

重组羧肽酶原 B 的复性方法研究*

张晓彦 刘海峰 袁勤生**

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘要: 构建的羧肽酶原 B 表达质粒在大肠杆菌中获得高表达。但目的蛋白是以包涵体的形式存在。为了获得活性羧肽酶 B, 必须对其包涵体进行变复性。首先利用稀释复性确定了羧肽酶原 B 复性的最佳缓冲液; 在凝胶过滤复性中, 研究了柱长和洗脱流速对羧肽酶原 B 复性效率的影响; 另外对比了稀释复性、透析复性、凝胶层析复性和 Ni^{2+} 亲和层析法等四种方法对羧肽酶原 B 的复性效果。结果发现, 这 4 种方法的复性效果有以下顺序: 凝胶过滤复性 > 稀释复性 > Ni^{2+} 亲和层析 > 透析复性。

关键词: 羧肽酶原 B, 包涵体, 凝胶过滤, 稀释, 透析, Ni^{2+} 亲和层析

中图分类号: Q782 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0039-06

Study on Refolding Ways of Recombinant pro-Carboxypeptidase B*

ZHANG Xiao-Yan LIU Hai-Feng YUAN Qin-Sheng**

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: Recombinant pro-carboxypeptidase B forms insoluble inclusion bodies when overexpressed in *Escherichia coli*, and it must be denatured and renatured in vitro before it acquires activity. Firstly, we optimized the renaturation buffer by dilution ways. In the urea gradient gel filtration, we studied the column length and elution velocity on pro-carboxypeptidase B refolding effect. Finally, refolding effects of four ways including dilution, dialysis, urea gradient gel filtration and Ni^{2+} immobilize metal affinity chromatography were compared. The results indicated that the sequence of refolding effect was as follows: urea gradient gel filtration > dilution > Ni^{2+} immobilize metal affinity chromatography > dialysis.

Key words: Pro-carboxypeptidase B, Inclusion bodies, Urea gradient gel filtration refolding, Dilution, Dialysis, Ni^{2+} immobilize metal affinity chromatography

天然存在的羧肽酶 B (水解酶 EC3.4.17.2, Carboxypeptidase B, 简称 CPB) 是一种含锌原子的外肽酶, 它可以特异性地从肽链中去除 C 端的碱性氨基酸, 包括精氨酸、赖氨酸和鸟氨酸。羧肽酶 B 在商业和科研上有着很广泛的用途, 它可用于蛋白质和多肽的序列分析^[1]; 在胰岛素的生产过程中, 羧肽酶 B 用于切割胰岛素原, 使之变成为胰岛素; 在医学上用于诊断胰腺炎^[2,3]。羧肽酶 B 最早是从猪和牛的胰脏中分离得到的。到目前为止, 很多其他来源的羧肽酶 B 也得到了很好的纯化和研究, 比如: 人类, 海星, 龙虾, 鲶鱼, 肺鱼^[4-6]等。目前商业上使用的羧肽酶 B 是从猪的胰腺纯化得到的, 不仅价格昂贵, 而且并不完全排除其他酶, 如羧肽酶 A。因此, 用重组的方法生产一种高纯度、高活性, 同时又价格低廉的羧肽酶 B 对于研究和应用来说有极为重要的意义。

* 上海市重点学科资助项目

** 通讯作者 Tel: (021) 64252255, Fax: (021) 64252255, E-mail: qsyuan@ecust.edu.cn

收稿日期: 2004-07-05, 修回日期: 2004-09-03

我们采用基因工程技术克隆了羧肽酶原 B (Pro-Carboxypeptidase B, 简称 pCPB), 并使其在重组的工程菌中得到了高效表达。为了使表达时所形成的包涵体获得活性, 本文应用几种方法进行了复性研究, 包括: 稀释复性, 透析复性, 凝胶过滤复性及 Ni^{2+} 亲和层析复性。结果发现, 在最终蛋白浓度较高的情况下, 使用凝胶过滤复性的活力回收率最高, 实验中对于凝胶柱的长度和复性过程中的流速也进行了优化。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

质粒: pT7-pCPB, pT7-473-pCPB, 克隆菌株 *E. coli* DH5 α , 表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3), 本实验室保存。

1.2 试剂

蛋白胨 (Oxoid, UK), 酵母粉 (Oxoid, UK), IPTG (异丙基硫代半乳糖苷, 进口分装), 胰蛋白酶 (Sigma); Hippuryl-L-arg, Sigma; Sephacryl S-200, Pharmacia; Ni^{2+} immobilize metal affinity chromatography (简称 IMAC), Pharmacia。其余均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器和设备

