

金属螯合亲和层析纯化和复性重组人铜锌超氧化物歧化酶 Purification and Renaturation of Recombinant Human Cu,Zn-SOD by Metal-Chelating Affinity Chromatography

刘建荣*, 刘建国, 赵晓瑜, 顾雅君

LIU Jian-Rong*, LIU Jian-Guo, ZHAO Xiao-Yu and GU Ya-Jun

河北大学生命科学学院, 保定 071002

College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China

摘 要 将重组人铜锌超氧化物歧化酶(rhCu,Zn-SOD)包含体(经纯化后纯度达 80% 以上)以稀释法或透析法初步复性后,分别再经金属螯合亲和层析(MCAC)纯化。结果透析复性样品和稀释复性样品经 MCAC 纯化后的 rhSOD 比活是各自上柱前样品比活的 2.2 倍和 5.3 倍,蛋白回收率分别为 64% 和 25%,同时两者活性回收率皆大于 130%。表明目标蛋白 rhSOD 在经过 MCAC 纯化的同时又获得进一步复性。SDS-PAGE 显示 rhSOD 为 19kD 的单一一条带,纯度大于 95%,比活达到 5000 u/mg 左右,同时 NBT 生物活性染色鉴定显示出很强的超氧化物歧化酶活性。表明 MCAC 对于复性不完全的 rhCu,Zn-SOD 而言是一种纯化和使其进一步复性的简便省时且有效的方法。该方法为以包含体形式表达的基因重组蛋白的纯化和复性提供了新思路。

关键词 金属螯合亲和层析,复性,重组人铜锌超氧化物歧化酶(rhCu,Zn-SOD),包含体

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0993-05

Abstract Overexpression of recombinant Human Cu,Zn-Superoxide Dismutase(rhCu,Zn-SOD) in *E. coli* results in the form of insoluble inclusion body. Purity of rhSOD inclusion body was over 80% by isolation and purification. After preliminary renaturation by conventional dilution or dialysis, enzyme preparations was respectively purified by using Copper Metals-Chelating Affinity Chromatography (Copper-MCAC). RhSOD specific activity purified by MCAC (from the sample renatured partly by dialysis) was 2.2 times as much as that by dialysis and protein recovery was 64%. RhSOD specific activity purified by MCAC (from the sample renatured partly by dilution) was 5.3 times as much as that by dilution and protein recovery was 25%. The two rhSOD preparations purified by MCAC had specific activities about 5000u/mg and activity recoveries were all over 130% of the enzyme activities in the samples renatured partly by dilution or dialysis. The above-mentioned results indicated that Copper-MCAC resulted in a purification and further renaturation of target protein. SDS-PAGE showed that the target protein rhSOD (19kD) was purified homogeneously and NBT activity identification proved that the purified and renatured rhSOD had very strong SOD activity. In conclusion, Copper Metals-Chelating Affinity Chromatography appears to be a simple, rapid and efficient procedure for purifying and further renaturing rhCu,Zn-SOD by dilution or dialysis. The method provided a new idea for purifying and renaturing recombinant proteins expressed in the form of inclusion body in *E. coli*.

Key words Metal-Chelating Affinity Chromatography(MCAC), renaturation, rhCu,Zn-SOD, inclusion body

Received: July 5, 2005; Accepted: August 23, 2005.

This work was supported by a grant from the Biotechnology Key Subject of Hebei Province(No.200500021).

* Corresponding author. Tel: 86-312-5079735; E-mail: liujianrong63@yahoo.com.cn

河北省生物工程重点学科资助(No.200500021).

