



# 离子交换色谱流动相组成对溶菌酶复性的影响

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:**目的 研究了复性缓冲液组成对还原变性溶菌酶复性的影响。方法 用离子交换色谱法对还原变性溶菌酶进行复性。结果 低离子强度的 Tris 缓冲液比高离子强度的 PBS 缓冲液能明显提高复性收率;当复性缓冲液中不含其他种类的盐时,脲浓度为 2.0 mol/L 时复性产率最高;当脲浓度低时,复性缓冲液中含有氯化钠和硫酸铵的复性效果均不如不含这些盐的复性效果;当脲浓度高时,硫酸铵能很好地提高溶菌酶的复性回收率。结论 认为 Hofmeister 效应是造成这些现象的主要原因。

**关键词:**离子交换色谱;复性缓冲液;溶菌酶;脲;盐

**中图分类号:**TQ28.3<sup>+</sup>3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274 X (2004)01-0047-05

蛋白质折叠,即蛋白质分子如何从一条完整的、伸展的多肽链最终形成具有惟一分子构象和生物活性的天然状态的研究是当前蛋白质科学和分子生物学领域的一个热点。从变性蛋白再折叠的一般机制看,再折叠是分子内的一级反应,聚集反应是发生在分子间的二级或高级反应<sup>[1,2]</sup>。为了有效促进再折叠的进行,应尽量降低折叠中间体的浓度,以抑制聚集反应,同时使中间体向天然态的方向折叠,这是重组蛋白再折叠遵循的一般策略。据此,人们提出了许多折叠方法,如传统的稀释法、透析法、超滤法,近年还出现了稀释添加剂法、分子伴侣及人工分子伴侣法和再折叠色谱法(refolding chromatography)。其中,再折叠色谱法是一个应用较多的新蛋白折叠方法。在前文中已经用离子交换色谱成功地复性了还原变性的溶菌酶<sup>[3]</sup>,离子交换色谱固定相和流动相的协同作用使溶菌酶浓度非常高时,可以提高溶菌酶的活性回收率。同时,发现在离子交换色谱中用硫酸铵代替最常用的氯化钠为洗脱剂,且当流动相中含有 4 mol/L 的脲时可以获得最高的活性回收率。本文侧重对离子交换色谱中流动相组成对复性影响的研究。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

溶菌酶(lysozyme, Lys, 美国 Sigma 公司), DTT (华美生物工程公司, 美国 Amresco 公司进口分装), 氯化钠(分析纯, 沈阳化学试剂厂), Tris(分析纯, 北京益利精细化学品有限公司), 脲(urea, 分析纯, 中国成都金山化工试剂厂), 盐酸胍(GuHCl, 分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司), EDTA(分析纯, 天津市助特吉尔环保技术研究所), 考马氏亮蓝 G-250(Fluka 进口分装)。

紫外-可见分光光度计(UV-1601PC, 日本岛津公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 还原变性溶菌酶的制备 20 mg 的天然 Lys 溶解在 8 mol/L 脲变溶液中, 其组成为: 0.1 mol/L Tris-HCl, pH = 8.5, 8 mol/L urea, 1 mmol/L EDTA, 0.15 mol/L DTT; 40℃ 水浴恒温 3 h, 用 1 mol/L HCl 调其 pH 值为 3, 用 0.1 mol/L 醋酸透析过夜, 冷冻、干燥<sup>[4]</sup>, 备用。

1.2.2 稀释法复性 将还原变性的溶菌酶直接稀

收稿日期: 2002-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20175016)

作者简介: 王彦(1971-), 女, 甘肃临洮人, 西北大学博士生, 从事蛋白复性与分离纯化工作。

释到复性缓冲液中,摇匀,室温放置 4 h 后测定其活性。复性缓冲液组成见文中的具体说明。

1.2.3 活性测定 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),用玻棒搅匀,再加入磷酸盐缓冲液调其 A 值为 0.5~0.7 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,加入相同量的 Lys 溶液,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,共读 3 min,以 A 对时间 t 做图,取最初线性部分,其斜率为每分钟 A 的减少值( $\Delta A/\text{min}$ ),代入标准曲线,求得活性回收率<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 缓冲液种类的影响

