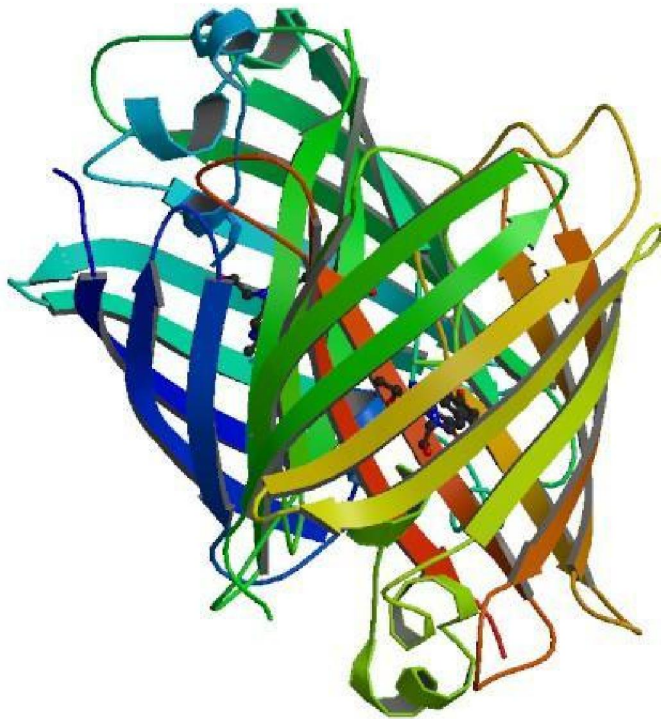


# 第十章 蛋白质复性

## Protein Refolding



# 本章内容

- **10.1 包含体的形成和性质**
- **10.2 包含体的纯化和溶解**
- **10.3 蛋白质复性**

# 10.1 包含体的形成和性质

## 一、包含体

重组蛋白质的高表达导致其在胞内发生错误折叠和聚集，形成的蛋白质聚集体称为包含体 (inclusion body)。

蛋白质，大部分为基因表达产物

一级结构正确，立体结构错误，没有生物活性

蛋白质的体外再折叠或复性

回收，溶解，恢复天然构型

## 二、包含体的形成

- 一般认为包含体的形成是部分折叠的中间态之间疏水性相互作用的结果，主要原因是蛋白质本身具有易于聚集沉淀的性质，或表达产物周围的物理环境（如温度、离子组成）不适或缺少某些折叠辅助因子（如分子伴侣）的作用。

包含体的形成是蛋白质过量表达的结果，而与蛋白质的种类和表达系统无关。即包含体的形成与其相对分子质量、疏水性以及折叠途径等内在性质没有必然的联系。

## 二、包含体的性质

- 高密度蛋白质聚集体，通常位于细胞质中，**主要成分为基因表达产物。**

以包含体形式表达重组蛋白具有如下优势：

- (1) 包含体蛋白质主要在以大肠杆菌为宿主细胞的原核细胞表达系统中形成，而大肠杆菌生长速度快，易于高密度培养，**有利于大规模生产目标蛋白质；**
- (2) **包含体蛋白质的表达量都很高；**
- (3) **利于后续分离纯化；**
- (4) 包含体内的目标蛋白不易被蛋白酶水解；
- (5) **解除目标蛋白对宿主细胞的毒害或杀伤作用。**

### 三、包含体的体内抑制

- 有些蛋白质很难进行体外复性，特别是相对分子质量较大、结构复杂和含有较多二硫键的蛋白质。

#### 抑制包含体的形

成：

降低细胞培养温度；将目标蛋白质与分子伴侣蛋白、折叠酶和二硫键异构酶共表达；使用非代谢性碳源降低代谢速度和蛋白质表达量；将目标蛋白质与亲水性蛋白质融合表达。

## 10.2 包含体的纯化和溶解

- 蛋白质复性包括：**包含体的分离纯化、包含体的溶解和复性等步骤。**

## 一、包含体的分离纯化

- **回收和纯化（一般方法）：**
- **（1）细胞破碎**
- **（2）离心沉降回收包含体**
- **（3）粗包含体的洗涤（螯合剂、低浓度变性剂、表面活性剂）**
- **（4）离心沉降回收包含体**
- **（5）根据需要，重复上述步骤（3）和（4），直至达到满意的包含体纯度。**