真核生物基因在大肠杆菌中表达的蛋白质大多数是以无生物活性的包含体形式存在,包含体易分离纯化,但包含体的复性是一个十分复杂的问题,不同的蛋白质复性条件各不相同,且无通用的方法可选择。通常使用的稀释法和透析法主要用于与变性剂分离和使蛋白复性,然而目标蛋白复性的活性回收率仅为5%~20%,而且难以与菌体杂蛋白分离,因此寻求有效的使基因重组蛋白既得到纯化又同时复性的技术一直是基因工程下游纯化技术的一个研究热点。液相层析(LC)是一种有效的纯化蛋白质的方法,已成为基因重组蛋白纯化必不可少的手段。目前,国内外科学家已分别采用疏水相互作用层析法(HIC)、离子交换法(IEC)、凝胶排阻层析法(SEC)和亲和层析法(AFC)^[1-2]这四种LC法成功地对某些变性蛋白质进行了纯化和复性。金属螯合亲和层析(MCAC)是AFC的一种,由于其具有配基简单、吸附量大、分离条件温和、通用性强等特点已逐渐被广泛用于分离纯化蛋白质^[3-4]。超氧化物歧化酶(SOD)是机体内超氧自由基的天然清除剂,是一种广泛存在于动植物和微生物中的金属酶,在医药、化妆品、日化及食品等方面都有广泛的应用,尤其在临床应用中对于治疗氧中毒、皮肤病、心血管病和防止缺血再灌注综合征及抗辐射损伤等方面具有重要的功能^[5]。研制开发重组人超氧化物歧化酶不仅可解决人源SOD的材料来源有限和因血制品污染而带来的安全性问题,而且可避免异源SOD在临床应用时可能出现的免疫性过敏反应。国内外已有不少采用MCAC纯化各种不同来源SOD包括可溶性重组人SOD的报道^[6-9,17]。本文对在大肠杆菌中以包含体形式表达的变性重组人铜锌超氧化物歧化酶(rhCu,Zn-SOD,以下简称rhSOD)进行了复性和纯化。首先对分离纯化后纯度达80%的rhSOD包含体以稀释法或透析法初步复性,然后将初步复性的rhSOD采用金属螯合亲和层析技术对其进行纯化,结果目标蛋白在纯化的同时获得了进一步复性,使rhSOD的纯度、比活和总活性都得到了显著的提高,活性回收率大于100%。该方法为以包含体形式表达的基因重组蛋白的纯化和复性提供了一个新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种为本研究室构建的含pTK-rhSOD载体(温度诱导型)的大肠杆菌,金属螯合亲和层析柱(吸附 Cu^{2+})为本研究室自制,氯化硝基四氮唑蓝(NBT)为BBI公司产品,邻苯三酚、尿素等其他主要试剂皆为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌种的诱导表达及表达产物的检测 将过夜培养的种子液按常规方法转接、诱导和表达,离心收获菌体,SDS-PAGE分析表达产物。

1.2.2 rhSOD包含体的分离纯化及溶解和复性 参照文献[10]进行包含体的分离和纯化。将纯化的包含体溶解于透析缓冲液(pH7.5, 0.02mol/L Tris-HCl, 8mol/L 尿素, 0.1mol/L β -巯基乙醇, 0.15mol/L NaCl) 4℃放置过中午或过夜,使包含体

充分溶解,离心去除不溶物及杂质得溶解上清液。

(1) 稀释法复性:将溶解上清液以稀释缓冲液(0.02mol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.15mol/L NaCl, 含 Cu^{2+} 、 Zn^{2+})将其稀释4倍至尿素终浓度为2mol/L, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 终浓度分别为60 $\mu\text{mol/L}$,边加边搅拌。4℃放置4h,取样测活,继续放置6d后再测活。

(2) 透析法复性:将溶解上清液装入透析袋,对一定体积的透析缓冲液(pH7.5, 0.02mol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, 60 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} , 60 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+})于4℃透析至尿素终浓度为1mol/L,取样测活后继续对另一份透析缓冲液透析至尿素终浓度为0.1mol/L,离心去沉淀取上清测活。

1.2.3 金属螯合亲和层析纯化及复性 rhSOD:参照文献[8]和[11]并作一些改动。以0.5% CuSO_4 溶液过柱至基质上部3/4全部变蓝(基质最下部1/4未吸附 Cu^{2+} ,用以吸附平衡和洗脱时流出的 Cu^{2+}),以水洗至无 Cu^{2+} 流出,以平衡缓冲液(pH7.5, 0.02mol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, 0.1mol/L 尿素)平衡后,将稀释复性样品(0.38mg/mL, 340u/mL)和透析复性样品(1.3mg/mL, 3098u/mL)分别上亲和层析柱,平衡液分别平衡至基线后以洗脱缓冲液(pH5.0, 0.02mol/L 柠檬酸钠, 0.75mol/L NH_4Cl)洗脱,回收洗脱峰,测活。

1.2.4 复性 rhSOD 的 NBT 活性染色:参照文献[12]进行。

1.2.5 rhSOD 纯度鉴定 SDS-PAGE 检测包含体和纯化 rhSOD 纯度,考马斯亮蓝法测定蛋白含量,邻苯三酚自氧化法(终止剂法)测 SOD 活性^[13]。该法测定结果与改良的邻苯三酚自氧化法一致。

