

· 基础理论研究 ·

还原变性的溶菌酶的体积排阻色谱复性

裴朝玉¹, 刘照胜², 苗会娟³, 方国波³, 吕宪禹^{3*}

(1 周口师范学院 化学系, 河南 周口 466000; 2 天津医科大学 药学院, 天津 300070; 3 南开大学 生命科学学院, 天津 300071)

摘 要: 探讨二次体积排阻色谱在非氧化还原平衡体系及中性条件下对还原变性的溶菌酶 (Lys) 的复性。结果表明: 在初次排阻色谱的溶菌酶洗脱液中加入过量的氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 和盐酸胍 (GuHCl) 充分作用后, 进行二次体积排阻色谱能够成功复性还原变性的溶菌酶。

关键词: 溶菌酶; 体积排阻色谱; 复性

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-0972 (2009) 01-0053-03

Rena turation of Reduced /dena tured Lysozyme by Size Exclusion Chroma tography

PEI Chao-yu¹, LIU Zhao-sheng², MIAO Hui-juan³, FANG Guo-bo³, LYU Xian-yu^{3*}

(1. Department of Chemistry, Zhoukou Normal College, Zhoukou 466000, China;

2. College of Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

3. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Renaturation of reduced/denatured Lysozyme in non-oxidation and reduction condition was studied with size exclusion chromatography used twice. The result shows that reduced/denatured Lysozyme can be renatured if excessive oxidized form of Glutathione and Guanidine Hydrochloride are added to elution solution of the first size exclusion chromatography to react completely, which would then be for a second size exclusion chromatography.

Key words: lysozyme; size exclusion chromatography; renaturation

体积排阻色谱法的基本原理是利用蛋白质分子大小及形状进行分离的, 同其他液相色谱不同, 变性蛋白质不与体积排阻色谱固定相之间发生吸附作用, 只是通过去除变性蛋白质溶液中的变性剂, 降低蛋白质浓度来促进蛋白质重折叠, 仅仅是有利于更换变性蛋白质复性的缓冲溶液, 几乎不涉及二硫键正确对接的问题^[1]。还原变性的蛋白质复性是一个比较复杂的问题, 其中最关键的是二硫键的正确对接。溶菌酶有 4 对二硫键, 复性难度大, 目前已经成为评价一个新的复性方法的标准。文献报道了还原变性的溶菌酶在氧化还原平衡体系及弱碱性条件下应用离子交换色谱成功地进行了复性^[2-3]。本文考察了应用体积排阻色谱在非氧化还原平衡体系及中性条件下复性还原变性的溶菌酶。

1 实验部分

1.1 试剂

盐酸胍 (GuHCl), 分析纯, 天津鼎国生物试剂公司; β 巯基乙醇, 分析纯, 天津鼎国生物试剂公司; 鸡蛋清溶菌酶 (lysozyme), 电泳级, 天津华美生物公司; 氧化型谷胱甘肽 (GSSG), 天津华美生物公司; 还原型谷胱甘肽 (GSH), 天津华美生物公司; 三氟乙酸 (TFA), 上海化学试剂厂; 乙腈, 色谱纯, 天津化学试剂公司; 溶壁球菌 (*M. lysodeikticus*) 由南开大学遗传实验室提供。

1.2 高效液相色谱系统

Spectra System P4000 高效液相色谱仪; Spectra-Physics 检测器; Anstar 色谱工作站; 定量环,

收稿日期: 2008-03-04; 修订日期: 2008-10-16; *. 通讯联系人, E-mail: fgb124@126.com

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20575045)

作者简介: 裴朝玉 (1977-), 女, 湖北随州人, 讲师, 硕士; 吕宪禹 (1949-), 男, 天津人, 教授, 从事蛋白质分离纯化及色谱柱性能研究。

20 μL ; 体积排阻色谱柱 TSK G2000SW (300 mm $\times$ 7.6 mm, 10 μm); 反相色谱柱, Vydac peptide protein C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 检测波长 214 nm, 流速 1 mL/min.

1.3 还原变性的 Lys 的制备

将 6.685 g GuHCl 120 μL β -巯基乙醇定容至 10 mL 配制成 7 mol/L GuHCl 还原变性液, 精密称取 5 mg Lys 溶于 1 mL 7 mol/L GuHCl 还原变性液配制成 5 mg/mL 蛋白质溶液, 室温放置 24 h 使之充分变性.

1.4 体积排阻色谱流动相的选择^[4]

考察了 2 种流动相对 Lys 在体积排阻色谱柱上的保留行为的影响. 流动相 A: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH 7.0; 流动相 B: 0.2 mol/L NaCl + 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH 7.0.

1.5 还原变性的 Lys 的体积排阻色谱复性

选择最佳流动相, 将还原变性 Lys 通过初次体积排阻色谱柱去除巯基乙醇和盐酸胍, 收集初次体积排阻色谱的溶菌酶洗脱峰, 然后用 2 种方法处理后进行二次体积排阻色谱复性: (1) 加入过量氧化型谷胱甘肽后在室温下充分氧化, (2) 加入过量氧化型谷胱甘肽和 GuHCl 后在室温下充分氧化.