在蛋白折叠中,复性缓冲液的种类会影响蛋白复性的效果。用稀释法复性时,缓冲液种类对 Lys 复性的影响如表 1 所示,可看出,在磷酸盐缓冲液(PBS)与 Tris 缓冲液中还原变性的 Lys 在稀释复性时,其折叠与聚集行为是显著不同的。当蛋白浓度仅为 0.04 mg/mL 时,PBS 缓冲液严重影响还原变性 Lys 的复性产量,这主要是因为 Lys 折叠不仅受其浓度的影响,而且受缓冲液中离子强度的影响。在高离子强度的缓冲液中,折叠中间体的溶解度会降低,致使中间体会大量地聚集在一起。文献[6]在还原变性 Lys 的复性中,用 Hepes(N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸)缓冲液及 PBS 缓冲液,发现即使蛋白浓度仅为 10  $\mu\text{mol/L}$ ,蛋白在 PBS 缓冲液也会生成大量的聚集体,造成复性产率下降,而在 Hepes 缓冲液中情况就好得多,Hepes 缓冲液的离子强度远小于 PBS 缓冲液。根据表 1 的结果,在本研究中一律采用 Tris-HCl 缓冲液作为复性缓冲液。

表 1 缓冲液种类对还原变性 Lys 复性的影响

Tab.1 The effects of the kinds of buffer on the renaturation yield of reduced/denatured Lys

缓冲液种类	复性产率/%
PBS	6.37 $\pm$ 0.12
Tris-HCl	80.2 $\pm$ 7.2

注:蛋白终浓度为 0.04 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,复性溶液为:PBS 缓冲液:2.0 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> urea + 50 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> PBS + 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA + 3.0 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> GSH/0.6 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> GSSG, pH = 8.0; Tris-HCl 缓冲液:2 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> urea + 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl + 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA + 3.0 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (GSH)/0.6 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (GSSG), pH = 8.0。

### 2.2 脲浓度

还原变性 Lys 的活性回收率随脲浓度的变化如图 1 所示,可以看出,当脲浓度从 0 mol/L 增加至 2.0 mol/L 时,还原变性 Lys 的活性回收率呈增加的趋势,当脲浓度高于 2.0 mol/L 时,还原变性 Lys 的活性回收率随脲浓度的增加而逐渐减小,当复性缓冲液中含有 2.0 mol/L 脲时,还原变性 Lys 复性产率最高。

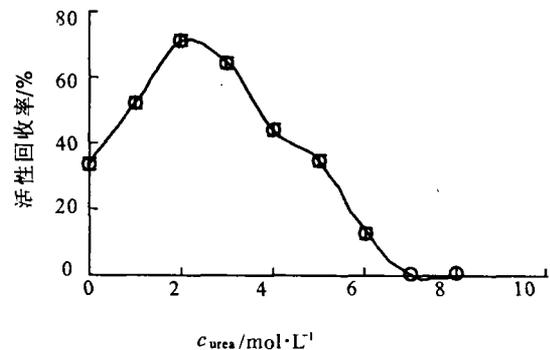


图 1 还原变性的 Lys 的活性回收率随脲浓度的变化

Fig.1 The effects of urea concentration on the bioactivity recovery  
注:复性缓冲液:0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA, 3 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (GSH)/0.6 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (GSSG), 0~8.0 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> urea; 蛋白浓度:0.10 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。

脲是一种最常用的蛋白变性剂,在 8.0 mol/L 脲的作用下,大多数蛋白质分子都由折叠构象变成完全伸展的构象,蛋白质寡聚体则解离成亚基。对于脲引起蛋白变性的原因,目前尚无定论。多年来人们一直认为<sup>[7]</sup>,脲与蛋白质生成氢键的能力比水分子强,它们通过破坏蛋白质分子内的氢键而使蛋白质变性。同时,脲能增加非极性分子(包括非极性氨基酸)在水中的溶解度,从而将疏水效应减少 1/3,这可能是脲影响水结构性质的间接结果。由此推测,脲很可能通过破坏蛋白质分子内部的疏水作用使蛋白质分子伸展。此外,脲也可能与蛋白质分子的折叠态与伸展态有直接作用,并产生各种效应。

