

蛋白的色谱复性及同时纯化

郭立安* 耿信笃**

(西北大学现代分离科学研究所 西安 710069)

摘要 对近年来新发展的用液相色谱(LC)进行蛋白质复性及同时纯化的方法做了评述,详细介绍了蛋白质在 4 种液相色谱上的复性及同时纯化的方法、设备和影响因素,并对各自的优缺点进行了比较,为色谱法作为研究蛋白质折叠及用于基因工程生产治疗蛋白质的复性及同时纯化技术的进一步应用提供依据。

关键词 蛋白质,液相色谱,折叠,基因工程,纯化

中图分类号 Q503 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2000)06-0661-06

蛋白质分子知道如何折叠,科学家目前还不甚了解。所以,对科学家来说这是一个挑战性的课题。这一问题不仅涉及生命科学中生命是如何起源的重大理论问题,而且对于基因重组蛋白质的复性等应用也有十分重要的指导作用。人们目前表达的重组蛋白质已达 4000 多种,其中用 *E. coli* 表达的要占 90% 以上,而这些蛋白质在 *E. coli* 中绝大多数是以包涵体形式存在,这就提出了用高浓度变性剂提取目标蛋白质后的复性问题。由于目前常用的稀释和透析法主要用于与变性剂分离以及进行蛋白的复性,不仅复性的活性回收率不高,一般仅为 5%~20%,而且难以与杂蛋白分离,这就直接影响了这类治疗蛋白质成本的降低。因此,基因重组蛋白质的复性问题一直是生物工程下游纯化技术的一个研究热点。

众所周知,液相色谱(LC)是一种最有效的纯化蛋白质的方法,已成为基因重组蛋白质纯化必不可少的手段^[1,2]。自 1991 年笔者之一等首先提出使用疏水相互作用色谱(HIC)作为蛋白质的复性工具并于翌年申请国家发明专利后^[3-5](现已获批准),同在 1994 年,捷克、美国和日本科学家分别用离子交换法(IEC)^[6],凝胶排阻色谱法(SEC)^[7]和亲和色谱法(AFC)^[8,9]成功地变性蛋白进行了复性。这一事实足以说明 LC 作为蛋白质的复性方法已引起了科学家强烈地反响。由于 HIC 在技术上的难度较大,直到 1997 年才被美国 Du Pont Merck 药业公司用于多个 HIV 蛋白酶突变体的复性和纯化^[10-13]。到目前为止,已有多个国家的科学家在研究如何有效地使用 LC 进行蛋白质复性。

目前,国内外已有多篇综述文章介绍蛋白质复性方法^[14-18]。在 HIC 法的进展中也曾涉及对蛋白质复性及同时纯化的评述^[2,16-18],但尚未见到专门用 LC 方法对蛋白质复性及同时纯化的评述。本文结合我们使用 HIC 作为蛋白

质复性的研究,也对各类色谱法用于蛋白质折叠研究进展现状一并进行评述。

1 各种液相色谱的蛋白质复性法

与传统的稀释法及透析法比较,用 LC 法进行蛋白质复性的优点是:①在进样后可很快除去变性剂;②由于色谱固定相对变性蛋白质的吸附可明显地减少,甚至完全消除变性蛋白质分子在脱离变性剂环境后的分子聚集,从而避免了沉淀的产生,提高蛋白质复性的质量和活性回收率;③在蛋白质复性的同时可使目标蛋白质与杂蛋白分离以达到纯化的目的,使复性和纯化同时进行;④便于回收变性剂,以降低废水处理成本。目前,能够用于蛋白质复性的 LC 方法包括 HIC、IEC、SEC 与 AFC 四种。

1.1 排阻色谱法

美国科学家 Werner M H 等首次实现了用 SEC 对 *E. coli* 的宿主整合因子(Integration host factor),核糖核酸酶(Rnase A),rhETS-1 和 Rhodanese 的复性^[7]。该法的复性机理为:在变性蛋白进入柱顶端时,因有高浓度变性剂的存在,变性蛋白质分子有一个随机的构象状态和大的动力学水合半径,不能进入柱的空隙,蛋白质在 SEC 柱上不保留。当使用复性的缓冲溶液洗脱时,因其逐步取代变性剂并使蛋白质浓度降低,使变性蛋白质分子处于热力学不稳定的高能状态,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,从而使蛋白质开始复性。此时,局部复性的蛋白质可以进入球的内部,开始在液-固两相间进行分配,随着时间的推移,当蛋白质分子的结构变得更加紧密时,蛋白质在两相中的分配系数会逐步增加。当蛋白质进入柱填料的孔隙后,其扩散速度减缓,从而限制了蛋白质