1.6 蛋白质复性鉴定及浓度测定

收集和天然 Lys 在体积排阻色谱上保留时间一致的复性洗脱色谱峰, 通过反相色谱对复性后的洗脱色谱峰进行复性鉴定, 判断和天然 Lys 在反相色谱上保留时间的一致性. 蛋白质的洗脱需要在梯度条件下进行^[5], 确定非线性梯度洗脱. 流动相 A: 0.1% TFA (V/V) + 30% 乙腈水溶液 (V/V), 流动相 B: 0.1% TFA (V/V) + 50% 乙腈水溶液 (V/V). 梯度洗脱程序: 0 ~ 5 min, 100% A; 5 ~ 15 min, 100% A $\rightarrow$ 100% B.

在该条件下测定洗脱的蛋白质峰浓度.

1.7 Lys 活性测定^[6]

将培养 24 h 的溶壁球菌 (*M. lysodeikticus*) 菌液在紫外分光光度计下测其光密度值 (OD), 然后用 pH 8.68 的磷酸盐缓冲溶液稀释, 调整 OD 值在 1.2 ~ 1.5 范围内, 作为待测菌液, 标准品及回收复性液与待测菌液按 1:2 比例混合, 将待测混合液置于比色皿中, 以去离子水作参比, 在 450 nm 处间隔 30 s 测 1 次 OD 值, 共计 3 min. 以 OD 值对时间作图, 取最初线性部分, 斜率为每分钟 OD 值的减少值, 一个活性单位相当于每分钟减少 0.0026 的 OD 值.

2 结果与讨论

2.1 流动相对 Lys 在体积排阻色谱上保留的影响

从图 1 可以看出, 流动相中增加盐离子强度时, Lys 保留时间提前, 色谱峰变窄, 说明盐离子强度对 Lys 在体积排阻色谱上的保留有影响. 由于色谱柱介质并不完全是惰性的, 在一定程度上会表现出离子作用和疏水作用, 且 Lys 是一种亲水性较强的碱性蛋白质, 其等电点 (pI) 为 10.8, 在中性条件下会带上正净电荷, 与电离的硅羟基之间产生静电作用, 从而会增加其保留. 因此, 盐离子强度对 Lys 有较大的保留影响. 在流动相中添加适宜的盐离子强度会抑制色谱介质离子作用和疏水作用, 有利于蛋白质的洗脱, 该实验的流动相最佳选择为含 0.2 mol/L NaCl 的磷酸盐缓冲溶液.

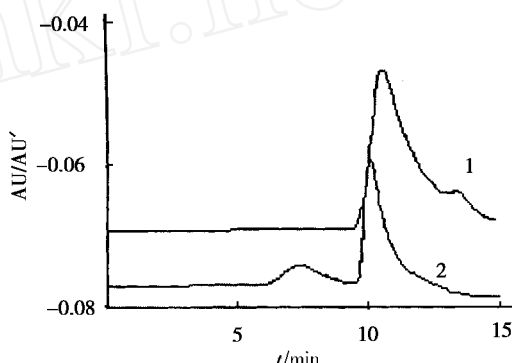


图 1 Lys 在不同流动相条件下的体积排阻保留色谱图

Fig 1 Retention chromatogram of native Lys in size exclusion chromatography with different eluent

1. 磷酸盐缓冲溶液; 2. 含 0.2 mol/L NaCl 的磷酸盐缓冲溶液

2.2 还原变性的 Lys 的体积排阻色谱复性效果

当进行初次体积排阻色谱时, 由于流动相中没有添加 GSSG, Lys 的二硫键处于还原状态, 又因为体积排阻色谱对 Lys 无吸附作用, Lys 保留时间较短而不能充分折叠, 因此初次体积排阻后 Lys 还处于变性的状态. 将初次体积排阻色谱柱的溶菌酶洗脱峰收集后分别用 2 种方法处理, 然后进行二次体积排阻色谱, 结果见图 2. 2 种方法都加入了过量的 GSSG 充分氧化, 二次体积排阻色谱都出现 2 个洗脱峰: 第 1 个峰保留时间较短, 推断为复性过程中出现的聚集体, 文献 [7-8] 认为在复性折叠的过程中, 折叠中间体浓度较高时, 暴露在中间体表面的疏水性氨基酸相互聚集不可逆地形成聚集体, 在这种复性环境条件下, 形成聚集体是二次体积排阻色谱的主要副反应; 其中第 2 个色谱峰保留时间