从另一方面讲,作为一种失活剂高浓度的脲会使蛋白折叠产率降低,因为在折叠态与失活态之间存在一个平衡,当有高浓度的脲浓度存在时,它与蛋白的结合占据优势,从而推动平衡向失活反应的方向进行。但是,脲不仅是一种强的蛋白失活剂,也是一种有效的抑制聚集剂。将变性蛋白直接稀释至较低浓度的脲溶液中,蛋白折叠中的聚集反应在低浓度的脲中可以很好地被抑制<sup>[8,9]</sup>,蛋白质即可在一定程度上自发复性,从而增加蛋白正确折叠的产率。这种复性条件下的复性收率与溶液中变性剂和变性

蛋白质浓度密切相关<sup>[10]</sup>。从图1看出,在还原变性的Lys复性中,复性缓冲液中含有2.0mol/L脲时对Lys复性最有利,它可以抑制分子间聚集,提高复性产率<sup>[11]</sup>。

### 2.3 盐种类

在离子交换色谱的复性实验中<sup>[3]</sup>,由于脲浓度低时其质量回收率很低,所以通过提高脲浓度增加其质量回收率。但是,从前面的研究可知,高浓度的脲是不利于Lys复性的。在离子交换色谱的复性实验中,盐作为洗脱剂存在于复性溶液中。当脲浓度为4.0 mol/L和硫酸铵作为洗脱剂时,Lys可以获得最高的活性回收率,用氯化钠为洗脱剂却不能提高活性回收率。下面研究脲与硫酸铵或氯化钠共存时对Lys复性的影响。

在不同脲浓度的复性缓冲液中含有0.5 mol/L氯化钠及硫酸铵时,对Lys复性的影响见图2,可以看出,这时,还原变性Lys随脲浓度的增加均呈现先增加后减小的趋势。当复性缓冲液中含有0.5 mol/L氯化钠,达到最高复性回收率是在脲浓度为2.0 mol/L,当复性缓冲液中含有0.5 mol/L硫酸铵,脲浓度为4.0 mol/L时达到最高复性回收率的。当脲浓度较低时,复性缓冲液中含有硫酸铵的复性回收率不如氯化钠,而在高浓度脲时,恰恰相反,复性缓冲液中含有硫酸铵的复性回收率优于氯化钠。

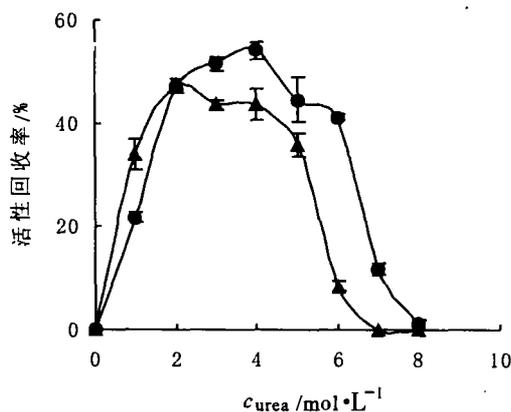


图2 在不同脲浓度的复性缓冲液中含有0.5 mol·L<sup>-1</sup>氯化钠及硫酸铵时对Lys复性的影响

Fig. 2 The effects of 0.5 mol·L<sup>-1</sup> sodium chloride and ammonium sulfate on the activity recovery of Lys at the presence of different urea concentration

注:复性缓冲液:0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 3 mmol·L<sup>-1</sup> (GSH)/0.6 mmol·L<sup>-1</sup> (GSSG), 0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl or 0.5 mol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0~8.0 mol·L<sup>-1</sup> urea; 蛋白浓度:0.10 mg·mL<sup>-1</sup>

○ 0.5 mol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ● 0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl

在不同脲浓度的复性缓冲液中含有1.0 mol/L

氯化钠及硫酸铵时,对Lys复性的影响见图3。当复性缓冲液中含有1.0 mol/L氯化钠及硫酸铵时,其Lys活性回收率的变化趋势与含有0.5 mol/L氯化钠及硫酸铵(见图2)相近。但是,变化趋势更加明显,即在低浓度脲时复性缓冲液中含有氯化钠的复性收率优于硫酸铵,在高浓度脲时,复性缓冲液中含有硫酸铵的复性收率优于氯化钠。