分光光度计 (UNICO, UV-2100), Beckman 高速冷冻离心机 (Model J2-21M), AKTA explorer 快速纯化工作站。

1.4 羧肽酶原 B 的表达和包涵体的收取与洗涤

挑取 LB (氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 平板上的单菌落接种于 25 mL LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 按 1% 接种至二级瓶中 (30 mL 液体 LB 培养基, 氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 生长至菌浓度 OD_{600} 约 0.5 ~ 0.8 时, 加入 5×10^{-4} mol/L IPTG 进行诱导, 继续生长 5 h 后, 离心收集菌体。将菌体悬浮在 TE (0.02 mol/L Tris-HCl, pH8.0 0.001 mol/L EDTA) 中, 加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶菌酶, 进行超声破碎。离心收集包涵体。用 0.02 mol/L Tris-HCl, 1% Triton pH8.0 的溶液悬浮包涵体, 静置 30 min 后, 离心, 所得沉淀用 TE 再洗涤两次, 离心收集包涵体。

1.5 包涵体的溶解

按照蛋白终浓度为 1 ~ 10 mg/mL 的比例加入包涵体溶解液 (8 mol/L 尿素, 0.02 mol/L Tris-HCl pH8.0), 溶解包涵体, 在室温下溶解 1.5 ~ 2.0 h 后, 离心, 取上清进行复性。

1.6 稀释法复性

将上述变性液按照一定的比例缓慢滴入正在搅拌的复性液中, 静置 24 h 后, 比较不同的蛋白浓度、pH 范围、温度、氧化还原对、变性剂浓度对重组羧肽酶原 B 体外复性效率的影响。

1.7 透析法复性

采用分段透析的方法, 将浓度为 1 mg/mL 的 pCPB (10 mL) 分别对含有 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L、0.5 mol/L 尿素的复性液进行透析, 透析液体积为 100 mL, 温度 4 $^{\circ}\text{C}$, 时间均为 4 h。

1.8 凝胶过滤法复性

采用谷振宇等人发展的尿素浓度梯度脱除^[7]的方法, 使用两种溶液分别为 A: 即

为优化好的复性缓冲液; B: A 液中加入 8 mol/L 的尿素。以 A 液平衡 Sephacryl S-200 柱, 设定程序在 1/4 柱体积内使 B 的浓度增加至 100%, 然后加入样品 (浓度为 5.5 mg/mL), 以 A 液洗脱。收集目标蛋白峰。

1.9 Ni^{2+} 亲和层析柱复性

IMAC 柱 1.5 mL 用 10 mL 蒸馏水冲洗后, 用 10 mL (10 mg/mL) NiSO_4 进行活化, 并用 10 mL 蒸馏水洗去未结合的 Ni^{2+} 。用含有 8 mol/L 尿素的复性缓冲液平衡柱子, 上样 3 mg (6His-tag pCPB 0.5 mg/mL), 以相同的复性缓冲液平衡, 在上样和平衡过程中保持较低流速 (0.1 mL/min), 使目的蛋白和柱体能够很好的结合。复性采用梯度脱除尿素的方法来实现: 在 30 mL 的总体积内, 使尿素的浓度从 8 mol/L 降低为 0.5 mol/L, 梯度结束后, 用含 0.5 mol/L 尿素的复性缓冲液继续缓慢冲洗 (0.1 mL/min)。复性后, 用含有 0.1 mol/L 组氨酸的复性液洗脱目的蛋白, 流速为 0.5 mL/min。

1.10 复性效率的定义

复性后, 用胰蛋白酶酶解后 (样品量: 胰蛋白酶量为 10:1 W/W) 测活, 以 CPB 的比活和总活力两个指标判断复性效率的高低。

1.11 蛋白浓度的计算

Bradford 法^[8]测定蛋白浓度, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准蛋白。

1.12 羧肽酶 B 活性测定方法

参照 Folk 的方法^[9], 以含 0.1 mol/L NaCl 的 0.001 mol/L Hippuryl-L-arg 作为底物, 25℃测定。一个活力单位定义为: 25℃时, 每分钟催化水解 1 μmol Hippuryl-L-arg, 导致 254 nm 处 1 cm 路径长的光吸收增加 0.12 的酶量定义为一个活力单位。

