

高效疏水作用色谱法对还原变性溶菌酶的折叠研究

王 彦, 耿信笃

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

摘要 :首次用高效疏水相互作用色谱(HPHIC)研究了还原变性溶菌酶(Lys)的复性。对还原变性 Lys 在 3 种疏水性不同的色谱柱上的复性情况进行了考察,发现还原变性 Lys 在疏水性最弱的 XDM-GM1 型色谱柱上的复性效率最高,当 Lys 质量浓度为 2.0 g/L 时,其复性效率可达到 94.6%。

关键词 还原变性 溶菌酶 高效疏水色谱 蛋白质折叠

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2003)03-0218-04

Refolding of Reduced/Denatured Lysozyme by High Performance Hydrophobic Interaction Chromatography

WANG Yan, GENG Xindu

(Shaanxi Key Laboratory of Modern Separation Science, Institute of Modern Separation Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract : This is the first report on successful refolding of reduced/denatured lysozyme(Lys) by using hydrophobic interaction chromatography(HIC) with the presence of reduced and oxidized glutathione in the mobile phase. The comparison between three stationary phases of different hydrophobicity, such as polyethylene glycol, tetramethylene glycol and phenyl, was made. The highest bioactivity yield, 94.6% was obtained from the least hydrophobic HIC column, at the loading of Lys concentration of 2.0 g/L. The effects of urea on the renaturing and mass recovery of reduced/denatured Lys were investigated. The recovery of protein mass was found to be independent of the concentration of urea. However, the activity of the protein increased with the urea concentration lower than 4.0 mol/L, and decreased with the urea concentration higher than 5.0 mol/L. The rationale was discussed in detail.

Key words : reduced/denatured; lysozyme; high performance hydrophobic interaction chromatography; protein refolding

1991 年,耿信笃等首次将高效疏水相互作用色谱(high performance hydrophobic interaction chromatography, HPHIC)用于重组人干扰素- γ (rhIFN- γ)的复性及同时纯化^[1],1992 年又将 HPHIC 和尺寸排阻色谱(size exclusion chromatography, SEC)用于其他几种目标蛋白质的复性^[2,3]。但是这些目标蛋白质的变性方式均为非还原变性,即不打破蛋白质中二硫键的变性状态。由于 95% 的蛋白质都含有二硫键,当蛋白质变性时采用还原变性方式,即打破蛋白质中二硫键的变性方式,复性时必须使二硫键正确配对才能维持其天然结构。对于含有多个半胱氨酸(Cys)的重组蛋白质,二硫键的正确配对是其具有生物活性的前提^[4]。在基因工程中,真核生物基因在原核细胞大肠杆菌(*E. coli*)中表达时,由于

原核生物表达系统无法进行特定的翻译后修饰,如形成正确的二硫键、蛋白质的糖基化及磷酸化等,导致在大肠杆菌中生产的真核生物蛋白质没有生物活性^[5]。所以重组蛋白质在复性过程中必然要涉及到二硫键的正确对接问题。因为不打破二硫键的非还原变性与还原变性的变性方式不一样,从而造成了复性方法和复性效率截然不同。如溶菌酶(Lys)含有 4 对二硫键,还原与非还原变性 Lys 的复性过程和机理差别很大。还原变性 Lys 分子间容易聚集,因涉及分子内二硫键的对接使折叠速率变慢(τ 为 15~20 min),其折叠机理至少是一个三态折叠机理,而非还原变性 Lys 分子间不易聚集,折叠速率较快(τ 为 15~20 s),一般认为其折叠过程遵循二态折叠机理^[6]。非还原变性的溶菌酶在蛋白质浓

收稿日期 2003-02-17

作者简介 王彦,女,1971 年生,博士。

通讯联系人 耿信笃 教授,博士生导师, Tel/Fax (029)8303817, E-mail xdgeng@nwu.edu.cn.

