

# EC-SOD 包涵体的柱上复性、纯化及稳定性研究

朱希强 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:** 利用 His-tag 与金属离子的特异结合作用, 通过金属 (Ni) 亲和层析对 EC-SOD 包涵体进行柱上复性。考察蛋白上样量、尿素脱除速率和复性温度对复性效率的影响。利用 Ni-sepharose 和 Heparin-sepharose 亲和柱对重折叠后的蛋白进行纯化, 并研究复性蛋白的稳定性。结果表明, 利用 Ni-sepharose 亲和柱可以对 EC-SOD 进行复性, 上样量越大, 尿素脱除速率越快, 复性效率越低; 温度升高, 复性效率增加。Ni-sepharose 对复性后蛋白具有纯化作用, 经 Heparin-sepharose 亲和柱纯化后蛋白比活明显提高。复性蛋白在 10℃ ~ 50℃ 温度范围内活性稳定, pH 低于 5 大于 10 时, 其稳定性显著降低, 在尿素和盐酸胍溶液中复性蛋白的稳定性较弱。

**关键词:** 重组人 EC-SOD, 包涵体, 柱上复性, 纯化

**中图分类号:** Q782 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0101-06

## On-column Refolding of EC-SOD Inclusion Bodies, Purification and Stability Study

ZHU Xi-Qiang YUAN Qin-Sheng\*

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

**Abstract:** EC-SOD inclusion bodies was refolded on column using metal (Ni) affinity chromatography, based on the metal-binding property of His-tag. The effect of protein amount, urea removal speed and temperature on refolding was observed. We compared the different efficiency purified with Ni-sepharose and Heparin-sepharose affinity chromatography, and studied the stability of the refolded proteins. The results indicate that the inclusion bodies can be renatured with Ni-sepharose affinity chromatography. The increase of the protein amount and urea removal rate, the lower of the renaturation efficiency. Higher temperature was benefit to protein renaturation. Both the Ni-sepharose and Heparin-sepharose affinity column can be used to purified the refolded proteins, but purified by Heparin-sepharose affinity column the protein had higher activity. The activity of renatured protein was stable in 10 °C ~ 50 °C, when pH < 5 or pH > 10 its stability was lower significantly. In denaturing solution the stability of renatured protein was low.

**Key words:** Recombinant hEC-SOD, Inclusion bodies, On-column refolding, Purification

EC-SOD (Extracellular Superoxide Dismutase) 是超氧化物歧化酶 (SOD) 的一种同工酶, 主要存在于细胞外体液中, 如淋巴液、滑膜液及子宫液等<sup>[1]</sup>。该酶是一种疏水糖蛋白, 分子量大约为 135kD<sup>[2]</sup>, 结构稳定, 有较强的抵抗高温、极端 pH 和高浓度尿素等作用<sup>[3]</sup>。

EC-SOD 主要功能是清除细胞外产生的多余的超氧离子 ( $O_2^-$ ), 并由此引发多种药理学作用, 如 NO 的细胞间信号传导; 脑、肺及心脏组织损伤的保护作用; 糖尿病及神

\* 通讯作者 Tel: 021-64252255, Fax: 86-021-64252255, E-mail: qsyuan@ecust.edu.cn

收稿日期: 2004-10-18, 修回日期: 2004-11-29

经性疾病等<sup>[4]</sup>。EC-SOD 体内含量极少, 靠分离纯化来获取蛋白十分困难, 因此进行基因克隆表达具有重要意义。

Karin 在 1987 年首次克隆了人 EC-SOD 的 cDNA, 并对其序列进行了分析<sup>[5]</sup>。我室与中科院合作构建了 EC-SOD 的大肠杆菌表达质粒, 并成功进行了高表达<sup>[6]</sup>。表达蛋白以包涵体的形式存在, 需经体外复性才能获得生物活性。本实验在稀释复性研究的基础上利用重组蛋白 N 端的 His-tag 与  $\text{Ni}^{2+}$  亲和柱特异结合的特性, 探讨柱上复性的可行性。并初步研究了复性后 EC-SOD 的稳定性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

