

蛋白质二硫键异构酶相关蛋白 A 的表达及性质的研究

周海平 贾翠娟 张渝英*

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘 要 克隆了 *Aspergillus niger* T21 中的蛋白质二硫键异构酶相关蛋白 A (PRPA) 基因,并将它插入 pET23b 表达载体。在 *E. coli* 中表达时,PRPA 占菌体总蛋白的 34%。经过超声破细胞、硫酸铵分级沉淀和离子交换层析获得了纯度大于 90% 的重组蛋白。PRPA 有二硫键异构酶活性。在 PRPA 存在下,变性和还原的溶菌酶复性率和复性速度降低,电泳结果表明溶菌酶聚集增多。荧光结果表明 PRPA 表面有较多的疏水基团。

关键词 蛋白质二硫键异构酶相关蛋白 A 抗分子伴侣 蛋白质重折叠

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0595-06

外源蛋白质基因在 *E. coli* 中的大量表达常常会产生包涵体,包涵体中的蛋白质是没有生物活性的,需要经过重折叠才能成为有活性的蛋白质。蛋白质折叠一直是生物学研究热点之一,蛋白质序列中决定蛋白质折叠状态的信息被称为第二密码。在细胞内,由于蛋白质浓度很高,蛋白质折叠需要有折叠因子即折叠酶和分子伴侣(foldase and chaperone)的帮助,折叠酶和分子伴侣在体外同样也能提高变性蛋白质的复性率^[1]。蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)是折叠酶中的一种,它是一种多功能的蛋白质,能催化二硫键形成,具有分子伴侣活性,并且是脯氨酰 4-羟化酶和微粒体甘油三酸酯转运蛋白的组成部分^[2],PDI 是目前发现帮助蛋白质折叠活性最高的蛋白质^[3]。PRPA(PDI-related protein A)是一种 PDI 相关蛋白,它的基因由 Wang^[4]从 *Aspergillus niger* var. *awamori* 中分离出来的,其分子量为 50kD,在它的 N-端有一个硫氧还蛋白的活性中心。PRPA 的 C 端有一 HEDL 序列,表明它是一膜结合蛋白质。Wang 的文章是目前唯一的关于 PRPA 的研究文章,对它的生物学功能的研究有待深入。

本研究从 *Aspergillus niger* T21 中克隆了 PRPA 的基因,并在大肠杆菌中进行了高效表达,纯化了重组 PRPA 蛋白质,对 PRPA 的性质进行了初步研究,为进一步研究 PRPA 的性质及生物学功能打下了基

础。

1 材料和方法

1.1 材料

Aspergillus niger T21 由中科院微生物所唐国敏教授惠赠,人蛋白质二硫键异构酶(hPDI)的表达质粒 pBV220-*hpdi* 由首都师范大学高音博士惠赠。DH5 α 、BL21(DE3)和 pET23b 均由本实验室保存。试剂主要来自 Promega、Sigma、NEB、Sangon、Amersham、Bio-Rad 及国产分析纯试剂。根据文献[4]设计 *prpA* 引物(由上海生工公司合成)。P1: 5'-ga,tat,cat,atg,ctg,cag,ccc,ag-3'; P2: 5'-aag,ctt,taa,aca,cct,gtg,cta,ata,aac-3'。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 法合成 *Aspergillus niger* T21 的 *prpA* cDNA 用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取 *Aspergillus niger* T21 的总 mRNA^[5]。以 oligo(dT)₁₈ 为引物,通过反转录合成 cDNA 的第一条链。然后用 P1 和 P2 为引物经 PCR 得到 1.4kb 的片段。PCR 条件为:95 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 1min,52 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1.5min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 8min。回收 PCR 产物与 pGEM-Teasy 相连,得到 pGEM-Teasy-*prpA*,进行测序。

1.2.2 表达载体的构建:用 *Nde* I 酶切 pGEM-Teasy-*prpA* 得到 *prpA* 基因插入到 pET23b/*Nde* I 中,

收稿日期 2003-12-12,修回日期 2004-03-19。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.3997003)。