收稿日期 2000-04-07 修回日期 2000-07-24。

基金项目 国家自然科学基金资助(29675017,3988000)。

* 西安第四军医大学中心实验室 现为西北大学博士后。

** 通讯作者。

的聚集,这样就减少了沉淀的产生。蛋白质分子大,先从柱子上洗脱下来,变性剂分子质量小,最后流出色谱柱^[7]。故 SEC 的主要作用不是变性蛋白质与 SEC 固定相间的特殊作用力,而是有利于更换变性蛋白质复性的缓冲溶液,这里当然更不涉及二硫键是否正确对接的问题^[19]。与稀释法比较,该方法可使溶菌酶、碳酸酐酶和重组白细胞介素-6(IL-6)等的蛋白质质量回收率和活性回收率显著提高^[21~22]。

1.2 离子交换法

捷克科学家 Sutttnar J 等首次使用了强阴离子交换色谱法对 HPV16E7MS2 融合蛋白成功地实现了复性^[6]。他们使用 0.01mol/L NaOH、1% SDS 和 8mol/L 的尿素分别溶解 HPV16E7MS2 融合蛋白包涵体,对于尿素和 SDS 溶解的包涵体,则使用了 50mmol/L 的 Tris-HCl pH8.0 的溶液透析和离心,其上清液用 Mono Q 柱进行复性和纯化。用 NaOH 溶解的样品可直接用 Mono Q 柱对其同时进行分离和复性。其复性机理不同于 SEC 之处在于变性蛋白质与固定相有分子间的电荷作用,这种作用力可导致变性的蛋白吸附于固定相表面,在洗脱过程中进行吸附—解吸—再吸附的复性。依此法使 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)^[23]在 IEC 得到了复性。Hamaker 将 DEAE-纤维素卷成柱状装入色谱柱中,使用等浓度洗脱,对重组白细胞分泌抑制因子(Secretory leukocyte inhibito)进行了复性和纯化,用该法复性其蛋白质浓度比稀释方法提高了 6.4 倍,且 46% 的蛋白质可以获得复性^[24],质量回收率为 96%,时间只用了 5min。

1.3 亲和色谱法

AFC 是利用配体与目标蛋白质间的特异性亲和作用,使变性蛋白分子保留在柱的顶端使其与变性剂分离,而后在洗脱过程中进行复性的。依其 AFC 柱端基的不同,可将其分为固定化金属亲和色谱(IMAC)、脂质体亲和色谱和分子伴侣亲和色谱。由于配体与目标蛋白质间的作用特异性强,而且不同配体与蛋白质间的作用差别较大,所以 AFC 作为蛋白质复性的机理比较复杂。

IMAC 是以其端基与末端标记有组氨酸的蛋白质分子间有特异的亲合作用,而这种作用又不受强变性剂(如尿素)的影响。 Ni^{2+} 亲和色谱柱就是其中的一种^[25]。对重组人朊病毒(rhPrion)^[26,27]和重组 Toc 75、LHC2^[25]进行了复性就是其中的几个例子。

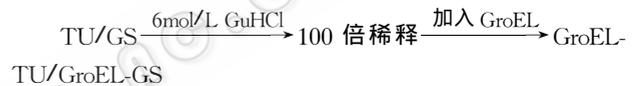
脂质体作为配体对蛋白质复性的原理推测为:局部变性的蛋白质分子结构类似于融球状态,且具有与天然蛋白质相类似的二级结构,此时蛋白质分子仍然具有强的疏水表面,故可同脂质体的脂质双层作用以帮助蛋白质进行复性。一个很好的例子就是对失活的碳酸酐酶氢酶的复性^[28],其活性回收率为 83%,如果使用没有脂质体的柱子,则回收率便降至 58%;如果直接采用稀释 50 倍的方法,其活性回收率为 52%。