EC-SOD 基因工程菌由本课题组构建; 质粒 Pet-28a (+) 和菌株 BL21 (DE3) 由中国科学院上海生物化学研究所吴祥甫教授提供。

蛋白胨, 酵母粉均为 Oxoid, UK, 氧化/还原型谷胱甘肽 (GSSG/GSH), 精氨酸, Triton X-100 均为 AMRESCO 分装, 硫酸镍, 上海凌峰化学试剂有限公司, 咪唑, 永华特种化学试剂厂, 二硫代苏糖醇 (DTT), 怡成生物公司, Calbiochem 分装, SDS, 尿素等均为国产分析纯, His-蛋白质镍亲和层析介质 (IMAC), 上海华舜生物工程有限公司; Heparin-sepharose CL-6B, Pharmacia。

### 1.2 方法

**1.2.1 包涵体的制备和变性:** EC-SOD 在大肠杆菌中的表达按文献 [6] 方法进行。冰浴条件下超声破碎菌体, 于  $4^{\circ}\text{C}$  12,000r/min 离心 10min, 弃上清。所有包涵体均悬于适量 Triton X-100 溶液中, 室温振荡约 30min, 于  $4^{\circ}\text{C}$  12,000r/min 离心 10min。以上步骤重复 3 次, 用 TE-buffer 洗涤残留的 Triton X-100, 凉干后, 冷冻保存。

称取 50mg 包涵体, 加含 0.2mol/L DTT 的变性液 1mL (8mol/L 尿素, 20mmol/L Tris-HCl, pH7.5), 室温振荡 1h, 使其充分溶解。 $4^{\circ}\text{C}$  12,000r/min 离心 10min, 去除不溶物, 上清经 G-25 脱出 DTT, 洗脱液为上述变性液, 但 pH 为 3~4。收集蛋白峰, 用 Bradford 法测蛋白含量, 密闭后置  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

**1.2.2 金属螯和层析柱的预处理:** 配制 A、B 两种缓冲液, A 为稀释复性的最佳缓冲液, 组成为: 20mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 4mmol/L GSH, 1mmol/L GSSG, 4mmol/L 精氨酸, 1.5mol/L 尿素; 溶液 B 中尿素浓度为 8mol/L, 其它同溶液 A。上样前用溶液 B 平衡被  $\text{Ni}^{2+}$  离子充分饱和的 IMAC 柱, 上样后, 用缓冲液 B 洗脱至  $A_{280}$  下基线平稳, 再进行复性操作。

**1.2.3 蛋白上样量对 IMAC 复性的影响:** 分别取 100 $\mu\text{L}$ 、200 $\mu\text{L}$ 、400 $\mu\text{L}$  及 600 $\mu\text{L}$  上述包涵体变性的溶液上样, 通过梯度混合器形成从缓冲液 B 到 A (尿素浓度从 8mol/L 到 1.5mol/L) 的线性梯度, 流速为 0.06mL/min, A 和 B 的体积分别为 15mL。复性后用含 0.3mol/L 咪唑的缓冲液 A 进行洗脱。联苯三酚法进行活性测定<sup>[7]</sup>。比较上样量不同时复性后蛋白比活的差异。

**1.2.4 尿素脱除速率对 IMAC 复性的影响:** 取 200 $\mu\text{L}$  变性蛋白溶液上样, 控制线性梯度形成时的溶液流速, 使其分别为 0.06mL/min、0.04 mL/min、0.02mL/min 及 0.01mL/min。

min。柱上复性后按上述方法进行洗脱、测活。比较尿素脱除速度对复性的影响。

**1.2.5 温度对 IMAC 复性的影响：**取 200 $\mu$ L 变性蛋白溶液上样，通过梯度混合器形成从缓冲液 B 到 A（尿素浓度从 8mol/L 到 1.5mol/L）的线性梯度，流速为 0.06mL/min，复性温度分别为 10 $^{\circ}$ C 和 25 $^{\circ}$ C，柱上复性后按上述方法进行洗脱、测活。比较温度对复性的影响。