* 通讯作者。Tel:86-10-62626769;E-mail:zhangy@sun.im.ac.cn

选出正向插入的克隆。将 pET23b-*prpA* 质粒转化 BL21(DE3)。

1.2.3 PRPA 的表达和纯化 :重组蛋白质的表达按照 Novagen 公司的操作手册进行。离心收集菌体 (以下各步均在 4℃ 进行),用 1/10 体积的 TE (pH7.5)悬浮菌体进行超声破碎,10 000r/min,40min 离心。上清液中加固体硫酸铵达 45% 饱和度沉淀蛋白。将离心所得的沉淀用 buffer A(20mmol/L PBS, pH7.0)溶解,并对 buffer A 透析。10 000r/min,40min 离心后,上清液在预先用 buffer A 平衡好的 Bio-Rex 70 上进行柱层析。用含 0.25mol/L NaCl 的 buffer A 洗至 A_{280} 无吸收,再用含 0.25 ~ 0.65mol/L NaCl 的 buffer A 梯度洗脱,SDS-PAGE 分析各组分。收集所需的部分,对不同的缓冲液透析,并超滤浓缩。

1.2.4 hPDI 的纯化 :参照文献 [6]。

1.2.5 二硫键异构酶活性的测定 :二硫键异构酶活性按 Lambert 方法^[7],略有改动。200 μ L 反应体系中含有 50mmol/L Tris-HCl(pH7.5),250 μ mol/L EDTA,25mmol/L KCl,5mmol/L MgCl₂,20 μ mol/L DTT,1.2 μ g S-RNA,80 μ g RNA,加入适量样品,30℃ 反应一定时间,加入 20 μ L 终止液(0.75% 醋酸双氧铀,25% 高氯酸)。冰浴 15min 后,10 000r/min 离心 10min,取上清测 A_{260} 。

1.2.6 溶菌酶的变性、复性 :溶菌酶的变性、复性参照 Gilbert 方法^[8]进行,其中变性方法完全相同,复性方法有所改动。将变性的溶菌酶加到含有不同浓度的蛋白质(PRPA、BSA 和 hPDI)的复性溶液中。复性溶液为 100mmol/L HEPES buffer(pH7.0),5mmol/L MgCl₂,20mmol/L NaCl,2mmol/L EDTA 或 100mmol/L PBS(pH7.5),2mmol/L EDTA。如无特殊说明复性液中含有 2mmol/L GSH,1mmol/L GSSG。复性时溶菌酶的最终浓度为 5 μ mol/L,复性温度为 37℃,时间为 1h。以相同量的天然溶菌酶活性为 100%,溶菌酶测活方法参照文献 [9]。

1.2.7 荧光分析 :蛋白质内源荧光用 295nm 激发,而加 ANS 后用 380nm 激发。荧光测定时蛋白质浓度均为 2 μ mol/L,缓冲液为 100mmol/L HEPES buffer(pH7.0),5mmol/L MgCl₂,20mmol/L NaCl 和 2mmol/L EDTA。ANS 的终浓度为 300 μ mol/L。

2 结果

2.1 PRPA cDNA 的克隆及表达质粒的构建

RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见一条

约 1400bp 的条带。回收 PCR 产物与 pGEM-T easy Vector 连接,转化 DH5 α 。经测序表明与文献 [4] 报道的 *prpA* 基因仅有 4 个碱基不同,但不影响氨基酸的编码。pET23b-*prpA* 构建过程见图 1。

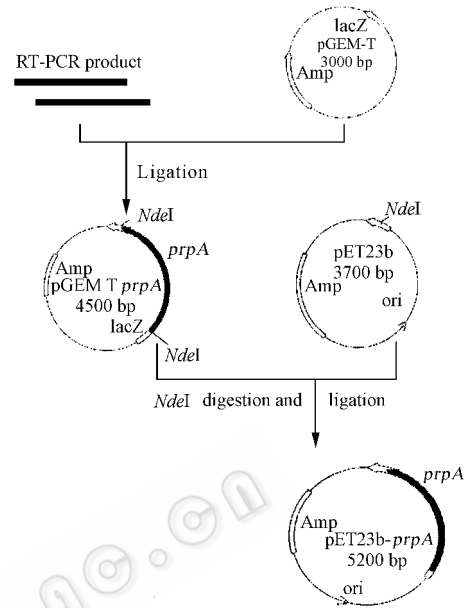


图 1 pET23b-*prpA* 构建流程图

Fig. 1 Construction of plasmid pET23b-*prpA*

2.2 PRPA 的纯化

pET23b-*prpA* 在 BL21(DE3)中表达时,PRPA 占菌体总蛋白的 34% 左右,PRPA 各步纯化的电泳结果如图 2 所示。纯化得到的重组 PRPA 在 SDS-PAGE 上呈均一条带,纯度在 90% 以上。