分子伴侣是在体内介导表达蛋白质建立天然构象的一类重要的蛋白质。在重组蛋白质的体外折叠过程中也是一类很好介导蛋白质复性的辅助因子,已有多篇文章阐述了在

溶液中进行蛋白质复性的研究结果。在溶液中加入分子伴侣后,尽管可提高蛋白质的复性效率,但溶液中同时引入了杂蛋白,还因其价格昂贵,在实际生产中还没有一个蛋白质使用该法来复性。如将其作为亲和色谱则可能部分克服以上的缺点^[8,9,29,30]。

分子伴侣亲和色谱介导蛋白质的复性同它在溶液中的作用一致,与 HIC 有相似之处^[31]。分子伴侣在复性蛋白质时,为变性的蛋白提供一个中空环状疏水腔,当变性蛋白质进入空腔后,可部分避免或完全消除变性蛋白质分子间的相互聚集作用,使蛋白质在疏水环境下进行“结合—释放—再结合”的循环过程,直到其恢复到天然的构象状态。目前英国剑桥大学的一个研究小组在这一领域中做得最好。他们合成了几个复杂的固定相体系用于蛋白质复性,使这些在溶液中无法复性的蛋白质在柱子上得到了好的复性,并称之为折叠色谱(Folding chromatography)。他们使用上述方法对 Cyclophilin 进行了复性^[29]。Phadtare 等建立的分子伴侣亲和色谱复性了谷氨酰氨合成酶(Glutamine synthetase,GS)和微管蛋白(Tubulin,TU)两种蛋白质,方法如下^[9]。

试液处理:



色谱复性:



图 1 三组份亲和色谱固定相对 GS 和 TU 的复性示意图

Fig. 1 The refolding scheme of the GS and TU on the three-component affinity chromatographic parkings

1.4 疏水色谱法

笔者之一首次用 HIC 对重组人干扰素- γ (rhIFN- γ)复性并同时进行了纯化^[3]。如前所述,这也是第一个用 LC 法对变性蛋白质进行复性并同时纯化的报道,比上述其它 3 种 LC 法早 3 年。变性蛋白质在 HIC 上的复性机理为:当蛋白质、变性剂和杂蛋白质进入 HIC 系统后,由于 HIC 固定相对变性剂的作用力较弱,而对变性蛋白质的作用力较强,变性剂首先同变性的蛋白质分离,并随流动相一同流出色谱柱。又因 HIC 固定相能提供较通常方法高出数十乃至数百倍的能量^[35],在变性蛋白质被 HIC 固定相吸附的同时瞬时除去以水合状态附着在蛋白质表面和与固定相表面接触区域的水分子^[31],而蛋白质的特定的疏水性氨基酸残基与 HIC 固定相表面作用以形成区域立体结构(Microdomain),接着形成折叠中间体(Intermediate),随着流动相的不断变化,变性蛋白质不断地在固定相表面上进行吸附—解吸附—再吸附,并在此过程中逐渐被复性,形成与天然蛋白质构象相同的蛋白质并流出色谱柱^[3]。在此过程中,因不同的蛋白质与固定

相上的作用力强弱不同,复性的目标蛋白质就可以与大部分杂蛋白进行分离。利用 HIC 对 *E. coli* 表达的 rhIFN- γ 和 rhIFN- α 分别在复性的同时进行了纯化。rhIFN- γ 的 GuHCl 提取液在 40min 内使用一次色谱过程就可以使其纯度达到 85%, 活性回收率为稀释法的 2~3 倍^[3, 32, 33]。笔者之一将 rhIFN- α 的 GuHCl 提取液一步就可以达到 30% 以上的纯度^[1]。该技术用在基因重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)也获得了满意的研究效果^[34]。

该法的特点是:可将用浓变性剂溶液(7mol/L GuHCl, 8mol/L 尿素及月桂酸钠)从 *E. coli* 提取的目标蛋白直接进入 HIC 柱上进行多种变性蛋白的复性及同时纯化。

