

还原变性核糖核酸酶在疏水性液-固界面上的复性

毕 晶, 白 泉*, 王 军, 王 骊 丽

(西北大学合成与天然功能分子化学教育部重点实验室, 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 :采用疏水相互作用色谱(HIC)对还原变性核糖核酸酶 A (RNase A)在疏水性液-固界面上的复性进行了研究。详细讨论了流动相中脲的浓度、还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)的比例、流动相 pH 和变性蛋白质浓度对还原变性 RNase A 复性效率和质量回收率的影响。结果表明,在最优化的复性条件(流动相中含有 2.0 mol/L 脲, GSH/GSSG 的浓度比为 8:1, 流动相 pH 为 8.0)下,还原变性 RNase A 能完全复性。当变性蛋白质质量浓度为 5.0 mg/mL 时,还原脲变性 RNase A 的活性回收率和质量回收率分别为 98.0% 和 61.9%,还原胍变性 RNase A 分别为 100.1% 和 66.8%。研究表明 HIC 是还原变性蛋白质复性的有力工具之一,可为蛋白质复性研究提供新方法和新思路。

关键词 :蛋白质复性;疏水作用色谱;还原变性;核糖核酸酶 A

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)08-0786-04

Refolding of reduced/denatured RNase A on the hydrophobic liquid-solid interface

BI Jing, BAI Quan*, WANG Jun, WANG Lili

(Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecule Chemistry of Ministry of Education,
Institute of Modern Separation Sciences, Key Laboratory of Separation Science in
Shaanxi Province, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract : The renaturation of the reduced/denatured RNase A on the hydrophobic liquid-solid interface was investigated using hydrophobic interaction chromatography (HIC). The effects of urea concentrations, the ratios of reduced and oxidized glutathiones (GSH and GSSG), the pH of mobile phase and protein concentrations on the refolding efficiency and mass recovery of the reduced/denatured RNase A were investigated in detail. The results indicated that the reduced/denatured RNase A can be refolded completely under the optimized conditions of pH 8.0, 2.0 mol/L urea and the concentration ratio of GSH/GSSG of 8:1 in mobile phase. When the denatured protein was at the concentration of 5.0 mg/mL, the bioactivity efficiency and mass recoveries were 98.0% and 61.9% for 8.0 mol/L urea-denatured RNase A, respectively; and 100.1% and 66.8% for 7.0 mol/L guanidine hydrochloride (GuaHCl)-denatured RNase A, respectively. It proves that HIC is a powerful tool and new approach for protein refolding.

Key words : protein renaturation; hydrophobic interaction chromatography (HIC); reduced/denatured; RNase A

用大肠杆菌(*E. coli*)表达的重组蛋白质,由于过表达和在表达过程中缺乏某些复性因子和酶,外源性蛋白质因为疏水作用相互聚集容易形成难溶于水的包涵体(inclusion body)。包涵体不溶于水,但可溶于 7.0 mol/L 的盐酸胍或 8.0 mol/L 的脲等强

变性剂中,因此蛋白质必须经过复性才能得到具有生物活性的目标蛋白质^[1]。这就提出了用高浓度变性剂提取目标蛋白质后的复性问题。通常采用稀释法或透析法进行蛋白质复性,但复性效率一般仅为 5%~20%,且难与杂蛋白质分离。所以蛋白质的

* 通讯联系人:白 泉,教授,博士生导师,主要研究方向为生物大分子的分离纯化。E-mail: baiquan@nwu.edu.cn.

基金项目:国家“863”计划项目(No. 2006AA02Z227)和陕西省重点实验室重点科研项目(05JS62)。

收稿日期:2010-04-08

复性问题已成为生物工程产业化的技术瓶颈。此外,95%的蛋白质中含有二硫键,如何提高还原变性蛋白质在复性过程中二硫键的正确对接,对蛋白质药物的纯度和产率的提高及生物工程技术的发展具有非常重要的意义。

