

固定化分子伴侣 GroE 促进变性溶菌酶复性的研究

董晓燕 杨 晖 甘一如 白 姝 孙 彦

(天津大学化工学院生物化工系 天津 300072)

摘 要 利用重组大肠杆菌表达制备了分子伴侣 GroE(GroEL 和 GroES),研究了 GroE 以及 GroEL 辅助变性溶菌酶复性的作用。结果表明,不仅游离 GroEL 单独作用可使溶菌酶复性收率达到 90% 以上,而且固定化 GroEL 亦可有效地促进蛋白质复性,最佳复性温度为 37℃,最佳 pH 值范围为 6~8,复性酶的活性收率在 85% 以上。另外,固定化 GroEL 可反复回收利用,表明固定化 GroEL 有可能在实际生物下游过程中得到应用。

关键词 分子伴侣, GroEL/ES, 固定化, 溶菌酶, 复性

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0169-04

广泛存在于原核和真核生物体内的一类蛋白质——分子伴侣(Molecular chaperones),在体内和体外都具有抑制蛋白质伸展肽链错误折叠和凝聚,辅助肽链折叠成天然活性肽的作用^[1-3]。已鉴定的分子伴侣蛋白有数十种,其中研究最多的是源于大肠杆菌的 Chaperonin 家族(GroE)。GroE 有两种分子量不同但氨基酸顺序相关的蛋白,大的称 GroEL,由 14 个分子量约 57kD 相同亚基形成双层饼状;小的称 GroES,由 7 个分子量约 10kD 相同亚基形成单层饼状。GroEL 具有三磷酸腺苷(ATP)酶的活性,在辅助肽链折叠的过程中需要 ATP 的存在,水解 ATP 释放底物蛋白和能量。GroES 具有促进 GroEL 折叠肽链的作用^[1]。最近, GroEL 和 GroEL/ES(GroE)在体外辅助蛋白复性的作用已被许多研究所证实,复性收率在 80%~100% 之间,远高于无分子伴侣存在下的自然复性率(<40%)^[4-6]。即使对于极易凝聚沉淀的变性柠檬酸合成酶,在 GroE 的存在下复性率亦可达到 28%,而无 GroE 存在时复性率低于 3%^[7]。研究结果充分显示了分子伴侣在蛋白质复性中的应用前景。为促进分子伴侣的实际应用,必须研究其有效利用方法^[8,9]。根据分子伴侣结合变性蛋白并促进其折叠成正确天然态的特性,利用固定化分子伴侣是有效手段之一。

本研究用含有 GroE 高表达质粒的重组大肠杆菌表达了分子伴侣 GroE,纯化制备了 GroEL 和

GroES。以变性溶菌酶为模型蛋白质,分别利用游离 GroE、GroEL 和固定化 GroE、GroEL 研究了其对变性酶的复性作用,优化了利用固定化 GroEL 辅助变性溶菌酶复性的条件,探讨了固定化 GroEL 反复利用的可能性。

1 材料和方法

1.1 菌种及试剂

含有 GroEL/ES 高表达质粒 pND5 的大肠杆菌由 Horowitz 教授(Univ. Texas Health Sci. Center)惠赠。DEAE-Toyopearl 650 购自日本 Tosoh 公司。甲酰基纤维素凝胶(Formyl-Cellulofine)购自日本 Chisso 公司。溶菌酶、牛血清白蛋白(BSA)、羟乙基化甲壳素、三磷酸腺苷(ATP)镁盐和盐酸胍(GuHCl)购自 Sigma 公司。其它化学试剂均为分析纯。

1.2 GroE 的表达和纯化

基因工程大肠杆菌在含有 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中 30℃ 振荡培养 6h 后,以 1:10 转接到新鲜培养基。继续培养 3h 后迅速升温至 42℃ 进行诱导表达。

离心收集诱导表达的菌体进行超声破碎,离心分离取上清液。用 DEAE-Toyopearl 650 柱(φ26×200)离子交换层析分离上清液,分别收集各洗脱峰,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,确定 GroES 和 GroEL 的洗脱峰。GroEL 和 GroES 分别用 80% 饱和度的硫酸铵盐析沉淀。将沉淀溶于 50mmol/L 的 Tris-

HCl 缓冲液 (pH7.8) 并用相同的缓冲液透析后, 用聚乙二醇 6000 反透析浓缩, -20°C 冻存储备用。

1.3 SDS-PAGE 和蛋白质浓度的测定

不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 采用 Laemmli 系统^[10], 分离胶浓度 12.5%。电泳凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色。蛋白质浓度采用 Bradford 方法测定^[11], 以 BSA 为标准。

