用疏水色谱复性并同时纯化蛋白质的机理及其应用*

耿信笃** 白 泉
(西北大学现代分离科学研究所, 现代分离科学陕西省重点实验室, 西安 710069)

摘要 变性蛋白表面的疏水氨基酸残基有与疏水色谱固定相(STHIC)颗粒相互作用的倾向, 两者之间的疏水相互作用能够抑制变性蛋白分子间的相互聚集. 同时疏水色谱固定相还能在分子水平上给变性蛋白分子提供足够高的能量, 使其瞬时脱水并折叠成其天然构象或不同的折叠中间体. 变性蛋白在疏水界面上的折叠不仅取决于其氨基酸之间的特异性相互作用及疏水色谱固定相的结构, 而且还取决于固定相和流动相之间的协同作用. 同时, 还提出了高效疏水相互色谱(HPHIC)进行蛋白折叠的机理及其进行蛋白折叠时能实现质量控制的原理. 在适当的色谱条件下, HPHIC 可使几种变性蛋白一步实现复性及同时纯化. 此外, 还设计制造出了直径比柱长大得多的实验室型和制备型"变性蛋白复性及同时纯化装置, USRPP", 该"装置"具有完全除去变性剂、使蛋白质复性, 与杂蛋白分离及易于回收变性剂的"一石四鸟"功能. 该"装置"对变性蛋白的复性和纯化效率与通常使用的长柱相当. 在制备规模情况下, 该"装置"可以在低压梯度条件下简便、快速、而经济地应用于重组蛋白药物的制备. 文中以重组人干扰素-γ为例, 说明了制备型"装置"在其复性及同时纯化生产工艺中的应用.

关键词 蛋白折叠 质量控制 疏水相互作用色谱 纯化 生物工程 干扰素-γ

1991 年, 我们在国际上首次将疏水相互作用色谱(high performance hydrophobic interaction chromatography, HPHIC)用于重组人干扰素-γ(rhIFN-γ)的复性及同时纯化[1], 1992 年又将 HPHIC 和体积排阻色谱(size exclusion chromatography, SEC)用于其他几种蛋白质的复性[2,3]. 1994 年, SEC[4], 离子交换色谱(IEC)[5]以及亲合色谱[6,7](AC)也先后被用于研究变性蛋白质的复性. 高效疏水色谱已经被成功用于 HIV-1 蛋白酶的复性及同时纯化[8,9].

虽然蛋白质在 SEC 和 IEC 上的保留和复性机理不同, 但人们认为固定相的主要贡献是在除去变性剂的同时可吸附变性蛋白质分子, 从而减少或防止变性蛋白分子间的聚集[10,11].

因为蛋白质与亲合色谱的配基之间, 如分子伴侣或分子伴侣体系[6,7,12,13], 金属镍离子螯合物[14]和脂质体[15]等, 可形成特异性的相互作用, 因此, Altamirano 等[12,13] 将分子伴侣/DSBA/PPI-琼脂糖键合到亲合色谱填料上, 合成了一种三组分的折叠色谱填料, 并将其用于还原变性的蝎子毒素 Cn5(scorpion toxin Cn5)的复性, 其质量回收率为 87%, 而活性回收率可达到 100%. 然而, 用其他方法根本无法使蝎子毒素 Cn5 复性. 此法被称为"液相色谱-折叠色

2002-07-08 收稿
* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39880003, 20175016)
** E-mail: xdgeng@nwu.edu.cn

谱法”[12]. 最近作者之一对变性蛋白的液相色谱复性进行了综述[16].

自 1995 年以来, 有许多关于在溶液中加入“人工分子伴侣”(artificial chaperones)协助蛋白折叠的研究工作的报道[17~23]. 人工分子伴侣是利用低分子量的物质代替分子伴侣来模拟其辅助蛋白折叠的行为. 将表面活性剂, 如聚乙二醇(PEG), 或改性的 PEG 结合到抗体或抗原上, 先与变性蛋白分子作用形成复合物, 从而防止变性蛋白分子的聚集. 然后再使变性蛋白分子从复合物中释放出来, 并最终在一个合适的环境中自发折叠和复性. Wicker 等[24]最近报道了分子伴侣和蛋白酶能识别变性多肽上暴露的疏水区. 当分子伴侣促进正确的蛋白折叠并防止蛋白聚集时, 与能量相关的蛋白酶除去了不可逆的已经损坏了的蛋白. 因此, 两者起着能使蛋白复性过程的质量控制作用[24].

依据 HPHIC 中蛋白质的计量置换保留模型(stoichiometric displacement model for retention, SDM-R)[25], 在高盐浓度时蛋白质分子与流动相之间强疏水作用力驱使蛋白质分子以其疏水区部分与固定相作用, 与此同时, 亲水区朝向流动相[2,25]. 通过梯度洗脱和随着流动相中盐浓度的降低, 来自流动相的推力也不断减小, 从而在低盐浓度条件下从固定相上洗脱该蛋白. 蛋白质在 HPHIC 中的保留模型是用 8 个热力学平衡推导出来的, 其中一个平衡就是蛋白质分子和 HPHIC 固定相上的配基可形成络合物. SDM-R 的核心是当该溶剂化的蛋白分子被溶剂化的 HPHIC 固定相吸附时, 在蛋白质和固定相之间的接触界面上必然释放出一定计量数目的水分子[25].

最近, Perkins 等[26]测定了从蛋白分子与 HPHIC 固定相之间的接触区置换出水分子的量. 通过理论和实验方法, 他们还能够测定当蛋白质分子被疏水色谱固定相吸附时, 从蛋白质分子的疏水区瞬间释放出的水分子的量. Geng 和 Regnier 最近也定量测定了胰岛素置换出甲醇的量[27], 还发现了反相液相色谱中两相界面的传质动力学对这种置换作用的影响[28]. 本文解决的主要问题是研究 HPHIC 是如何使变性蛋白复性并同时纯化的, 以及如何利用 HPHIC 方法对蛋白复性过程进行质量控制的.

在前文中已简要地阐述了用 HPHIC 对变性蛋白复性的机理[2]. HPHIC 可防止变性蛋白聚集或形成沉淀, 这也为除 SEC[16,17]外的其他液相色谱用于变性蛋白的折叠的研究奠定了基础. 本文拟对 HPHIC 对变性蛋白的复性机理进行详细的研究. 同时, 为了将这种方法应用于蛋白质的复性及同时纯化并可放大到生产规模, 我们还设计和制造了一种“变性蛋白复性及同时纯化装置”(unit of simultaneous renaturation and purification of protein, 简称 USRPP), 并用重组人干扰素-γ(rhIFN-γ)进行了性能测试.