## 二、包含体的溶解

- **溶解**

**变性剂：**

5 ~ 8mol/L 盐酸胍、8mol/L 尿素

硫氰酸盐、表面活性剂（十二烷基磺酸钠，十六烷基三甲基氯化胺等）

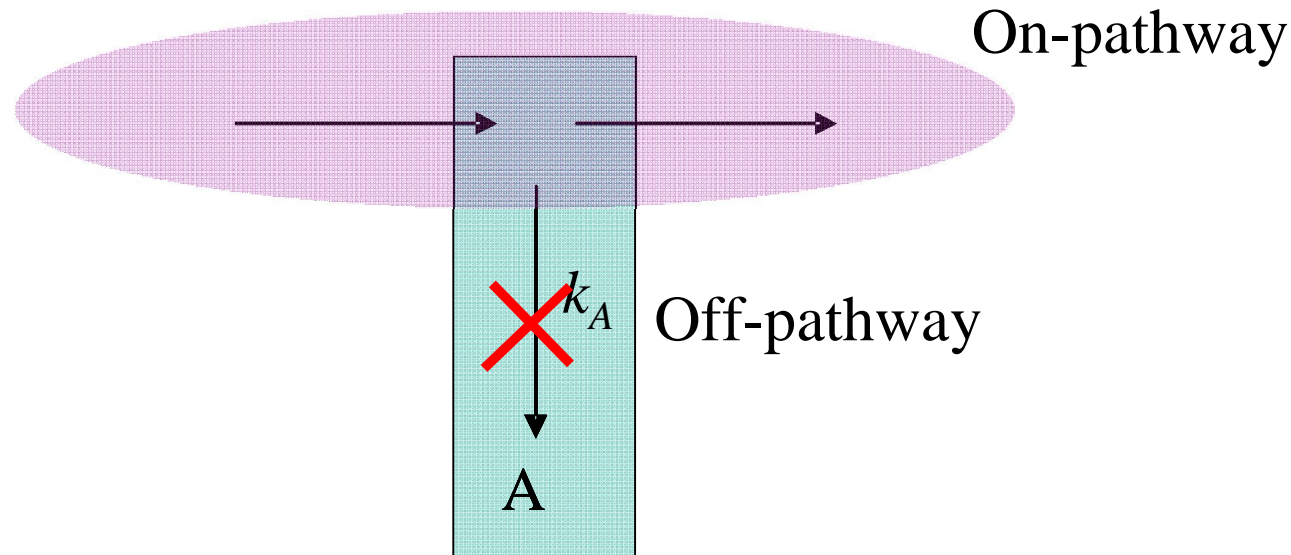
**还原剂：**

1 ~ 100 mmol/L 的二硫苏糖醇；

1 ~ 200 mmol/L 的  $\beta$ -巯基乙醇或半胱氨酸

## 10.3 蛋白质复性

I 分子内折叠和分子间聚集的动力学竞争过程。



∅ 蛋白质体外复性的主要挑战：

创造适宜的复性**操作条件**，促进正确折叠、抑制聚集体生成，提高复性收率。

## 主要影响因素

- | 变性剂浓度（脲、盐酸胍）
- | 氧化还原剂浓度、比例
- | pH
- | 蛋白质稳定剂（甘油、海藻糖...）
- | 蛋白质浓度
- | 杂质种类和含量
- | 变性剂浓度（脲、盐酸胍）
- | 蛋白质聚集抑制剂（聚乙二醇、表面活性剂...）
- | 盐的种类、浓度
- | 混合效率
- | 温度

# 体外复性研究的核心问题

## 1、模仿体内蛋白质折叠过程：

构建适于蛋白质正确折叠的环境，设计能够促进蛋白质正确折叠、抑制折叠中间体聚集的折叠助剂

## 2、发挥体外折叠的独特优势：

构建体内不可能存在的独特环境，实现高效复性和分离纯化：

色谱、反胶团、膜、双水相系统、沉淀……

## 4.1 稀释复性

- 降低变性蛋白质溶液中变性剂的浓度，创造适宜的氧化还原环境（氧化还原电位），可引发蛋白质折叠复性；
  - 基本条件：
    - 变性剂浓度：
      - 盐酸胍  $< 2 \text{ mol/L}$
      - 脲  $< 4 \text{ mol/L}$
    - GSH/GSSG  $4/0.4 \text{ mmol/L} \sim 5/5 \text{ mmol/L}$
- (例)

ü 直接稀释、透析、流加

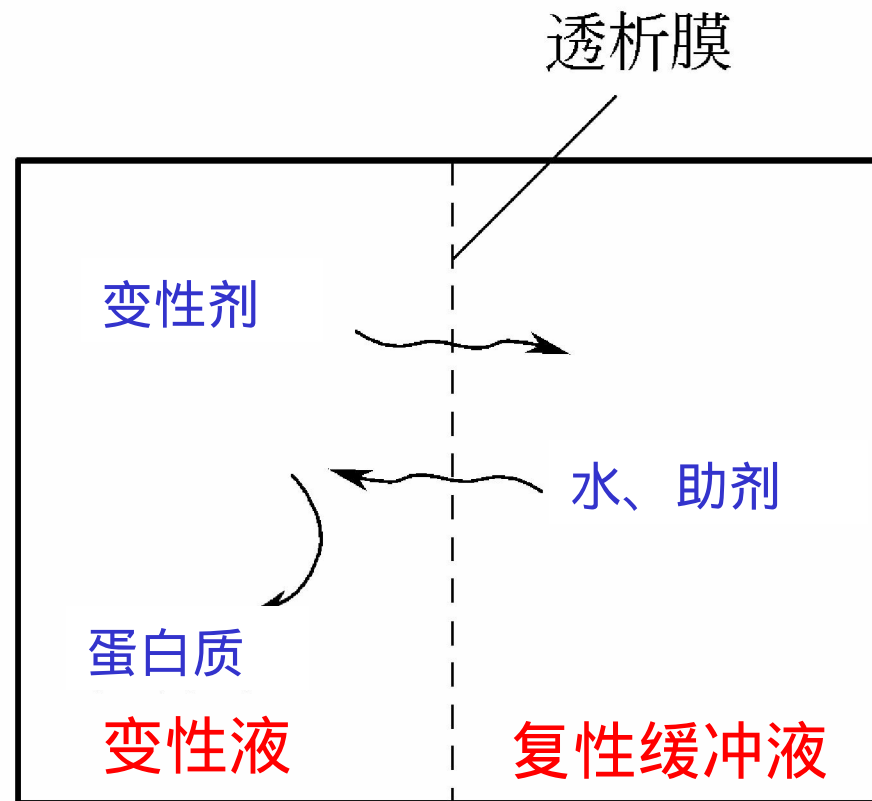
## ■ 直接稀释 ( Direct dilution )

- u 将少量变性蛋白质溶液直接加入到较大体积的复性缓冲液中，变性剂浓度降低，蛋白质开始复性；
- u 蛋白质浓度一定的条件下，稀释倍数和混合效率是影响复性收率的重要因素。