1.4 GroE 的固定化

用 20mmol/L 磷酸盐缓冲液 (含 0.5mol/L NaCl, pH7.1) 稀释上述 GroEL/ES 和 GroEL, 取适量甲酰基纤维素凝胶与一定量的 GroE (EL 和 ES 的摩尔比为 1, 含 10mmol/L ATP) 或 GroEL 溶液混合。于 30°C 缓慢搅拌反应 2h 后, 加入还原剂氰基硼氢化钠 (每克湿凝胶加 7mg 还原剂), 继续搅拌 6h。用 20 倍量蒸馏水洗凝胶后, 按比例每克凝胶加入 2mL 乙醇胺 (0.1mol/L) 溶液和 7mg 氰基硼氢化钠, 30°C 下搅拌 2h。用 20 倍量蒸馏水洗凝胶后, 将固定化分子伴侣凝胶悬浮于复性缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L MgCl_2 , 20mmol/L KCl, 2mmol/L ATP, pH7.8) 中备用。

1.5 溶菌酶活性的测定

用 0.05% 羟乙基化甲壳素 (溶于 0.1mol/L 醋酸缓冲液, pH4.5) 为底物, 0.5g/L 氰铁化钾溶液为显色剂, 测定反应液在 420nm 的吸光度, 通过 420nm 吸光度值的降低计算溶菌酶的活性^[12]。

1.6 溶菌酶的变性和复性

用含有 10mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT) 和 6mol/L GuHCl 的变性液, 在 40°C 下变性和还原溶菌酶。迅速用复性液稀释变性酶或将变性酶溶液与含有游离或固定化 GroE 的复性液混合, 在恒温条件下复性。变性酶的终浓度为 $2\mu\text{mol/L}$, 与游离 GroE 的摩尔比为 1:2, 与固定化 GroE 的摩尔比为 1:10。复性液中 GuHCl 的终浓度为 60mmol/L。

2 结果和讨论

2.1 分子伴侣 GroEL/ES 的表达和纯化

SDS-PAGE 电泳结果表明, 含有 pND5 质粒的大肠杆菌在 42°C 下热诱导时, 随着诱导时间的延长, GroE 的表达量不断提高。诱导时间为 7h 时, 表达量达到最大, 之后随诱导时间 GroE 有降解趋势。因此, GroE 的热诱导时间确定为 7h。

用 DEAE-Toyopearl 650 柱层析分离破碎细胞的上清液, 结果示于图 1。收集的各个洗脱峰用 SDS-PAGE 电泳分析, 确定峰 2 为 GroES 峰, 峰 7

为 GroEL 峰。收集的 GroES 和 GroEL 经盐析、透析和浓缩后, 测得其 280nm 和 260nm 处吸光度的比值为 1.95, 表明溶液中不含核酸。

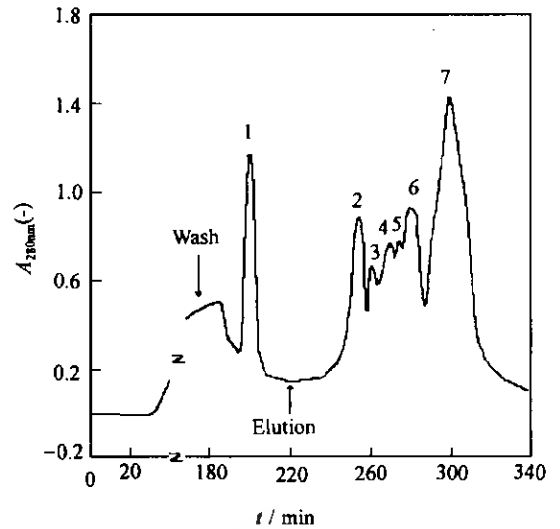


图 1 GroEL/ES 的阴离子交换层析分离图谱
Fig. 1 GroEL/ES purification by anion exchange chromatography from the cell lysate supernatant

Feedstock loading: 420mL supernatant (2.2mg/mL protein) in 50mmol/L Tris-HCl, 0.1mol/L KCl, pH7.8, at 2.6mL/min.

Wash: 50mmol/L Tris-HCl, 0.1mol/L KCl, pH7.8 (buffer A), at 10mL/min.

Elution: Linear gradient elution, buffer A to B (50mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L KCl, pH7.8 for 120min, at 5.2mL/min)

2.2 游离 GroEL 和 GroEL/ES 促进溶菌酶的复性作用

变性溶菌酶的自发复性以及游离 GroEL 和 GroEL/ES 促进变性溶菌酶复性的结果示于图 2。可以看出, 变性溶菌酶的自发复性能力很低, 说明本研究的实验条件不适于溶菌酶的自发复性。但是, 在相同实验条件下, 游离 GroEL/ES 对促进溶菌酶的复性效果非常明显, 溶菌酶的相对活性 (变性的或复性的溶菌酶活性相对于天然溶菌酶活性的百分数) 可从初始的 33% 复性到 110%。即使没有 GroES 存在, GroEL 也能促进溶菌酶活性恢复到 90% 以上, 说明 GroEL 单独存在也具有促进变性溶菌酶复性的作用。ATP 镁盐的存在对 GroEL 促进溶菌酶复性是必需的: 从图 2 可知, 当仅有 GroEL 存在而不加 ATP 时, 复性效果较差; 中途添加 ATP 至 2.0mmol/L 后, 酶活性则迅速提高, 30min 后仍可达到约 80%, 证实了 ATP 对 GroEL 辅助蛋白质复性的重要性。