基金项目 国家自然科学基金资助项目(批准号 20175016)。

度达到 1 g/L 时不会产生任何的聚集,几乎可以得到 100% 的活性回收率;而还原变性的溶菌酶即使蛋白质浓度低到 50 mg/L,也会产生聚集^[7],其中二硫键的形成是折叠的限速步骤^[8]。

本文以还原变性的 Lys 为目标蛋白质,首次用疏水色谱法对其实现了复性,并对疏水性不同的 3 种固定相对复性的影响进行了讨论。

1 实验部分

1.1 试剂

溶菌酶(lysozyme, Lys, 美国 Sigma 公司),还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH, 西安华美生物工程公司),氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG, 西安华美生物工程公司),二硫苏糖醇(DTT, 从美国 Amresco 公司进口),硫酸铵(分析纯, 天津石英钟厂霸州市化工分厂),三羟甲基氨基甲烷(Tris, 分析纯, 北京益利精细化学品有限公司),脲(urea, 分析纯, 成都金山化工试剂厂),乙二胺四乙酸(EDTA, 分析纯, 天津市肋特吉尔环保技术研究所),考马斯亮兰 G-250(Fluka 公司)。

1.2 装置

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-可见波长检测器,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);UV-1601PC 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

1.3 还原变性 Lys 的制备

将 20 mg 天然 Lys 溶解在 8.0 mol/L 脲变性溶液(其组成为 0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.5, 8 mol/L 脲, 1 mmol/L EDTA, 0.15 mol/L DTT)中,于 40 °C 水浴中恒温 3 h,用 1 mol/L HCl 调其 pH 为 3.0,用 0.1 mol/L 醋酸透析过夜,冷冻干燥^[9]。

1.4 高效疏水色谱柱的制备

按文献[10, 11]的方法,由本实验室合成硅胶基质的 3 种不同端基的高效疏水型色谱填料, XDF-GM1(聚乙烯型,其相对分子质量为 600), XDF-GM2(糠醇型,其相对分子质量为 102.14), XDF-GM3(苯基型,其相对分子质量为 78)。按文献[12]的方法在 100 mm × 4.0 mm i.d. 不锈钢色谱柱管内装入上述 3 种填料,制得高效疏水色谱柱。

1.5 用疏水色谱复性还原变性的 Lys

色谱条件:流动相 A, 1.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) + 1 mmol/L EDTA +

(0~5.0) mol/L 脲 + 3 mmol/L GSH/0.6 mmol/L GSSG; 流动相 B, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) + 1 mmol/L EDTA + (0~5.0) mol/L 脲 + 3 mmol/L GSH/0.6 mmol/L GSSG。所有色谱过程均在室温下进行。检测波长 280 nm。还原变性的 Lys 直接进样至已平衡好的疏水色谱柱中,线性梯度(0% B $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 100% B)洗脱后收集含有 Lys 的洗脱液,在室温下放置 4 h,然后测定洗脱液的酶活性。

1.6 紫外分光光度法测定蛋白质浓度

通过测定 280 nm 处的紫外吸收来测定蛋白质浓度。当光程长度为 1 cm 时,天然 Lys 和还原变性 Lys 的摩尔吸光系数分别为 2.63 和 2.37^[13]。

1.7 Bradford 法^[14]测定蛋白质含量

根据 Bradford 法,以考马斯亮兰 G250 染料来测定蛋白质在 595 nm 处的吸收。

1.8 Lys 活性的测定

取溶壁球菌干菌粉少许,加入少量 0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.2),用玻璃棒搅匀,再加入磷酸盐缓冲液调至其光密度值为 0.5~0.7(波长为 450 nm 时)即可。用移液管称取 3.0 mL 配制好的溶壁球菌液于比色皿中,加入一定量的 Lys 溶液(加入的酶量应控制在实验测得的标准曲线的线性范围内),迅速摇匀,以蒸馏水为参比,在 450 nm 波长下每隔 20 s 测一次吸光值(A),共测定 3 min,以 A 对时间 t (min)作图,取最初线性部分,其斜率为每分钟 A 的减少值,代入实验测得的标准曲线,求得活性回收率^[15]。