1.5 各种色谱复性方法的比较

用以上 4 种色谱法对变性蛋白质复性的一些典型事例列入表 1。从表 1 看出,所用固定相又可分为以刚性基质硅胶的高效液相色谱(HPLC)和其它非刚性基质的中压或常压色谱。HIC 便属于前者,其余 3 种属于后者。这不仅涉及到一个复性与同时纯化所需的时间长短,还涉及到在流动相置换变性剂时出现的变性蛋白质分子聚集及固定相表面吸附两者速度快慢之间的动力学问题,从而会影响到复性效率。

这 4 类色谱相同之处都是色谱固定相对蛋白质复性作出了贡献,但其作用机理却差异甚大。

SEC 固定相使变性蛋白质分子在洗脱过程中分子体积逐渐减小而进入 SEC 填料孔中而保留,因此蛋白质先被洗脱,而变性剂最后流出 SEC 柱,因此柱的负荷受到了很大限制,而且在用流动相置换变性剂的过程中不可避免地会产生沉淀。此外,SEC 的分离效果是 LC 中最差的,故用于纯化蛋白质的效果也不够理想。与 SEC 比较,IEC 的柱负荷高,且变性蛋白分子可与固定相作用使变性蛋白质在填料的表面吸附,减少了由于分子间聚集产生沉淀的趋向较 SEC 强,且分离效果也好于 SEC。但在 IEC 上进行蛋白质复性时,最常用的变性剂盐酸胍也会在 IEC 柱上保留,这不仅会影响柱容量,而且往往与蛋白质一起在洗脱过程中流出色谱柱,从而使最有效提取的蛋白质的变性剂盐酸胍的使用受到限制。AFC 固定相,特别是使用含有分子伴侣的二组份和多组份的 AFC 固定相与变性蛋白分子间有特异的亲和力,使变性的蛋白质分子间形成沉淀的可能性大大减小,能将原来认为不可逆折叠的蛋白质变成了可逆的折叠,使其成为一种强有力的研究蛋白质折叠的手段。遗憾的是一种 AFC 柱只对一种或少数几种蛋白质有亲和作用,使用范围窄,而且,如图 1 中 TU/GS 复性流程图所示,试液先在分子伴侣存在条件下稀释 100 倍,然后才用 AFC 复性,手续繁杂,所需时间变长。更重要的是其柱价格十分昂贵,目前还难以用到制备规模,更难以用到工业生产中蛋白质的复性和纯化。

HIC 固定相是从高浓度盐溶液(近饱和状态的 3mol/L 硫酸铵溶液)中吸附变性蛋白质,且与变性剂瞬时分离,不仅大大降低了蛋白分子间的聚集作用,还因固定相能在分子水平上为变性蛋白质提供很高的能量,使水化的变性蛋白质瞬时失水,并形成局部结构以利于蛋白质分子从疏水核开始折

叠^[4]。此外,梯度洗脱使各种蛋白质分子“自己选择”对自己有利的条件进行折叠,以达到同固定相和流动相间的协同作用,更有利于复性和纯化的最优化条件的选择。从技术上讲,高效液相色谱的流速可以从 1.0mL/min 到 10mL/min 不等,大大缩短了变性蛋白质分子脱离变性剂环境后与 HIC 固定相的接触时间,从另一角度避免了变性蛋白质分子间的相互聚集而有利于固定相的吸附。因此,用 HIC 对变性蛋白质复性时,其质量和活性回收率一般都大于 90%,而活性回收率有时 would 超过 100%^[30, 33]。HIC 是一个好的蛋白质分离手段,故在蛋白质复性的同时又能与包括折叠中间体在内的其它杂蛋白质进行很好地分离,更重要的是 HIC 柱较便宜,可用于制备规模,在 30~40min 内就可完成上述过程,所以 HIC 可能是一种较为理想的,且最具有发展潜力的,对变性蛋白质复性及同时纯化的色谱方法。