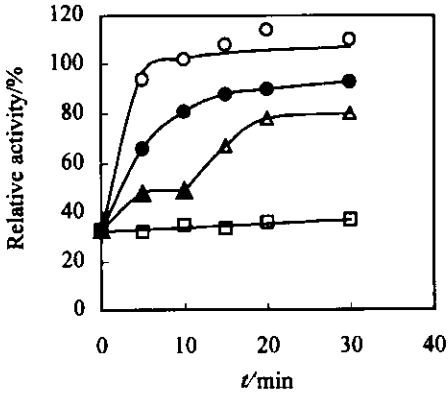


图 2 游离 GroEL/ES 和 GroEL 对变性溶菌酶的复性作用

Fig.2 Reactivation of denatured lysozyme assisted by free GroEL/ES and GroEL.

GroEL/ES/ATP(○);GroEL/ATP(●);

GroEL, without ATP(▲);GroEL, adding ATP in 10min(△);

Spontaneous refolding(□).

2.3 固定化 GroEL 和 GroEL/ES 辅助溶菌酶的复性作用

利用固定化分子伴侣凝胶(固定化密度为 10mg/g)辅助溶菌酶复性的结果示于图 3。在固定化 GroEL 和 GroE 的存在下,30min 后溶菌酶的活性从原活性的 33% 分别提高到 68% 和 76%。与图 2 相比,固定化分子伴侣的复性效果低于游离分子

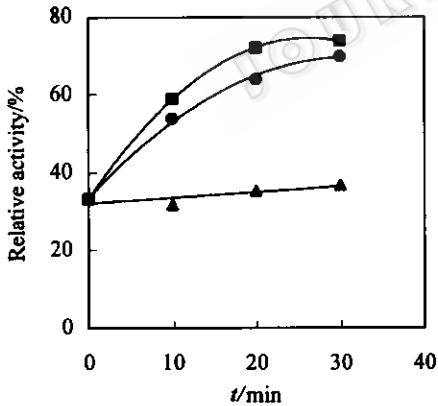


图 3 固定化 GroEL/ES 和 GroEL 促进变性溶菌酶的复性

Fig.3 Reactivation of denatured lysozyme promoted by immobilized GroEL/ES(■) and GroEL(●), and by simple dilution (spontaneous refolding)(▲)at 30°C

伴侣。主要原因可能有以下三方面:(1)固定化凝胶载体存在扩散传质阻力,使酶的表现复性速率降低,相同复性操作时间内的复性收率低于游离分子伴侣;(2)GroEL 的分子量大(约 800kD),固定化载体的空间位阻作用降低了其与酶的接触效率,导致其活性部分下降;(3)固定化分子伴侣辅助溶菌酶复性

的条件(如温度)可能不同于游离分子伴侣,需要进一步优化。

因此,为了优化固定化 GroEL 辅助变性溶菌酶复性的条件,进一步探讨了操作条件对复性的影响。图 4 和图 5 分别为不同温度和 pH 条件下固定化

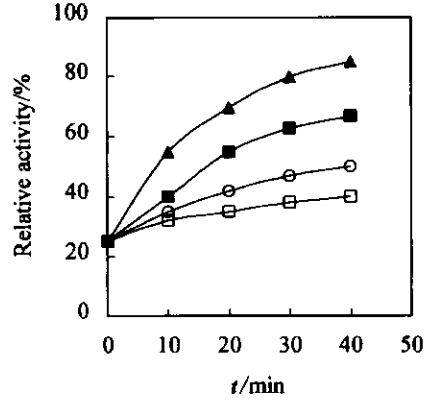


图 4 不同温度下固定化 GroEL 促进变性溶菌酶的复性

Fig.4 Lysozyme reactivation in the presence of immobilized GroEL at different temperatures: 25°C(○);30°C(■);37°C(▲);42°C(□)(pH7.8).

