

包涵体蛋白体外复性的研究进展

方 敏 黄华樑*

(中国科学院遗传研究所,北京 100101)

摘 要 外源基因在大肠杆菌中高水平表达时,通常会形成无活性的蛋白聚集体即包涵体。包涵体富含表达的重组蛋白,经分离、变性溶解后须再经过一个合适的复性过程实现变性蛋白的重折叠,才能够得到生物活性蛋白。近年来,发展了许多特异的策略和方法来从包涵体中复性重组蛋白。最近的进展包括固定化复性以及用一些低分子量的添加剂等来减少复性过程中蛋白质的聚集,提高活性蛋白的产率。

关键词 重组蛋白,包涵体,重折叠,复性,二硫键形成

中图分类号 Q51 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2001)06-0608-05

DNA 重组技术的发展使得蛋白质的生产进入了一个新时代。大肠杆菌表达体系因其具有低廉性、高效性和稳定性等优点在科研生产中被广泛应用。然而,重组蛋白在大肠杆菌中的高水平表达经常导致蛋白聚集而形成不溶的、无活性的包涵体。因此,自从应用大肠杆菌体系表达基因工程产品以来,人们就一直通过以下两个方向的研究以期得到高活性、高产量的重组蛋白:(1)促进重组蛋白在大肠杆菌中的可容表达:改变大肠杆菌的生长条件,或使重组蛋白与其它蛋白(如分子伴侣、折叠酶等)融合表达或共表达,或使重组蛋白分泌表达至细菌周质腔中等策略使重组蛋白在大肠杆菌中表达成可溶的生物活性形式。(2)优化复性过程,将包涵体蛋白在体外复性得到生物活性蛋白。由于包涵体中富含重组蛋白,且包涵体易于分离纯化,只要能够在体外成功复性,将是大量生产重组蛋白最有效的途径之一。近年来的研究使人们对于蛋白质在体外的重折叠过程有了一定的了解,新的复性过程可以使复杂的疏水蛋白、多结构域蛋白、寡聚蛋白、含二硫键蛋白在体外成功复性。

1 包涵体形成的原因

重组蛋白在宿主系统中高水平表达时,无论是用原核表达体系或酵母表达体系甚至高等真核表达体系,都可形成包涵体。事实上,内源性的蛋白质,如果表达水平过高,也会聚集形成包涵体。因此,包涵体形成的原因主要是高水平表达的结果。动力学模型表明^[1]:活性蛋白的产率取决于蛋白合成的速率、蛋白折叠的速率、蛋白聚集的速率(如图 1 所示)。在高水平表达时,新生肽链的聚集速率一旦超过蛋白正确折叠的速率就会导致包涵体的形成。

对于含有二硫键的重组蛋白而言,细菌细胞质内的还原

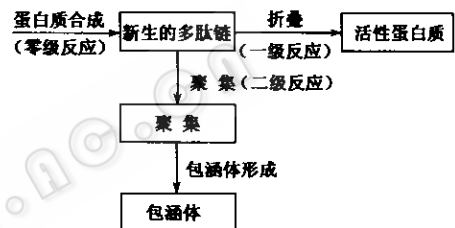


图 1 蛋白质的合成、折叠与聚集示意图

Fig.1 Schematic diagram for the synthesis, folding and aggregation of protein

环境不利于二硫键的形成。实验证明,硫氧还蛋白还原酶活性缺失突变的大肠杆菌菌株 ADA494, ADA494 (DE3) 等有利于二硫键在细胞质内的形成^[2]。

重组蛋白在大肠杆菌中表达时,缺乏一些蛋白折叠过程中需要的酶和辅助因子,如折叠酶和分子伴侣等,是包涵体形成的又一原因。

包涵体虽然由无活性的蛋白组成,但包涵体形成对于重组蛋白的生产也提供了几个优势:包涵体具有高密度,易于分离纯化;重组蛋白以包涵体的形式存在有效地抵御了大肠杆菌中的蛋白酶对目的蛋白的降解;对于生产那些处于天然构象时对宿主细胞有毒害的蛋白时,包涵体形成无疑是最佳选择。