达到完全混合前的几秒钟时间内，不均匀混合造成局部高浓度区，聚集体生成速度快

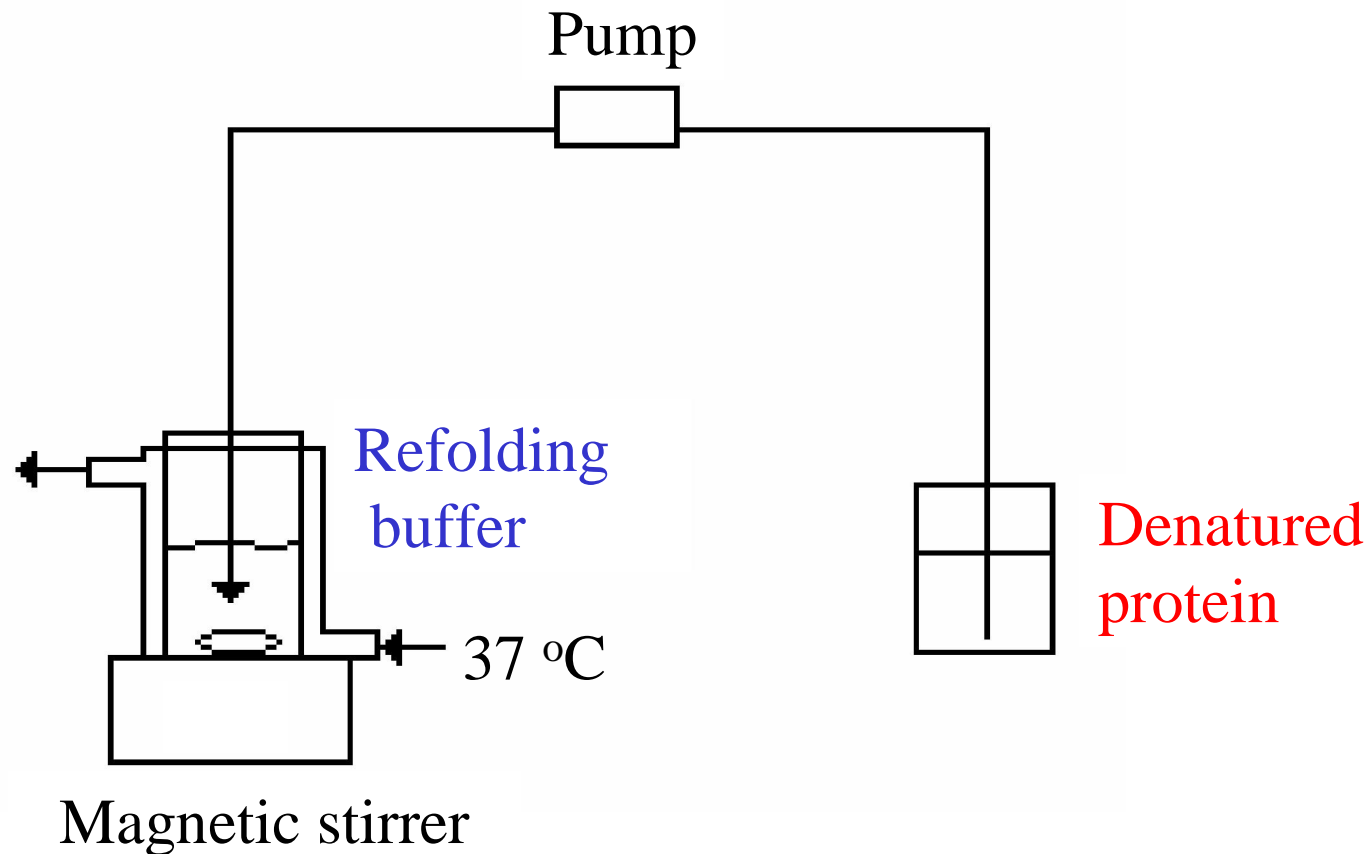
## ■ 透析稀释 (Dilution by dialysis) :