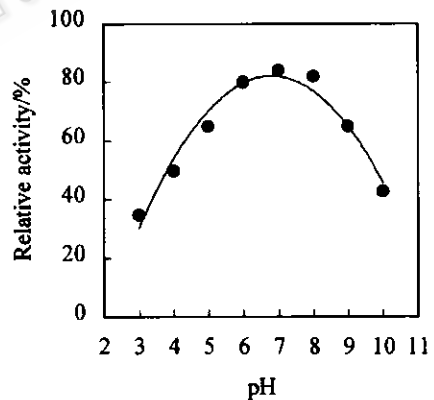


图 5 pH 对固定化 GroEL 促进变性酶复性的影响

Fig.5 Effect of pH on lysozyme refolding promoted by immobilized GroEL (refolding time:40min)

GroEL 辅助溶菌酶复性的情况。从图 4 可见,在 25~42°C 的温度范围内,固定化 GroEL 均能辅助溶菌酶复性。但 37°C 下的复性效果最好,复性 40min 后,初始相对活性从 25% 提高到 85%。当温度过高或过低时(42°C 或 25°C),复性效果均不理想。在不同的 pH 值下,虽然固定化 GroEL 对溶菌酶均有复性作用,但存在最佳 pH 范围,为 pH6~8(图 5),若偏离了这个 pH 范围,复性效率显著下降。比较图 3 和图 4 可知:(1)延长复性时间可提高固定化 GroEL 辅助溶菌酶复性的效果,证明载体内的扩散传质阻

力影响表观复性速率;(2)优化操作温度可提高蛋白质的复性收率。例如,在 37℃ 下可使溶菌酶复性收率达到 85% 以上,接近游离 GroEL 的复性作用。

2.4 固定化 GroEL 的反复利用

Guise 和 Chaudhuri 根据 GroEL 分子量大的特点,利用超滤法回收 GroEL,但 GroEL 的单级收率约 85%,反复利用 5 次后,GroEL 仅能回收 50%^[9]。本研究亦尝试了固定化 GroEL 的反复回收利用。如图 6 所示,固定化 GroEL 反复利用 5 次,酶的复性收率无明显变化,保持在 82%~88% 之间。因此,固定化分子伴侣技术有可能应用于生物下游的蛋白质复性过程。

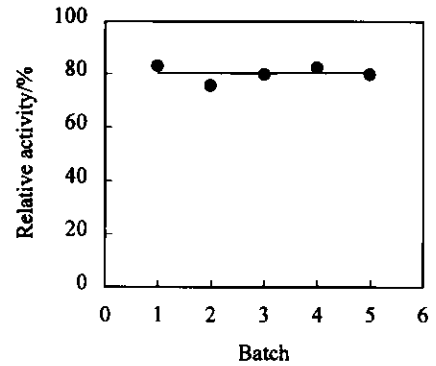


图 6 固定化 GroEL 凝胶的反复利用
Fig. 6 Recycled use of immobilized GroEL gel for the reactivation of denatured lysozyme

参 考 文 献

- [1] 冯佑民,张友尚. 蛋白质折叠,见:敖世洲主编. 基因分子生物学研究进展. 上海:上海科学技术出版社,1992. 125.
- [2] Hockney R C. *Trends Biotechnol*, 1994, **12**(2):456
- [3] Hendrick J P, Hartl F U. *The TASEB Journal*, 1995, **9**:1559
- [4] Llorca O, Carrascosa J L, Valpuesta J M. *J Biol Chem*, 1996, **271**(1):68
- [5] Smith K E, Fisher M T. *J Biol Chem*, 1995, **270**:21517
- [6] Mendoza J A, Rogers E, Lorimer G H *et al.* *J Biol Chem*, 1991, **266**:13044
- [7] Buchner J, Schmidt M, Fuchs M *et al.* *Biochem*, 1991, **30**:1586
- [8] Sadana A. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **48**(2):481
- [9] Guise A D, Chaudhuri J B. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**(2):343
- [10] Laemmli U K. *Nature*, 1970, **227**:680
- [11] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248
- [12] Yagishita K, Imoto T. *Agr Biol Chem*, 1971, **35**:1154

Reactivation of Denatured Lysozyme with Immobilized Molecular Chaperones GroE

DONG Xiao-Yan YANG Hui GAN Yi-Ru BAI Shu SUN Yan

(Department of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract The molecular chaperones GroEL and GroES were expressed in recombinant *E. coli* and purified by anion exchange chromatography. The renaturation of the denatured lysozyme with the free and immobilized GroEL/ES or GroEL was studied. We show here that using free GroEL alone could reactivate the denatured lysozyme up to a relative activity of over 90%. The immobilized GroEL was also effective for promoting lysozyme refolding. Moreover, the optimal temperature (*i. e.*, 37℃) and (pH (*i. e.*, 6 to 8)) for the immobilized GroEL-facilitated lysozyme refolding operation were determined. Under the optimal condition, the activity of lysozyme could be recovered up to 85%. In addition, the immobilized GroEL was repeatedly used five times without loss of its renaturation ability, indicating its potentiality to be used in practical downstream bioprocesses.

Key words Molecular chaperones, GroEL/ES, immobilization, lysozyme, refolding