2 包涵体的分离和溶解

2.1 包涵体的分离

包涵体是聚集的蛋白质形成的非常致密的颗粒,它们可直接用反相显微镜在活细胞中观察到^[3]。包涵体直径可达 μm 级,并呈现出无规则或类晶体的结构。由于包涵体具有

收稿日期:2001-04-13,修回日期:2001-07-20。

基金项目:国家 863 项目(863-102-09-04-01)资助。

* 通讯作者。 Tel:86-10-64889350; Fax:86-10-64857285; E-mail:hlhuang@genetics.ac.cn

很高的密度($\sim 1.3 \text{ mg/mL}$)^[4],它们在细胞裂解后可通过低速离心收获。为防止细胞碎片的共沉淀,细胞裂解必须很充分,比较有效的途径是高压匀浆结合溶菌酶处理。分离出来的包涵体中主要含有重组蛋白,但也含有一些细菌成分,如一些外膜蛋白、质粒 DNA 和其它杂质。去垢剂如 Triton X-100、脱氧胆酸盐和低浓度的变性剂如尿素充分洗涤去除杂质,这一步很重要,因为大肠杆菌外膜蛋白 OmpT(37kD)在 4~8 mol/L 尿素中具有蛋白水解酶活性,在包涵体的溶解和复性过程中可导致重组蛋白质的降解^[5,6]。

2.2 包涵体的溶解

包涵体蛋白溶解需要用很强的变性剂,比如 6 mol/L 盐酸胍或 6~8 mol/L 尿素。变性剂的选择因不同的蛋白而异。包涵体蛋白中存在一些与蛋白的天然构象类似的二级结构,用变性剂溶解包涵体时,若能保留这些二级结构,可以提高复性率^[7]。r-hGH 形成的包涵体在含有 2 mol/L 尿素的 Tris 缓冲液(pH 12.5)中可以充分溶解。低浓度的变性剂保留了包涵体蛋白中的二级结构,提高了复性率^[8]。

用去垢剂也可溶解一些包涵体蛋白质。Kandula Sunitha 等人用 Triton X-100 来溶解 *Zymomonas mobilis* levansucrase 包涵体蛋白^[9]。膜蛋白在 *E. coli* 中形成的包涵体,通常不易溶于尿素或盐酸胍,可用强的去垢剂或温和的去垢剂和变性剂联合溶解^[10]。

对于含有半胱氨酸的蛋白,分离的包涵体中通常含有一些链间形成的二硫键和链内的非活性二硫键。应加入巯基还原剂例如 DTT、GSH 或 β -ME 等进行处理以还原这些二硫键。螯合剂,如 EDTA、EGTA 可捕获一些金属离子以清除这些金属离子带来的不必要的氧化反应。

3 包涵体蛋白的复性

为了获得正确折叠的活性蛋白质,必须要去除过量的变性剂和巯基还原剂,并把还原的蛋白转到氧化的环境中促使二硫键的形成。常用的方法有:稀释、透析、渗滤等。蛋白复性过程必须根据蛋白质不同而优化过程参数,如蛋白的浓度、温度、pH 和离子强度等。

对于含有二硫键的蛋白,复性过程应能够促使二硫键形成。常用的方法有:空气氧化和使用氧化交换系统。氧化交换系统由低分子量的氧化型和还原型的巯基试剂组成。最常用的氧化交换系统是 GSH/GSSG,而 cysteine/cystine、cysteamine/cystamine、DTT/GSSG、DTE/GSSG 等也都有应用。在 Trey Simmons 等人的研究中 cysteamine/cystamine 系统比 GSH/GSSG 更有效。这也许是由于 cysteamine/cystamine 分子更小,更易于接近紧密结构的内部^[11]。氧化交换系统通过促使不正确形成的二硫键的快速交换反应提高了正确配对的二硫键的产率。通常使用 1~3 mmol/L 还原型巯基试剂,还原型和氧化型巯基试剂的比例通常为 10:1~5:1。最近,Hevehan D 等人的研究表明,当还原型和氧化型巯基试剂的比例介于 3:1 到 1:1 之间时,可以得到最高的复性率^[12]。重组蛋白的复性过程如表 1 所示。

