技术方法

文章编号:1000-5404(2006)09-0994-03

# 溶菌霉等10种标准蛋白质在高效离子交换色谱上的复性研究

童 卫[1],黄亚渝[2],王一苇[2],郭立安[3] (第四军医大学:[1]西京医院医教部,[2]血液科;[3]基础医学部药学系化学教研室,西安 710033)

**提 要:目的** 研究变性蛋白质在高效离子交换色谱(high performence ion exchange chromatography,HPIEC)上的保留行为及复性效率。**方法** 分别用盐酸胍(GuHCl)、尿素(Urea)和十二烷基磺酸钠(SDS)将溶菌酶(Lys)等10种标准蛋白质变性,然后在流动相为氯化钠的条件下,用HPIEC对变性蛋白质进行复性,并测定其保留时间、Z值、质量及活性回收率。**结果** 10种变性蛋白质中的4种在HPIEC上得到复性,其保留时间、峰形、Z值与天然蛋白基本一致,其中溶菌酶和核糖核酸酶的质量和活性回收率高,复性效果好。**结论** 用HPIEC对变性的标准蛋白质进行复性,得到较好的复性效果,为HPIEC用于蛋白质复性的实际应用奠定了基础。

基因重组蛋白质在临床及科研中具有广泛的用途。但目前原核细胞仍是生产基因重组蛋白的首选体系,外源蛋白进行表达时,常常以不可溶的包涵体的形式存在,需经变性、复性才能成为有实际应用价值的基因重组蛋白。因此,蛋白质的复性成为生物工程下游技术中极为关键的一项技术。传统的复性方法(如稀释法、透析法等)耗时、费力、复性率低,应用时受到很大的限制。近10余年来,液相色谱法因其显著的优点已经逐渐发展成为蛋白质复性的一种重要方法[1,2]。我们用高效离子交换色谱对变性的标准蛋白进行复性,研究了其在高效离子交换色谱(high performance ion exchange chromatography,HPIEC)上的保留行为及复性效率,以期为HPIEC用于基因重组蛋白质的复性提供实验基础及理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

溶菌酶(Lys)、核糖核酸酶(RNase)、牛血清白蛋白(BSA)、α-乳糜蛋白质酶原A(α-Chy-A)、胰蛋白酶(Trypsin)、细胞色素-C(Cyt-c)、肌红蛋白(Myo)、α-淀粉酶(α-Amy)、β-乳清蛋白(β-lact)、碳酸酐酶、SDS均购自Sigma公司。氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸二氢钠、Urea均购自西安化学试剂厂。GuHCl、酵母核糖核酸购自上海化学试剂进出口公司。溶壁球菌为西北大学现代分离研究所发酵。色谱柱为4.6 mm(内径)×100 mm(长度)不锈钢管,强阳离子交换复合树脂填料由中国科学院化学研究所提供。LC-6A高效液相色谱仪系统(日本Shimadzu公司),台式自动平衡记录仪(上海大华仪表厂),紫外分光光度计(美国Backman公司),Chemco-124A型匀浆装柱机(日本Chemco公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 蛋白变性 分别用7 mol/L GuHCl、8 mol/L Urea及10 g/L SDS将10种标准蛋白(终浓度为2 g/L)变性,室温放置24 h。

1.2.2 色谱柱装填 用4.6 mm(内径)×100 mm(长度)色谱柱,将强阳离子交换复合树脂填料(端基为-$SO_3H$)置于适量甲醇中,经过超声振荡均匀,用高压匀浆法装柱。

1.2.3 HPIEC条件 色谱洗脱液A液:0.05 mol/L $KH_2PO_4$;B液:1.0 mol/L NaCl + 0.05 mol/L $KH_2PO_4$,均过滤后使用。用100% A液平衡4.6 mm(内径)×100 mm(长度)柱子15 min,梯度洗脱100% A→100% B,20 min,流速1.0 ml/min,检测波长为280 nm。收集变性的Lys、RNase上柱后洗脱期间流出的组分,对其进行活性测定。

1.2.4 Z值的测定[3] 将变性蛋白上样后,记录出峰时相应的A液百分比浓度。分别选择高于和低于此浓度1~2个百分点的A液浓度,对重新上样的蛋白进行恒定洗脱,并记录保留时间($t_R$)和死时间($t_0$)。计算容量因子($K'$),$K' = (t_R(t_0)/t_0$,一价置换离子的浓度[C] = $(d_A\varphi_A + d_B\varphi_B - W_S)/0.018$,$d_A$和$d_B$分别为A和B液的密度,$\varphi_A$和$\varphi_B$分别是它们的体积分数,$W_S$是混合溶液中盐的质量。将$K'$和[C]代入方程:$\lg K' = \lg I - Z\lg[C]$,可得到Z值。

