

从大肠杆菌包含体中提取有活性的人溶菌酶的研究

钱世钧 陈欣* 叶军 郭良栋 郭伟

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

在医药和工业上,许多非常有应用前景的真核多肽,往往由于它们天然来源缺乏,不能充分提供产品,限制了它们的应用范围。通过基因克隆技术使其在大肠杆菌中表达,这就为这些蛋白质提供丰富的来源。然而,在细菌中表达的重组蛋白质在细胞内常以不溶性的没有生物活性的包含体形式累积,从这些包含体中恢复重组蛋白质的生物活性成为 DNA 重组技术广泛应用的一个重大课题。

我们已自行设计、自行合成了人溶菌酶基因^[1]并已在^[1]大肠杆菌中获得表达。它也是以不溶性的包含体形式存在于工程菌中。本文试图通过对该包含体的分离,溶解,多肽复性方法等的研究,来提高酶的复性率。

1 材料和方法

1.1 菌种

人溶菌酶工程菌 JPB-Hly,由本组自行构建。

1.2 培养基和培养方法

培养基:每 100ml 含 5×M9 20ml,胰蛋白胨 2.0g,酵母提取物 1.5g,葡萄糖 0.2g,pH7.0。按 4% 的接种量接到该培养基中,28℃ 摇荡培养,在 A₆₆₀达到 4.0~4.5 时,立即转到 42℃ 诱导 1~2h。

1.3 试剂

聚乙二醇为 Sigma 产品,氧化型和还原型谷胱甘肽为 Serva 公司产品,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.4 包含体的分离

1.4.1 将菌体悬浮于磷酸钠缓冲液(50mmol/L, pH6.4),用超声波破碎菌体,然后离心收集沉淀物。

1.4.2 有机溶剂处理菌体:按每克湿菌体加 4ml 冷丙酮(或其他有机溶剂),磁力搅拌 1h,在 20℃ 以下自然风干得细胞干粉。

1.5 包含体的溶解

上述两种方法所得到的固形物都悬浮于缓冲液 I (50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.1mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100)中,10000r/min,离心 10min.,收集沉淀,再用冷水洗二次,离心。按 lg 湿菌体 8ml 的比例,将缓冲液 II (50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, 8mol/L 尿素, 10mmol/L 巯基乙醇)慢慢加入于上述固形物中,搅拌过夜。

1.6 蛋白质的复性

在上述溶解液里,慢慢加入 9 倍体积的缓冲液 III (50mmol/L K₂HPO₄, 1mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, pH10.7),用 KOH 保持 pH10.7~10.8,搅拌 1h。再用 1mol/L HCl 调回 pH8.0,搅拌 1h,如需加不

* 北京师范大学生物学系 1995 年毕业生。

“八五”国家科技攻关计划资助项目。

本文于 1995 年 12 月 15 日收到。

同助复性试剂,则在调回 pH8.0 后加入,搅拌 1h,放置 2~3h。离心上述溶液,上清液对水透析。

1.7 酶活力测定方法

取 1.2ml 溶于磷酸钠缓冲液(50mmol/L, pH6.4)的溶壁微球菌(150 μ g/ml)中,加入 300 μ l 粗酶液,立即摇匀,并在 30 $^{\circ}$ C 下测出在 A₄₅₀处 10min 内光密度变化值。

酶单位定义:在上述标准条件下,每分钟光密度降低 0.001 所需要的酶量为一个酶活力单位。

2 结果

2.1 不同方法处理菌体的比较

按材料和方法所述,等量培养液所得菌体分别用超声·丙酮·甲苯处理,然后同样按常规方法进行变性复性处理,测定酶活力。结果表明,用有机溶剂处理菌体,同样能使含人溶菌酶的包含体从细胞中释放出来,特别是在丙酮处理后,经变性复性所得酶活性还高出超声处理后所得的酶活性 12%。

2.2 聚乙二醇对人溶菌酶复性的影响:

按材料和方法所述,菌体经超声、溶解后,在复性时,加入不同分子量的聚乙二醇(PEG)(聚乙二醇加量为 3g/L),然后按常规法搅拌,透析,测定酶活力。从结果看,加入分子量 8000,20000 的 PEG,都能提高酶的复性率(分别提高 22% 和 17%),而分子量较低的 1540, 6000PEG,效果不明显。

以 PCG8000 为例,在复性时加入不同量的 PEG,结果表明,如以 3g/L 比例加入 PEG 时,人溶菌酶复性效果最好。

在复性过程的不同阶段,分别在 pH10.7 和 pH8.0 时加入 PEG,对复性效率也会有差别,一般说来,在调回 pH8.0 以后加入 PEG,效果会更好些。(数据未列出)