表 1 包涵体蛋白的复性程序

步骤	条件
包涵体分离	细胞裂解后离心
包涵体溶解	6 mol/L GdmCl or 8 mol/L urea 10~100 mmol/L DTT 1~5 mmol/L EDTA 0.1 mol/L Tris HCl, pH 8.0 在室温下孵育 2 h
包涵体复性	Tris-HCl 缓冲液 pH7.5 ^a or pH8.5 ^b 5 mmol/L EDTA, 4 °C 复性 可以加入添加剂提高复性率 - 无添加剂 - 0.5 mol/L L-Arginine - 1 mol/L Tris - 0.5~2 mol/L GdmCl - 33 mmol/L Chaps - 20% glycerol - metal ions, ligands, etc. ^c
结果分析	复性后,用一个可靠的方法来检测重组蛋白的天然构象,计算复性产率 - 酶活性分析 - RP-HPLC - 分光光度 - 配基结合 - ELISA - 生物学分析

a. 对于不含有半胱氨酸而不含二硫键的蛋白质,在复性液中加入 2mmol/L DTE。

b. 对于含有二硫键的蛋白,在复性液中加入 3mmol/L 还原型和 1mmol/L 氧化型谷胱甘肽。

c. 对于在活性状态下含有金属离子的蛋白,复性液中不能含有 EDTA,应加入 5 倍量的相应金属离子。同样的,加入蛋白天然构象时结合的其他配基。

4 提高复性率的策略

4.1 稀释或透析复性

在体外复性过程中,变性的蛋白质要经过一系列的折叠中间体,最后形成蛋白的天然构象。在蛋白的折叠过程中,部分折叠的中间体的疏水簇外露,分子间的疏水相互作用引起蛋白聚集(如图 2 所示)。由于聚集是分子间的现象,聚集反应是二级(或高级)反应,而正确折叠却是一级反应,所以,聚集反应更依赖于高蛋白浓度。因此,减少聚集最直接的方法就是降低蛋白浓度。在蛋白浓度介于 10~50 $\mu\text{g/mL}$ 之间时,可以预期得到较高的复性率。

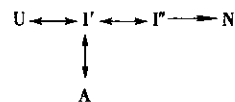


图 2 变性蛋白体外折叠与聚集示意图

Fig. 2 Competition between folding and aggregation of denatured protein *in vitro*

U: Unfolded protein; I: Intermediate
N: Native protein; A: Aggregate

一个成功的复性过程在于能够在高蛋白浓度下仍能得到较高的复性率。一个方法是把变性蛋白缓慢连续或不连续地加入复性液中。在两次蛋白加入之间,应有足够的时间间隔使蛋白折叠通过了易聚集的早期中间体阶段。这是由于完全折叠的蛋白通常不会与正在折叠的蛋白共聚集。该方法可提高单位体积的复性液的复性蛋白量。另一种方法是用温度跳跃策略。变性蛋白在低温下复性折叠以减少聚集,直到易聚集的早期中间体大都转化为不易聚集的后期中间体后,温度快速升高来促使中间体快速折叠成蛋白的天然构象。用此方法可使 Carbonic anhydrase II 在 4 mg/mL 浓度下成功复性^[13]。第三种方法是复性在中等的变性剂浓度下进行,变性剂浓度应高到足以有效防止聚集,同时又必须低到能够引发正确复性。溶菌酶的氧化复性在 1~2 mol/L 盐酸胍存在时在 5 mg/mL 仍有很高的复性率^[12]。Maeda Y 等人设计了一种缓慢透析的复性方法,复性起始于变性蛋白对含有 8 mol/L 尿素的透析液进行透析,而透析液中尿素浓度逐渐地用不含有变性剂的溶液来稀释,应用这种方法 Maeda Y 等使溶菌酶的复性率在 5 mg/mL 时达到 80%, IgG 的复性率在 1 mg/mL 时可达 70%^[14]。