液相色谱(LC)是生物大分子分离纯化的主要手段,自1991年疏水作用色谱(hydrophobic interaction chromatography, HIC)首次用于蛋白质复性研究^[2]以来,国内外用LC进行蛋白质复性的研究方兴未艾^[3,4],现已发展成为研究蛋白质复性的新方法——蛋白质复性液相色谱法(protein folding liquid chromatography, PFLC)^[5],并已有有人阐述了PFLC研究蛋白质复性的分子学机理^[6]。与通常的复性方法相比,PFLC在一个色谱过程中可同时实现4种功能:(1)快速除去变性剂;(2)分离杂蛋白质;(3)目标蛋白质复性;(4)回收变性剂^[7]。PFLC已成功应用于多种变性蛋白质和重组蛋白质药物的复性并同时纯化研究^[8-13]。本实验室采用醋酸溶液对样品进行透析处理并冻干后再进行复性的PFLC方法,对还原变性核糖核酸酶A(RNase A)的复性进行了一些研究,但蛋白质易形成沉淀,发生分子构象变化,从而导致复性效率和质量回收率较低^[14,15],且无法模拟包涵体蛋白质变性提取的真实过程。本文以RNase A为模型蛋白质,采用HIC技术,深入研究了还原变性RNase A在疏水性液-固界面上的复性。通过优化蛋白质复性条件,成功地对还原变性的RNase A进行了复性。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

高效液相色谱仪(LC-20A,日本岛津公司),包括两台LC-20AT泵,一台SPD-20A紫外-可见检测器,Rheodyne 7725i手动进样阀和N2000色谱工作站,紫外分光光度计(UV-1700,日本岛津公司);pH计(PB-10,德国赛多利斯公司);色谱柱为采用匀浆法在100 mm×4.6 mm不锈钢管中装填本实验室合成的硅胶基质的疏水色谱分离介质(粒径7 μm,孔径30 nm,端基为PEG-600)^[16];超纯水制备仪(美国Pall公司)。

RNase A(牛胰脏)(Sigma公司),氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽(GSH)(生化试剂,上海伯奥生物科技有限公司),盐酸胍(GuaHCl,分析纯,中国医药上海化学试剂公司),脲(urea,分析纯,沈阳化学试剂厂,需重结晶后使用)。二硫苏糖醇(DTT,华美生物工程公司,美国Amresco公司进

口分装),核糖核酸酵母(上海源聚生物科技有限公司),其他试剂均为分析纯。实验所用溶液均用3次蒸馏水配制。

1.2 实验方法

1.2.1 RNase A的还原变性

将10 mg天然RNase A溶于2.0 mL含有0.1 mol/L Tris-HCl,1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA),0.15 mol/L DTT的8.0 mol/L脲或7.0 mol/L GuaHCl变性溶液中,蛋白质质量浓度为5 mg/mL。于45 °C下恒温放置3 h,使RNase A完全还原变性后,于-4 °C下储存备用。

1.2.2 疏水作用色谱复性过程

色谱条件:流动相A液为2.5 mol/L (NH₄)₂SO₄+50 mmol/L KH₂PO₄+2.0 mol/L脲+2.4 mmol/L GSH+0.3 mmol/L GSSG(pH 8.0),B液为50 mmol/L KH₂PO₄+2.4 mmol/L GSH+0.3 mmol/L GSSG+2.0 mol/L脲(pH 8.0)。

将还原变性RNase A直接进样50 μL于已用100% A液平衡的疏水柱上;采用0~100% B液20 min线性梯度洗脱,用100% B液延长洗脱10 min使柱再生,然后用100% A液平衡;流速为1.0 mL/min;检测波长为280 nm。

1.2.3 质量回收率的测定

采用Bradford法^[17]测定蛋白质含量。

1.2.4 活性回收率的测定

移取用0.1 mol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)配制的含0.5 mg/mL核糖核酸酵母溶液2.5 mL,在25 °C条件下加入不同浓度的标准蛋白质样品0.1 mL,迅速摇匀,在300 nm波长下以蒸馏水为参比每隔30 s读值一次,记为A_t,共读3 min;3 h后再读一次值,记为A_f,以log(A_t-A_f)对时间t作图得到一条直线,求出直线斜率S。以S对蛋白质的浓度作图得到一条标准曲线。样品测定步骤同上,将待测样品的S值代入标准曲线,求得样品的活性回收率。将S代入下列公式中,可求出酶的活力^[18],酶的活力(U/mg)=-2.3S/C,其中C为样品中酶的质量浓度(mg/mL)。