变性蛋白质溶液中，变性剂浓度降低（小分子折叠助剂浓度增大），蛋白质开始复性。



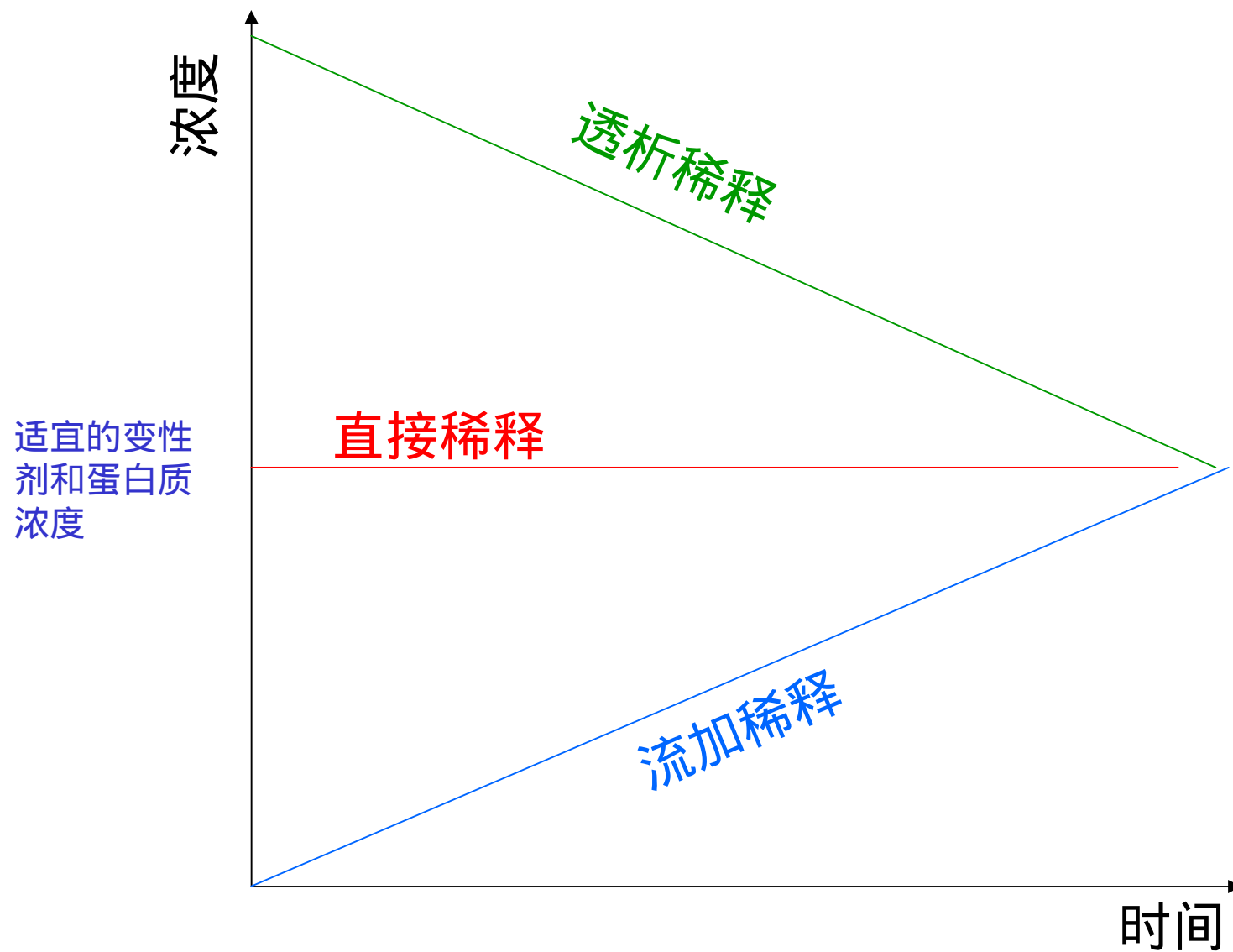
## ■ 流加稀释复性 ( Fed-batch dilution )

复性液中蛋白质初始浓度 = 0。边流加、边复性。  
故变性蛋白质浓度始终保持在较低水平，有利于  
提高复性收率，且终浓度较高。





# 复性操作过程中蛋白质/变性剂浓度的变化



# 蛋白质复性特点 - 稀释复性小结

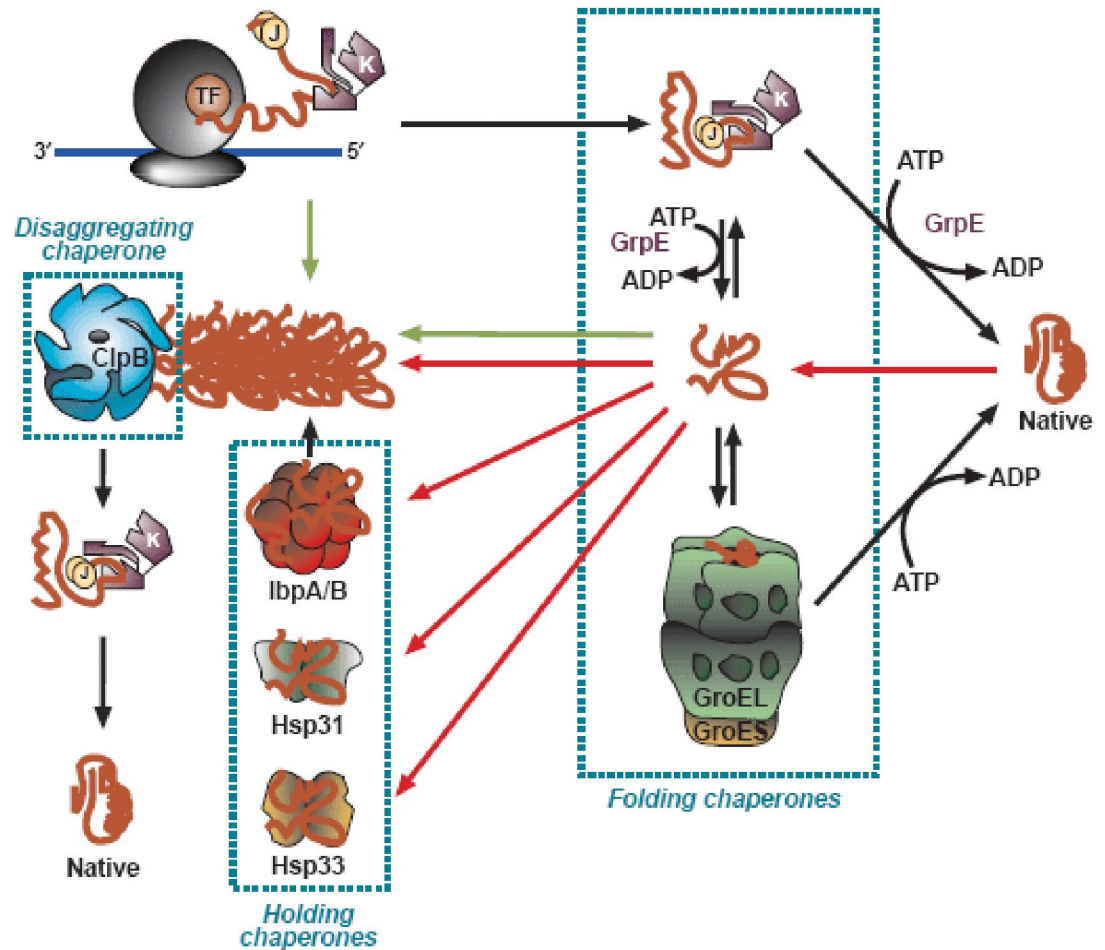
- 低浓度下进行复性操作有利于提高活性收率；
- 浓度提高则聚集体生产速度加快，复性收率下降；
- 流加复性有利于实现高浓度下的高收率复性；
- 存在适宜的变性剂浓度，使复性收率最大；
- 抑制聚集体的生成，是提高复性收率的关键！