**1.2.6 用 IMAC 纯化蛋白：**EC-SOD 含有 His-tag，可以与 Ni-sepharose 特异结合，但杂蛋白不能与 Ni-sepharose 特异结合，因此包涵体蛋白用 IMAC 复性后，用含 0.3mol/L 咪唑的缓冲液 A 进行洗脱后得到的蛋白，即为纯化后的蛋白。

**1.2.7 用 Heparin Sepharose 亲和柱纯化蛋白：**取 10mL Heparin- Sepharose，依法用 1mol/L NaCl 溶液处理后，取经 IMAC 复性的蛋白溶液（含蛋白约 5mg）上样，用 20mmol/L Tris-HCl pH = 8.0 的缓冲液洗至  $A_{280}$  基线为零，然后用含 1mol/L NaCl 的上述缓冲液洗脱。收集蛋白峰测活。

**1.2.8 复性蛋白的热稳定性：**取纯化后的复性蛋白，用 20mmol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释成 10mg/mL 的蛋白溶液。各取 500 $\mu$ L 分别在 20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、75 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C 及 85 $^{\circ}$ C 条件下保温 30min，测活，比较其活性的变化。

**1.2.9 复性蛋白的酸碱稳定性：**取纯化后的复性蛋白适量，用 100mmol/L 甘氨酸缓冲液溶解蛋白后配成 pH 分别为 3.0、4.0、5.0 及 6.0 的蛋白溶液，同时用 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液配成 pH 分别为 7.0、8.0、9.0 及 10.0 的复性蛋白溶液，所有蛋白溶液浓度均为 10mg/mL。25 $^{\circ}$ C 水浴中放置 1h，测活，比较不同 pH 对复性蛋白活性的影响。

**1.2.10 复性蛋白对变性剂的稳定性：**取纯化后的复性蛋白适量，用 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液配成含蛋白 2.5mg/mL，尿素和盐酸胍终浓度分别为 2mol/L、4mol/L、6mol/L、及 8mol/L，pH 均为 8.0 的溶液，25 $^{\circ}$ C 水浴中放置 2h，测活，比较活性的变化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 包涵体的制备和变性

G-25 过柱后共得到 7mL 变性的蛋白溶液，含量测定表明共含包涵体约 38mg，其中中间收集管约 4mL 蛋白浓度较高，为 6.8mg/mL。

蛋白和 DTT 的分离结果见图 1。蛋白分子量较大，因此首先出柱（峰 1），DTT 分子量较小，后流出分离柱（峰 2）。但为了快速脱出 DTT，柱体积一般较小，二峰很难

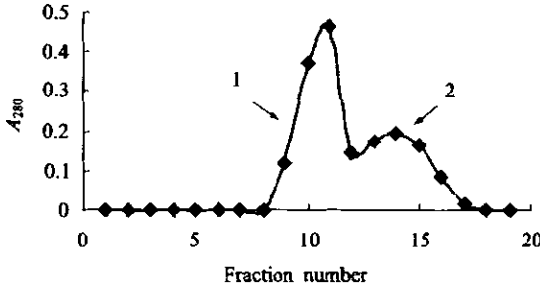


图 1 G-25 凝胶柱脱除变性包涵体溶液中的 DTT  
1 包涵体蛋白，2 DTT

完全分开, 为了避免流出的蛋白中会含有少量 DTT, 在收集蛋白时要引起注意。

## 2.2 蛋白上样量对 IMAC 复性的影响

结果如图 2。从图中可以看出随着上样量的增加, 其复性效率会降低。这是因为吸附在 IMAC 柱上的蛋白, 在复性过程中分子间会形成聚集体, 且随着蛋白浓度的增加, 其形成聚集体的机会增大, 因此复性效率会降低。