2 结果和讨论

2.1 菌体表达产物及纯化包含体的电泳分析

对菌体表达产物和纯化后的 rhSOD 包含体进行 SDS-PAGE 分析(见图1)。rhSOD 亚基的表观分子量为19kD,与文献[14]报道的人 Cu,Zn-SOD 表观分子量一致。破菌后 rhSOD 主要存在于破菌沉淀中,表达量约占菌体总蛋白的30%,以包含体形式存在(泳道2),纯化后包含体纯度大于80%(泳道4)。

2.2 rhSOD 包含体的初步复性

将纯化包含体以8mol/L尿素溶解后,对离心去除杂质的上清液分别以透析法和稀释法复性,复性结果见表1。透析复性时,样品透析1d至尿素终浓度为1mol/L, rhSOD 活性为3620u/mL。透析至尿素终浓度0.1mol/L,出现絮状沉淀,离心测上清活性为3830u/mL,活性略有增加,对沉淀电泳检测结果显示绝大部分为杂蛋白(图1泳道9和10)。表明当尿素浓度降至1mol/L时, rhSOD 活性即开始回复并基本达到稳定。上清置于-20℃冻存,取出融化后活性略有降低。稀释至尿素浓度2mol/L复性时,约4h后, rhSOD 活性为150u/mL, 6d后活性增至340u/mL(换算为稀释前样品,活性应为1360u/mL),且不产生蛋白质聚集沉淀(因此稀释复性样品蛋白组成与纯化包含体相同)。以上结果表明 rhSOD 活性的恢复不仅需要 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的参与,还需要一定时间的保证。

表 1 透析法和稀释法复性 rhSOD 包含体活性比较
Table 1 Renaturation of rhSOD inclusion body by dialysis and dilution

Renaturation method	Protein concentration (mg/mL)	Total activity /u	Enzyme activity (u/mL)	Specific activity (u/mg)	Urea concentration (mol/L)	Precipitate
By dialysis {	the first	—	3620	—	1.0	Not
	the second	—	3830	—	0.1	Yes
	freeze then thaw	1.3	34078	3098	0.1	Not
By dilution	0.38	14960	340	895	2.0	Not

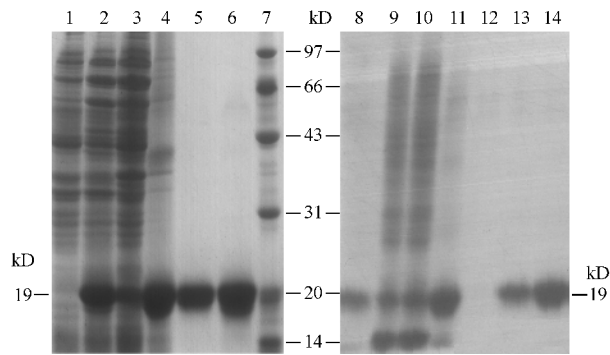


图 1 rhSOD 的 SDS-PAGE 图谱**

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of rhSOD**

1 :before induction ; 2 : after induction ; 3 : the suspension of induced bacteria was sonicated ,cleard by centrifugation ; 4 :purified insoluble rhSOD inclusion body ; 5 ,8 : highly purified rhSOD by MCAC (by dilution) ; 6 ,13 ,14 : highly purified rhSOD by MCAC (by dialysis) ; 7 : protein size markers (Sangon) ; 9 ,10 : the precipitate of rhSOD by dialysis by centrifugation ; 11 : the suspension of rhSOD by dialysis by centrifugation ; 12 : liquid of rhSOD by dialysis passed through MCAC column .

**The sample of rhSOD by dilution didn't resulted in the precipitate of protein and was same as purified rhSOD inclusion body (lane 4) so it is not provided in Fig.1 again .