2 结果与讨论

疏水色谱是一种溶质在高浓度的盐溶液中保留、低浓度的盐溶液中被洗脱的色谱模式。它的复性原理为:含有疏水基团的 HPHIC 固定相可与变性蛋白质分子作用,并形成蛋白质-配基配合物,从而防止了变性蛋白质分子形成聚集或沉淀。其次,变性蛋白质分子能够通过加入其他化学试剂或改变环境使其从该配合物中释放出来而折叠。这个方法对于非还原变性蛋白质的复性是非常成功的^[16]。但对于二硫键被打断的还原变性蛋白质来说,由于还原变性蛋白质疏水基团充分暴露,疏水性非常强,还原变性蛋白质在进样过程中,或在样品溶液与流动相混合过程中,未与固定相接触之前就可能形成了聚集体。如果变性蛋白质与固定相接触之前形成聚集体或沉淀,就会在样品环中或色谱柱的顶端产生聚集。所以强疏水性的还原变性蛋白质在疏水色谱上的复性一直没有成功。

在本研究中,我们采取 4 种方式来实现还原变性的 Lys 在疏水色谱上的复性。一是降低通常在疏水色谱中使用的盐流动相的浓度(从通常使用的 3.0 mol/L 硫酸铵降为 1.0 mol/L 硫酸铵);二是在流动相中加入脲来增加还原变性 Lys 的溶解度;三是在流动相中加入还原型及氧化型谷胱甘肽以有助于二硫键的正确对接;四是用不同疏水性的色谱柱来

增加其复性效率。还原变性 Lys 在 3 种不同端基的疏水色谱柱上的保留顺序为:XDF-GM1(聚乙烯型) $<$ XDF-GM2(糠醇型) $<$ XDF-GM3(苯基型),所以这 3 种色谱柱的疏水性强弱顺序为 XDF-GM1(聚乙烯型) $<$ XDF-GM2(糠醇型) $<$ XDF-GM3(苯基型)。图 1 是 Lys 在这 3 种疏水性色谱柱上脲浓度对其活性及质量回收率的影响。

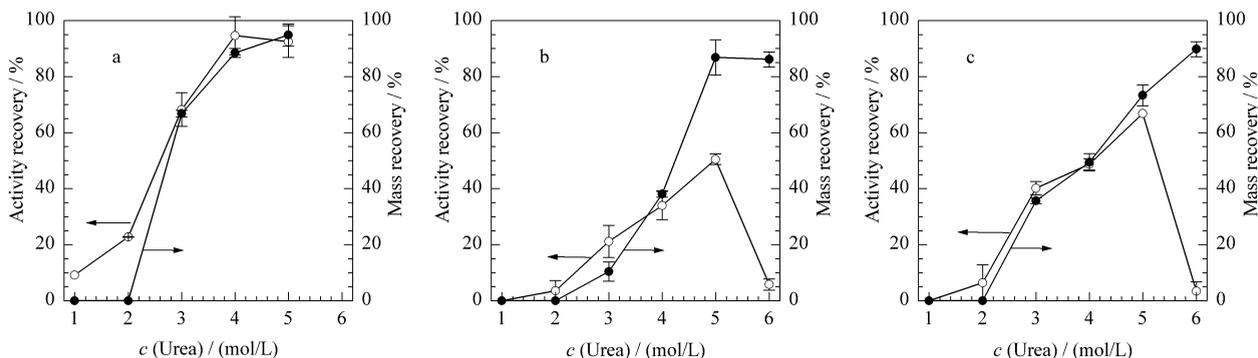


图 1 流动相中脲浓度对还原变性 Lys 在 3 种疏水性不同的色谱柱上活性回收率及质量回收率的影响

Fig. 1 Effects of urea concentrations in the mobile phase on bioactivity and mass recovery of reduced/denatured Lys on three columns with different hydrophobicities

a. XDF-GM1 column; b. XDF-GM2 column; c. XDF-GM3 column.

Conditions: Lys initial concentration, 2.0 g/L; mobile phase A, 1.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) + 1 mmol/L EDTA + 3 mmol/L GSH/0.6 mmol/L GSSG + (0-5.0) mol/L urea; mobile phase B, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) + 1 mmol/L EDTA + 3 mmol/L GSH/0.6 mmol/L GSSG + (0-5.0) mol/L urea; linear gradient elution: 0% B $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 100% B; flow rate, 1 mL/min.