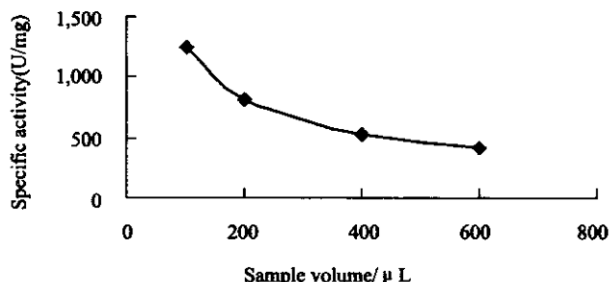


图 2 蛋白量对复性的影响 (蛋白浓度为 6.8 mg/mL)

## 2.3 尿素脱除速率对 IMAC 复性的影响

实验表明, 复性过程中复性液流速越快, 复性效率越低。由于尿素的线性变化是一定的, 因此流速越快, 尿素的脱除速度也越快。结果见图 3。

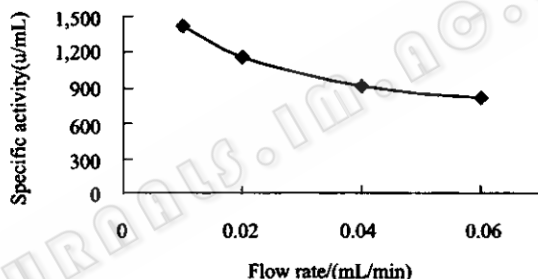


图 3 尿素脱除速率对复性的影响

尿素是蛋白变性剂, 其脱除速度慢, 蛋白复性过程长, 可反复进行折叠和变性, 复性效率就高; 相反, 尿素脱除速度快, 蛋白很难进行反复折叠, 复性效率就低。

## 2.4 温度对 IMAC 复性的影响

在 IMAC 复性过程中, 温度对复性的影响与稀释复性中的情况正好相反, 温度高复性效率也较高。本试验中, 在 10℃ 复性时, 蛋白比活只有约 800U/mg, 在 25℃ 复性时, 蛋白比活可高达 1,200U/mg。

IMAC 复性时, 蛋白与介质固定结合, 即使温度升高, 分子运动也会受到限制, 不象稀释复性那样易于形成聚集体, 相反温度升高会加快复性速度, 从而提高复性效率。

## 2.5 重折叠后蛋白的纯化

纯化结果见图 4 和表 1。由于蛋白在表达过程中产生的 His-Tag 与  $Ni^{2+}$  具有特异亲和性, 而大多杂蛋白则

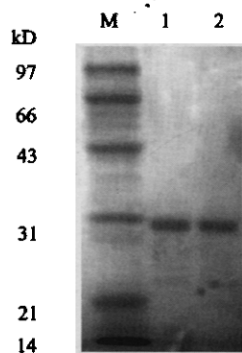


图 4 IMAC 和 Heparin-S 对重折叠后蛋白的纯化  
1 IMAC 纯化后的蛋白,  
2 Heparin-S 纯化后的蛋白

没有与  $\text{Ni}^{2+}$  的结合能力, 因此用 IMAC 柱不仅可进行蛋白的复性, 同时也可用来进行蛋白的纯化, 应用十分方便。

EC-SOD 蛋白结构中含有肝素结合域, 其于肝素具有较强的结合作用, 因此经 IMAC 复性纯化后的蛋白, 还可以再用 Heparin-S 进行二次纯化。结果见表 1。

表 1 包涵体蛋白重折叠后的纯化

	SOD 总活力 (U)	蛋白总量 (mg)	比活 (U/mg)
IMAC	3339.4	4.32	773.0
Heparin-S	2519.1	2.49	1011.7

从表 1 中可以看出, 经 Heparin-S 纯化后, 蛋白比活有较大提高。由于复性时形成的聚集体蛋白与  $\text{Ni}^{2+}$  具有特异结合性, 因此用 IMAC 纯化时不能将其除去。但聚集体蛋白的肝素结合域没处于与 Heparin 结合的正确位置, 不能与其正确结合, 因此用 Heparin-S 纯化时作为杂蛋白被去除, 从而使比活有所提高。