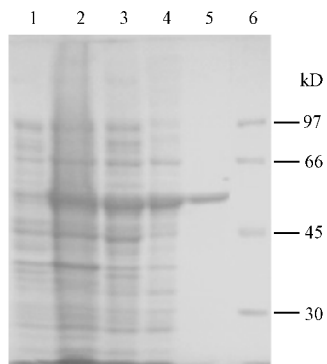


图 2 PRPA 纯化的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE analysis during the purification of PRPA

1 : total cell protein without induction ; 2 : total cell protein after 3h induction ; 3 : crude extract ; 4 : 0% ~ 45% (NH₄)₂SO₄ fraction ; 5 : after Bio-Rex 70 column ; 6 : molecular weight marker

2.3 PRPA 的二硫键异构酶的活性

PRPA 的二硫键异构酶活性的测定见图 3。其中 PRPA 的浓度为 2.3 μ mol/L, hPDI 的浓度为

0.0124 μ mol/L。经计算 PRPA 的二硫键异构酶活性大约为相同摩尔 hPDI 的 1/250。

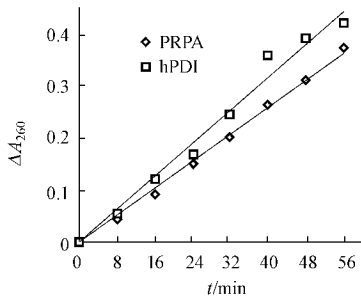


图3 PRPA 和 hPDI 的二硫键异构酶活性的比较

Fig.3 Disulfide isomerase activities of PRPA and PDI

The concentration of PRPA is 2.3 μ mol/L and the concentration of hPDI is 0.0124 μ mol/L

2.4 PRPA 存在下溶菌酶复性情况

还原变性的溶菌酶(终浓度为 5 μ mol/L)在含 2mmol/L GSH, 1mmol/L GSSG 的 100mmol/L HEPES buffer (pH7.0), 5mmol/L MgCl₂, 20mmol/L NaCl 和 2mmol/L EDTA 溶液中复性时,不同蛋白质对溶菌酶的复性影响如图 4 所示。随着 PRPA 的浓度的增加,溶菌酶的复性率降低,PRPA 一直呈抗分子伴侣活性。而 [hPDI] \leq 0.5 μ mol/L 时,hPDI 呈抗分子伴侣活性,但当 [hPDI] > 0.5 μ mol/L 时,hPDI 呈分子伴侣活性,这与文献 8 报道的 PDI 相一致。

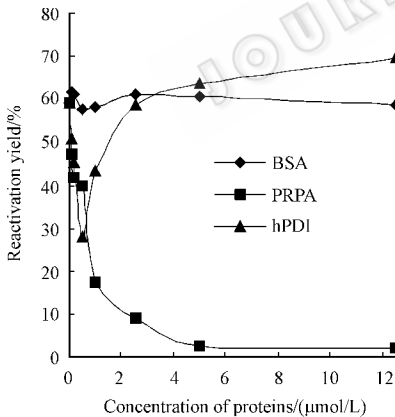


图4 在氧化还原的 HEPES 溶液中不同蛋白质对溶菌酶的复性的影响

Fig. 4 The effects of the different proteins on the refolding of lysozyme in redox HEPES buffer

Denatured and reduced lysozyme (5 μ mol/L final concentration) was added to 100mmol/L HEPES (pH7.0), 5mmol/L MgCl₂, 20mmol/L NaCl and 2mmol/L EDTA containing 2mmol/L GSH, 1mmol/L GSSG and various concentrations of different proteins to proceed refolding at 37 $^{\circ}$ C for 1h. The reactivation yield of lysozyme (%) was based on the activity of the same amount of native lysozyme measured under the same condition