1　实验部分

1.1　仪器和材料

所有分析型色谱操作在 LC-10A 高效液相色谱仪(日本, 岛津)上进行. 使用了一套制备色谱系统(Walters Delta Prep 300, Millipore, 美国), 包括一台泵(Waters), 系统控制器(Walters 600E), 双波长吸收检测器(Waters 2487)以及一台台式自动平衡记录仪(上海大华仪器测量厂). USRPP(10 × 200 和 10 × 300 mm I.D.)的外壳用不锈钢制作, 两者的顶部和底部均有用塑料制作的径向溶剂分布器.

所用硅胶基质高效疏水色谱填料(粒径, 6.5 μm, 孔径, 30 nm, 中国科学院兰州化学物理研

究所)由本研究所制备并装填于色谱柱和 USRPP 中. 聚合物基质的色谱柱在空的不锈钢管(50 ×8 mm I.D.)中原位合成, 并称其为连续棒色谱柱.

1.2 试剂

细胞色素 C(Cyt-C, 马心, Ⅲ型), 肌红蛋白(Myo, 马心), 核糖核酸酶 A(RNase-A, 牛胰脏, Ⅰ-A 型), 溶菌酶(Lys, 鸡蛋清), α-淀粉酶(α-Amy, 细菌 anthracis, ⅡA 型), α-糜蛋白酶(α-Chy, 牛胰脏)以及胰岛素(Ins, 牛胰脏)均购自 Sigma 公司(St. Louis 美国). 去离子水用 Barnstead E-pure(Barnstead 有限公司, 美国)制备. 其他化学试剂均为分析纯.

高效疏水色谱中的流动相包括溶液 A, 3.0 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ + 0.050 mol/L KH_2PO_4(pH 7.0)和溶液 B, 0.050 mol/L KH_2PO_4(pH 7.0).

1.3 标准蛋白溶液

每种天然标准蛋白水溶液的浓度为 5.0 mg/mL. 部分和完全变性的标准蛋白溶液的配置方法为: 将蛋白溶解在不同浓度的盐酸胍溶液中, 并放置 24 h 后备用.

1.4 rhIFN-γ 提取液的制备

按申烨华方法[1)]进行. 发酵用 *E.coli* 表达的 rhIFN-γ. rhIFN-γ 的包涵体在 20 mmol/L PBS + 1 mmol/L EDTA + 0.2 mg/mL lysozyme(pH7.4)的缓冲液中进行超声破碎. 然后依次用下述 3 种缓冲液对包含体进行洗涤三次: (1)20 mmol/L PBS + 1 mmol/L EDTA + 2 mol/L urea + 1 mol/L NaCl: (pH7.4); (2) 20 mmol/L PBS + 1 mmol/L EDTA + 0.5% Triton X-100 + 1 mol/L NaCl (pH 7.4); (3) 20 mmol/L PBS + 1 mmol/L EDTA + 1 mol/L NaCl (pH 7.4). 最后, 将其溶解在 7.0 mol/L 盐酸胍(GuHCl)溶液中. 在 4℃温度条件下充分搅拌 24 h, 在 20000 r/min 条件下离心得到含有 rhIFN-γ 的上清液.

1.5 色谱程序

进样前, 色谱柱或 USRPP 都需用新的流动相, 在选择的流速条件下平衡至少 15 min. 根据色谱柱或 USRPP 的大小选择梯度洗脱所需流速, 并在 280 nm 波长条件下检测. 收集目标蛋白的洗脱馏分, 并测定其生物活性和质量回收率. 由于在不同条件下 rhIFN-γ 提取液的进样体积不同, 所以收集液中蛋白的最后浓度是不同的. rhIFN-γ 的初始和最后浓度列于本文的图注和表注中.

1.6 酶生物活性的测定

酶生物活性的测定: 溶菌酶用溶壁球菌[30], α-淀粉酶用淀粉[31], 核糖核酸酶 A 用酵母 RNA[32], α-糜蛋白酶用乙基-L-tryrosineethyl (ATEE)[33]. rhIFN-γ 的生物活性检测是用含有 WISH 细胞和 VSV 病毒的 CPE 抑制剂方法进行的[2,34].

2 结果与讨论

2.1 蛋白质复性及同时纯化装置(USRPP)

设计并制造了一系列不同规格的, 如图 1(a)照片所示的“蛋白质复性及同时纯化装置, USRPP”. 这些装置为不锈钢的外壳, 直径 5.0~300 mm, 长度或厚度均为 10 mm, 内可装填不同类型的色谱填料. 这些 USRPP 既可用于色谱分析, 也可用于制备规模. 通过用标准蛋白对 USRPP 的分离度和活性回收率进行测定, 表明直径为 200 mm 的制备型 USRPP 可对 5 种标准

1) 申烨华. 重组人γ-干扰素生产工艺优化及 α-糜蛋白酶复性研究. 西北大学博士论文, 2001, 12

蛋白进行很好的分离, 结果如图 1(b)所示. 研究表明小分子溶质的分离与柱长有关, 而生物大分子的分离基本上与柱长无关[10]1), 我们用 5.0~150 mm 长度不等的 HPHIC 色谱柱对 7.0 mol/L 盐酸胍变性的溶菌酶和核糖核酸酶进行了复性研究, 其活性回收率列于表 1 中, 结果表明两种蛋白的分离度和回收率基本与柱长无关.

表 1　不同柱长的 HPHIC 柱对溶菌酶和核糖核酸酶 A 活性回收率的比较 a)

柱长/mm	5.0	10.0	25.0	50.0	75.0	100.0	125.0	150.0
溶菌酶/%	98.0	95.9	95.6	93.7	97.5	95.3	93.2	97.3
核糖核酸酶 A/%	94.9	88.6	88.6	85.8	91.5	88.6	87.3	89.2

a) 9.5 mg/mL 胍变溶菌酶 10 μL 和 6.0 mg/mL 胍变核糖核酸酶 20 μL 直接进样到不同柱长的 HPHIC 柱(端基为 PEG 600). 流出液中蛋白的最终浓度：溶菌酶 0.063 mg/mL, 核糖核酸酶 0.060 mg/mL

使用 LC 对变性蛋白进行复性的一个主要优点是可抑制变性蛋白分子之间的非特异性作用, 从而减少了聚集沉淀, 所以, 蛋白质分子和固定相之间的作用必须是在热力学和动力学上都是有利的. 在热力学方面, 蛋白质被吸附到固定相上可与蛋白质聚集反应产生竞争. 但是, 如果吸附太强, 则蛋白质很难从柱子上洗脱下来. 在动力学方面, 无论如何吸附作用也要比聚集反应快.