从图 1 看出,在 3 种不同疏水性端基的色谱柱上 Lys 的质量回收率均随脲浓度的增加而增加。在疏水色谱中,一方面脲是一种常用的流动相添加剂,它可以通过降低流动相的极性使蛋白质的保留值减小,降低非特异性吸附;另一方面脲可以增加还原变性蛋白质在其中的溶解度,所以在 3 种疏水性不同的色谱柱上其质量回收率均随脲浓度的增加而增加。在 3 种疏水色谱柱上,当脲浓度低时,还原变性 Lys 的活性回收率均随脲浓度的增加而增加;当脲浓度高时,还原变性 Lys 的活性回收率却随着脲浓度的增加而降低。XDF-GM1 型色谱柱的最大活性回收率出现在脲浓度为 4.0 mol/L 时,XDF-GM2 和 XDF-GM3 的最大活性回收率出现在脲浓度为 5.0 mol/L 时。当脲浓度较低时,其活性回收率随脲浓度的变化趋势与质量回收率的变化趋势相似。所以,用 HIC 复性 Lys 时,当脲浓度低时,活性回收率的损失主要源于质量回收率的损失。在一般情况下,用稀释法复性蛋白质时,脲浓度为 2.0 mol/L 的复性效率最高^[17],高浓度的脲则成为一种失活剂,使折叠效率降低,这是因为在折叠态与失活态之间存在一个平衡,当有高浓度的脲存在时,它与蛋白质的结合占了上峰,从而推动平衡向失活方向进行。但从图 1 的结果可看出,用 HIC 法复性还原变性的 Lys 时,当脲浓度高于 2.0 mol/L 时,与一般的稀释

法相比^[17],还原变性 Lys 的复性效率并没有随脲浓度的增加而降低,这是由于流动相中有硫酸铵存在。硫酸铵是一种能够稳定天然蛋白质构象的盐。在较高浓度的脲存在下,它可以使蛋白质复性的平衡向天然态移动,从而增加复性效率^[18]。但过高的脲浓度又会打破平衡,使折叠反应向失活态移动,造成复性效率下降。所以,对这 3 种不同疏水性的色谱柱来说,当脲浓度高于 5.0 mol/L 时,其复性效率均呈现下降的趋势。同时也能看出,对于 3 种不同端基的疏水性色谱柱来说,还原变性 Lys 在疏水性最弱的 XDF-GM1 型柱上的活性回收率最高,当流动相中含有 4.0 mol/L 脲和 GSH/GSSG 时,活性回收率为 94.6%。

3 结论

首次用 HIC 实现了还原变性 Lys 的复性。在疏水性最弱的 XDF-GM1 型色谱柱上,当流动相中含有 4.0 mol/L 的脲和氧化还原对 GSH/GSSG,蛋白质质量浓度为 2.0 g/L 时,活性回收率可达 94.6%。

参考文献:

- [1] Geng Xindu, Feng Wenke, Chang Jianhua. High Technology Letters, 1991, 1(7): 1

- 耿信笃,冯文科,常建华. 高技术通讯,1991,1(7):1
- [2] Geng X D, Chang X Q. J Chromatogr, 1992, 59(1-2): 185
- [3] Geng Xindu, Feng Wenke, Bian Liujiao. Chinese Patent, ZL 92 1 02727. 3, 1992
耿信笃,冯文科,边六交. 中国专利, ZL 92 1 02727. 3, 1992
- [4] Shen Tong, Wang Jingyan. Biochemistry. Beijing: China Higher Education Press, 1990. 167
沈 同,王镜岩. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1990. 167
- [5] Qu Lijia, Gu Hongya, Hu Ping, Chen Zhangliang. Introduction to Modern Biotechnology. Beijing: China Higher Education Press and Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998. 217
瞿礼嘉,顾红雅,胡 苹,陈章良. 现代生物技术导论. 北京: 高等教育出版社、施普林格出版社, 1998. 217
- [6] Van den Berg B, Ellis R J, Dobson C M. EMBO J, 1999, 18 (24): 6 927
- [7] Gao Y, Mehta K. J Biochem(Tokyo, Jpn), 2001, 129(1): 179
- [8] Roux P, Delepierre M, Goldberg M E, Chaffotte A F. J Biol Chem, 1997, 272(40): 24 843
- [9] Van den Berg B, Chung E W, Robinson C V, Dobson C M. J Mol Biol, 1999, 290(3): 781
- [10] Chang Jianhua, Geng Xindu, Yin Jianning. Chinese Journal of Chromatography, 1991, 9(4): 263
常建华,耿信笃,殷建宁. 色谱, 1991, 9(4): 263
- [11] Chang Jianhua, Geng Xindu. Chinese Patent, ZL 93103028. 5, 1993
常建华,耿信笃. 中国专利, ZL 93103028. 5, 1993
- [12] Liu Guoquan, Yu Zhaolou. Technology of Columns. Beijing: Chemical Industry Press, 2001. 115
刘国诠,余兆楼. 色谱柱技术. 北京: 化学工业出版社, 2001. 115
- [13] Wetlaufer D B, Johnson E R, Clauss L M. In: Lysozyme. Os-sernan E F, Canfield R E, Reychok S, eds. New York and London: Academic Press, 1974. 269
- [14] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 248
- [15] Goldberg M E, Rudolph R, Jaenicke R. Biochem, 1991, 30 (11): 2 790
- [16] Geng Xindu, Bai Quan. Science in China(Series B), 2002, 45: 655
- [17] Gu Z, Su Z, Janson J C. J Chromatogr A, 2001, 918(2): 311
- [18] Maeda Y, Yamada H, Ueda T, Imoto T. Protein Eng, 1996, 9(5): 461