2 结果与讨论

2.1 流动相中脲的浓度对还原变性RNase A复性的影响

在蛋白质复性过程中,变性蛋白质因表面大量的疏水性氨基酸残基相互结合而聚集形成沉淀,易造成色谱柱堵塞而使柱压迅速升高。高浓度的脲是一种强变性剂,而低浓度的脲可以有效抑制蛋白质

的聚集^[19]。因此可在流动相中加入一定浓度的脲来抑制变性蛋白质的聚集,提高其复性效率。

图 1a 和图 1b 分别为还原脲变性和还原胍变性的 RNase A 在流动相中含有不同浓度的脲时的 HIC 色谱分离图。从图 1 可以看出,随着流动相中脲浓度的增大,还原脲变性和还原胍变性的 RNase A 在 HIC 上的保留时间逐渐减小,色谱峰的峰高和峰面积增大,质量回收率亦增大。图 2 为不同脲浓度下 RNase A 的活性回收率变化。可以看出,无论是还原脲变性还是还原胍变性 RNase A,其活性回收率在脲浓度为 2.0 mol/L 时最大。因此流动相中脲的添加浓度选择为 2.0 mol/L。

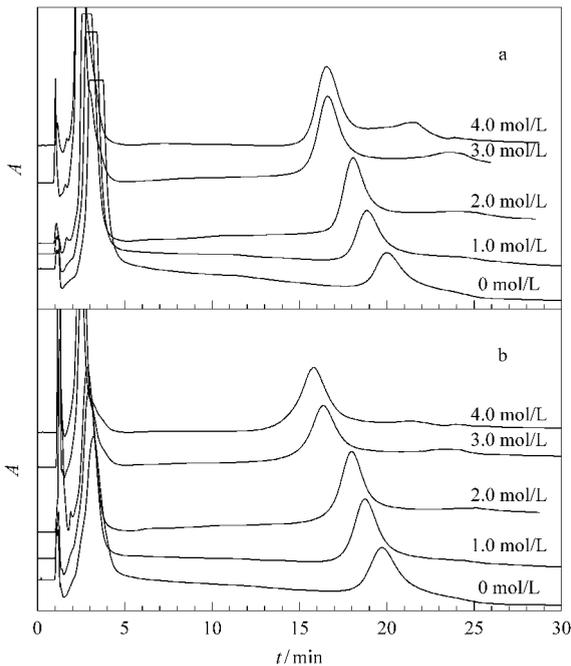


图 1 流动相中含有不同浓度的脲时还原变性 RNase A 的 HIC 分离图

Fig. 1 HIC chromatograms of reduced/denatured RNase A with different concentrations of urea in mobile phase

a. urea-denatured ; b. GuaHCl-denatured.

2.2 GSSG/GSH 对还原变性 RNase A 复性的影响

RNase A 分子内含有 4 对二硫键,要使还原变性的 RNase A 恢复生物活性,必须使还原的半胱氨酸重新配对形成正确的二硫键。二硫键的形成需要

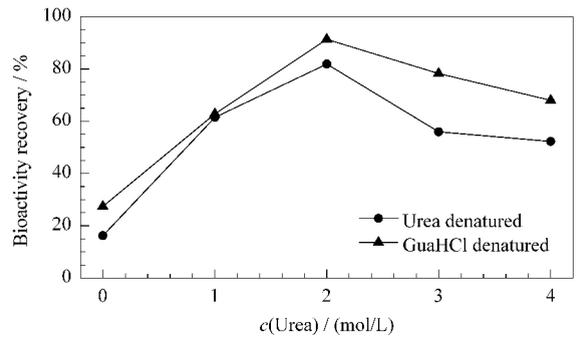


图 2 流动相中含有不同浓度的脲对还原变性 RNase A 活性回收率的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of urea in mobile phase on the bioactivity recoveries of reduced/denatured RNase A