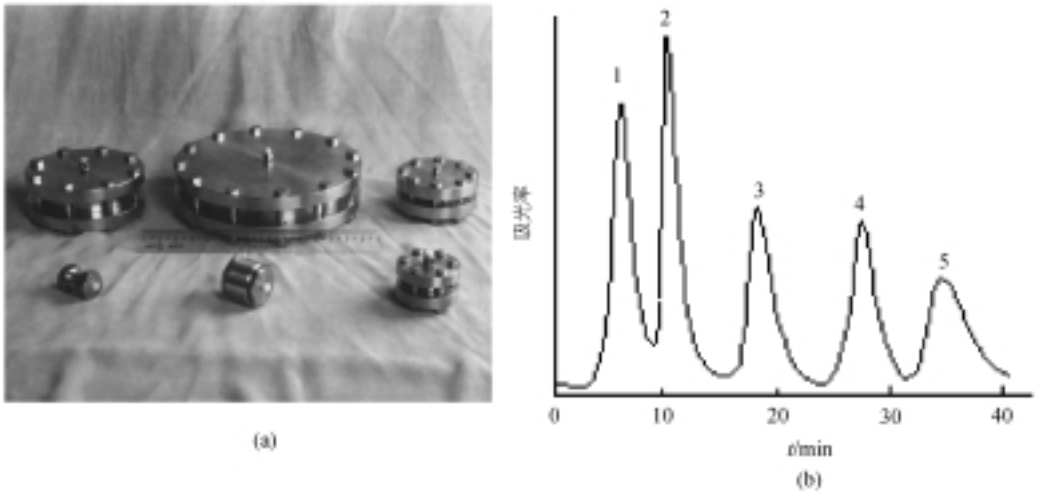


图 1　USRPP 的照片及对五种标准蛋白的色谱分离图

(a) 实验室型和制备型 USRPP 照片; (b) 用 10 × 200 mm I.D.的 USRPP 分离五种标准蛋白的色谱图. 进样量为：总蛋白为 41.5 mg 的 200 μL 混合溶液. 1 示细胞色素-C(5.0 mg), 2 示肌红蛋白(7.5mg), 3 示溶菌酶(1.5 mg), 4 示α-淀粉酶(7.5 mg), 5 示胰岛素(20.0 mg). 线性梯度洗脱, 40 min, 100%A[3.0 mol/L 硫酸铵–0.05 mol/L 磷酸二氢钾(pH7.0)到 100%B[0.05 mol/L 磷酸二氢钾(pH 7.0), 延长 10 min. 流速, 100 mL/min; 纸速, 2.5 mm/min; 检测波长 280 nm. 衰减为 0.05AUFS

2.2　疏水色谱固定相(STHIC)的疏水性

用 4 种不同疏水性的 HPHIC 固定相(stationary phase of hydrophobic interaction chromatography, 简写 STHIC)对溶菌酶和核糖核酸酶复性进行了研究, 结果列于表 2 中. 4 种不同固定相对溶菌酶的色谱分离图如图 2 所示. 这四种固定相端基疏水性的增加顺序为：

1) 刘　彤. 蛋白复性及同时纯化理论、装置及应用. 西北大学博士论文, 1999. 47~59

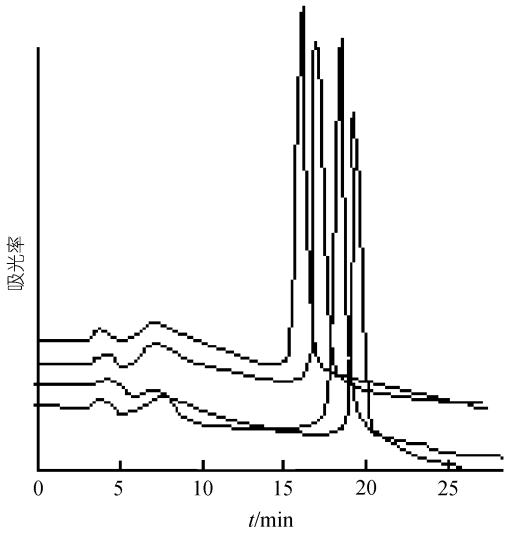


图 2 4 种不同疏水性固定相对溶菌酶的色谱分离图

色谱柱(4.0 × 100 mm I.D.): 1 示 PEG-400; 2 示 PEG-600; 3 示 PEG-800; 4 示苯基. 除流动相流速为 1.0 mL/min 外, 其他色谱条件与图 1(b)所示的相同. 衰减为 0.08AUFS, 样品量: 20 μL 的 5.0 mg/mL 溶菌酶, 收集液中的最后浓度是 0.10 mg/mL

PEG-400<PEG-600<PEG-800<phenyl. 从表 2 看出, 这两种蛋白的生物活性回收率随固定相疏水性的增大而增加. 在此似乎我们可以得出这样的结论: 疏水色谱固定相的疏水性越强, 蛋白质复性效率越高. 但是, 如表 3 中所示, 当采用硅胶基质的聚乙二醇 600 和含不同浓度甲基丙烯酸丁酯(BMA)及由甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)-甲基丙烯酸丁酯(BMA)-乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)共聚物合成的连续棒色谱柱对α-淀粉酶进行复性后的活性回收率却给出了相反的结果. 阿拉伯数字 5, 11 和 17 分别代表 BMA 在填料中的含量. BMA 含量越高, 疏水性越强. 疏水性大小的顺序为 PEG-600<HICP-5<HICP-11<HICP-17.

因为色谱柱 HICP-5 的疏水性较 PEG-600 强, 所以, α-淀粉酶经 HICP-5 分离后活性回收率较高, 这与表 2 的结果是一致的. 但是, 随着固定相疏水性或 BMA 含量的不断增加, α-淀粉酶的活性回收率却不断降低. 当用 HICP-17 色谱柱对α-淀粉酶进行分离时, 无论所用盐酸胍的浓度是多少, 其活性回收率均为零. 这是因为 HICP-17 的疏水性基本与反相液相色谱填料一样强, 天然α-淀粉酶在 HICP-17 上完全变性. 所以, 用于蛋白质复性的疏水色谱固定相应该具有适中的疏水性.