## 4.2 辅助复性

- 折叠中间体之间的疏水性相互作用是聚集的主要原因。
- 可利用小分子添加剂抑制此疏水性相互作用。
- 在辅助因子或折叠助剂存在下的复性过程：  
在稀释复性或其他复性操作中，添加折叠助剂，抑制聚集体生成和/或促进折叠，提高复性收率。
- 体内蛋白质折叠在各种辅助因子存在下进行，因此体外蛋白质辅助复性是模拟体内复性过程的基本形式。

# *In vivo* protein folding

体内折叠：  
是在一系列折叠酶、分子伴侣和水解酶的辅助下完成的。



# 折叠助剂 ( Folding aids )

- I 蛋白质体内折叠是在各种折叠调解因子 ( modulators ) 和蛋白酶的共同作用下完成的 ;
- I 调解因子 : 分子伴侣 ( chaperones) 和折叠酶 ( foldases )

# 折叠酶、蛋白水解酶

I 折叠酶：

沿着折叠路径，促进限速步骤的折叠速度

肽基脯氨酰基顺反异构酶

二硫键异构酶

蛋白酶：水解错误折叠产物，实现质量控制

# 体外蛋白质复性的策略

| 体外复性应模仿体内折叠过程。

但难度极大！

| 主要方略：

调解氧化还原环境（电位），采用各种辅助因子（**稀释添加剂**、多孔色谱介质、反胶团，等等）

表 1 具有辅助蛋白质复性作用的稀释添加剂  
( 1 )

低浓度变性剂:
盐酸胍 (0.5 ~ 2 mol/L)
尿素 (1 ~ 4 mol/L)
L-精氨酸 (0.5 ~ 1 mol/L)、氨基酸乙脂
表面活性剂:
聚乙二醇 (polyethylene glycol, $M_r$ 3550)
Triton X-100
十二烷基磺酸钠 ( SDS )
十六烷基三甲基溴化胺 ( CTAB )
月桂醇麦芽糖苷 (lauryl maltoside)
Tween
磷脂 (phospholipids)



表 1 具有辅助蛋白质复性作用的稀释添加剂  
( 2)

糖类:
海藻糖、蔗糖、葡萄糖
环糊精 ( cyclodextrin, $\alpha$ -CD)
乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl glucosamine)
醇类:
甘油 (glycerol)
正戊醇 (n-pentanol)
正己醇 (n-hexanol)
环己醇(cyclohexanol)

表 1 具有辅助蛋白质复性作用的稀释添加剂  
( 3 )

其他有机小分子化合物:
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)
丙酮acetone
乙酰胺 (acetamide)
肌氨酸 (sarcosine)
硫脲 (thiourea)
硫化甜菜碱 (sulfobetaines)
无机盐:
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , LiCl, NaCl, $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , $\text{K}_2\text{SO}_4$

# 添加剂的两种作用

1、稳定天然蛋白质结构，降低错误折叠蛋白质的稳定性：

甘油、海藻糖、蔗糖、甜菜碱

2、提高折叠中间体或折叠肽链的溶解度（稳定性）：

变性剂、表面活性剂、精氨酸、丙酮...

## 辅助复性的特点和需要注意的6个问题

- 1、 添加剂辅助蛋白质复性的作用具有选择性；
- 2、 对于那些稳定折叠中间体或伸展肽链的添加剂，其辅助作用在一定的浓度范围内有效，即存在最佳浓度或浓度范围；
- 3、 添加剂的最佳浓度或浓度范围与蛋白质种类和浓度有关。

## 辅助复性的特点和需要注意的问题

- 4、添加剂在抑制聚集体生成的同时，也会抑制蛋白质的折叠复性，造成折叠速率降低。故需要延长复性操作时间；
- 5、若利用盐酸胍或尿素溶解包含体，应首先考虑通过调节盐酸胍或尿素的浓度来获得满意的复性效果；
- 6、选择表面活性剂类添加剂时，必须考虑在后续纯化过程中的去除问题。

## 4.3 分子伴侣和人工伴侣辅助复性

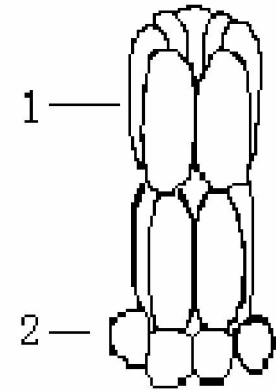
### 一、分子伴侣

- 分子伴侣在体内和体外都具有抑制蛋白质伸展肽链错误折叠和聚集、促进肽链折叠成天然活性肽的作用。
- 利用纯化的分子伴侣和/或折叠酶（单独/共同）作用，辅助蛋白质体外复性。
- 直接模拟*in vivo* folding的复性方法。