2 蛋白质复性及同时纯化装置

原则上讲,用于上述各种液相色谱的仪器均可用于变性蛋白的复性及同时纯化研究。但由于所有这 4 种色谱法都不能完全防止在使用流动相置换变性剂时可能产生变性蛋白质分子间的聚集所形成的少许沉淀。这些沉淀在进行梯度洗脱时常常也不能溶解在洗脱能力强的流动相中,甚至浓的变性剂溶液中。这些沉淀积累后就会使用柱压很快升高直至报废。这就要求在进行蛋白质复性时使用的色谱仪必须能在数百千克压力条件下工作。此外,因常用色谱仪对流速、精度、检测器的灵敏度、重现性均有极高的要求,加之色谱中通常使用的是管形色谱柱,流速增大就会使柱压升得很高,很难在制备规模条件下正常工作,如果要通过改造仪器克服压力造成的问题,就会使仪器造价极高。因此,需要另辟捷径解决上述问题。

基于生物大分子的分离好坏基本上与柱长无关的论点及实验数据^[34, 31],笔者之一设计制作了变性蛋白质复性及同时纯化装置(Unit of simultaneous renaturation and purification of proteins, USRPP)或称为多功能蛋白纯化器^[36, 37]。该装置可做成各种大小不同的实验室或制备型的柱子。柱长很短,仅为 1cm,而柱直径可达 20cm 甚至更大。在使用 5×1cm 的 USRPP 时,在流速高达 7mL/min 的条件下,其柱后压力只有 30kg/cm²。因柱流过的面积(如柱径为 10cm)是常用的直径 4.6mm 色谱柱的 21 倍,加之其柱长只有通常色谱柱的 1/10~1/25,所以少许的沉淀聚集在柱子顶端的滤片上或残留在柱填料的顶端,不会造成柱压的升高。而这些产生的沉淀在常用实验室规模的色谱柱上产生的柱压可能是 USRPP 的 10 倍乃至 100 倍,这或许是到目前为止,尚未见到通常所用制备色谱柱在工业生产规模上进行蛋白复性及同时纯化的原因。人们普遍担心的问题是长度仅为 1cm 的柱的负荷及分离效果会如何。对于内填疏水色谱填料的一个大小为 10×50mm 的 USRPP 而言,其上样总蛋白可高达 1g,而进样体积每次可达 3~4mL,且可多次进样,使每次复性与纯化的总的进样体积高达 40mL^[32]。journals. im. ac. cn

表 1 色谱法对蛋白质的复性及同时纯化举例

Table 1 Examples of the renaturation and/or purification of proteins by liquid chromatography

Refolding proteins	Chromatographic methods	Chromatographic ligands	Results of refolding	Years	References
Recombinant human interferon- γ Lysozyme	HIC(H)*	HIC-silica	比稀释法高 2~3 倍 —	1991,1992	[3~5]
Papiloma virus HPV E7MS2 fusion protein	IEC(H)	Mono Q	—	1994	[6]
<i>E. coli</i> integration host factor rhETS-1	SEC(S)	Superdex 75 Sephacryl-S-100	60% 71%	1994	[7]
Rnase A Rhodanese	AC(H)	Sephacryl-S-100 mini-chaperones-TSK gel	>90% 10%	1994	[8]
Lactate dehydrogenase Tubulin	AC(S)	Anti-GroEL-Ab	—	1994	[9]
Glutamine synthetase Human ETS-1 protein	SEC(S)	Sephacryl-S-100 HR	—	1995	[20]
Bovine ribonuclease A Lysozyme	IEC(S)*	Heparin-sepharose	40% ,为稀释法 4 倍 蛋白浓度比稀释法高 1000 倍	1996	[23]
Bovine carbonic anhydrase Fusion proteins of monomeric α -glucosidase	IEC(S)	DEAE-cellulose	46% , 蛋白质浓度比稀释法高 6.4 倍	1996	[24]
Recombinant secretory leukocyte inhibitor	SEC(S)	Superose 6	比稀释法高 2.5 倍	1997	[19]
Complement C1 inhibitor Recombinant human prion protein	AC(S)	Nickel-NTA-agarose	—	1994,1997	[26,27]
Recombinant bovine prion protein Recombinant murine prion protein	AC(S)	GroEL191-345-agarose HSA-agarose GroEL 191-376-agarose	100%复性,无配体柱 只有 25%复性	1997	[29]
Cyclophilin A	AC(S)	GroEL191-345-agarose	92%		
Several mutants of indole 3-gly- cerol phosphate synthetase		GroEL 191-376-agarose			
Glucosamine 6-phosphate dea- minase proteases		GroEL191-345-agarose	100% 稀释法 < 10%		
Lysozyme	SEC(S)	Sephacryl-S100HR	当浓度为 0.4mg/mL 稀释复 性最高为 20% ,当浓度为 82mg/mL 色谱法复性 >46%	1997	[39]
Bovine carbonic anhydrase			当浓度为 2.0mg/mL 稀释法 有 40%复性,当浓度为 11.3mg/mL 色谱的复性 >76%		
Several recombinant HIV-1 mutant	HIC	—	—	1997,1998	[10~13]
Recombinant membrane proteins Toc LHC2	75 AC	Nickel chelating-agarose	8% ,比稀释法高 5% ,比稀释法高	1998	[25]
Bovine carbonic anhydrase	AC(S)	Liposome-Superdex 20 Liposome-TSK6000PW	83% ,无 AC 配体柱 58%	1998	[28]
Lysozyme	SEC(S)	Superdex 75HR	—	1999	[21]
Recombinant interleukin-6	SEC			1999	[22]
Scorpion toxin cn5	AC(S)	Minichaperone-agarose DsbA-agarose Peptidyl-prolyl isomerase		1999	[30]
Recombinant human interferon- γ	HIC(H)		比稀释法高 2~3 倍	1999	[34]
Recombinant human GC-CSF	HIC(H)		比稀释法高 2.6 倍		
α -Amylase	HIC(H)		47.3% 稀释法 0		
Recombinant lysozyme	SEC		比稀释法活性率高 35% 以上	1999	[42]
Maize cytokinin glucoside-specific beta-glucosidase	IMAC		—	1999	[43]
Heterodimeric platelet-derived growth factor (AB)	SEC		75% 以上的活性回收率	1999	[44]
Lysozyme	AFC		100%复性	1999	[45]