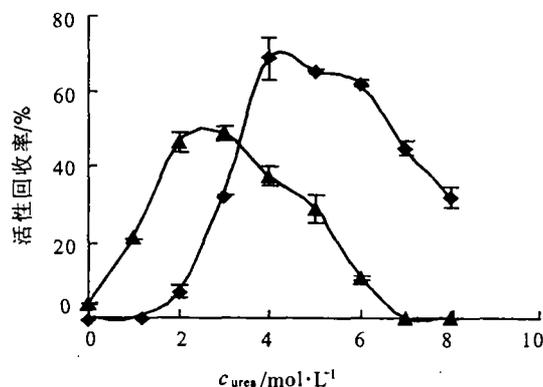


图3 在不同脲浓度的复性缓冲液中含有1.0 mol·L<sup>-1</sup>氯化钠及硫酸铵时对Lys复性的影响

Fig. 3 The effects of 1.0 mol·L<sup>-1</sup> sodium chloride and ammonium sulfate on the activity recovery of Lys at the presence of different urea concentration

注:复性缓冲液:0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 3 mmol·L<sup>-1</sup> (GSH)/0.6 mmol·L<sup>-1</sup> (GSSG), 1.0 mol·L<sup>-1</sup> NaCl or 1.0 mol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0~8.0 mol·L<sup>-1</sup> urea; 蛋白浓度:0.10 mg·mL<sup>-1</sup>

◆ 1.0 mol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ▲ 1.0 mol·L<sup>-1</sup> NaCl

在不同脲浓度的复性缓冲液中含有不同浓度氯化钠时,对Lys复性的影响见图4所示,可以看出,当复性缓冲液中氯化钠浓度不同时,复性产率没有显著的变化,即无论复性溶液中含有0.5 mol/L的氯化钠,还是1.0 mol/L的氯化钠,对还原变性Lys的复性没有大的影响。不同脲浓度的复性缓冲液中含有硫酸铵时,对Lys复性的影响见图5所示,可以看出复性缓冲液中硫酸铵浓度极大地影响了Lys的复性产率。当脲浓度较低时(<4.0 mol/L),复性缓冲液中含有0.5 mol/L硫酸铵的复性产率高于含有1.0 mol/L硫酸铵的复性产率;当脲浓度较高时(>4.0 mol/L),复性缓冲液中含有1.0 mol/L硫酸铵的复性产率高于含有0.5 mol/L硫酸铵的复性产率。所以,在脲浓度较低范围内,低浓度的硫酸铵有利于还原变性Lys的复性;脲浓度较高时高浓度的硫酸铵有利于其复性。

盐对于蛋白溶解度及稳定性的影响一般遵循Hofmeister序列<sup>[12]</sup>,尤其是阳离子为单价离子时。Franz Hofmeister研究了中性盐对蛋白质溶解性的影

响,根据盐(分成阴、阳离子)对蛋白质的沉淀能力,得出下列顺序: $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{SCN}^-$ 。阳离子的 Hofmeister 效应没有阴离子明显。目前普遍认为,上述盐类对蛋白质的沉淀作用,除了影响蛋白质的表面电荷外,更主要是通过离子与水分子的影响,改变了水分子与蛋白质分子的相互作用,形成沉淀,其作用主要是通过水分子间接实现的。盐类通过水分子,进而对蛋白质(或其他生物大分子)产生的效应,统称为 Hofmeister 效应。一般将排序中  $\text{Cl}^-$  左边(即  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ )化合物称为 Kosmotrope(使水结构有序的物质, water structure maker),即能使蛋白质分子稳定,保持酶活性,促进变性多肽链折叠成有活性的蛋白质; $\text{Cl}^-$  右边的离子(为  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{SCN}^-$ )则称为 Chaotrope(使水分子结构混乱的物质, water structure breaker),即能破坏蛋白质的稳定性,使其变性, $\text{Cl}^-$  则介于两类物质中间。Hofmeister 序列反映了小分子溶质通过溶质-水的相互作用对生物大分子的稳定性产生的影响。

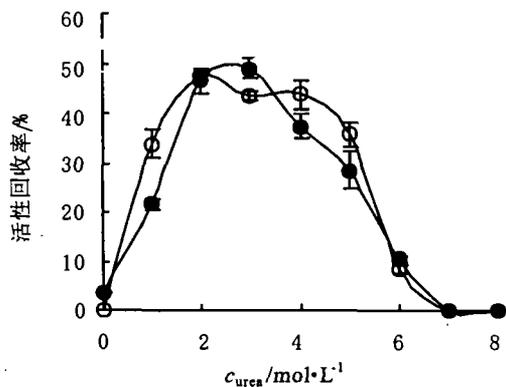


图 4 在不同脲浓度的复性缓冲液中含有不同浓度的氯化钠时对 Lys 复性的影响

Fig. 4 The effects of ammonium sulfate concentration on the activity recovery of Lys at the presence of different urea concentration