表 2 疏水色谱固定相疏水性对溶菌酶和核糖核酸酶活性回收率的影响 a)

No.	配基	溶菌酶/%	核糖核酸酶 A/%
1	-(CH_2-CH_2-O)400	85.8	83.4
2	-(CH_2-CH_2-O)600	88.5	85.8
3	-(CH_2-CH_2-O)800	90.5	93.6
4	-O-CH_2-O-phenyl	98.5	101.1

a) 5.0 mg/mL 的 7.0 mol/L 胍变溶菌酶和核糖核酸酶 20 μL 分别直接进样到 4 种不同配基的 HPHIC 柱. 流出液中蛋白的最终浓度: 溶菌酶 0.10 mg/mL, 核糖核酸酶 A 0.050 mg/mL

表 3 疏水色谱固定相疏水性对α-淀粉酶活性回收率的影响 a)

色谱柱	C_{GUHCL}/mol·L^{-1}			
	0.2	0.4	0.6	0.8
DXF-600	118.0	108.0	39.0	0.00
HICP-5	105.4	106.8	104.0	96.2
HICP-11	86.7	89.0	84.4	44.3
HICP-17	-	-	-	-

a) PEG-600——polyglycol-600; HICP——甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)-甲基丙烯酸丁酯(BMA)-乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)疏水聚合物固定相; 5, 11, 17 分别表示 butyl methacrylate 的含量. 进样量: 5.0 mg/mL 的 7.0 mol/L 胍变 α-淀粉酶 20 μL, 流出液中 α-淀粉酶的最终浓度: 0.050~0.034 mg/mL. –表示 α-淀粉酶不能被洗脱

这里必须指出的是, 所用 DXF-600 固定相对α-淀粉酶分离后的活性回收率为 118%, 这看起来似乎不合理的, 但事实确实如此. 因为测定α-淀粉酶的活性回收率时是以天然α-淀粉酶为标准的, 因为它已储藏了两年以上, 已损失了部分活性, 当用 HPHIC 分离时可使已失活的那部分α-淀粉酶得到复性. Altamirano 等报道了类似的结果, 他们采用亲和色谱法将储藏了 5 年并已完全失活的蛋白完全复性, 活性回收率达到 100%[13].

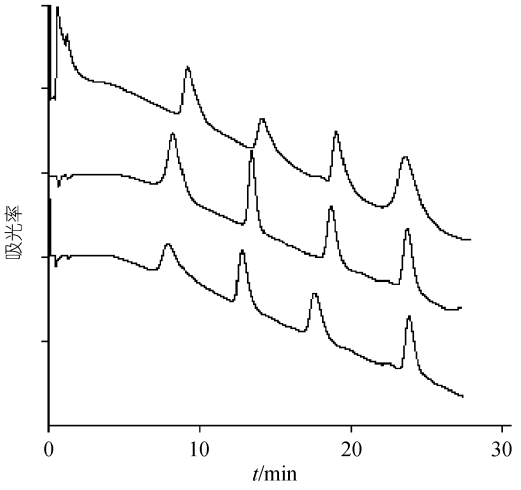


图 3　3 种疏水性相当但配基不同的 HPHIC 固定相对 4 种标准蛋白的色谱分离图

(a) PEG-600; (b) 四氢糠醇; (c) 苯基; 1 示细胞色素-C; 2 示肌红蛋白; 3 示溶菌酶; 4 示α-糜蛋白酶. 衰减为 0.08AUFS. 蛋白浓度为 5.0 mg/mL. 1~4 四种蛋白的绝对量分别是: 40, 30, 15 和 30 μg, 经分离后在收集液中的最后浓度分别是 0.133, 0.100, 0.075 和 0.10 mg/mL. 除流速为 0.8 mL/min 外, 其色谱条件与图 2 中所示完全相同

2.3　HPHIC 固定相配基的结构

用 3 种不同配基的 HPHIC 固定相, PEG-600, 四氢糠醇(THFA)和苯基对 4 种标准蛋白进行分离, 如图 3 的色谱图所示. α-糜蛋白酶的保留时间分别为 23.44, 23.55 和 23.72 min. 表明这三种色谱柱具有基本相同的疏水性. 然而, 这三种固定相对经 1.70 mol/L 盐酸胍变性的α-糜蛋白酶复性后的活性回收率却分别为 94.4%, 82.1%和 65.3%. 表明疏水色谱固定相的配基不同, 对蛋白的复性效率也会不同. 也就是说, 与 PEG-600 相比, 四氢糠醇固定相对α-糜蛋白酶的复性效果更好.

综上所述, 可得出如下结论, 如果采用具有与变性蛋白分子的疏水氨基酸残基相匹配的疏水强度和配基结构的疏水色谱固定相, 会大大提高蛋白质复性效率. 我们将此方法称为“疏水相互作用-折叠色谱法”(hydrophobic interaction-refolding chromatography, HIRC).

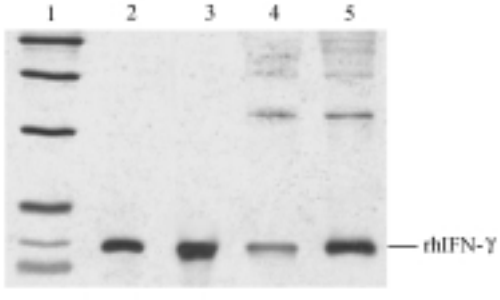


图 4　不同阶段洗脱的 rhIFN-γ 的 SDS-PAGE (银染)

1 示标准蛋白(14400, 20100, 31000, 43000, 66200, 97400 Da), 2 和 3 示经过一个 10×300mm I.D.的 USRPP 分离后 90~180min 和 0~90min 的复性和纯化后的 rhIFN-γ 的收集馏分, 4 示进样品体积超过色谱饼突破体积后的 rhIFN-γ 的馏分, 5 示 rhIFN-γ粗体液的 7.0mol/L 盐酸胍提取液

2.4　用 USRPP(10×300mm I.D.)对 rhIFN-γ 进行复性并同时纯化

我们首次将研制的 10×300 mm I.D.制备型 USRPP 用于 rhIFN-γ的复性及同时纯化工艺的研究. 先用含有 60%A 和 40%B 的混合流动相平衡 USRPP, 流速为 100.0 mL/min. 然后在合适的流动相与试样体积比例的条件下, 用泵连续将总蛋白含量为 2.04 g 的 700 mL rhIFN-γ 的 7.0 mol/L 盐酸胍提取液泵入 USRPP 中. 用 40%B 液等度洗脱至少 20 min 以除去一些杂蛋白, 然后从 40%B 到 100%B 液线性梯度洗脱 90min 后, 再 100%B 液洗脱 90 min. 收集 0~90 和 90~180 min 两段时间内的目标蛋白, rhIFN-γ 的色谱馏分, 在脱盐后测其活性和纯度. 从图

4 可看出，SDS-PAGE[19]检测的 rhIFN-γ的纯度大于 95%，经测定活性，其比活大于 5.7×10^7 IU/mg，结果完全符合中国生物产品标准对 rhIFN-γ的纯度和比活要求. 然而，这样复性并同时纯化得到的 rhIFN-γ仍不能作为一个药物，它还需进行除盐. 与复性前的 rhIFN-γ 相比，在经 USRPP 一步复性及同时纯化后，rhIFN-γ的总活性回收率较进柱前提高了 62 倍. 通常的变性蛋白的复性回收率只有 5%~20%，相比而言，USRPP 对变性蛋白具有很好的复性效率，表明 USRPP 确实可作为变性蛋白复性的强有力工具.