在一个合适的氧化还原环境中进行。以 GSH 和 GSSG 作为氧化还原试剂对加入到复性缓冲液或色谱流动相中,可以促进二硫键的正确形成^[20]。表 1 中列出了在流动相中添加不同浓度比的 GSH/GSSG 对还原变性 RNase A 复性效率的影响。从表 1 可看出,当流动相中加入 GSH/GSSG 后,还原变性 RNase A 的复性效率明显提高,当 GSH/GSSG 的比例为 8:1 时,复性效果最好,还原脲变性的 RNase A 的活性回收率和质量回收率分别为 63.6% 和 42.4%,而还原胍变性的 RNase A 的活性回收率和质量回收率分为 74.9% 和 39.9%。

2.3 蛋白质浓度对还原变性 RNase A 复性的影响

还原变性蛋白质的浓度对其复性效率也有一定的影响。表 2 列出了不同蛋白质浓度时还原变性 RNase A 的活性回收率和质量回收率。从表 2 可看出,随着变性蛋白质浓度的增大,还原变性 RNase A 的活性和质量回收率均逐渐降低。这是因为随着蛋白质浓度的增大,蛋白质分子之间的相互作用增强,容易聚集形成沉淀,甚至会堵塞色谱柱头。因此采用低浓度的变性蛋白质有利于还原变性 RNase A 的复性。当变性蛋白质质量浓度为 5 mg/mL 时,其复性效率可达到 98% 以上,而当蛋白质质量浓度达到 20 mg/mL 时,RNase A 的复性效率仍然可以达到 80% 以上,只是质量回收率由于蛋白质的聚集沉淀而降低很多。

表 1 流动相中添加不同比例的 GSH/GSSG 对还原变性 RNase A 的活性回收率和质量回收率的影响

Table 1 Effects of the different concentration ratios of GSH/GSSG in the mobile phase on the bioactivities and mass recoveries of reduced/denatured RNase A

$\alpha(\text{GSH})/\alpha(\text{GSSG})$ ((mmol/L) / (mmol/L))	Urea-denatured RNase A		GuaHCl-denatured RNase A	
	Activity recovery / %	Mass recovery / %	Activity recovery / %	Mass recovery / %
10:1	58.2	41.6	68.9	39.9
8:1	63.6	42.4	74.9	39.9
4:1	57.8	40.6	60.5	39.6
2:1	59.2	39.3	58.2	41.9

表 2 变性蛋白质浓度对还原变性 RNase A 活性回收率和质量回收率的影响
Table 2 Effect of the denatured-protein concentrations on the bioactivities and mass recoveries of reduced/denatured RNase A with HIC

ρ (Protein)/(mg/mL)	Urea-denatured RNase A		GuaHCl-denatured RNase A	
	Activity recovery/%	Mass recovery/	Activity recovery/%	Mass recovery/%
5	98.0	61.9	100.1	66.8
10	89.5	58.6	90.7	62.0
15	84.4	45.2	86.2	49.7
20	80.3	35.2	82.2	45.2

此外,我们还考察了流动相 pH 对还原变性 RNase A 复性效率的影响。结果表明,当流动相的 pH 为 8.0 时,还原变性 RNase A 的复性效率最好。这是因为当流动相中添加一定比例的 GSH/GSSG 时,只有在弱碱性条件下才有利于二硫键的氧化对接。因此,选择流动相的 pH 为 8.0。

综上所述,在最优化的蛋白质复性条件下,当还原变性 RNase A 的质量浓度为 5 mg/mL、流动相中脲浓度为 2.0 mol/L, GSH/GSSH 的浓度比为 8:1 和流动相 pH 为 8 时,采用 HIC 对还原变性 RNase A 可以完全复性,色谱图如图 3 所示。还原脲变性的 RNase A 的活性回收率和质量回收率分别为 98.0% 和 61.9%,而还原胍变性的 RNase A 的活性回收率和质量回收率分别为 100.1% 和 66.8%。