另外 ,从表中可见 ,透析复性 rhSOD 总活性是稀释复性的 2 倍多 ,表明此条件下稀释法复性效率较之透析法要低。同时稀释法得到的 rhSOD 比活较低 ,原因可能是 2mol/L 尿素不是活性回复的最佳浓度 ,如果将 8mol/L 尿素溶解的 rhSOD 包含体改用逐滴加入含适量 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的稀释缓冲液中 ,使尿素浓度控制在 0.1 ~ 1mol/L 范围 ,活力回复可能会大幅度提高。上述样品为初步复性 rhSOD。

2.3 稀释法及透析法复性 rhSOD 的金属螯合亲和层析纯化和复性

对上述已经过稀释复性和透析复性的 rhSOD 样品分别以金属螯合亲和层析柱纯化 ,得到以下洗脱曲线 (图 2 ,a 和 b)。峰 I 为上样流出液峰 ,测活几乎无活性 ,为杂蛋白和尿素峰 (尿素在 280nm 下监测时有明显吸收峰) ,表明目标蛋白全部吸附于层析柱上。峰 II 为洗脱峰 ,测活具有 SOD 活性 ,为活性峰。亲和层析纯化结果见表 2。

从表 2 可知 ,尽管上柱前两种复性方法的样品比活差异很大 ,稀释法比活只有 895u/mg ,但经过亲和层析纯化后比活接近 ,均可达到 5000u/mg 左右 ,各自比活分别为上柱前透析复性样品和稀释复性样品比活的 2.2 倍和 5.3 倍 ,尽管蛋白

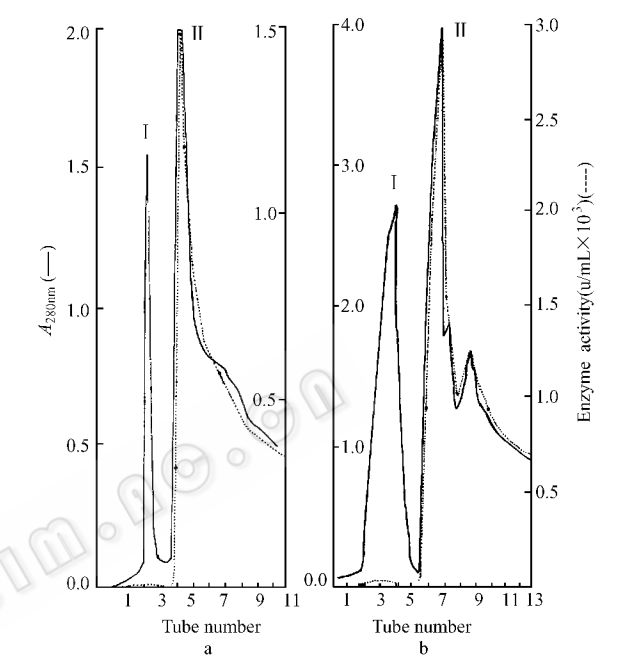


图 2 rhSOD 金属螯合亲和层析洗脱曲线

Fig. 2 The elution curve of rhSOD by MCAC
a rhSOD by dilution ; b rhSOD by dialysis .

回收率分别为 64% 和 25% ,但活性回收率均超过 130%。在 4℃ 放置过程中发现 ,复性后 rhSOD 活性非常稳定 ,而且活性还有所增加。

金属螯合亲和层析 (MCAC) 是近年来被普遍应用的纯化蛋白质常用的方法 ,金属离子通过亚氨基二乙酸被螯合到载体上 ,蛋白质主要通过其表面的氨基酸残基中的咪唑基、巯基和吡咯基与之发生特异性结合而被吸附 ,通过改变溶液的 pH 或离子强度 ,或者采用加入竞争性物质 (如咪唑、组氨酸和 NH_4^+ 等) 使蛋白质被置换下来。rhCu ,Zn-SOD 分子含有多个 His 和 Cys 残基 ,因此与金属离子有很强的亲和力。pH 值降低 ,或 NH_4^+ 浓度升高 ,都有利于蛋白质的洗脱^[1]。在本实验的洗脱条件下洗脱吸附于铜螯合亲和层析柱上的 rhSOD ,不论是何种方法初步复性的样品 ,经洗脱后的 rhSOD 比活均可达到 5000u/mg 左右 ,且 SDS-PAGE 结果显示目标蛋白条带均一 ,纯度大于 95% (图 1 泳道 5 ,6 ,8 ,13 和 14)。尽管蛋白回收率小于 64% ,但活性回收率均大于 130% ,表明部分无活性的 rhSOD 折叠中间体在洗脱过程中继续得以复性。比活的提高不仅仅是由于杂蛋白的去除 ,更是由于 rhSOD 的进一步复性所致。