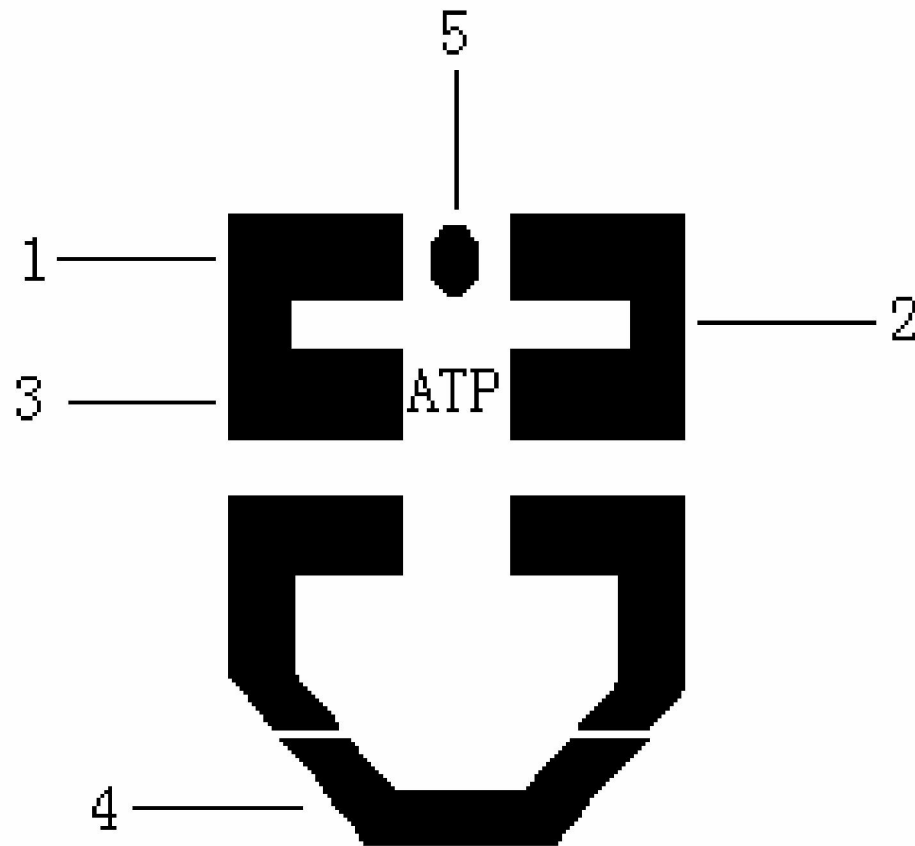
# 应用于体外复性的分子伴侣

## GroEL/ES系统：

- GroEL - 分子量60kD亚基（547aa）构成的14聚体，双层饼状。直径约14nm，高16nm，柱体的中央有一疏水空腔，直径大约4-6nm
- GroES - 分子量16kD亚基构成的7聚体，单层饼状
- ATP驱动GroEL/ES解离，释放底物蛋白质（折叠中间体）



# GroEL/ES的结构和作用



1. 顶端区
2. 中间区
3. 赤道区
4. GroES
5. 底物蛋白质



# 体外分子伴侣的应用

(1) 超滤回收分子伴侣

(2) 固定化分子伴侣

例：

- 固定化DanK，在ATP存在下可使基因重组抗毒素蛋白质的复性收率提高一倍；
- GroEL固定在用抗GroEL抗体衍生的载体，在ATP和GroES的协助下，可使谷氨酸合成酶正确折叠。

## 多种分子伴侣的联合应用

- U 将16.7kD的GroEL片段、DsbA、PPI等三种分子陪伴固定Sepharose 凝胶，使94%的蝎毒蛋白Cn5达到100%的复性。
- U 在自发条件下，绝大部分的（超过95%）的蛋白均聚集生成沉淀。
- U GroEL片段防止蛋白聚集；DsbA二硫键异构酶；PPI=肽基-脯氨酰基顺反异构酶

### (3) 固定化分子伴侣色谱

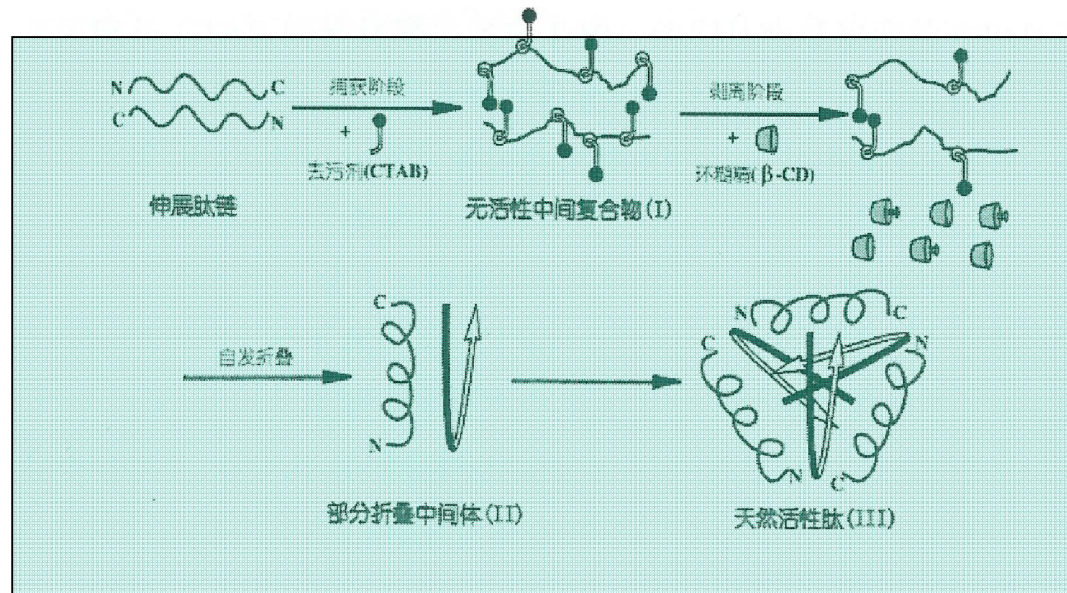
- 小分子伴侣（GroEL片断）的固定化色谱
- 完整GroEL的固定化色谱

## 应用限制

- 分子伴侣本身为蛋白质，应用成本较高。
- 在通常的操作条件下分子伴侣仅对低浓度蛋白质的辅助效果较好。

## 二、人工分子伴侣

- 模仿GroEL/ES的作用机理，即变性蛋白质/折叠中间体的捕获 - 释放机理辅助蛋白质折叠复性
- 人工伴侣系统：CTAB/beta-CD



## 人工伴侣：提高复性收率

CTAB (mmol/L)	-CD (mmol/L)	$k_N$ (min <sup>-1</sup> )	$k_A$ (ml <sup>2</sup> mg <sup>-2</sup> min <sup>-1</sup> )	Yield <sup>b</sup> (%)
0	0	0.047	0.365	61
1.2	4.8	0.077	0.284	74
2.4	9.6	0.092	0.199	85

<sup>a</sup> GdmCl concentration in the final refolding system was kept at 0.7 mol/L in all experiments.