* :H 表示填料为硬基质 ;S 表示填料为软基质

使用上述装置,我们对糖核酸酶-A、溶菌酶、rhG-CSF进行了有效地复性和纯化。其中 rhG-CSF 和 rhIFN- γ 的复性效果比溶液中复性的效果高 2.6 倍以上^[32,34]。

3 影响色谱复性的因素

除了 LC 中固定相对蛋白质折叠做出主要贡献外,流动相的组成、温度、pH 值等对蛋白质复性也起着重要的作用, α -淀粉酶就是其中的一例^[38]。在 HIC 中使用的流动相组成通常是连续变化的,称之为固定相与流动相之间的协同作用。变性蛋白质的浓度太高,很容易产生分子间的聚合作用,如 α -葡糖苷酶在使用稀释复性时的最佳浓度为 5 μ g/mL,使用 IEC 最大浓度则可以达到 5mg/mL,增加蛋白质浓度在 1000 倍以上,而且活性回收率比稀释复性提高了 4 倍^[23]。但无论如何,在 LC 中可允许变性蛋白质的浓度比稀释法要高。用 LC 复性蛋白质时,尽管蛋白质的复性浓度要比传统的稀释法高,但在浓度过高时,仍然会有部分沉淀产生^[31,39]。变性剂浓度同样也影响蛋白质复性效果,如溶菌酶在 SEC 上进行复性时尿素的浓度为 2mol/L 时复性效果最好^[20,39]。蛋白质在失活状态向天然状态转化时存在数目不等的中间体,而中间体在向天然态的转化又是复性的限速步骤^[16]。为了使中间体完全复性,在进行色谱复性时,有些蛋白质必需在色谱柱上停留一段时间。对于牛碳酸酐酶(BCA)^[28]、重组膜蛋白 LHC2^[25]复性而言,需要停留大约 30min,这样才可获得合适的复性效果。当流速较低时,脂质体可以比较充分地帮助 BCA 进行复性,当在高的流速下,脂质体无法有效地同 BCA 进行作用,直接影响了复性的效果^[28]。在 HIC 的流动相中加入氧化型谷胱甘肽,提高了还原型牛胰岛素中双硫键的正确对接率^[46]。