表 2 透析法和稀释法复性 rhSOD 的金属螯合亲和层析纯化及复性结果
Table 2 Purification and renaturation of rhSOD by dilution and dialysis by MCAC

		rhSOD by dilution					rhSOD by dialysis				
		Total protein /mg	Total activity /u	Specific activity (u/mg)	Protein recovery /%	Activity recovery /%	Total Protein /mg	Total activity /u	Specific activity (u/mg)	Protein recovery /%	Activity recovery /%
before	MCAC	16.72	14960	895	100	100	7.8	18588	2383	100	100
after	MCAC	4.13	19736	4778	25	132	5.0	26200	5240	64	141

人 Cu,Zn-SOD 由两个亚基组成,每个亚基中含有一个 Cu²⁺ 和一个 Zn²⁺,为金属酶。Cu,Zn-SOD 活性中心是一个椭圆形的“口袋”,Cu²⁺ 与 4 个组氨酸残基咪唑环上的氮原子构成配位结构,Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 之间共同连接组氨酸 His61,形成“咪唑桥”结构,而金属辅基 Cu²⁺ 对 Cu,Zn-SOD 的催化活性影响很大,没有一种金属离子能取代 Cu²⁺ 而起恢复酶活性的作用^[15]。对重组人 Cu,Zn-SOD 理化性质的研究也表明,乙腈和 EDTA 对 rhCu,Zn-SOD 的活性有明显的抑制作用,且 Cu 是以 2 价态存在,据此推测酶活性中心的 Cu²⁺ 是 rhCu,Zn-SOD 保持活性所必需^[16]。含金属辅基的 rhCu,Zn-SOD 包含体的复性要比一般非金属酶包含体的复性更为复杂。究竟 Cu²⁺、Zn²⁺ 是在变性 Cu,Zn-SOD 折叠形成正确的空间构象后再掺入到酶活性部位,还是折叠过程与 Cu²⁺、Zn²⁺ 的掺入同时进行,其复性机制还不清楚。在本实验的稀释法和透析法复性的样品中,实际上包含复性 rhSOD 和未复性 rhSOD,未复性 rhSOD 可能是在变性剂浓度逐渐降低使其恢复正确空间构象的过程中,由于 Cu²⁺ 没有及时结合于酶活性中心而不能表现出活性,但却以可溶性的折叠中间体状态与复性 rhSOD 共存。复性与未复性 rhSOD 皆可与铜螯合亲和层析柱结合(过柱流出液杂蛋白和尿素峰检测不到 SOD 活性和泳带)(见图 1 泳道 12),此时在吸附过程中尿素缓慢过柱流出,达到与目标蛋白的分离。从铜螯合亲和层析柱上洗脱下来的 rhSOD 之所以活性回收率大于 100%,推测一是由于在上柱吸附过程中目标蛋白逐渐与尿素分离,尿素浓度的逐步降低使原来未复性的 rhSOD 在柱上得以复性,同于稀释复性原理。二是由于在洗脱时,铜螯合亲和层析柱上的少量 Cu²⁺ 会随洗脱液发生部分脱落,而脱落的 Cu²⁺ 正好填补了酶活性中心的 Cu²⁺ 的空缺,因而使无活性的 rhSOD 折叠中间体在洗脱过程中得以复性。

2.4 复性 rhSOD 的 NBT 活性染色鉴定

将亲和层析柱洗脱下来的 rhSOD 根据所测得的活性(蛋白浓度为 0.2mg/mL)分别点入 0.3u,0.6u,1.2u,2.4u,3.6u,4.8u 和 6.0u 进行天然 PAGE,同时以天然牛血 SOD 作对照,电泳毕将凝胶进行 NBT 活性染色(结果见图 3)。泳道 7 只点入 0.3u(相当于 0.05μg 复性后 rhSOD,纯度按 100%计,若纯度按 95%计,实际点入的 rhSOD 还要少于 0.05μg),即可检测到明显的 SOD 活性,且随点入活性单位数的增加而增强。泳道 8 和 9 分别点入了 4μg 和 2μg 纯化 rhSOD 包含体(溶解于 8 mol/L 尿素中,测活几乎无活性,纯度按 80%计,则 rhSOD 分别为 3.2μg 和 1.6μg)经 NBT 活性染色后亦显示出 SOD 活性,但其活性透明带亮度只与复性后的 0.6u(泳道 6,相当于