注:复性缓冲液:  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.0),  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA,  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (GSH)/ $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (GSSG),  $0.5$  or  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl and  $0 \sim 8.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  urea; 蛋白浓度:  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

●  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl ○  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl

图 2 到图 5 的结果都可以用 Hofmeister 序列得到很好的解释。从 Hofmeister 序列得知,  $\text{SO}_4^{2-}$  对蛋白质的沉淀能力强于  $\text{Cl}^-$ , 对蛋白质分子的稳定能力也强于  $\text{Cl}^-$ 。聚集是多肽链的疏水区发生非特异性作用的结果, 是蛋白折叠过程中最主要的竞争性反应。当复性缓冲液中存在合适浓度的变性剂时, 例如,  $2.0 \text{ mol/L}$  的脲(见图 1), 聚集反应被有效地

抑制, 折叠产率就能增加。但是, 当复性缓冲液中加入  $\text{SO}_4^{2-}$  时, 由于  $\text{SO}_4^{2-}$  对蛋白质的沉淀能力很强, 在含有低浓度脲时, 硫酸铵的存在反而加剧了聚集反应的发生, 硫酸铵浓度越高, 沉淀能力越强, 低浓度的脲此时并不足以完全抑制聚集反应, 使折叠产率下降。氯化钠对蛋白的沉淀能力不强, 在含有低浓度的脲时, 氯化钠虽然也会促使聚集反应的产生, 使复性产率低于不含有氯化钠时的产率, 但氯化钠对蛋白聚集的能力不如硫酸铵显著, 氯化钠的浓度也没有对其复性产生较大的影响。所以, 在低浓度脲时, 复性缓冲液中加入硫酸铵不是好的选择。

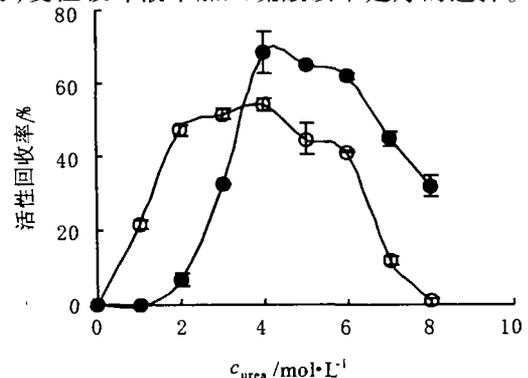


图 5 在不同脲浓度的复性缓冲液中含有硫酸铵时对 Lys 复性的影响

Fig. 5 The effects of ammonium sulfate concentration on the activity recovery of Lys at the presence of different urea concentration

注:复性缓冲液:  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.0),  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA,  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (GSH)/ $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (GSSG),  $0.5$  or  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  and  $0 \sim 8.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  urea; 蛋白浓度:  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

●  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  ○  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$

当复性缓冲液中含有过高浓度的脲时, 会促使折叠平衡向失活态的方向移动(如图 1 所示), 即使这时聚集已经被很好地抑制, 折叠产率依然会下降。如果此时在这种高浓度脲的复性缓冲液中加入硫酸铵, 由于硫酸铵是一种热力学上能够稳定天然 Lys 构象的盐<sup>[13]</sup>, 可以在高浓度脲存在的条件下, 使折叠平衡向失活态的移动发生逆转, 继续向天然态方向移动, 从而增加折叠蛋白的产量。硫酸铵的浓度越高, 对天然蛋白的稳定能力越强, 蛋白复性回收率就越高。然而, 复性缓冲液中含有氯化钠时还原变性 Lys 的折叠产量得不到提高, 说明氯化钠对于稳定蛋白的天然态不起积极作用, 氯化钠的浓度也就对复性产率的影响不大。同样, 硫酸脲能够稳定蛋白, 盐酸脲是一个通用的蛋白失活剂能很好地说明这点<sup>[14]</sup>。综上所述, 在复性缓冲液中含有低浓度的