1.2.5 核糖核酸酶活性的测定[4] 在25 ℃恒温条件下,取0.5 g/L酵母核糖核酸2.0 ml,待测酶液0.1 ml,余加水至4.0 ml。用紫外分光光度计,以蒸馏水作参比,在波长为300 nm处测定吸光度($D$)随时间的变化,每隔30 s读1次$D$值,共读3 min。得到1组对应于时间($t$/min)的$A_t$的数据。当样品管反应进行3 h后,再测定300 nm的$A_f$,以$A_f$为最终的A,分别求得1组对应于t的$\lg(A_t - A_f)$,以$\lg(A_t - A_f)$对t作图,得到一条直线。求出直线的斜率为S,将S代入下列公式中,可求出酶的活力。

单位/mg = S×(-2.3)×4/(样品管中含酶的数量)

1.2.6 溶菌酶活性的测定[5] 将溶壁球菌干粉少许,加入少量的pH 6.2的磷酸缓冲溶液,搅拌均匀,用水作参比在450 nm处调整$D$值为0.5~0.7备用。取3.0 ml配制好的溶壁

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30080007)
Supported by the National Science Foundation of China (30080007)

作者简介:童 卫(1966-),男,陕西省西安市人,主治医师,主要从事蛋白质复性方面的研究。电话:(029)84775205,E-mail:tongwei@fmmu.edu.cn

通讯作者:郭立安,电话:(029) 82663462

收稿日期:2005-08-29;修回日期:2005-11-29

球菌菌液于比色皿中，加入 0.1 ml 的待测溶菌酶溶液（酶量在 100 μg 左右），迅速摇匀，以蒸馏水为参比，在 450 nm 波长下，每隔 30 s 测定 1 次 $D$ 值，共读 3 min，以吸光值对时间作图。取最初线性部分，斜率为每分钟吸光值的减少值（$\Delta D$/min），代入标准曲线，求得活性回收率，按下列方程计算活力单位：

活力单位 = $\Delta D$/min/(0.001 × 酶量 mg/ml)

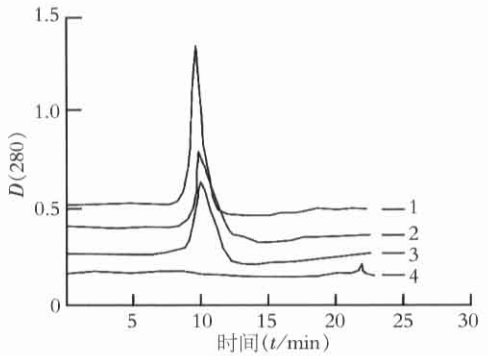
## 2　结果

### 2.1　HPIEC 柱效测定结果

将 RNase、Cyt-c、α-Chy-A 3 种标准蛋白上样，得到 3 个峰，每个峰均高尖，基本达到基线分离（图略）。说明柱效好，装填满意，此 HPIEC 柱可用于后续实验。

### 2.2　变性蛋白在 HPIEC 上的出峰情况

将 10 种变性蛋白质分别上柱后，GuHCl 及 Urea 变性的 Lys、RNase、Trypsin、α-Chy-A、BSA 在 HPIEC 上出峰，而且其保留时间、峰形与相应的天然蛋白一致（图 1），根据峰面积计算质量回收率（图 2）。其余的变性蛋白保留时间明显延长，峰形改变，有的出现双峰。