0.1μg 复性后 rhSOD)相当。由此可见,经复性纯化后的 rhSOD 样品具有非常强的活性。变性的 rhSOD 在天然 PAGE 后经 NBT 染色之所以表现出活性,是由于变性 rhSOD 在天然 PAGE 过程中随着尿素的逐渐稀释而使极少量的目标蛋白复性所致。

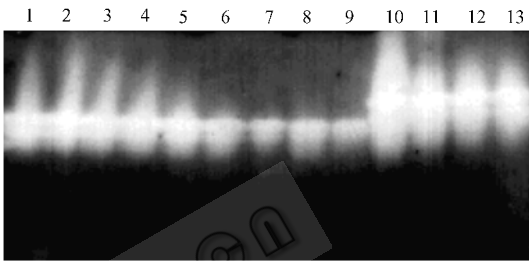


图 3 复性 rhSOD 的 NBT 活性鉴定

Fig. 3 Activity identification of renatured rhSOD by NBT strain 1 ~ 7: purified and renatured rhSOD by metals-chelating affinity chromatography, 6.0u, 4.8u, 3.6u, 2.4u, 1.2u, 0.6u and 0.3u respectively, amount of rhSOD 1μg, 0.8μg, 0.6μg, 0.4μg, 0.2μg, 0.1μg and 0.05μg; 8 ~ 9: denatured rhSOD inclusion body solubilized by 8mol/L urea, amount of rhSOD 3.2μg and 1.6μg; 10 ~ 13: natural bovine Cu,Zn-SOD from blood.

施惠娟^[17]等通过基因工程手段构建表达了可溶性的人源 SOD,经纯化后比活虽然大于 5000u/mg(邻苯三酚自氧化法测定活性),但纯度只有 88%。因此,对于可溶性表达的 SOD 的纯化,不仅步骤较繁杂,而且菌体杂蛋白很难完全去除。张翊等^[10]从人肝组织克隆了人 Cu,Zn-SOD cDNA,并在大肠杆菌中获得以包含体形式表达的 rhSOD。在对其以稀释法复性后先经超滤浓缩系统将样品浓缩,再经过凝胶过滤和离子交换两步层析柱纯化,最终获得纯度达 98%的 rhSOD,然而比活只有 2529u/mg(改良的邻苯三酚自氧化法测定活性)。不仅纯化步骤多,耗时长,而且活性不高,表明大量 rhSOD 并未得到有效复性,而是以无活性的 rhSOD 折叠中间体存在。本法首先分离纯化得到纯度大于 80%的包含体,然后以简单的稀释法或透析法对其初步复性,最后经过一步铜螯合亲和层析进行纯化,结果目标蛋白在纯化的同时又得到了进一步复性,获得了纯度大于 95%、比活 5000u/mg 左右并经 NBT 活性染色证明有很强 SOD 酶活性的 rhSOD。本法复性和纯化步骤简便易行,除在包含体溶解缓冲液中添加 0.1mol/L 的还原剂 β-巯基乙醇外,在复性时并未使用任何有助于蛋白质复性所使用的其它添加剂,不需要特殊仪器设备,所用铜螯合亲和层析柱凝胶载体为本实验室自制,成本低廉,适合今后大规模生产的需要。

3 结论

rhSOD 作为一种人源基因重组蛋白质,由于在大肠杆菌中过度表达等原因,使 rhSOD 工程菌合成的 rhSOD 分子不能及时折叠形成正确的空间结构,表达产物为不溶性的包含体,但形成包含体最大的优点是防止表达蛋白被宿主蛋白酶降解和易于分离纯化。AFC 法利用配体与目标蛋白质间的特异性亲和作用,使变性蛋白质分子保留在柱的顶端,使其与变性剂分离,然后在洗脱过程中进行复性。MCAC 是 AFC 的一种,被螯合到柱载体上的金属离子(如 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 等)与蛋白质氨基酸残基中的咪唑基、巯基和吡啶基之间有特异性的亲和作用,而这种作用又不受强变性剂(如尿素)的影响^[2]。我们利用吸附了 Cu^{2+} 的金属螯合亲和层析柱对以稀释法和透析法初步复性的 rhCu、Zn-SOD 分别进行了纯化,透析法样品经铜柱纯化后的 rhSOD 比活是上柱前透析法样品比活的 2.2 倍,蛋白回收率为 64%,稀释法样品经铜柱纯化后的 rhSOD 比活是上柱前稀释法样品比活的 5.3 倍,蛋白回收率为 25%,同时两者活性回收率都大于 130%。这个结果充分说明,目标蛋白 rhSOD 在纯化的同时又获得了进一步复性。电泳结果显示 rhSOD 条带均一,纯度大于 95%,比活达到 5000 u/mg 左右,NBT 生物活性染色显示出很强的 SOD 酶活性。表明铜螯合亲和层析对于低复性效率的稀释或透析复性 rhCu、Zn-SOD 而言是一种纯化和使其进一步复性的简便省时且有效的方法。对以 8mol/L 尿素溶解的 rhSOD 包含体溶解液或将其适当稀释后直接以铜螯合亲和层析柱纯化并以期复性的实验正在进行当中。对于金属螯合亲和层析法是否在纯化蛋白质的同时通过改变洗涤和洗脱条件也能起到间接复性的效果,还有待于使用其它变性蛋白质进行实验研究得出结论。