“第十四次全国色谱学术报告会暨仪器展览会”会议报道(I)

由中国化学会色谱专业委员会、中国分析测试协会色谱学会和中国色谱学会共同举办、江南大学协办的“第十四次全国色谱学术报告会暨仪器展览会”,于2003年4月20日至23日在江苏无锡市成功举行。会议得到了中国化学会、中国分析测试协会、中国色谱学会和中国科学院大连化物所各级领导的大力支持。出席会议的著名色谱专家有卢佩章院士、陆婉珍院士、方肇伦院士及马立人、夏其昌、张玉奎、孙毓庆、武杰、张汉英、牟世芬、盛龙生等多名教授,外国友人、《色谱》国际编委 Dr. R. Stevenson 也特地从美国来中国参加会议。中国化学会色谱专业委员会委员、中国色谱学会理事和《色谱》编委近60人出席。这次会议共收到论文379篇,录用355篇。其中大会报告34篇,色谱基础理论15篇,气相色谱108篇,液相色谱140篇,离子色谱2篇,薄层色谱5篇,毛细管电泳28篇,仪器及其他23篇。与会总人数400人左右。与会代表普遍认为,这次会议反映了我国色谱界当前最高学术水平。

学术交流作为本次会议的主体和基本任务,分3个层次进行,即大会报告、小会报告和大字报(Poster)。今年恰逢色谱发明100周年,为了体现色谱的发展成果,本次会议特地组织了国内外著名色谱学者的34个大会报告,从各个角度反映本学科在生命科学、环境保护、人体健康、食品安全等方面研究的进展,使与会代表能充分了解当前国际上的热点。同时,为保证在有限的时间内,使更多的与会代表有机会把自己的研究成果展示给大家,会议通过大字报的形式对其他论文进行了交流,并在香港岛津(Shimadzu)公司的帮助下,特别设立了“岛津优秀展报奖”。从大字报展的情况来看,无论是版面还是大家的参与性,都比以往有很大的提高。这一交流形式今后要坚持下去。

这次会议既是我国色谱界的学术盛会,又是国内外色谱仪器厂家宣传和推销产品、推广和交流新技术的盛会。参加展览和技术交流的仪器厂商达64家,是历次会议中仪器厂家与会最多的一次。

会议期间还召开了中国色谱学会理事会和常务理事会,这也是中国色谱学会换届后的第一次全体理事会。在这次理事会上选举出了中国色谱学会第四届常务理事、理事长、副理事长,任命了秘书长、副秘书长,聘请了顾问和名誉理事、名誉理事长。

应该说,这次大会开得比较成功。虽然由于SARS的影响,会议不得不提前结束,小会报告未能完成,但在这样的特定环境下有400人参加会议,进一步体现出了色谱学科的繁荣兴旺。会议基本达到了预期目的。相信这次会议在推动我国色谱科学技术的发展中将产生积极的作用。借此机会我们也对支持我们工作的各位与会代表致以最深切的谢意。

(郭蕾 许国旺报道)