由于目前对用 LC 复性蛋白质的计量仍缺乏深入的研究和缺乏大量的实验数据,对于上述的影响因素的解释仍然

缺乏充分的说服力。

4 展 望

与通常稀释及透析方法比较,虽然 LC 具有除变性剂、使蛋白质折叠、与杂蛋白分离及便于变性剂回收的“一石四鸟”的优越性,尽管其问世至今已有近 10 年历史,但它仍然是一种处于发展阶段的方法。重要原因之一是从理论方面对复性的机理研究仍然不够,从而影响其在实际中的广泛应用。从应用方面来讲,抓住固定相对蛋白质折叠贡献最大的主要矛盾,合成性能优良的对蛋白质复性好、分离效果亦好的各类色谱固定相,并使之放大到制备规模,将会使这一技术发展得更快。从各类色谱法用于蛋白复性及同时纯化的各类指标比较看出,高效疏水色谱法是一个较理想,并具有发展前途的方法。用 LC 创造的特殊环境对那些通常认为不可逆折叠的变性蛋白质实现“蛋白质人工折叠”是有可能的。由于体内蛋白质折叠有细胞膜存在,在重力场存在的地球上进行的所有体外折叠也是在容器中进行的,故固体表面性质对蛋白质折叠起到十分重要的作用。基于这一事实,从 LC 研究所得的数据和结论对于非 LC 体外及体内蛋白质折叠研究都会有借鉴的价值,所以用 LC 法研究蛋白质折叠也有可能为体内蛋白质的折叠规律及生命起源的研究起到重要的作用。

致 谢:十分感谢国家自然科学基金委化学科学部无机分析组在过去年代中 3 次给予基金资助及生命科学部细胞与遗传组 2 次“高技术、新概念”项目资助,使我们对于小分子溶质和生物大分子在液相色谱中保留机理、复性及有关的理论进行了系统的研究,这才使作者有可能在这一研究领域取得了一些创新性的研究成果,从而为撰写本文奠定了基础,作者在此表示诚挚的谢意!