REFERENCES(参考文献)

[1] Zhang YD(张耀东),Zhang LH(张丽华),Geng XD(耿信笃). Cultivation of human interferon- γ gene engineering *Escherichia Coli* and purification, renaturation of its products. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, **15** (2): 240-243

[2] Guo LA(郭立安),Geng XD(耿信笃). Simultaneous renaturation and purification of proteins by liquid chromatography. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16** (6): 661-666

[3] Tie F(铁锋),Ru Q(茹刚),Li LY(李令媛) *et al.* Purification of metallothioneins by metal chelaing affinity chromatography. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1994, **21** (5): 447-450

[4] Wei Q(魏琪),Yao RH(姚汝华),Bao SX(鲍时翔). Separate recombinant antibacterial peptide with immobilized metal-chelated affinity chromatography membrances. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2000, **27** (4): 401-403

[5] Yuan QS(袁勤生). Application of SOD in pharmaceuics , daily chemical and foodstuff. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceuticals*(中国生化药物杂志),1994, **15** (4): 289-293

[6] Weselake RJ, Chesney SL, Petkau A *et al.* Purification of human copper, zinc Superoxide Dismutase by copper chelaing affinity chromatography. *Anal Biochem*, 1986, **155**: 193-197

[7] Wei Q(魏琪), Yao RH(姚汝华), Bao SX(鲍时翔). Preparation of immobilized metal-chelaing affinity membrane and its application to purification of Cu/Zn-superoxide dismutase. *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), 2000, **18** (4): 361-363

[8] Lü X(吕星), Chen JZ(陈吉中), Li PF(李培峰) *et al.* Purification of cuprozinc superoxide dismutase from human erythrocytes by Cu^{2+} chelaing affinity chromatography. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1994, **21** (3): 259-262

[9] Hadded NIA(纳米尔), Yuan QS(袁勤生). Purification of copper-zinc superoxide dismutase from Semen *Lethospermi* (SL) by copper-chelate affinity chromatography. *Chin J Nat Med Ncv* (中国天然药物), 2004, **2** (6): 379-384

[10] Zhang Y(张翊), Wang JZ(王军志), Wu YJ(吴勇杰). Gene cloning, expression and purification of its production of recombinant human superoxide dismutase. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16** (5): 557-560

[11] Sun XD(孙旭东), Li HQ(李红旗), Sui HY(隋洪艳) *et al.* Study on protein separation using immobilized metal ion affinity chromatography. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16** (4): 495-499

[12] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971, **44**: 276-287

[13] Jing TY(静天玉), Zhao XY(赵晓瑜). The improved pyrogallol method by using terminating agent for superoxide dismutase measurement. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1995, **22** (1): 84-86

[14] Hartman J R, Geller T, yavin Z *et al.* High-level expression of enzymatically active human Cu/Zn superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 7142-7146

[15] McCord JM, Fridovitch I. Superoxide dismutase——an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969, **244**: 6049-6055

[16] Gao JX(高俊杰), Xia WC(夏文超), Yuan QS(袁勤生). Study on the properties of recombinant human Cu, Zn-SOD. *Pharmaceutical Biotechnology* (药物生物技术), 2003, **10** (1): 43-47

[17] Shi HJ(施惠娟), Fan LQ(范立强), Chen CH(陈长华). Cloning, expressing, fermentation and purification of human copper/zinc-superoxide dismutase cDNA. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 1999, **34** (5): 340-342