4.2 封闭蛋白的疏水簇促进复性

①对蛋白结构和序列的分析可以确定出在蛋白中可能引起分子间相互作用的疏水簇,能够改变或破坏这种疏水簇的突变,可能会减少聚集,这种方法已经为 Plückthun 等所证实^[15,16],他们证明处于蛋白转角处和疏水簇处的突变在体外和体内可减少重组抗体片段的聚集。②用特异性结合疏水簇的单克隆抗体来封闭疏水簇,减少分子间结合引起的聚集。Katzav 等人的工作表明 Carboxypeptidase A 的聚集可通过应用特异的单克隆抗体来防止^[17]。

4.3 凝胶过滤层析复性

为了减少高浓度下的聚集反应,凝胶过滤层析技术也被用来进行蛋白的体外复性,Batas B 等使用 Sephacryl S-100 (HR)作为凝胶介质,在 80 mg/mL 起始浓度下将 Hen egg white lysozyme (HEWL)和 Bovine carbonic anhydrase (CAB)进行柱上复性,回收率分别为 63% (比活 104%)和 56% (比活 81%)^[18]。层析介质的隔离作用,降低了蛋白之间相互作用产生的聚集,使复性浓度、复性率都得到很大的提高。同时,蛋白经过凝胶过滤层析本身也可得到一定的纯化。

4.4 通过形成融合蛋白促进复性

重组蛋白与亲水的并且易折叠的蛋白形成融合蛋白后有助于提高复性率。Sachdev D 等人用大肠杆菌的 Maltose-binding protein (MBP)和 Thioredoxin (trx)分别与哺乳动物的 Procathepsin D 和 Pepsinogen 形成融合蛋白,在大肠杆菌中表达仍形成包涵体形式,但是复性后可溶的融合蛋白量大大提高。由于 MBP 和 Thioredoxin 可有效地复性,当融合蛋白在体外复性时,它们可能会首先复性,融合蛋白中的高可溶成分的出现目的蛋白缓慢复性的过程中可阻止蛋白聚集的发生^[19]。除了完整的蛋白,小的亲水肽和重组蛋白融合,也可减少聚集形成。Human granulocyte colony-stimulating factor

(hG-CSF)与不同的短肽形成的融合蛋白的体外复性率与融合的短肽的亲水性正相关^[20]。

4.5 固定化复性

使变性蛋白结合到一个固相载体上复性可以提高复性率。例如,通过 N 端或 C 端融合的 6 个 Arg,变性的 α -glucosidase 融合蛋白可结合到具有多聚阴离子基团的固相支持物 (Heparin-Sepharose[®])上,去除变性剂后,结合在固相支持物上的蛋白由于减少了聚集而提高了复性率^[21]。6 个组氨酸的组氨酸簇在融合蛋白中占有独有的位置。融合蛋白通过组氨酸簇与金属亲和介质结合后可实现固定化复性,提高复性率。Zouhar 等应用迭代复性机理使结合在 Ni-NTA resin 上的 (His)₆Zm-p60.r 成功复性^[22]。该方法可实现蛋白的同时纯化及复性。

4.6 小分子添加剂促进的复性

降低蛋白聚集的一个简单有效的策略是用一些小分子的添加剂。一系列的添加剂都已证明可阻止蛋白聚集。它们可能的作用为:①稳定蛋白的活性状态,②降低非正确折叠分子的稳定性,③增加折叠中间体的稳定性,④增加解折叠状态的稳定性。总之,添加剂并不加快折叠速率,只是抑制了副反应聚集的发生。已证明可提高复性率的添加剂如表 2 所示。表面活性剂和去垢剂已被证明是很好的折叠促进者,尤其对含有二硫键的蛋白。但表面活性剂和去垢剂具有结合蛋白和形成微束的能力而不易去除。L-Arg 是最常用的添加剂。在 Human-PA^[23]或其截短形式^[24]的体外复性中,0.5 mol/L L-Arg 的存在使复性率大大提高,其促进作用在抗体 F_{ab} 片段、单链免疫毒素、单链抗体等蛋白的复性中得到了很好的验证。