参 考 文 献

- [1] 郭立安. 高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术. 西安: 陕西科学技术出版社, 1993
- [2] 刘 彤, 耿信笃. 色谱, 2000, 18(1): 30~35
- [3] 耿信笃, 常建华, 李华儒等. 高技术通讯, 1991, 1(7): 1~8
- [4] Geng X, Chang X. *J Chromatogr*, 1992, 599: 185~194
- [5] 耿信笃, 冯文科, 边六交等. 中国专利, ZL92102727.3
- [6] Suttmar J, Dyr J, E Hamsikova E et al. *J Chromatogr B*, 1994, 656(1): 123~126
- [7] Werner M H, Clore G M, Gronenborn A M et al. *FEBS Lett*, 1994, 345(2-3): 125~130
- [8] Taguchi H, Makino Y, Yoshida M. *J Biol Chem*, 1994, 269: 8529~8634
- [9] Phadtare S, Fisher M T, Yarbrough L R. *Biochem Biophys Acta*, 1994, 1208(1): 189~192
- [10] Jadhav P K, Ala P J, Woerner F J et al. *J Med Chem*, 1997, 40(2): 181~191
- [11] Ala P J, Huston E E, Klabe R M et al. *Biochem*, 1997, 36(7): 1573~1580
- [12] Ala P J, Delosskey R J, Huston E E et al. *J Biol Chem*, 1998, 273(20): 12325~12331
- [13] Ala P J, Huston E E, Klabe R M et al. *Biochem*, 1998, 37(43): 15042~15049
- [14] 耿信笃, 常晓青. 西北大学学报(自然科学版), 1992, 22(增刊): 5~16
- [15] 白 泉, 耿信笃. 西北大学学报(自然科学版), 1994, 24(增刊): 193~198
- [16] 郭立安, 朱宝泉, 陈代杰. 中国医药工业杂志, 1999, 30(3): 141~146. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [17] 阎 哲 郭立安 袁育康 . 国外医学-预防、诊断、治疗用生物制品分册 ,1997 ,20(1) :10~14
- [18] 刘 彤 耿信笃 . 色谱 ,1998 ,16(1) :30~34
- [19] Gauthier M ,Patston P A . *Anal Biochem* ,1997 ,248(2) :228~233
- [20] Batas B ,Chaudhuri J B . *Biotechnol Bioeng* ,1995 ,50 :16~23
- [21] Batas B ,Chaudhuri J B . *J Chromatogr A* ,1999 ,864(2) :229~236
- [22] Ejima D ,Watanabe M ,Sato Y *et al* . *Biotechnol Bioeng* ,1999 ,62(3) :301~310
- [23] Stempfer G ,Neugebauer B H ,Rudolph R . *Nat Biotechnol* ,1996 ,14 :329~334
- [24] Hamaker K H ,Liu J ,Seely R J *et al* . *Biotechnol Prog* ,1996 ,12(2) :184~189
- [25] Rogl H ,Kosemund K ,Kuhlbrandt W *et al* . *FEBS Lett* ,1998 ,432(1~2) :21~26
- [26] Zahn R ,Von Schroetter C ,Wuthrich K . *FEBS Lett* ,1997 ,417(3) :400~404
- [27] Sinha D ,Bakhshi M ,Vora R . *BioTechniques* ,1994 ,17 :509~514
- [28] Yoshimoto M ,Kuboi R ,Yang Q *et al* . *J Chromatogr B* ,1998 ,712 :59~71
- [29] Altamirano M M ,Golbik R ,Zahn R *et al* . *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 ,94(8) :3576~3578
- [30] Altamirano M M ,Garcia C ,Possani L D *et al* . *Nat Biotechnol* ,1999 ,17(2) :187~191
- [31] Geng X ,Guo L ,Chang J . *J Chromatogr* ,1990 ,507 :1~23
- [32] 刘 彤 . 西北大学博士学位论文 ,1999
- [33] 张耀东 张丽华 耿信笃 . 生物工程学报 ,1999 ,15(2) :240~243
- [34] Liu T ,Geng X . *Chinese Chemical Letter* ,1999 ,10 :219~222
- [35] 耿信笃 张 静 卫引茂 . 科学通报 ,1999 ,44(19) :2046~2049
- [36] 刘 彤 耿信笃 . 西北大学学报(自然科学版) ,1999 ,29(2) :123~126
- [37] Lin T ,Geng X . *Biochemical Engineering :Marching Toward the Century of Biotechnology* ,Edit By Ouyang Z Y ,Yu F ,Cao Z A . Beijing :Tsinghua University press ,1997 ,pp. 879~883.
- [38] 白 泉 卫引茂 耿明晖等 . 高等学校化学学报 ,1997 ,18(8) :1291~1295
- [39] Batas B ,Jones H R ,Chaudhuri J B . *J Chromatogr A* ,1997 ,766(1~2) :109~119
- [40] Ahmed A K ,Schaffer S W ,Wetlaufer DB . *J Biol Chem* ,1975 ,250 :8477~8482
- [41] Holl-Neugebauer B ,Rudolph R ,Schmidt M *et al* . *Biochem* ,1991 ,30 :11609~11614
- [42] Batas B ,Schiraldi C ,Chaudhuri JB . *J Biotechnol* ,1999 ,68(2~3) :149~158
- [43] Zouhar J ,Nanak E ,Brzobohaty B . *Protein Expr Purif* ,1999 ,17(1) :153~162
- [44] Muller C ,Rinase U . *J Chromatogr A* ,1999 ,855(1) :203~213
- [45] Yoshimoto M ,Kuboi R . *Biotechnol Prog* ,1999 ,15(3) :480~487
- [46] 白 泉 孔 宇 张养军 耿信笃 . 西北大学学报(自然科学报) ,2000 ,32(4) :127~130

Simultaneous Renaturation and Purification of Proteins by Liquid Chromatography

GUO Li-An GENG Xin-Du

(Institute of Modern Separation Science ,Northwest University ,Xi 'an 710069)

Abstract The recent development of simultaneous renaturation and purification of proteins by liquid chromatography was reviewed. The principles ,advantages and disadvantages for the simultaneous renaturation and purification of proteins by four kinds liquid chromatography ,hydrophobic interaction chromatography ,ion exchange chromatography ,size exclusion chromatography and affinity chromatography were introduced in details. The new method may be used for researching the refolding of recombinant protein and the simultaneous renaturation and purification of recombinant therapeutic protein in preparative even in productive scales in industry. This paper contains one table ,one figure and 46 references.

Key words Protein , liquid chromatography , renaturation , recombinant protein , purification