除此之外，如何提高 rhIFN-γ 的质量回收率也是一个需要解决的重要问题. 因为变性 rhIFN-γ的疏水性强，在流动相中的溶解度低，当变性 rhIFN-γ的 7.0 mol/L 盐酸胍提取液与含高浓度硫酸铵的流动相接触时，rhIFN-γ在进口的筛板表面或柱床顶部会聚集形成少量的沉淀. 因为沉淀很难溶解在流动相中，从而也难以对其进行复性. 但俗话说“肉烂了还在锅里”. 沉淀在 USRPP 上的 rhIFN-γ会在下次色谱洗脱过程而进一步溶解. 如果沉淀累积过多，则可用盐酸胍或脲溶液将其洗脱出来，再重新用 USRPP 对其复性. 这样，通过这种方法就可减少 rhIFN-γ的损失，从而提高其质量回收率.

如图 5 所示，USRPP 具有完全除去变性剂，使变性蛋白复性，将复性的目标蛋白和杂蛋白分离以及易于回收变性剂的“一石四鸟”功能. 此外，重组治疗蛋白的下游工艺通常需要几天和几步才能得到合格的产品，但活性回收率仅有 5%~20%. 与此相比，若使用 USRPP 一步便能得到如此好的结果确实是长期以来分离科学家的一个梦.

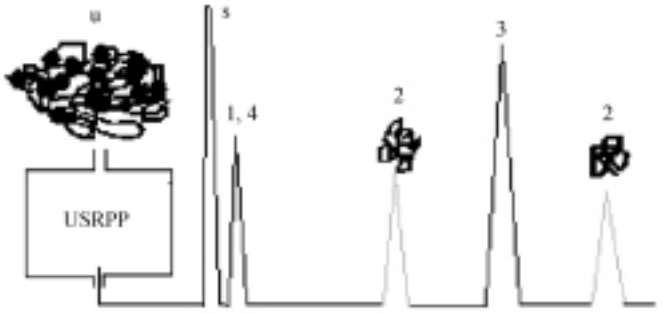


图 5 蛋白质复性及同时纯化装置的“一石四鸟”功能简图

1 示变性剂溶液; 2 示复性的蛋白质; 3 示杂蛋白; 4 示回收变性剂, s 示溶剂; u 示含有变性蛋白的样品溶液

2.5 HPHIC 对变性蛋白的复性机理

众所周知，在高盐浓度的溶液中，由于非极性颗粒和盐水溶液之间的疏水相互作用，任何非极性颗粒都倾向于从溶液中被挤出. 这样，蛋白质分子中的疏水区就会被疏水相互作用推动并寻找和其他颗粒的疏水区相接触. 对于被吸附在疏水色谱固定相上的变性蛋白质分子亦是如此. 因为对于特定的 HPHIC 固定相只有一个适中的且不变的疏水性，不同蛋白分子只有少数的疏水区因其疏水性和立体效应才有可能被固定相所吸附. 这样，疏水色谱固定相可以选择蛋白分子的疏水氨基酸残基而形成区域结构. 不同区域结构可以代表被吸附在固定相上的蛋白分子的天然态和各种折叠中间体. Fausnaugh-Pollitt 等[35]报道了蛋白分子在 HPHIC 的保留是由其在催化反应裂口相反表面上的氨基酸残基决定的. 所以，正确折叠的蛋白分子应该与其天然态具有相同的保留时间.

将盐酸胍或脲变性蛋白进样到 HPHIC 色谱柱上，并用特定的梯度方式进行洗脱. 随着变

性剂完全和快速的除去, 呈线状结构的多肽链在高盐浓度时首先被吸附在 HPHIC 固定相上, 并在低盐浓度时解吸附. 在吸附和解吸附过程中, 变性蛋白可折叠成天然态和各种折叠中间体. HPHIC 可进一步将这些不同的折叠产物进行分离. 如果收集经 HPHIC 分离后的、与天然蛋白具有相同的保留时间的色谱馏分, 便可得到折叠成天然构象的纯蛋白质, 并且可同时与其折叠中间体分离. 因此, HPHIC 固定相在蛋白复性的过程中对复性的质量控制起着重要的作用. 这取决于 HPHIC 固定相的疏水性、配基结构和多肽的疏水区之间的匹配.

HPHIC 法和“人工分子伴侣”法对变性蛋白复性有某些相似之处. 首先, 经含有疏水基团的 PEG 配基修饰的 HPHIC 固定相可与变性蛋白分子作用并形成蛋白质-配基络合物, 从而防止了变性蛋白质分子形成聚集或沉淀. 其次, 变性蛋白分子能够通过用加入其他化学试剂或改变环境以使其从该络合物中释放出来而折叠. 此外, HPHIC 固定相与分子伴侣一样都是通过疏水作用对变性蛋白进行折叠和质量控制的. 不仅如此, HPHIC 固定相对变性蛋白的复性有更多的贡献. 当一个组分从溶液中转移到一个固体表面时, 就会发生化学势跳跃[36]. 变性蛋白被固定相吸附时, 就会从固定相上得到能量. 最近研究结果表明, HPHIC 固定相能够为用 2.8 mol/L 盐酸胍变性的α-淀粉酶提供高达(838 ± 36) kJ/mol 的能量[37]. 与通常蛋白质分子在缓冲溶液中的折叠能 2~20 kJ/mol 相比, HPHIC 固定相实际上能为变性蛋白分子提供更高的能量. 当盐酸胍浓度为 7.0 mol/L 时, HPHIC 固定相能为变性α-淀粉酶提供的能量会更多.

综上所述, 显而易见, HPHIC 固定相结合了分子伴侣和蛋白酶[24]两者的优点. 在一次色谱过程中, HPHIC 固定相能够在分子水平上给变性蛋白分子提供足够高的能量, 并同时起着质量控制的作用. HPHIC 固定相在蛋白质分子吸附过程中提供足够高的能量可解释如下:

(ⅰ) 虽然报道一些蛋白分子内部包含水并对分子构象起稳定作用[38], 但大部分天然蛋白质分子的内部并不含有自由水. 一方面, 当蛋白质分子变性时, 蛋白质分子必须去折叠(unfolding). 如图版Ⅰ(a)所示, 去折叠的蛋白质分子将在盐的水溶液中进行水合作用. 去折叠蛋白质分子被水分子(蓝色)包围变得更加稳定. 因此, 依据热力学的观点, 变性蛋白分子在水合过程中会释放能量以降低其势能, 以水合形式存在的水熵则减小. 另一方面, 当除去变性环境时, 水合的蛋白质分子的失水过程是自发进行的, 既使以很慢的速率, 则以水合形式存在的水的熵会增加. 若蛋白质分子能获得外加能量时, 失水过程就会加速. 当蛋白分子被 HPHIC 固定相表面吸附时, 蛋白质分子的失水就会以相当快的速度进行. 因此, HPHIC 固定相在此过程中必定为蛋白质分子提供能量. 图版Ⅰ(a)表示在 HPHIC 固定相表面水合蛋白质分子的失水过程示意图. 从图中便可看出以水合状态存在的变性蛋白分子是如何在与 HPHIC 固定相接触表面区域挤出水分子的[25,26].