2 结果

2.1 稀释复性基本条件的确定

在稀释复性中, 考察了蛋白浓度、pH 值、温度、氧化还原对、及尿素浓度等因素对复性效率的影响, 结果最终得到的复性液成分如下: 0.02 mol/L Tris-HCl, pH9.5, 0.001 mol/L GSH, 0.5 mol/L 尿素, 蛋白浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$, 温度为 25℃。在此条件下, 复性后的 pCPB 经酶解后, CPB 比活可以达到 30.50 u/mg。(具体数据另文发表)

2.2 透析复性结果

由于采用了缓慢降低尿素浓度梯度的方法, 在透析过程中, 没有产生沉淀。另外, 考虑到透析袋内溶氧有限, 对二硫键的重新形成不利, 因此, 在利用上述优化好的复性液基础上, 又添加了 0.004 mol/L GSSG。但最终复性液中蛋白的比活和总活力都很低, 只有 2.65 u/mg 和 29.15 U, 这说明在利用透析的方法对 pCPB 进行复性时, 由于起始蛋白浓度过高, 蛋白之间的相互聚集是非常严重的, 如果要提高复性液中的活力, 必须降低初始的蛋白浓度, 这样又势必会引起透析液体积的扩大, 从而造成浪费。

2.3 凝胶过滤复性结果

凝胶过滤柱上复性是研究较为深入的一种色谱复性方法。它的原理在于凝胶介质为变性蛋白提供了类似于“无限稀释”的复性空间, 有效地分散了蛋白质分子, 抑制了分子间疏水作用而导致的聚集^[10]。本文应用谷振宇^[7]等发展的尿素浓度梯度凝胶过滤复性, 对 pCPB 的复性进行了研究, 这种方法可使柱从顶端到出口形成一个尿素梯度, 因为尿素分子很小, 可保证蛋白分子从尿素梯度中穿行而过, 从而避免了因为尿

素浓度的过快变化对复性造成的不利影响。另外考察了不同柱型以及流速对复性效果的影响。

2.3.1 凝胶柱长度对复性效果的影响：使用了 3 种不同规格的凝胶柱对 pCPB 进行了复性研究，分别是 30 cm × 1.5 cm (A)；60 cm × 1.5 cm (B)；及 120 cm × 1.5 cm (C)。上样量为柱体积的 1%，蛋白浓度均为 5.5 mg/mL。洗脱流速为 0.5 mL/min。洗脱曲线如下图：

从图 1 可以看出，随着凝胶柱柱长的增大，洗脱曲线发生了明显的变化：从 A 柱上得到的洗脱峰窄而尖锐，经酶解测活后，未测到活力（表 1）；从 B 柱上得到两个洗脱峰，其中一号峰没有活力，二号峰的活力也较低，说明至少有部分蛋白得到了正确折叠；从 C 柱上得到的两个洗脱峰均有活力，一号峰的活力为 3.86 u/mg，二号峰的活力很高，为 32.62 u/mg（表 1）。

蛋白在变性液中，结构处于完全伸展的状态，其 Strokes 半径和天然结构的蛋白相比要大很多，当用复性缓冲液洗脱时，局部变性剂浓度降低使得蛋白质分子处于热力学不稳定的高能态，这些蛋白质分子就会自发地向热力学稳定的低能态，即蛋白质的天然状态转化，蛋白质因此开始复性。由此可见，高浓度变性剂的缓慢脱除对于复性来说是必需的。如果没有足够的柱长，变性剂脱除过快，变性蛋白在没有完成正确折叠的时候就被洗脱下来。以上数据可以看出，柱长和柱体积越大，复性效果越好。但考虑到实验中的可操作性，我们选定了 C 柱型，即 1.5 cm × 100 cm。

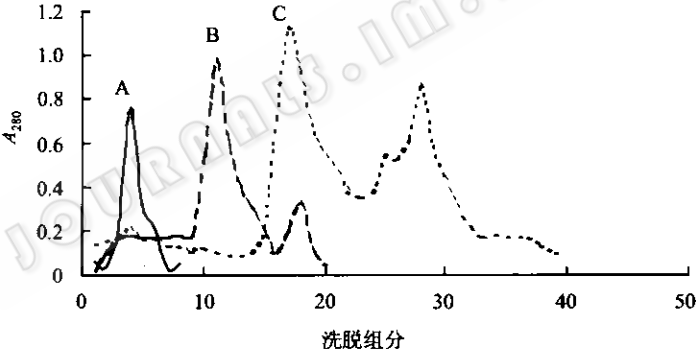


图 1 柱长度对洗脱峰形状的影响

表 1 不同柱型对复性效果的影响

	一号峰		二号峰	
	比活 (u/mg)	总活力 (u)	比活 (u/mg)	总活力 (u)
A	—	—	—	—
B	—	—	4.91	9.85
C	3.86	17.83	32.62	185.82