NDSBs (Non-detergent sulphobetaines)是近年来出现的可促进蛋白复性的新家族。NDSBs 由一个亲水的硫代甜菜碱及一个短的疏水基团组成,故不属于去垢剂,不会形成微束,易于透析去除。推测 NDSBs 上的短的疏水基团与蛋白的疏水区域相互作用而抑制了蛋白聚集^[25]。目前,常用的有 NDSB-195 (Dimethylethylammonium propane sulfonate), NDSB-201 [3-(1-pyridino)-1-propane sulfonate], NDSB-256 (Dimethylethylammoniumpropane sulfonate)。

4.7 分子伴侣或折叠酶促进的复性

应用分子伴侣和折叠酶在体外帮助蛋白复性也可以提高复性率。但复性后分子伴侣和折叠酶的分离是比较繁琐的步骤,若分离出的分子伴侣和折叠酶不能重复使用必将增加成本。Altamirano M M 等人设计了一个实用的方法来解决该问题。用固定化的微小分子伴侣来提高几种变性蛋白的复性率,这种微小分子伴侣由 GroEL 的片段固定在层析介质上构成,从而解决了将分子伴侣从复性的蛋白中去除的难题且该介质可以反复使用。他们应用该介质对几种变性蛋白和久贮失活的酶进行了成功的复性层析^[26]。不过,该介质只适用于 GroEL 的作用底物。

4.8 人工分子伴侣促进的复性

模拟 GroEL-GroES 在体内的作用模式,Aozema 和 Cellman

表 2 可提高蛋白质复性率的添加剂举例

Table 2 Examples of additive shown to promote renaturation yield

Additive	Protein	Reference
Non-denaturing concentrations of chaotropic agents		
GdmCl	<i>P. fluorescens</i> lipase	[29]
	Hen egg-white lysozyme	[12]
	Carbonic anhydrase II	[30]
	Interferon- β -polypeptides	[39]
Urea	Porcine growth hormone	[31]
	Hen egg-white lysozyme	[32]
	IGF-1	[40]
	Interferon- β -polypeptides	[39]
L-arginine	<i>P. fluorescens</i> lipase	[29]
	Fab fragments	[33]
	Hen egg-white lysozyme	[12]
Salts	α -glucosidase	[21]
	Ammonium sulphate	Hen egg-white lysozyme [32]
	Sugars	
Glycerol	<i>P. fluorescens</i> lipase	[29]
	Hen egg-white lysozyme	[32]
Sucrose	IGF-1	[40]
	IGF-1	[40]
Glucose	Hen egg-white lysozyme	[32]
	N-acetyl glucosamine	Hen egg-white lysozyme [32]
Sarcosine	Hen egg-white lysozyme	[32]
Detergent and surfactants		
Chaps	TGF- β -like proteins	[41]
	Carbonic anhydrase II	[30]
Tween	Human growth hormone	[34]
SDS	Interferon- β -polypeptides	[39]
Sarkosyl	RNA polymerase q factor	[35]
Sodium laurylsarcosine	Single chain Fv fragment	[36]
Dodecyl maltoside	Class II MHC	[37]
Triton X-100	Carbonic anhydrase II	[30]
Polyethylene glycol	Carbonic anhydrase II	[30]
Octaethylene glycol monolauryl	Carbonic anhydrase II	[30]
	Phospholipids	
Sulphobetaines	Hen egg-white lysozyme	[38]
	TGF- β -like proteins	[41]
Short chain alcohols	Hen egg-white lysozyme	[25]
	β -D-galactosidase	[25]
n-pentanol	Carbonic anhydrase II	[30]
	n-hexanol	Carbonic anhydrase II [30]
	cyclohexanol	Carbonic anhydrase II [30]

发展了一种复性方法,称为“人工分子伴侣促进的复性”(Artificial chaperone-assisted refolding)。其步骤为:首先,变性蛋白被复性液中的去垢剂所捕获,形成蛋白-去垢剂复合物,复合物的形成抑制了蛋白的聚集,然后,加入环糊精从复合物中剥去去垢剂,促使蛋白的重折叠。CAB 和 lysozyme 用该方法在高蛋白浓度下获得高的复性率^[27,28]。