(ⅱ) 众所周知, 天然蛋白质分子的疏水袋是埋在分子的内部. 那么, 我们有理由相信蛋白折叠应该是从分子内部的疏水袋开始的. 因此, 形成含有大多数疏水氨基酸残基且结构正确的内部疏水区域是非常重要的. 在 HPHIC 中, 变性蛋白分子通过疏水氨基酸残基与固定相表面结合而被吸附在固定相上. 这些高密度疏水氨基酸残基就起着使蛋白分子形成具有正确的三维结构所必需的内部疏水袋的作用. 蛋白质分子形成不正确的三维结构也是可能的. 蛋白分子形成的区域结构和折叠中间体过程的示意图如图版Ⅰ(b)所示. 疏水氨基酸残基(红色)结合到 HPHIC 固定相表面上, 亲水氨基酸残基(黄色)则面向流动相. 该变性蛋白分子很牢固的结合在固定相表面以形成稳定的络合物, 因此既便蛋白质分子还剩余有一些疏水区, 但因

这些牢牢固定的蛋白分子不能相互作用，当然也就不会发生蛋白质分子间的相互聚集. 如图版Ⅰ(b)所示，因为肽链骨架是刚性的，HPHIC 固定相提供的能量能够顺着肽链传递到变性蛋白分子的其他氨基酸残基. 这样，最初没有和固定相接触的氨基酸通过氨基酸残基间的相互作用而脱水. 已经证实区域结构形成过程中伴随着脱水过程[39].

当处于水合状态的变性蛋白分子(Uh)进入 HPHIC 色谱柱中时，如图版Ⅰ(c)所示，大部分蛋白质分子被吸附并且同时完成脱水(绿色). 因为蛋白在两相的分配系数不可能是无穷大，仍会有一小部分蛋白在流动相中，在溶液中它也会慢慢脱水(黑色，1b). 被吸附的已失水的处于变性态的蛋白，一些则会形成折叠中间态，其中一些可能形成正确的疏水结构(蓝色和绿色，2a)，另一些可能形成错误的疏水构型(黑色，2a). 因为这些折叠中间体被牢牢地吸附在固定相表面，具有正确疏水结构的蛋白质分子无法继续折叠成它的天然态，而具有错误疏水结构的蛋白分子也不能仅仅依靠 HPHIC 固定相进行修正.

(ⅲ) HPHIC 中连续改变的流动相组成能帮助变性蛋白分子折叠成它的天然态. 图版Ⅰ(c)给出了蛋白质再折叠的各步骤示意图. pH = 7.0 时，从高盐浓度到低盐浓度进行梯度洗脱，被吸附的构象正确的和错误的折叠中间体将会在不同的保留时间被洗脱下来. 构象正确且热力学稳定的折叠中间体在合适的流动相条件下可继续折叠成天然态. 而构象错误、热力学不稳定的折叠中间体在流动相中一定会很快消失并成为无序的线团状的多肽(2b). 无序的线团状的多肽，如在水溶液中进行折叠一样，在流动相中也可进一步形成构象正确的或错误的折叠中间体(3b).

所有天然态蛋白分子和具有正确和错误疏水区域结构的折叠中间体将会再次被 HPHIC 固定相吸附. 如图版Ⅰ(c)3a 所示，上述过程将不断重复. 随着时间的推后，更多的天然态蛋白质分子(蓝色)就会形成，但仍有较少的具有错误疏水构象的分子(黑色，3b). 最后，大多数蛋白质分子将如图版Ⅰ(c)4a，4b 所示进行正确折叠. 不同的蛋白质分子需要在一个特殊的或很窄盐浓度范围内进行折叠. 用上述方法，采用梯度洗脱方式能成功地将几种变性蛋白进行复性.

因此，对于 HPHIC 固定相和流动相间的协同作用可得出如下结论：(ⅰ)随着盐浓度的降低或水浓度的增加，被吸附的变性蛋白解吸附. (ⅱ)通过流动相中多次吸附和解吸附可使蛋白质的错误构象得到修正. (ⅲ)可以对完全复性的蛋白质和错误折叠的中间体进行分离.

另外，只要变性蛋白分子被复性，或者部分被复性，那么它们被洗脱时流动相的盐浓度应该与其天然态完全一样. 因此，在色谱分离过程中，HPHIC 可使不同蛋白质同时实现复性和分离.

总之，HPHIC 对变性蛋白的复性机理和质量控制原理为：高盐浓度的流动相中的疏水作用力推动变性蛋白分子向 HPHIC 固定相移动，并以氨基酸序列中的非极性区牢牢地被吸附在固定相上，形成稳定的络合物，而该变性蛋白的亲水性部分则面向流动相. 这样，变性蛋白分子就不能相互聚集. 此外，变性蛋白分子在分子水平上可从 HPHIC 固定相得到足够高的能量并瞬间进行(ⅰ) HPHIC 固定相识别多肽的特定疏水区；(ⅱ) 从水合的变性蛋白和疏水色谱固定相接触表面处挤出水分子；(ⅲ) 在 HPHIC 固定相上形成该蛋白分子的区域结构. 随着盐浓度的降低或流动相中水浓度的增大，变性蛋白分子从 HPHIC 固定相上解吸附. 由于蛋白质的错误区域结构在热力学上不稳定，它们在流动相中将通过瞬间消失以得到修正. 随着在梯度洗脱过程中蛋白质多次的吸附和解吸附，具有错误区域结构的蛋白分子将会变得越来越少，而

具有正确的区域结构的蛋白分子将会变得越来越多, 结果蛋白质得到完全复性. 完全复性的蛋白质能够与那些稳定的折叠中间体或未复性的蛋白质分离, 所以, 变性蛋白能够在 HPHIC 中同时实现复性并且相互分离.

这里也要指出的是, 实验可观察到变性蛋白质分子被 HPHIC 固定相吸附前在流动相中会产生聚集. 在此情况下, 变性蛋白质分子则根本无法复性, 或者只能部分复性. 此外, 如果 HPHIC 固定相不能给变性蛋白分子提供足够高的能量, 或者配基的立体结构与目标蛋白不匹配, 则蛋白质分子不能, 或只能部分复性. 如果疏水色谱固定相给变性蛋白提供过高的能量, 变性蛋白可能折叠成某些自然界中不存在, 但构象稳定的折叠中间体.