Goldberg^[10]报道溶菌酶复性时形成的聚集体主要是由于二硫键交联形成的,进不了非还原的 SDS-PAGE 胶,因而还原与非还原 SDS-PAGE 胶中溶菌酶的差值被认为是聚集的溶菌酶。由图 5B 知在还原 SDS-PAGE 中,各种情况下溶菌酶的条带的量近乎相等,而在非还原的 SDS-PAGE 胶中(图 5A),随着 PRPA 的浓度增高,溶菌酶的量减少(图 5A 通道 5-7),也就是说溶菌酶聚集逐渐增多。在低浓度 hPDI 存在时,溶菌酶的量少(图 5A 通道 2),随着 hPDI 浓度增高,溶菌酶的量增加(图 5A 通道 3 和 4)。这表明 hPDI 浓度较低时溶菌酶聚集较多,随着 hPDI 浓度的增加,溶菌酶聚集逐渐减少。不同浓度的 BSA 存在时,溶菌酶条带的量几乎相等,说明了 BSA 对溶菌酶的聚集影响不大。以上说明了 PRPA 和 hPDI 对溶菌酶的聚集影响是特异性的。

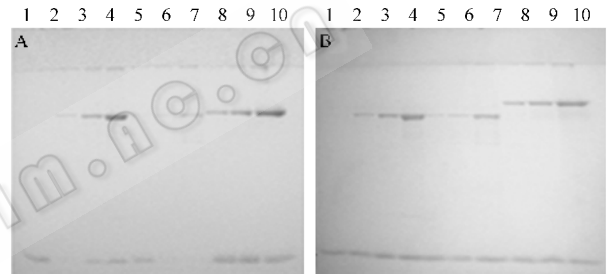


图5 不同蛋白质对溶菌酶聚集体形成的影响

Fig. 5 The effects of different proteins at indicated concentrations on lysozyme aggregation

The conditions for refolding of lysozyme were as describe in Fig. 4. After completion of folding reaction, samples were withdrawn and treated with SDS buffer without β -mercaptoethanol (panel A) or with β -mercaptoethanol (panel B).

1 : lysozyme 2 : lysozyme + 0.5 μ mol/L hPDI ; 3 : lysozyme + 1 μ mol/L hPDI ; 4 : lysozyme + 2.5 μ mol/L hPDI 5 : lysozyme + 0.5 μ mol/L PRPA 6 : lysozyme + 1 μ mol/L PRPA 7 : lysozyme + 2.5 μ mol/L PRPA ; 8 : lysozyme + 0.5 μ mol/L BSA ; 9 : lysozyme + 1 μ mol/L BSA ; 10 : lysozyme + 2.5 μ mol/L BSA

在氧化还原的 HEPES buffer 溶液中,溶菌酶的自复性及在 0.5 μ mol/L PRPA 存在下复性的动力学曲线如图 6 所示。由图 6 可知自复性的 $t_{1/2}$ = 13.3min,而在 0.5 μ mol/L PRPA 存在下 $t_{1/2}$ = 24.0min,可见 PRPA 不仅降低溶菌酶的复性率,而且降低溶菌酶的复性速度。

Song 报道^[11]在 100mmol/L PBS (pH7.5), 2mmol/L EDTA 溶液中,牛 PDI 对还原、变性的溶菌酶复性只起分子伴侣活性而不表现抗分子伴侣活性。PRPA 对还原、变性的溶菌酶在 100mmol/L PBS (pH 7.5), 2mmol/L EDTA 溶液中复性影响如图 7 所示。在 PBS

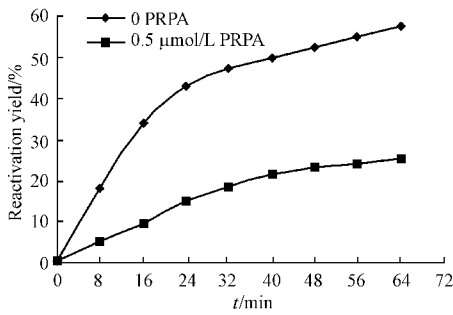


图6 在氧化还原的 HEPES 溶液中溶菌酶复性动力学曲线

Fig.6 The effect of PRPA on kinetics of the refolding of lysozyme

The conditions for refolding of lysozyme were as describe in Fig. 4

溶液中,溶菌酶的自复性率约为 10%(图 7),远低于在 HEPES 溶液中的 60%(图 4),但 hPDI 在 PBS 溶液中对溶菌酶没有抗分子伴侣作用,这与文献 11 报道的牛 PDI 对溶菌酶复性影响是一致的,而 PRPA 在 PBS 溶液中仍呈抗分子伴侣活性。