和天然溶菌酶保留时间较为接近,经反相色谱分析该峰为复性后的 Lys,结果见图 3. 复性后的 Lys 保留时间比天然的略为提前,这种现象是复性过程中蛋白质的构象发生变化所引起的,即从伸展态向致密态转变时,蛋白质分子体积的变化使其在体积排阻色谱中的分配系数逐渐增加,完全折叠后达到天然态蛋白质的分配系数. 从图 2 看出,在初次体积排阻色谱溶菌酶回收液充分氧化的同时加入盐酸胍,聚集体峰和复性峰的比例发生了明显的改变,此现象说明盐酸胍在复性中有着重要的作用:使聚集体形成的几率降低,复性的概率增加. 这种方法

处理的还原变性的 Lys 复性质量回收率达到 85.9%,活性回收率达到 76.2%,这种现象符合热力学假说^[9],即变性的蛋白质在复性折叠过程中优先向自由能最低的形态转变,即向结构最稳定的天然态变化,正是这种热力学上的变化保证了在充分氧化时还原态的溶菌酶二硫键较高的正确对接几率. 在二硫键氧化时,蛋白质还以伸展态的形式存在,但是加入的过量盐酸胍能够阻止氧化后的变性蛋白质相互聚集,抑制了聚集体的形成,从而使变性溶菌酶以单个分子形式存在,有利于二次体积排阻色谱复性.

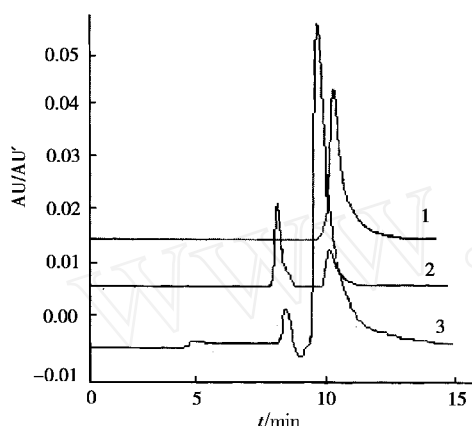


图 2 天然 Lys 及回收液经不同方法处理后的体积排阻保留色谱图

Fig 2 Retention chromatogram of native and recycled solution processed by different methods in size exclusion chromatography

1. 天然 Lys; 2. 加入过量 GSSG 后的二次体积排阻色谱;
3. 加入过量的 GSSG 和 GuHCl 后的二次体积排阻色谱

3 结论

通过初次体积排阻色谱除去还原变性液中的盐酸胍和巯基乙醇,向溶菌酶峰的收集液中加入过

参考文献:

- [1] Gauthier M, Patsion P A. Reactivation of C 1-inhibitor polymers by denaturation and gel-filtration chromatography[J]. Analytical Biochemistry (S0003-2697), 1997, 248 (2): 228-233.
- [2] 王彦,耿信笃. 高效疏水作用色谱法对还原变性溶菌酶的折叠研究[J]. 色谱, 2003, 21 (3): 218-221.
- [3] 刘红妮,龚波林,耿信笃. 离子交换色谱对溶菌酶复性的色谱条件优化[J]. 西北大学学报:自然科学版, 2004, 2 (11): 109.
- [4] 韦志明,陈立仁,左雄军. 分子排阻色谱硅质填料的制备及其对蛋白质的分离机理[J]. 分析实验室, 2004, 23 (2): 35-37.
- [5] 王俊德,李晓红,董鹏. 无孔硅胶反相键相用于生物大分子的高效液相色谱分离研究[J]. 色谱, 1995, 13 (5): 361-364.
- [6] 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]. Biochemistry (S1520-4995), 1991, 30: 2790 - 2797.
- [7] Weir M P, Sparks J. Purification and renaturation of recombinant human interleukin-2[J]. Biochemistry (S1520-4995), 1987, 245: 85-91.
- [8] Hagen A J, Hatton T A, Wang D C. Protein refolding in reversed micelles[J]. Biotechnology Bioengineering (S1097-0290), 1990, 35: 955-965.
- [9] Anfinsen C B, Haber E, Sela M, et al. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain[J]. PNAS (S1091-6490), 1961, 47: 1309-1314.

责任编辑:张建安

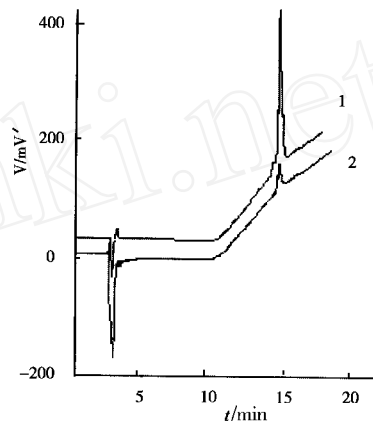


图 3 天然 Lys 及二次体积排阻回收液的反相保留色谱图

Fig 3 Reversed-phase retention chromatogram of native Lys and elution recycled by the second size exclusion chromatography

1. 天然 Lys; 2. 回收液

量的 GSSG 和盐酸胍充分作用后,经过二次体积排阻色谱能够成功复性还原变性的溶菌酶.