脲时,不含有氯化钠和硫酸铵这些盐类对复性是有利的;在复性缓冲液中含有高浓度的脲时,加入一定浓度的硫酸铵能够提高复性效率。

在用IEC复性蛋白质时,虽然在含有低浓度脲,洗脱剂为硫酸铵时还原变性Lys的质量回收率高于洗脱剂为氯化钠时的质量回收率,但两者都不是很好,所以,宜选用高浓度的脲为流动相。但是,在高浓度脲的存在下,硫酸铵比起氯化钠能显著提高还原变性Lys的复性产率,当Lys用离子交换色谱复性时,硫酸铵作为洗脱剂是一个很好地选择,它一方面提高质量回收率,一方面促使折叠反应的平衡向天然态移动,提高活性回收率。

### 参考文献:

- [1] GUISE A D, WEST S M, CHAUDHURI J B. Protein folding in vivo and reanturation of recombinant proteins from inclusion bodies[J]. Mol Biotechnol, 1996, 6: 53-64.
- [2] MUKHOPADHYAY A. Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms[J], Adv Biochem Eng Biotechnol, 1997, 56: 61-109.
- [3] WANG Y, GONG B L, GENG X D. Refolding of denatured/reduced lysozyme using weak-cation exchange chromatography[J]. Chinese Chem Lett, 2003, 14(8): 828-831.
- [4] BERT V D B, CHUNG E W, ROBINSON C V, et al. Characterisation of the dominant oxidative folding intermediate of hen lysozyme[J]. J Mol Biol, 1999, (3): 781-796.
- [5] GOLDBERG M E, RUDOLPH R, JAENICKE R. A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme[J]. Biochem, 1991, 30(11): 2 790-2 797.
- [6] SONG J L, QUAN H, WANG C C. Dependence of the anti-chaperone activity of protein disulphide isomerase on its chaperone activity[J]. Biochem J, 1997, (12): 841-846.
- [7] 陶慰孙, 李 惟, 姜涌明. 蛋白质分子基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. 317-318.
- [8] HAGEN A J, HATTON T A, WANG D I C. Protein refolding in reversed micelles[J]. Biotech Bioengineer, 1990, 35(4): 955-965.
- [9] CLARK E De B, HEVEHAN D, SZELA S, et al. Oxidative renaturation of hen egg - white lysozyme, folding vs. aggregation[J]. Biotechnol Prog, 1998, 14(1): 47-54.
- [10] MAEDA Y, UEDA T, YAMADA H, et al. The role of net charge on the renaturation of reduced lysozyme by the sulfhydryl - disulfide interchange reaction[J]. Protein Eng, 1994, (7): 1 249-1 254.
- [11] GU Z Y, SU Z G, JANSON J C. Urea gradient size - exclusion chromatography, enhanced the yield of lysozyme refolding[J]. J Chromatogr A, 2001, (2): 311-318.
- [12] LI W, OU Y F. Hofmeister effect and inclusion body denaturation and renaturation[J]. Biotech Inform, 2000, (4): 37-40.
- [13] MAEDA Y, YAMADA H, UEDA T, et al. Effect of additive on the renaturation of reduced lysozyme in the presence of 4M urea[J]. Protein Engineer, 1996, 9(5): 461-465.
- [14] ARAKAWA T, TIMASHEFF S N. Protein stabilization and destabilization by guanidinium salt[J]. Biochem, 1984, 23(25): 5 924-5 929.

(编辑 陈懿文)

## Effects of the composition of mobile phase on the bioactivity recovery of reduced/denatured of lysozyme by using ion-exchange chromatography

WANG Yan, GENG Xin-du

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

**Abstract:** **Aim** The effects of the composition of mobile phase on the bioactivity recovery of reduced/denatured of lysozyme was studied. **Methods** The refolding of the reduced denatured lysozyme by ion exchange chromatography. **Results** It was found that the bioactivity yield in the Tris buffer with low ion strength is better than that of in the phosphate solution buffer (PBS) with high ion strength. When the renaturation buffer includes any other kinds of salt, the bioactivity recovery is the highest with 2.0 mol/L urea concentration in the renaturation buffer. The bioactivity recovery of lysozyme is bad when the renaturation buffer contains other kinds of salt except urea. However, ammonium sulfate can enhance the bioactivity yield of reduced/denatured lysozyme when urea concentration is higher in the renaturation buffer. **Conclusion** The reason of these phenomena is discussed in detail. Hofmeister effect is the main reason.

**Key words:** ion-exchange chromatography; the renaturation buffer; lysozyme; urea; salt