1：天然的 Lys；2：GuHCl 变性的 Lys；3：Urea 变性的 Lys；4：SDS 变性的 Lys

**图 1　Lys 在 HPIEC 上复性的色谱图**

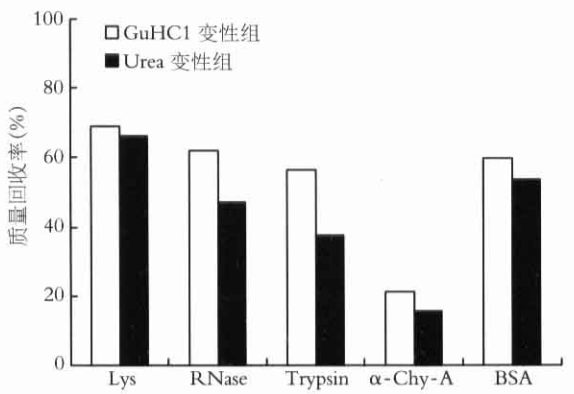



**图 2　5 种蛋白质经两种变性剂作用后在 HPIEC 上的质量回收率**

### 2.3　Z 值测定结果

Z 值表示置换掉一个吸附在配体上的蛋白分子所需的取代离子数。当蛋白质构象发生变化时，蛋白质与固定相间被置换出的离子的 mol 数就会发生变化，因此 Z 值可作为一个表征蛋白分子构象变化的参数[6]。GuHCl 变性的 4 种及 Urea 变性的 3 种蛋白质，Z 值与相应的天然蛋白相近（表 1），SDS 变性的蛋白质无法测定 Z 值。

**表 1　4 种蛋白质在 HPIEC 上的 Z 值测定结果**

| 组别 | Lys | RNase | Trypsin | α-Chy-A |
|---|---|---|---|---|
| 天然蛋白组 | 2.9 | 3.5 | 3.9 | 3.6 |
| GuHCl 变性组 | 3.1 | 3.3 | 3.8 | 2.7 |
| Urea 变性组 | 2.4 | 3.3 | 4.6 | — |

— ：由于流动相范围很窄，α-Chy-A 的 Z 值无法测定

### 2.4　Lys 及 RNase 的活性回收率测定结果

生物学活性是检验蛋白质是否复性最具说服力的指标。GuHCl 及 Urea 变性的 Lys 和 RNase 在经过 HPIEC 后得到较高的活性回收率（表 2）。

**表 2　Lys 和 RNase 在 HPIEC 上的活性回收情况**

| 变性剂 | Lys | | RNase | |
|---|---|---|---|---|
| | 生物学活性 (nkat/mg) | 活性回收率 (%) | 生物学活性 (nkat/mg) | 活性回收率 (%) |
| GuHCl | 58.0 | 70.6 | 8.1 | 57.4 |
| Urea | 54.2 | 65.9 | 5.9 | 41.8 |

天然 Lys 的生物学活性是 82.2 nkat/mg，天然 RNase 的生物学活性是 14.1 nkat/mg

## 3　讨论

高效离子交换色谱被广泛的应用于肽、蛋白质和其他生物大分子的分离。它利用不同分子的表面电荷量不等，表面电荷分布密度不同，因而与具有相反电荷的离子交换剂的吸附强弱不等，采用不同洗脱强度的流动相，将其逐一分离。由于 HPIEC 是根据分子与配体的静电作用力不同而使其分离的，所以作用温和；而且流动相为盐水体系，价格便宜，易于处理。此外，在选择置换条件时，既可以使用 pH 梯度又可以使用盐梯度进行洗脱，使得 HPIEC 具有更高的实用性和灵活性。HPIEC 用于蛋白质复性的机制是：变性的蛋白质上样后，变性剂首先被瞬时分离，随流动相一同流出色谱柱。而变性蛋白质与固定相之间存在分子间的电荷作用，这种作用力导致变性的蛋白吸附于固定相表面。接着流动相的连续变化，为变性蛋白质折叠提供了可选择的流动相组成的最佳范围，在洗脱过程变性蛋白不断地在固定相表面进行吸附 - 解吸 - 再吸附，并在此过程中逐渐折叠，最终形成与天然蛋白质构象相同的蛋白质流出色谱柱。

变性蛋白质在 HPIEC 上的复性情况可以通过保

留时间、峰个数和峰形的改变初步反应。在10种变性蛋白质中，GuHCl及Urea变性的5种蛋白质的梯度保留时间、峰个数、峰形与天然蛋白质相同，初步说明了这些蛋白质在HPHIC上可能得到了的复性。而其他变性蛋白质有的保留时间明显延长，有的峰形宽、低，出现肩峰、双峰，有的难以洗脱，这些蛋白未复性。

计量置换模型的Z可以用于表征蛋白质构象的变化，是反映蛋白质复性效果的参数之一[3,7]。当变性蛋白质的构象完全恢复或接近天然状态时，Z值应该相同或相近。以上GuHCl及Urea变性的蛋白质中4种Z值与相应的天然蛋白接近，进一步说明变性蛋白质经过HPIEC后其空间构象基本恢复至天然状态。而BSA的Z值无法测定，说明其空间构象尚未恢复。

