effect of artificial chaperone and guanidine hydrochloride on facilitating lysozyme refolding. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2002, **53** (6): 590-594
- [10] Dong Xiaoyan, Fu Minling, Sun Yan. Refolding of recombinant homodimeric malate dehydrogenase expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, **38**: 341-348
- [11] Deborah B, Ernesto R, Leonard J B. Engineering the quaternary structure of an enzyme: construction and analysis of a monomeric form of malate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Protein Science*, 1994, **3**: 2023-2026
- [12] Maria S, Mikael O. High concentrations of viscogens decrease the protein folding rate constant by prematurely collapsing the coil. *J. Mol. Biol.*, 2003, **326**: 263-271
- [13] Tadashi U, Makiko N. Aggregation and chemical reaction in hen lysozyme caused by heating at pH6 are depressed by osmolytes, sucrose and trehalose. *J. Biochem.*, 2001, **130**: 491-496
- [14] Arakawa T, Timasheff. Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, **224**: 169-177
- [15] Christopher R G, Julie M, David J N, *et al.* A single amino acid mutation enhances the thermal stability of *E. coli* malate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 1994, **224**: 249-255
- [16] Hall M D, Levitt D G, Banaszak L J. Crystal structure of *Escherichia coli* malate dehydrogenase: a complex of the apoenzyme and citrate at 1.87 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 1992, **226**: 867-882
- [17] Rozema D, Gellman S H. Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry*, 1996, **35**: 15760-15771
- [18] Bryan C T, Mary F J, Mark T F. A comparison of the GroE chaperonin requirements for sequentially and structurally homologous malate dehydrogenases. The importance of folding kinetics and solution environment. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276** (48): 44541-44550