2.3 谷胱甘肽对人溶菌酶复性的影响

在复性液中,加入不同比例的氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽(GSH),从最后的结果看(表 1),加入各种比例的谷胱甘肽之比在 2:1 时,酶的复性效果更好些。

表 1 谷胱甘肽对人溶菌酶复性的影响

GSH /mmol·L ⁻¹	GSSG /mmol·L ⁻¹	GSH/GSSG	Relative Enzyme Activity/ %
0	0		100
1.0	0.5	2:1	154
0.1	0.1	1:1	140
0.2	0.1	2:1	149
0.5	0.1	5:1	148
1.0	0.1	10:1	141

2.4 Na₂SO₃·Na₂S₂O₃ 对人溶菌酶复性的影响

加入一定浓度,一定比例的 Na₂SO₃·Na₂S₂O₃,对人溶菌酶的复性率也有影响。在所试的各种条件中,加入 0.3mmol/LNa₂SO₃, 0.06mol/LNa₂S₂O₃ 时,复性率效果较佳(表 2)。

表 2 Na₂SO₃·Na₂S₂O₃ 对人溶菌酶复性的影响

Na ₂ SO ₃ /mmol·L ⁻¹	Na ₂ S ₂ O ₃ /mmol·L ⁻¹	Na ₂ SO ₃ /Na ₂ S ₂ O ₃	Relative Enzyme Activity/ %
0	0		100
0.3	0.06	5:1	154
0.3	0.03	10:1	152
0.3	0.02	15:1	138
0.1	0.0067	15:1	135

2.5 甘油对人溶菌酶复性的影响

一定浓度的甘油对酶的复性也有益处,5% 和 10% 的甘油浓度分别能提高酶的复性率 31.4% 和 36.5%。

3 讨论

没有生物活性的包含体需经包含体的分离,溶解,复性三步处理,才能获取有酶活性的蛋白质。

通常包含体累积在细胞质里,为了得到包含体,就需裂解细胞,常用的方法有:弗氏压碎法,匀浆,超声等。而经过

丙酮处理以后,包含体也能从细胞中释放出来,该方法简单,易行,可以作为代替超声等的一种有效方法,但应注意的是,不能在较高温下处理细胞。

在变性蛋白质的再折叠过程中,复性与没有生物活性蛋白质重新凝聚是互相竞争的^[2]。所以有必要选择一个形成凝聚物最少的条件。而常用的方法是改变复性液中成分。聚乙二醇由于它的脂肪链结构的障碍而受到蛋白质表面分子的排斥,能促使平衡趋向结构的紧密状态,如天然蛋白质状态,同时,PEG也能结合到多肽的非极性区域。如果结合到凝聚部位的中间体时,这样就减少了凝聚的可能性。因此,对于一定长度,一定量的PEG,这种排斥和结合的作用就能增加蛋白质再折叠,防止凝聚的能力,从而提高复性率。

对于大多数原有二硫键的变性蛋白质来说,一个关键的反应则是天然二硫键的再生^[3]。二硫键的重新形成通常有二种途径来达到,一个是空气氧化,另一个则是二硫键的交换。而前者往往会产生过氧化而不常用,而二硫键交换则需要有一组低分子量氧化-还原系统试剂。如还原型和氧化型的谷胱甘肽,且二者有一定比例,类似于细胞内环境。在我们的实验室里,GSH:GSSG之比在2:1时,对复性效果最好。

我们已经知道甘油能增加蛋白质天然状态的稳定性。从实验结果来看,一定浓度的甘油对于变性蛋白质的重新折叠也是有利的。它的原理估计是甘油能促使和稳定在重新折叠过程中分子内的中间状态结构。

参考文献

- [1]钱世钧,于颖,田开荣等.生物工程学报,1994,10(1):39~44.
- [2]Bernhard Fischer *et al.* Biotechnology and Bioengineering, 1993, 41:3~13.
- [3]Jeffrey L Clelang, Daniel I C Wang, Bio/Technology, 1990, 8:1274~1278.

The Studies on Recovery of Biologically Active Recombinant Human Lysozyme from Inclusion Bodies in *Escherichia coli*

Qian Shijun Chen Xin* Ye Jun Guo Liangdong Guo Wei

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Biologically active human lysozyme from an engineered bacterium *E. coli* was obtained by isolation and solubilization of inclusion bodies as well as renaturation of solubilized polypeptides. The inclusion bodies could also be obtained after the treatment of cell with acetone, instead of sonication. The additions of PEG, glutathione glycerol, or sodium sulfite and sodium thiosulfate in the renaturation solution, can increase yield of renatured active human lysozyme.

Key words Human lysozyme, inclusion body, renaturation