<sup>b</sup> Refolding yield at lysozyme concentration of 0.6 mg/mL.

## 人工伴侣和盐酸胍具有协同作用：

Lys (mg/ml)	GdmCl (mol/L)	$k_N$ (min <sup>-1</sup> )	$k_A$ (ml mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$k_N/k_A$ (mg/ml)	Yield (%)
0.6	0.28	0.148	2.97	0.050	45.2
	0.7	0.077	0.284	0.27	74.3
	0.88	0.066	0.051	1.29	92.0
	1.84	0.017	0.024	0.71	86.7
1.05	0.5	0.11	2.3	0.048	28.6
	0.7	0.077	0.284	0.27	55.1
	1	0.025	0.001	25	98.6
	2	0.019	0.068	0.28	55.8

<sup>a</sup> CTAB and -CD concentrations were 1.2 mM and 4.8 mM, respectively.

## 4.4 复性色谱

Refolding chromatography

On-column protein refolding

Protein refolding in chromatographic beds

- ü 在色谱柱内进行的复性过程

- ü 复性和分离（部分纯化）同时进行



凝胶过滤（尺寸排阻）色谱

吸附色谱：

离子交换色谱

金属螯合色谱

疏水性相互作用色谱

固定化辅助因子色谱（分子伴侣）

## 金属螯合色谱：

- 亲和吸附聚组氨酸融合蛋白的His-tag, 不影响蛋白质主体的折叠。
- 亲和吸附，分离选择性高

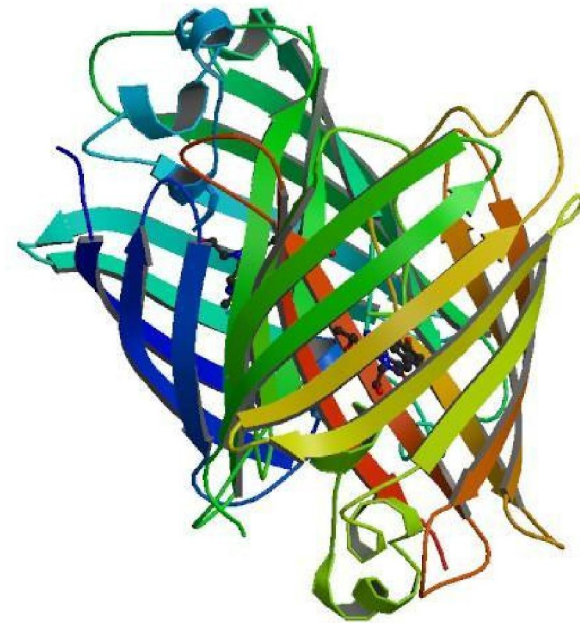
## GFP复性：

直接稀释

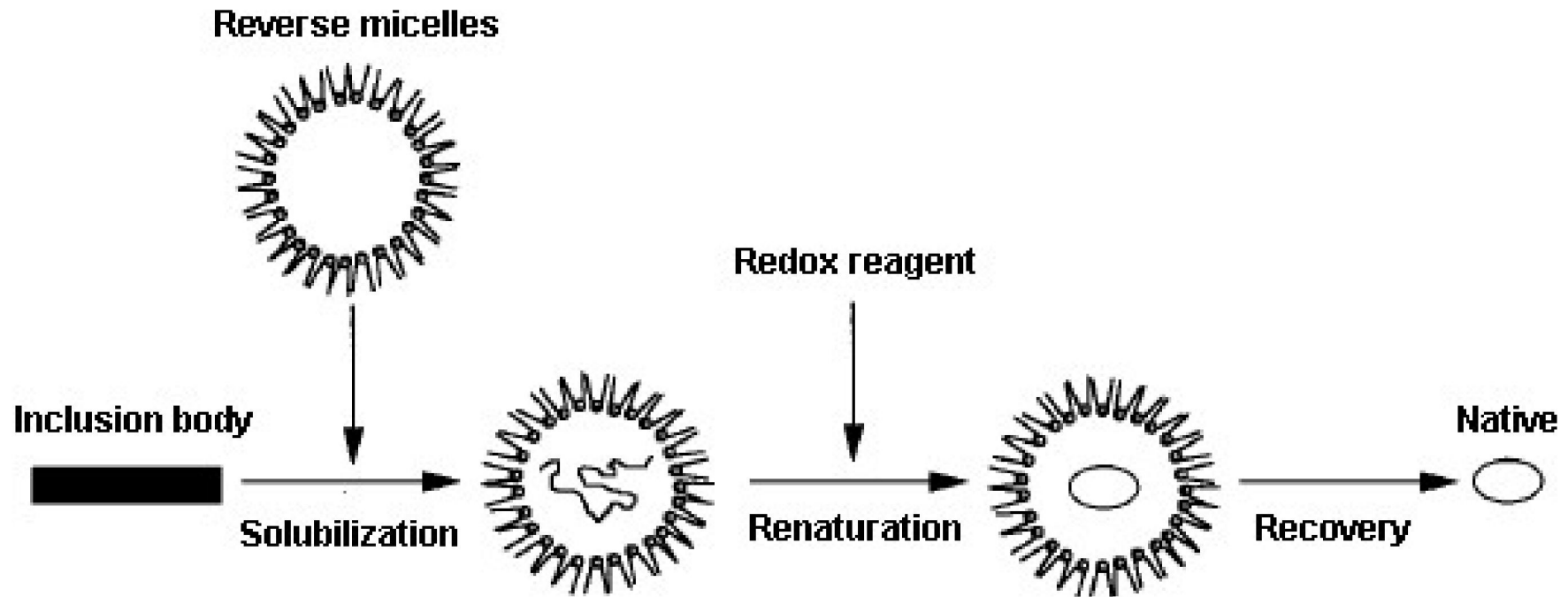
人工伴侣辅助（AC）

IMAC

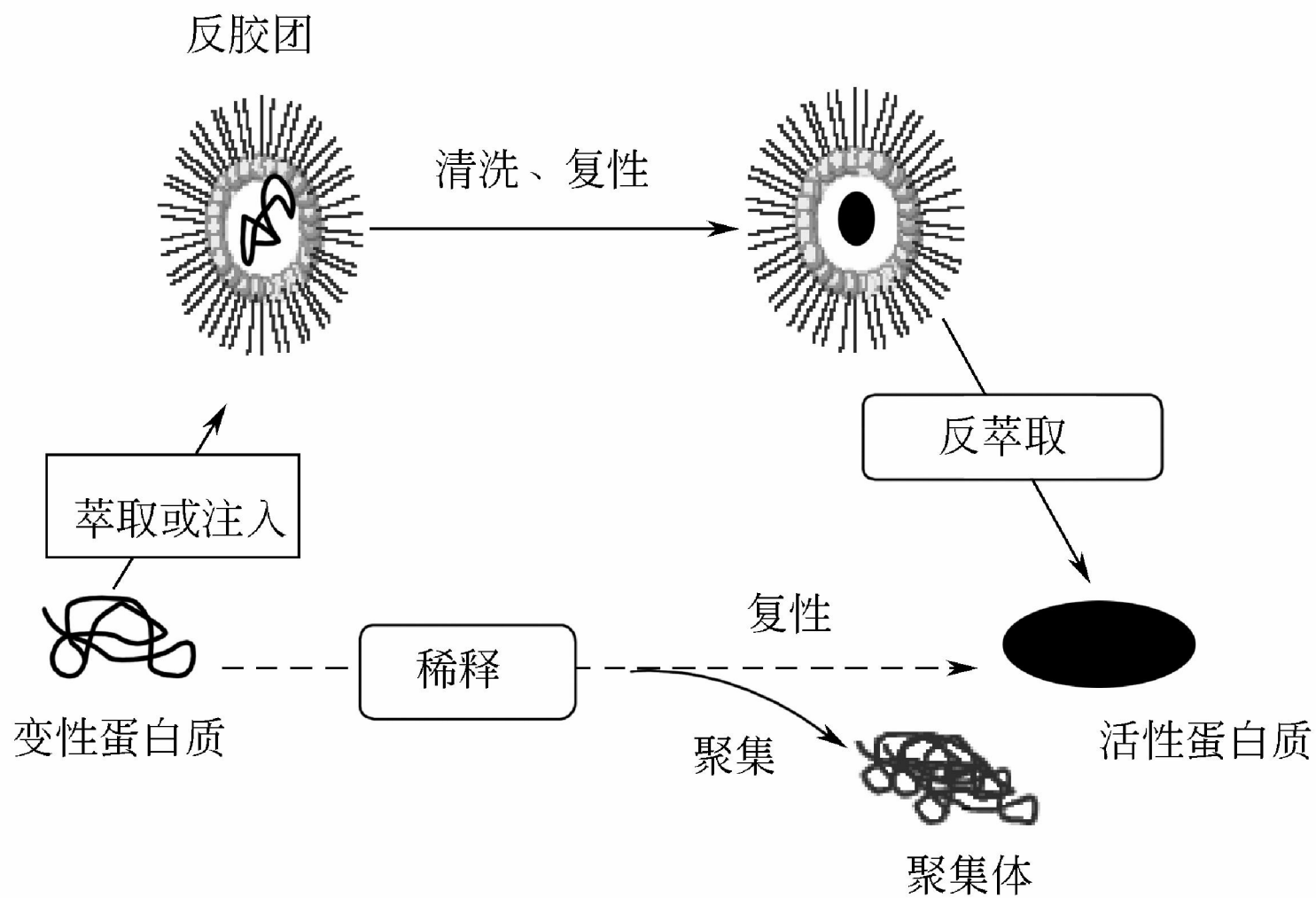
AC-IMAC



## 4.5 反胶团介导复性



Protein refolding in reverse micelles



## 反胶团辅助复性与稀释复性的比较

## 反胶团的作用

- ⊖ 将变性蛋白质分子彼此分隔开来，阻止分子间相互作用，提高复性收率；
- ⊖ 反胶团萃取 - 复性，实现目标蛋白质分离与复性的集成。

# 反胶团介导复性：困难和挑战

ρ AOT-based reverse micelles :

问题：

萃取率低；

反萃取困难，需要用冷丙酮沉淀。

ρ 非离子型表面活性剂反胶团

问题：萃取率低。

# 反胶团介导复性：困难和挑战

ρ 新型反胶团系统的研究，是实现反胶团萃取复性技术实际应用的关键。

ρ 亲和反胶团系统

高容量、选择性萃取：高容量分离 - 复性

色素亲和反胶团

金属螯合亲和反胶团

# 本章思考题

- 1、什么是包含体，其形成原因？
- 2、蛋白质复性包括哪几个步骤？
- 3、常用的复性方法有哪些？
- 4、添加剂在蛋白质复性中的主要作用？
- 5、稀释复性的操作模式可以分为？
- 6、辅助复性的特点及注意的问题？