2.3.2 洗脱流速对复性效果的影响：采用 C 柱型，考察了洗脱流速对复性效果的影响，上样量为 2 mL (5.5 mg/mL)。洗脱后，对比峰型的差异。从图 2 中可以看出，随着洗脱流速的降低，峰型也有比较明显的改变：当流速最大 (1 mg/mL) 时，只得到了单峰；流速降低，出峰时间有延迟的趋势；而且流速降低后，一号峰的体积减少，二号峰的体积增大。其中，0.3 mL/min 和 0.1 mL/min 的流速下所得到的峰型没有太大的差异。将各个条件下得到的峰分别收集起来，胰蛋白酶酶解后，测活，比较比活和总活

力的大小。从表 2 中可以看到,当流速为 1 mg/mL 时,得到的比活和总活力都很低,反映了只有部分蛋白得到了正确折叠,而且正确折叠的蛋白和聚集体是混合在一起的;当流速降低后,聚集体和复性蛋白在一定程度上得到了分离,使得 2 号峰的比活高出一号峰 10 倍左右,而且流速越低,复性蛋白越多,得到的总活力也越高。这是因为,在梯度凝胶过滤复性中,流速低时尿素脱除的速度比高流速下来得更加缓慢、温和;另外,低流速下,变性蛋白在柱上有足够的时间完成正确构象的折叠。虽然低流速可以提高复性效果,但当流速低于 0.3 mL/min 时,活力的提高就不明显了,而且过低的流速会延长复性时间。因此我们在实验中选择的流速为 0.3 mL/min。

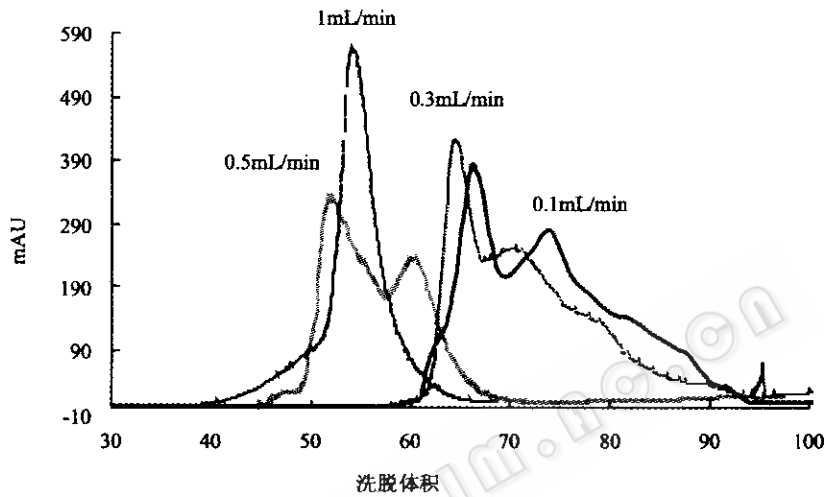


图 2 不同流速下洗脱峰的比较

表 2 不同流速对复性效果的影响

流速 (mL/min)	一号峰				二号峰				总活力 (一号峰+二号峰)
	体积 (mL)	蛋白浓度 (mg/mL)	比活 (u/mg)	总活力	体积 (mL)	蛋白浓度 (mg/mL)	比活 (u/mg)	总活力	
1	28	0.34	4.33	41.22	—				41.22
0.5	11	0.42	3.86	17.83	15	0.38	32.6	185.82	203.65
0.3	8	0.35	4.87	13.64	26	0.27	37.1	260.44	274.08
0.1	8	0.34	4.54	12.35	27	0.26	38.4	269.57	281.92

2.4 Ni²⁺ 亲和层析柱复性结果

Ni²⁺ 亲和层析柱复性是固相复性的一种,与凝胶过滤复性的原理不同,它提供了一种固相的介质,使带有组氨酸结构的蛋白能够与介质进行结合,从而降低了变性蛋白之间因疏水作用而相互靠近的趋势,在缓慢脱除变性剂的过程中,变性蛋白能够逐渐呈现天然结构,从而完成复性过程^[11,12]。较少的上样量和复性过程中较低的流速对于获得高的复性率是必须的。在本实验中,我们用 8M 尿素溶解 6His-tag pCPB 包涵体,并使用 Ni²⁺ 亲和层析对变性蛋白进行了复性研究。从表 3 可以看出,和稀释复性及凝胶过滤复性相比,用 IMAC 复性所得到的蛋白终浓度较高,但洗脱液中的比活很低,仅比透析复性高两倍,比稀释复性和凝胶复性要低 5 倍左右(表 3)。这说明, Ni²⁺ 亲和层析对于 6His-tag pCPB 的复性来说虽然有一定作用,但这种作用比较有限,只能使部分蛋白正确折叠。