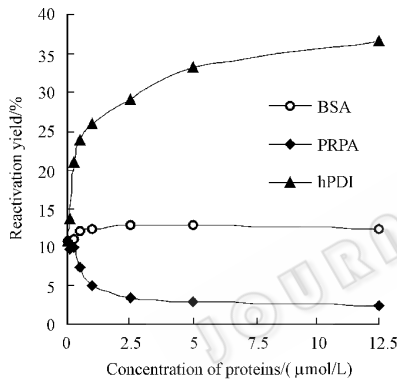


图7 在氧化还原的 PBS 溶液中不同蛋白质对溶菌酶的复性的影响

Fig.7 The effects of different proteins on the refolding of lysozyme in redox PBS buffer

Denatured lysozyme ($5\mu\text{mol/L}$ final concentration) was added to 100mmol/L PBS ($\text{pH}7.5$), 2mmol/L EDTA containing 2mmol/L GSH, 1mmol/L GSSG and various concentrations of different proteins to proceed refolding at 37°C for 1h. The reactivation yield of lysozyme (%) was based on the activity of the same amount of native lysozyme measured under the same condition

在非氧化还原的 HEPES 溶液中,溶菌酶自复性率很低,在 37°C 保温 4h 后,溶菌酶的自复性率只有 13% 左右,PRPA 仍呈抗分子伴侣活性(图 8)。hPDI 在低浓度时为抗分子伴侣活性而高浓度时起分子伴侣活性。在氧化还原和非氧化还原的 HEPES 溶液中,PRPA 及 hPDI 对溶菌酶复性影响的趋势是相似的(图 4 和图 8)。

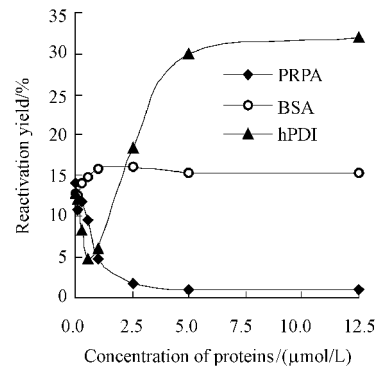


图8 在非氧化还原条件的 HEPES 溶液中不同蛋白度对溶菌酶复性的影响

Fig.8 The effects of different proteins on the refolding of lysozyme in non-redox HEPES buffer

The conditions for refolding of lysozyme were as describe in Fig. 4 except the refolding system without GSH and GSSG, the reaction time was 4h.

The reactivation yield of lysozyme (%) was based on the activity of the same amount of native lysozyme measured under the same condition

2.5 荧光分析结果

PRPA 内源荧光强度较 hPDI 要低(图 9A),但与 ANS 反应后 PRPA 的荧光强度比 hPDI 要高(图 9B),这表明了 PRPA 的表面疏水基团较 hPDI 的要多。

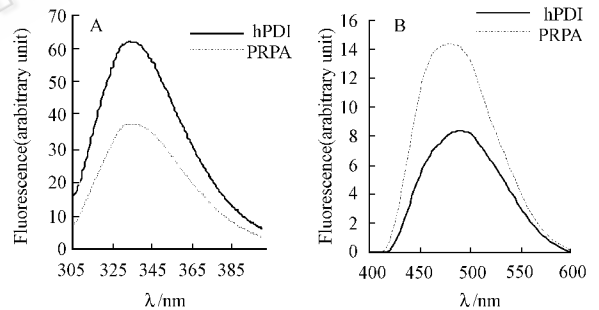


图9 PRPA 和 PDI 荧光图谱(A.内源荧光图谱; B. ANS 荧光图谱)

Fig. 9 Fluorescence spectra of PRPA and hPDI

A: intrinsic fluorescence spectra of $2\mu\text{mol/L}$ PRPA and $2\mu\text{mol/L}$ hPDI independently. The spectra were measured with the excitation at 295nm .