5 结 论

蛋白的体外复性曾被认为是一项异常艰巨的任务。今

天,对蛋白折叠和它的副反应机理的了解,使得设计复杂蛋白的复性过程成为可能。然而,不同蛋白的复性过程不同,特异的复性环境,包括缓冲液的组成、蛋白浓度、温度、pH 等应根据蛋白的不同而异。科研、医疗和工业生产中,都需要大量的蛋白,用大肠杆菌体系表达重组蛋白,以及一个高效的复性程序,对满足这些需要提供了一条有效的途径。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler H-H *et al.* Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Bio/Technology*, 1991, 9:825 ~ 829
- [2] Derman A I, Prinz W, Belin D *et al.* Mutations that allow disulfide bond formation in the cytosol of *Escherichia coli*. *Science*, 1993, 262: 1744 ~ 1747
- [3] Misawa S, Kumagai I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers*, 1999, 51: 297 ~ 307
- [4] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, 9:497 ~ 501
- [5] Babbitt P C, West B L, Buechter D D *et al.* Removal of a proteolytic activity associated with aggregates formed from expression of creatine kinase in *Escherichia coli* leads to improved recovery of active enzyme. *Bio/Technology*, 1990, 8:945 ~ 949
- [6] White C B, Chen Q, Kenyon G L *et al.* A novel activity of Omp T. *J Biol Chem*, 1995, 270:12990 ~ 12994
- [7] Khan R H, AppaRao K B C, Eshwari A N S *et al.* Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *E. coli*. *Biotechnol Prog*, 1998, 14:722 ~ 728
- [8] Patra A K, Mukhopadhyay R, Mukhija R *et al.* Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2000, 18: 182 ~ 192
- [9] Sunitha K, Chung B H, Jang K-H *et al.* Refolding and purification of *Zymomonas mobilis* levansucrase produced as inclusion bodies in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2000, 18:338 ~ 393
- [10] Kiefer H, Maier K, Vogel R. Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans*, 1999, 27(6):903 ~ 911
- [11] Simmons T, Newhous Y M, Arnold K S *et al.* Human low density lipoprotein receptor fragment successful refolding of a functionally active ligand-binding domain produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1997, 272(41):25531 ~ 25536
- [12] Hevehan D L, Clark E D B. Oxidative renaturation of lysozyme at high concentration. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 54:221 ~ 230
- [13] Xie Y, Wetlaufer D b. Control of aggregation in protein folding; the temperature-leap tactic. *Protein Sci*, 1996, 5:517 ~ 523
- [14] Maeda Y, Ueda T, Imoto T. Effective renaturation of denatured and reduced immunoglobulin G *In vitro* without assistance of chaperone. *Protein Eng*, 1996, 9:95 ~ 100
- [15] Knappik A, Plückthun A. Engineered turns of a recombinant antibody improve its *in vivo* folding. *Protein Eng*, 1995, 8:81 ~ 89
- [16] Nieba L, Honegger A, Krebber C *et al.* Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved *in vivo* folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng*, 1997, 10:435 ~ 444
- [17] Katzav-Gozansky T, Hanan E, Solomon B. Effect of monoclonal anti-