这里还要指出的是, 变性蛋白质可能在进样过程中, 或在样品溶液与流动相混合但蛋白未和固定相接触之前就已经形成了聚集体. 如果变性蛋白与固定相接触之前形成聚集体或沉淀, 就会在样品环中或色谱柱的顶端产生聚集. 那么, 目标蛋白的质量和活性回收率均会降低, 色谱柱也会被堵塞. 这对于那些强疏水性的重组治疗蛋白的复性和纯化特别重要. 因为 HPHIC 中盐浓度很高(如 2.5~3.0 mol/L 硫酸铵溶液), 特别是在制备规模 HPHIC 中, 变性蛋白会产生一些沉淀. 为了减少样品在样品环中的停留时间以及样品从样品环进入色谱柱的时间, 应采用小的柱死体积和高流速. 如上所述, 若采用我们研制的大直径 USRPP 便可解决上述难题. 因为蛋白质沉淀只能堵塞很小的面积, 如 USRPP 过滤器或固定相顶端总横截面 1/100, 这时 USRPP 的柱压一般不会增加. 沉淀则可用变性剂或合适的流动相进行溶解后, 可用 USRPP 进行再复性.

致谢　感谢本所卫引茂博士对本文提出了宝贵的意见, 以及刘彤、张养军、申烨华博士, 黄晓冬和李翔硕士为本文提供了部分实验数据.

参　考　文　献

1　耿信笃, 冯文科, 常建华, 等. 用制备型高效疏水色谱对复性和预分离重组人干扰素-gamma. 高技术通讯, 1991,1(7): 1~4

2　Geng X D, Chang X Q. High-performance hydrophobic interaction chromatography as a tool for protein refolding. J Chromatogr, 1992, 599: 185~194

3　耿信笃, 冯文科, 边六交, 等. 一种变性蛋白复性并同时纯化的方法.中国专利, 1992,　ZL 92102727.3

4　Werner M H, Clore G M. Gronenborn AM, et al. Refolding proteins by gel filtration chromatogaphy. FEBS Lett, 1994,345(2-3): 125~130

5　Suttnar J, Dyr J E, Hamsikova E, et al. Procedure for refolding and purification of recombinant proteins from escherichia coli inclusion bodies using a strong anion exchanger. J Chromatogr B, 1994; 656 (1): 123~126

6　Phadtare S, Fisher M T. Yarbrough L R. Refolding and release of tubulins by a functional immobilized groEL column. Biochim Biophys Acta, 1994,1208 (1): 189~192

7　Taguchi H, Makino Y, Yoshida M. Monomeric chaperonin-60 and its 50-kDa fragment possess the ability to interact with non-native proteins, to suppress aggregation, and to promote proteins folding. J Biol Chem, 1994,269: 8529~8634

8　Ala P J, Deloskey R J, Huston E E, et al. Molecular recognition of cyclic urea HIV-1 protease inhibitors. J Biol Chem, 1998, 273 (20): 12325~12331

9　Ala P J, Huston E E, Klabe R M, et al. Counteracting HIV-1 protease drug resistance: Structural analysis of mutant protease

complexed with XV638 and SD146, cyclic urea amides with broad specificities. Biochem, 1998, 37 (43): 15042~15049

10 Liu T, Geng X D. The separation efficiency of biopolymers with short column in liquid chromatography. Chin Chem Lett, 1999,10: 219~222

11 Stempfer G, Neugebauer B H, Rudolph R. Improved refolding of an immobilized fusion protein. Nat Biotechnol, 1996;14: 329~334

12 Altamirano M M, Garcia C, Possani L D, et al. Oxidative refolding chromatography: Folding of the scorpion toxin Cn5 [see comments]. Nat Biotechnol, 1999,17 (2): 187~191

13 Altamirano M M, Golbik R, Zahn R, et al. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. Proc Natl Acad Sci USA, 1997,94 (8): 3576~3578

14 Rogl H, Kosemund K, Kuhlbrandt W, et al. Refolding of escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. FEBS Lett, 1998,432 (1-2): 21~26

15 Yoshimoto M, Kuboi R, Yang Q, et al. Immobilized liposome chromatography for studies of protein-membrane interactions and refolding of denatured bovine carbonic anhydrase. J Chromatogr B, 1998,712: 59~71

16 郭立安, 耿信笃. 蛋白的色谱复性及同时纯化. 生物工程学报, 2000, 16: 661~666

17 Rozema D, Gellman S H. Artificial chaperones: Protein refolding via sequential use of detergent and cyclydextrin. J Am Chem Soc, 1995, 117,(8): 2373~2374

18 Dainiak M B, Izumrudov V A, Muronetz V I, et al. Conjugates of monoclonal antibodies with polyelectrolyte complexes- an attempt to make an artificial chaperone. Biochim Biophys Acta, 1998, 1381: 279~285

19 Kuboi R, Morita S, Ota H, et al. Protein refolding using stimuli-responsive polymer-modified aqueous two-phase systems. J Chromatogr, B, 2000,743,(1-2): 215~223

20 Kuboi R, Yoshimoto M, Walde P, et al. Refolding of carbonic anhydrase assisted by 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes. Biotechnol. Prog., 1997, 13(6): 828~836

21 Muronetz V I, Kazakov S V, Dainaik M B, et al. Interaction of antibodies and antigens conjugated with synthetic polyanions: on the way of creating an artificial chaperone. Biochem Biochem Acta, 1475,(2): 141~150

22 Akiyoshi K, Sasaki Y, Sunamoto J. Molecular chaperone-like activity of hydrogel nanoparticles of hydrophobized pullulan: Thermal stabilization with refolding of carbonic anhydrase B. Bioconjugate Chem, 1999,10,(3): 321~324

23 Shimizu H, Fujimoto K, Kawaguchi H. Improved refolding of denatured/reduced lysozyme using disulfide-carrying polymeric microspheres. Colloid Surf B, 2000, 18,(2): 137~144

24 Wickner S, Maurizi M R, Gottesman S. Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. Science, 1999, 286: 1888~1893

25 Geng X D, Guo L A, Chang J H. Study of the retention mechanism of proteins in hydrphobic interaction chromatography. J Chromatogr, 1990, 507: 1~23

26 Perkins T W, Mark D S, Root T W, et al. Protein retention in hydrophobic interaction chromatography: Modeling variation with buffer ionic strength and column hydrophobicity. J Chromatogr A, 1997, 766: 1~14