此外，活性回收率是描述蛋白质在色谱上复性效果的最直接和最重要的指标，活性的判断往往也是最终的指标。复性的蛋白必须具有生物学活性才有实际应用价值，而且蛋白质在天然或接近天然构象的状态下，其活性位点才会暴露，具有一定的生物学活性。所以活性的获得也从另一个侧面反映出蛋白质空间结构的恢复。我们对有条件测活的Lys、RNase进行活性测定。首先测定两种天然蛋白的生物活性以作为标准，然后测定变性的Lys、RNase在HPIEC上出峰时流出的组分。证实两种变性蛋白质在HPIEC上得到了较高的活性回收率。同时通过计算峰面积得到的质量回收率与活性回收率结果一致。

不同蛋白质的等电点(pI)不同，所需流动相的pH值不同。实验中用的是强阳离子色谱填料，流动相的pH值必须低于蛋白质的pI，对于pI较低的蛋白质，酸性环境可能对其复性不利。提示我们在今后的实验及应用中，对于pI大于7的蛋白宜选择强阳离子色谱填料；而pI小于7的蛋白则宜选用阴离子色谱填料，这样可以使流动相的pH值保持在7左右，避免过酸或过碱的环境影响蛋白质的复性。

**关键词**：蛋白变性；复性；高效离子交换色谱

**中图法分类号**：Q503 **文献标识码**：B

**参考文献**：

[1] 郭立安，耿信笃. 蛋白的色谱复性及同时纯化[J]. 生物工程学报，2000，16(6)：661－666.

[2] 崔建武，奚永志，刘 楠，等. 新型重组IL-6 D24-PE40KDEL外毒素融合蛋白复性及纯化[J]. 军事医学科学院院刊，2004，28(6)：523－526.

[3] CHANG J H，GUO L A，FENG W K，*et al*. Studies on the correlation of chromatographic behaviour of biopolymers between reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography. Testing the stoichiometric displacement between biopolymer and bisplacing agent[J]. Chromatographia，1992，34(11)：589－596.

[4] WITHKA J，MONCUSE P，BAZIOTIS A，*et al*. Use of high-performance size-exclusion，ion-exchange，and hydrophobic interaction chromatography for the measurement of protein conformational change and stability[J]. J Chromatogr，1987，398(10)：175－202.

[5] 姚志麟. 环境卫生学[M]. 第3版. 北京：人民卫生出版社，1993：325－326.

[6] 李 敏，王 彦，龚波林，等. Z及log I对离子交换色谱中脲变溶菌酶分子构象变化的表征[J]. 色谱，2003，21(3)：214－217.

[7] 刘 彤，耿信笃. 基因工程中的液相色谱[J]. 色谱，2000，18(1)：30－34.

(编辑 周 芳)

## 第六届全国创伤学术会议暨创伤骨科新进展研讨会征文通知

为了提高我国创伤外科的临床救治与基础研究水平、促进学术交流，由中华医学会创伤学分会、《中华创伤杂志》编辑部主办、深圳市第二人民医院协办的第六届全国创伤学术会议暨创伤骨科新进展研讨会，拟定于2006年9月22日～24日在广东省深圳市召开。

**1. 征文内容**：①颅脑创伤救治；②胸腹创伤救治及诊断；③四肢及血管损害；④脊柱脊髓及骨盆损伤；⑤多发伤救治；⑥创伤评分进展；⑦创伤基础研究。

**2. 征文要求**：①未曾发表过论文的500字以内摘要1份，论文应具有科学性、先进性和实用性；②按结构式摘要撰写，顺序为文题、作者单位及邮政编码、姓名、目的、方法、结果、结论；③请寄打印稿并加盖公章，同时附该文软盘(Word格式)，自留底稿不退稿。欢迎通过E-mail投稿。

**3. 优秀论文评选**：拟参加青年优秀论文评选者(45岁以下)，除寄摘要外，需附全文1份，并另纸注明第一作者的年龄、职称及职务。符合本刊要求的获奖论文优先在本刊发表。

**4：证书颁发**：参加会议者，将颁发国家级继续教育项目学分证书和中华医学会论文证书。

**3. 收稿地点**：来请请寄重庆市渝中区大坪长江支路10号《中华创伤杂志》编辑部向勇主任收；**邮政编码**：400042；**电话**：(023)68757458，68818654；**传真**：(023)68818654；E-mail：zhcszz@163.com。广东省作者可寄深圳市第二人民医院急救中心创伤外科(笋岗西路3002号)张胜利收。**邮政编码**：518035。**电话**：(0755)83324595；**移动电话**：13360519059；E-mail：zhangsl12001@yahoo.com.cn。信封上请注明“创伤会议”。

**截稿日期**：2006年7月20日前(以当地邮戳为准)，逾期不予受理。