- bodies in preventing carboxypeptidase A aggregation. *Biotechnol Appl Biochem*, 1996, 23:227 ~ 230
- [18] Batas B, Chaudhuri J B. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 50(1): 16 ~ 23
- [19] Sachdev D, Chirgwin J M. Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin. *Protein Expr Purif*, 1998, 12:122 ~ 132
- [20] Ambrosius D, Dony C, Rudolph R. European Patent Application, 1992, 0500108
- [21] Stempfer G, H8 11-Neugebauer B, Rudolph R. Improved refolding of an immobilized fusion protein. *Nat Biotechnol*, 1996, 14:329 ~ 334
- [22] Zouhar J, Nanak E, Brzobohaty B. Expression, single-step purification, and matrix-assisted refolding of a maize cytokinin glucoside-specific beta-glucosidase. *Protein Expr Purif*, 1999, 17:153 ~ 162
- [23] Rudolph R. In *Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Research*. Tschesche H Ed, Walter de Gruyter: New York, 1990, pp. 149 ~ 172
- [24] Kohnert U, Rudolph R, Verheijen J H *et al*. Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022. *Protein Eng*, 1992, 5:93 ~ 100
- [25] Goldberg M E, Expert-Bezancon N, Vuillard I *et al*. Non-detergent sulphobetaines: a new class of molecules that facilitate in vitro protein renaturation. *Fold Des*, 1996, 1(1):21 ~ 27
- [26] Altamirano M, Golbik R, Zahn R *et al*. Folding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:3576 ~ 3578
- [27] Rozema D, Gellman S H. Artificial Chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry*, 1996, 35:15760 ~ 15771
- [28] Rozema D, Gellman S H. Artificial Chaperone-assisted refolding of carbonic anhydrase B. *J Biol Chem*, 1996, 271:3478 ~ 3487
- [29] Ahn J H, Lee Y P, Rhee J S. Investigation of refolding condition for *Pseudomonas fluorescens* lipase by response surface methodology. *J Biotechnol*, 1997, 54:151 ~ 160
- [30] Wetlaufer D B, Xie Y. Control of aggregation in protein refolding: a variety of surfactants promote renaturation of carbonic anhydrase II. *Protein Sci*, 1995, 4:1535 ~ 1543
- [31] Cardamone M, Puri N K, Brandon M R. Comparing the refolding and reoxidation of recombinant porcine growth hormone from a urea denatured state and from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biochemistry*, 1995, 34:5773 ~ 5794
- [32] Maeda Y, Yamada H, Ueda T *et al*. Effect of additives on the renaturation of reduced lysozyme in the presence of 4M urea. *Protein Eng*, 1996, 9:461 ~ 465
- [33] Buchner J, Rudolph R. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol*, 1991, 9:157 ~ 162
- [34] Ban N B, Cleland J L, Randolph T W. Molten globule intermediate of recombinant human growth hormone: stabilization with surfactants. *Biotechnol Prog*, 1996, 12:801 ~ 809
- [35] Burgess R R. Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl. *Methods Enzymol*, 1996, 273:145 ~ 149
- [36] Kurucz I, Titus J A, Jost C A *et al*. Correct disulphide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies. *Mol Immunol*, 1995, 12:1443 ~ 1452
- [37] Stöckel J, Döring K, Jähnig F *et al*. Pathway of detergent-mediated and peptide ligand-mediated refolding of heterodimer class II major histocompatibility complex(MHC) molecules. *Eur J Biochem*, 1997, 248:684 ~ 691
- [38] Maachupalli-Reddy J, Kelley B D, De Bernardes Clark E. Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg white lysozyme. *Biotechnol Prog*, 1997, 13:144 ~ 150
- [39] Dorin G, McAlary P, Wong K. Bacterial production of hydrophobic polypeptides. *World (WO) Patent*, 1996, 96/39523
- [40] Builder S, Hart R, Lester P *et al*. Refolding of misfolded insulin-like growth factor-I. *US Patent*, 1997, 5 663 304
- [41] Cerletti N, McMaster GK, Cox D *et al*. Process for refolding recombinantly produced TGF- β -like proteins. *US Patent*, 1997, 5 650 494

Advances in *in vitro* Refolding of Inclusion Body Proteins

FANG Min HUANG Hua-Liang*

(Institute of Genetics, Chinese Academy of sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Overexpression of recombinant proteins in *E. coli* often results in formation of insoluble, inactive inclusion bodies. These inclusion bodies, which contain the recombinant proteins in a highly enriched form, can be isolated by solid/liquid separation. After solubilization, active proteins can be generated through an appropriate refolding process. Within the last decade, specific strategies and methods have been developed for preparing active recombinant proteins from inclusion bodies. Recent developments in renaturation procedure include the inhibition of aggregation during refolding by the application of low molecular weight additives and matrix-bound renaturation techniques.

Key words recombination protein, inclusion body, refolding, renaturation, disulfide bond formation

Received: April 13, 2001

This work was supported by grant from National 863 Program(863-102-09-04-01).

* Corresponding author. Tel:86-10-64889350; Fax:86-10-64857285; E-mail:hlhuang@genetics.ac.cn