2.6 复性蛋白的热稳定性

实验表明, 复性后的 EC-SOD 在  $10^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$  温度范围内活性稳定, 温度高于  $60^{\circ}\text{C}$  时随着温度升高, 其稳定性开始降低,  $75^{\circ}\text{C}$  时活性降为零。结果见图 5。

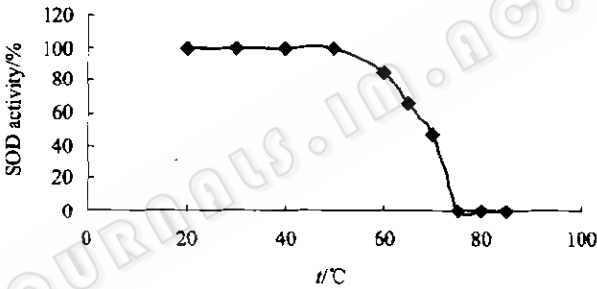


图 5 EC-SOD 的热稳定

与生物提取的 Cu, Zn-SOD 和 EC-SOD<sup>[8]</sup> 相比, 复性的 EC-SOD 其热稳定性显著相抵。EC-SOD 是糖蛋白, 其单亚基分子量可达 35kD, 蛋白在生物体内合成后经过后加工修饰, 可能有利于其结构的稳定。但通过大肠杆菌表达的 EC-SOD, 单亚基分子量只有 30 kD, 没有经过后加工处理, 这可能是其稳定性较低的原因。

2.7 复性蛋白的酸碱稳定性

在 pH 低于 5 大于 10 时, 其稳定性显著降低, 结果如图 6。  
与人肺中提取的 EC-SOD 相比, 其抗酸能力相当, 但抗碱能力显著降低。pH 为 6 时活性有所降低, 可能与其等电点接近有关。

2.8 复性蛋白对变性剂稳定性

与天然 EC-SOD 相比, 复性蛋白在尿素和盐酸胍溶液中的稳定性较弱, 尤其是在盐酸胍溶液中, 当盐酸胍浓度为 2mol/L 时, 即表现出对蛋白结构的破坏作用。结果见表 2。

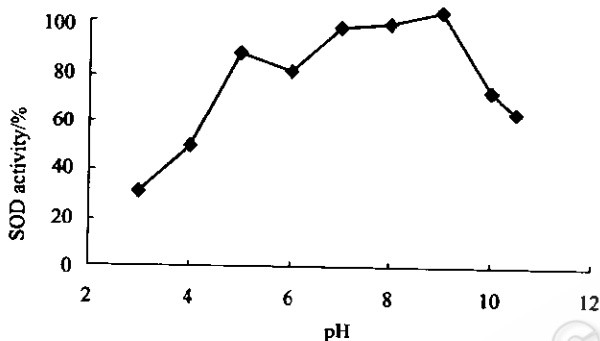


图 6 EC-SOD 的酸碱稳定性

表 2 EC-SOD 在变性剂溶液中的稳定性

尿素 (mol/L)	盐酸胍 (mol/L)	SOD 剩余活性 (%)
2	-	101.4
4	-	76.1
6	-	30.8
8	-	0
-	2	94.2
-	4	39.3
-	6	0

## 参考文献

- [1] Marklund S L, Holme E, Hellner L. Clin Chim Acta, 1982, 126: 41 ~ 51.
- [2] Oury T D, Crapo J D, Valnickova Z. Biochem J, 1996, 317 (Part1): 51 ~ 57.
- [3] Tibell L, Aasa R, Marklund S L. Arch Biochem Biophys, 1993, 304: 429 ~ 433.
- [4] Cheryl L, Fattman Lisa M. Free Radical Biolog, 2003, 35 (3): 236 ~ 256.
- [5] Karin H, Stefan L, Marklund Y. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 6340 ~ 6344.
- [6] Hua-jun H, Qin-shang Y, Guan-Zhen Y. Protein Expression and Purification, 2002, 24: 13 ~ 17.
- [7] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 医药工业, 1988, 19 (5): 217 ~ 219.
- [8] Lena T, Roland A, Stefan L M. Archive of Biochemistry and