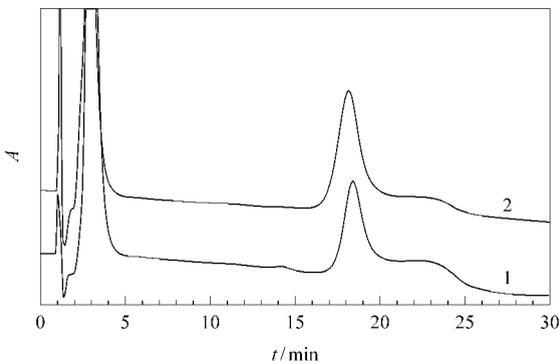


图 3 最佳条件下 HIC 对还原变性 RNase A 的色谱分离图
Fig. 3 Chromatograms of reduced/denatured RNase A renatured with HIC under optimal conditions

Mobile phases: solution A, 2.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 50 mmol/L KH_2PO_4 + 2.0 mol/L urea + 2.4 mmol/L GSH + 0.3 mmol/L GSSG, pH 8.0; solution B, 50 mmol/L KH_2PO_4 + 2.4 mmol/L GSH + 0.3 mmol/L GSSG + 2.0 mol/L urea, pH 8.0; linear gradient elution, 100% A-100% B in 20 min; flow rate, 1.0 mL/min; sample size: 100 μL (5 mg/mL); detection wavelength, 280 nm.

1. urea-denatured RNase A; 2. GuaHCl-denatured RNase A.

3 结论

采用 HIC 对还原变性 RNase A 在疏水性液-固界面上复性进行了研究,结果表明,HIC能对还原变

性的 RNase A 完全复性。在最优化条件下,其活性回收率大于 98%,表明 HIC 可作为蛋白质复性的有力工具。本文建立的方法为蛋白质复性研究提供了新方法和新思路。

参考文献:

- [1] Geng X D, Wang L L. J Chromatogr B, 2008, 866: 133
- [2] Geng X D, Chang J H, Li H R, et al. High Technol Lett, 1991, 1(7): 1
- [3] Li J J, Liu Y D, Wang F W, et al. J Chromatogr A, 2004, 1061: 193
- [4] Machold C, Schlegl R. J Biotech, 2005, 117: 83
- [5] Geng X D, Bai Q, Wang C Z. Protein Folding Liquid Chromatography. Beijing: Science Press (耿信笃,白泉,王超展. 蛋白质复性液相色谱法. 北京:科学出版社), 2006
- [6] Geng X D, Bai Q. Science in China: Series B, 2002, 45: 655
- [7] Geng X D, Chang X Q. J Chromatogr, 1992, 599: 185
- [8] Bai Q, Chen G, Liu J B, et al. Biotechnol Prog, 2007, 23: 1138
- [9] Wu D, Wang C Z, Geng X D. Biotechnol Prog, 2007, 23: 407
- [10] Wang C Z, Wang L L, Geng X D. Chinese Journal of Chromatography (王超展,王骊丽,耿信笃. 色谱), 2007, 25(4): 514
- [11] Bai Q, Kong Y, Geng X D. J Liquid Chromatogr Related Tech, 2003, 26(5): 669
- [12] Wu D, Gao D, Bai Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (吴丹,高栋,白泉,等. 色谱), 2008, 26(2): 206
- [13] Wang L L, Wang C Z, Geng X D. Biotechnol Lett, 2006, 28(13): 993
- [14] Liu H N, Wang Y, Gong B L, et al. Acta Chimica Sinica (刘红妮,王彦,龚波林,等. 化学学报), 2005, 63(7): 597
- [15] Li M, Duan S E, Wang Y, et al. Journal of Xi'an University of Science and Technology (李敏,段淑娥,王彦,等. 西安科技大学学报), 2006, 26(3): 372
- [16] Chang J H, Geng X D, Yin J N. Chinese Journal of Chromatography (常建华,耿信笃,殷剑宁. 色谱), 1991, 9(4): 263
- [17] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 248
- [18] Kunita M. J Biol Chem, 1946, 164: 563
- [19] De Bernardez Clark E, Hevehan D, Szela S, et al. Biotechnol Prog, 1998, 14: 47
- [20] Wang C H, Sinskey A J, Lodish H F. Science, 1992, 257(11): 1496