表 3 不同复性手段的复性效果的比较

复性方法	初始蛋白量 (mg)	终产物中总 蛋 (mg)	蛋白终浓度 (mg/mL)	比活 (u/mg)	总活力 (u)
稀释	11	11	0.29	20.51	225.61
	11	11	0.15	30.50	335.50
透析	11	11	1	2.65	29.15
分子筛	11	10.3	0.29	27.88	274.08
IMAC	3	2.3	0.37	4.98	12.96

3 讨论

文章中采用了稀释复性、透析、尿素梯度凝胶过滤以及 Ni^{2+} 亲和层析等 4 种方法对羧肽酶原 B 包涵体进行了复性研究。首先应用稀释复性确定了羧肽酶原 B 复性的最佳缓冲液, 即 0.02 mol/L Tris-HCl, pH9.5, 0.001 mol/L GSH (或者加入 0.004 mol/L GSSG), 0.5 mol/L 尿素, 温度为 25℃, 在蛋白浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 的条件下, 经酶解后得到羧肽酶 B 的比活可达到 30.5 u/mg。另外重点讨论了凝胶过滤复性中柱长和洗脱流速对复性效果的影响, 发现, 随着柱长度的增加和流速的降低, 复性效率相应地增加, 但考虑到实验中的可操作性, 选定的柱长 1.5 cm $\times$ 100 cm, 流速为 0.3 mL/min。在凝胶过滤复性中, 我们注意到尽管流速降低到 0.1 mL/min, 仍然有近 30% 的蛋白存在于第一个洗脱峰中, 这些蛋白只有部分正确折叠。如果要减少一号峰的蛋白量, 提高复性蛋白的产率, 可能需要更大的柱体积。比较这 4 种复性方法, 应用稀释复性和凝胶过滤复性都得到了较好的复性效果。在最终蛋白浓度相同的情况下 (0.29 mg/mL), 经凝胶过滤复性的比活和总活力要大于稀释复性, 而且应用凝胶过滤复性, 还可以使聚集体和复性蛋白在一定程度上得到分离。另外两种复性方法, 尽管蛋白终浓度较高, 但由于蛋白聚集严重, 导致酶解后复性液中 CPB 的比活和总活力都很低。

蛋白复性是一个复杂的工作, 需要针对每种蛋白的特性进行详尽的研究。找出适合的复性方法。本实验通过对几种复性方法的比较和探讨, 确定了重组羧肽酶原 B 包涵体的最佳复性方法, 为重组羧肽酶 B 的生产提供了依据。

参考文献

- [1] Cohen T, Gertler A, Birrk Y. *Comp Biochem Physiol*, 1981, **69B**: 639 ~ 646.
- [2] Appels S, Petersson U. *Br J Surg*, 2001, **88** (2): 216 ~ 221.
- [3] Muller C, Uhl W. *Swiss Surg*, 2000, **6** (5): 235 ~ 240.
- [4] Bradley G, Ryno J. *N Int J Biochem Cell Biol*, 1996, **28**: 521 ~ 529.
- [5] Hajjou M, Smine A. *Comp Biochem Physiol*, 1995, **110B** (4): 791 ~ 798.
- [6] Kishimura H, Hayashi K. *Comparative Biochemistry and Physiology part B*, 2002, **133**: 183 ~ 186.
- [7] Gu Z, Su Z, Janson J-C. *Journal of Chromatography A*, 2001, **918** (2): 311 ~ 318.
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2002. 42 ~ 47.
- [9] Folk J E, Gladner K, Piez A, *et al.* *Carboxypeptidases B Biol Chem*, 1960, **235** (3): 2271 ~ 2277.
- [10] Batas B, Chaudhuri J B. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **50** (1): 16 ~ 23.
- [11] Lemerrier C, Bakalara N, Santarelli X. *Journal of Chromatography B*, 2003, **786**: 305 ~ 309.
- [12] Matsumoto M, Misawa S, Tsumoto K. *Protein Expression and Purification*, 2003, **31**: 64 ~ 71.