27 Geng X D, Regnier F E. Determination of methanol increment in mobile phase consisting of methanol and water by on-line UV spectrometry in reversed phase liquid chromatography, Chin J Chem, 2002, 20 (1), 68~75

28 Geng X D, Regnier F E. Characters of the plateau of methanol increment in frontal analysis in reversed phase liquid chromatography, Chin J Chem, 2002, 20 (5), 431~440

29 Batas B, Chaudhuri J B. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. Biotechnol Bioeng, 1995, 50: 16~2330

30 Withka J, Moncuse P, Baziotis A, et al. Use of high-performance size-exclusion, ion-exchange, and hydrophobic interaction

chromatography for the measurement of protein conformational change and stability. J Chromatogr, 1987, 398: 175~202

31 李华儒, 党鸿喜. 色谱纯化后 α-淀粉酶活性和回收率的测定.西北大学学报(自然科学版). 1991,21: 93~98

32 Laskowski M. Chymotrypsinogens and chymotrypsins. Methods Enzymol, 1955, II: 8-26

33 Mcdonald M R. Ribonucleases. Methods Enzymol, 1955, II, 427~436

34 Lengyel P. Enzymology of interferon action- a short survey. Methods Enzymol. 1981, 79: 135~162

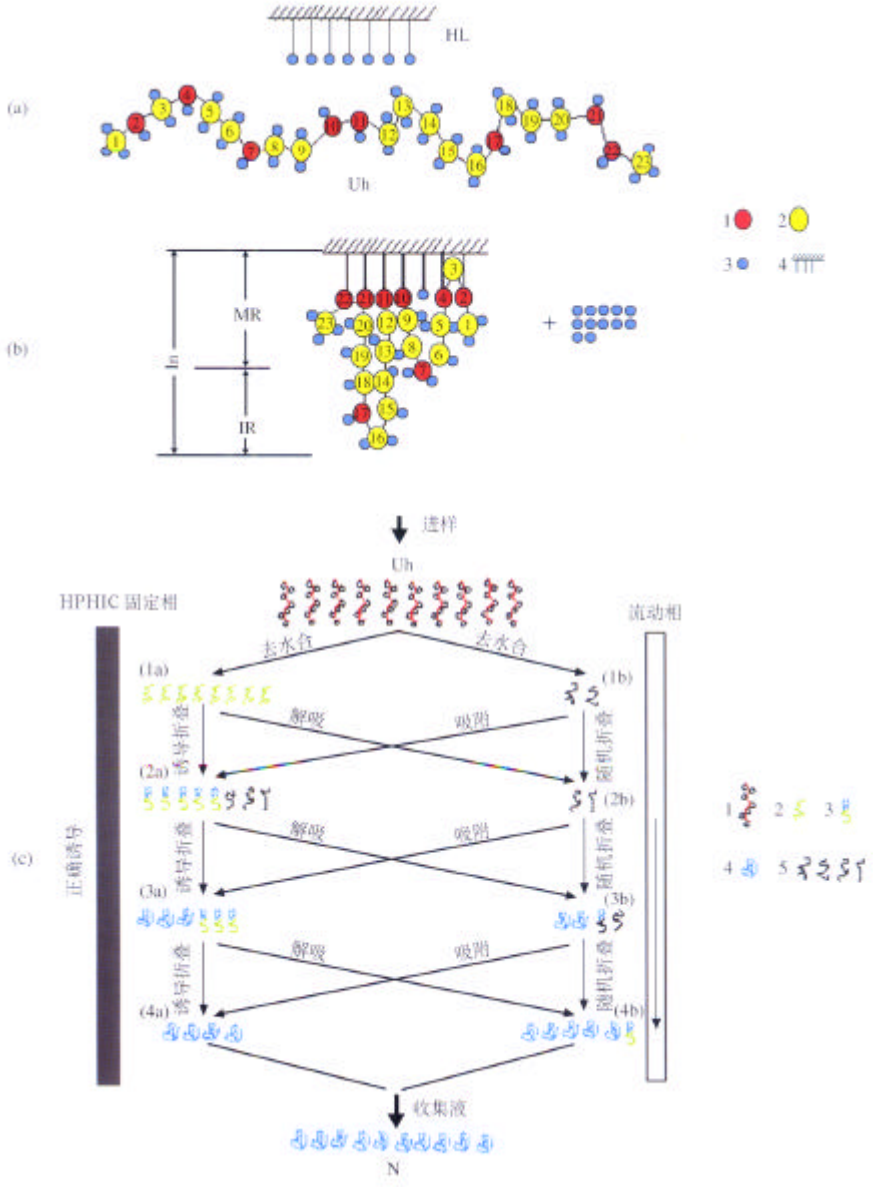
35 Fausnaugh-Pollit J, Thevenon G, Janis L, et al. Chromatographic resolution of lysozyme variants. J Chromatogr, 1988, 443: 221~228

36 Giddings J C. Unified Separation Science. New York: Wiley-Interscience Pub, John & Sons, INC, 1991. 144~149

37 Geng X D, Zhang J, Wei Y. Determination of free energy of protein refolding on a liqyid-solid interface, Chin Sci Bull, 2000, 45 (21): 236~241

38 Takano K, Funahashi J, Yamagata Y, et al. Contribution of water molecules in the interior of a protein to the conformational stability. J Mol Biol, 1997, 274 (1): 132~142

39 Richards F M. The protein folding problem. Sci Amer, 1991, 264(1): 34~41



HPHIC 中变性蛋白失水和形成蛋白折叠中间体的模型及蛋白质复性中固定相和流动相的协同作用步骤示意图

(a) 水合蛋白质分子和 HPHIC 固定相; (b) 含有区域结构和诱导区的折叠中间体的形成. 1 示疏水氨基酸残基; 2 示亲水氨基酸残基; 3 示水分子; 4 示疏水色谱固定相配基， HL 示水合配基; Uh 示变性的水合氨基酸残基; MR 示区域结构; IR 示诱导区域; In 示中间体; (c) 1. 水合变性蛋白; 2. 含正确区域结构和诱导结构的中间体; 3. 去水合变性蛋白; 4. 正确折叠的蛋白; 5. 错误折叠的中间体; a 示疏水色谱固定相上的诱导复性; b 示流动相中的随机复性. 1a 和 1b 分别是吸附态和解吸附态的去水合变性蛋白分子; 2a 示在疏水色谱固定相上形成的正确的(注 4)和错误的(注 3)中间体; 2b 示在溶液中随机复性形成的中间体; 3a 示天然蛋白(注 4)和疏水色谱固定相上的正确中间体(注 4); 3b 示流动相中复性的天然蛋白(注 5)和正确中间体(注 4 和注 3), 和错误中间体(注 3); 4a 和 4b 示分别是在疏水色谱固定相上和在流动相中的完全复性的蛋白