B: ANS ($300\mu\text{mol/L}$ final concentration) fluorescence spectra of $2\mu\text{mol/L}$ PRPA and $2\mu\text{mol/L}$ hPDI independently. The spectra were measured with the excitation at 380nm

3 讨论

本文报道了 PRPA 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达,并对纯化的 PRPA 的性质进行了初步研究。PRPA 有一个硫氧还蛋白结构域,但与大部分硫氧还蛋白活性位点 WCGHCK 不同^[12],PRPA 为 WCGHCQ。PRPA 的还原酶活性很低(结果未显示),它的二硫键异构酶活性只有 hPDI 的 1/250 左右。这可

能是由于 PRPA 只有一个硫氧还蛋白活性位点,另外可能是在 PRPA 的硫氧还蛋白活性位点中的一个中性氨基酸(Q)取代了一个碱性氨基酸(K)以及活性中心附近的氨基酸不同导致 PRPA 的硫氧还蛋白活性位点的空间结构发生改变,从而影响 PRPA 二硫键异构酶和还原酶的活性。PRPA 的二硫键异构酶的活性对真菌的 PDI 而言可能是比较低的,这表明 PRPA 在细胞中二硫键异构酶活性可能不是它的主要功能。

Wang^[4]在黑曲霉中将 PRPA 与前葡萄糖淀粉酶原催化结构域-凝乳酶原融合共表达时表明:过量表达 PRPA 对凝乳酶的分泌影响很小。这说明 PRPA 在胞内可能不是直接帮助蛋白质分泌。本实验室将在不同表达质粒中的牛凝乳酶原基因和 PRPA 基因转入同一宿主进行共表达时,结果发现过量表达 PRPA 使部分凝乳酶原以可溶的形式存在于细胞中(结果未显示),但这种可溶性的凝乳酶原却不能活化,表明它还不是凝乳酶原的正确折叠形式。由于体外折叠环境相对简单,溶菌酶又是研究蛋白质折叠常用的“模式”蛋白质,本文研究了 PRPA 在不同条件下对溶菌酶折叠的影响。

在本文研究的条件下,BSA 对溶菌酶的复性率影响很小,而 hPDI 在不同条件下对溶菌酶起分子伴侣或抗分子伴侣活性,而 PRPA 则在不同缓冲液及氧化还原或非氧化还原条件下均呈抗分子伴侣活性(图 4、7 和 8)。说明 PRPA 在溶菌酶复性过程中起抗分子伴侣活性是特异性的。在某种情况下,细胞内有些外源或有毒性的蛋白质的过量表达会影响细胞的生存,细胞需要某种机制来促使这些蛋白质聚集,从而降低它们的毒性^[13](例如 GroEL 能帮助 VP1LAC 形成包涵体^[14])。又由于某种原因,大量的蛋白质聚集并滞留在内质网膜上,细胞通过某种机制来滞留这些蛋白质,譬如结合蛋白(binding protein, BiP)和 PDI 就可能参与这一过程,这是伴侣蛋白表现帮助蛋白质聚集,也就是表现所谓的抗分子伴侣活性^[7,15]。从某种意义上讲抗分子伴侣活性是分子伴侣活性的另一种表现形式。体外实验表明了 PRPA 可以降低去折叠的溶菌酶复性率(图 4、7 和 8)和在一定范围内增加溶菌酶的聚集,PRPA 的这些特性表明了它有可能在胞内参与上述两个反应过程。

蛋白质错误折叠原因之一是折叠的多肽链之间疏水面发生错误的相互作用,并因此形成不规则的蛋白质聚集体,从而阻止蛋白质正确折叠^[16]。荧光

分析结果可知 PRPA 表面疏水基团较多(图 9),因此 PRPA 有可能通过疏水区与去折叠的溶菌酶疏水区相互作用,从而阻止去折叠的溶菌酶复性,使溶菌酶的复性率降低。本研究只对 PRPA 的结构和功能进行了初步的研究,PRPA 在体外降低溶菌酶复性率和帮助溶菌酶聚集的机制以及在细胞内的作用仍需要进一步研究。

致谢:感谢本所唐国敏教授惠赠 *Aspergillus niger* T21 菌种和首都师范大学高音博士惠赠 pBV221-hPDI 质粒。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. Molecular chaperone, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1997, **66**(1): 197 - 237
- [2] Lumb RA, Balleid NJ. Is protein disulfide isomerase a redox-dependent molecular chaperone? *The EMBO Journal*, 2002, **21**(24): 6763 - 6770
- [3] Primm TP, Walker KW, Gilbert HF. Facilitated protein aggregation, effects of calcium on the chaperone and anti-chaperone activity of protein. *J Biol Chem*, 1996, **271**(52): 33664 - 33669
- [4] Wang H, Ward M. Molecular characterization of a PDI-related gene *prpA* in *Aspergillus niger* var. *Awamori*. *Current Genetics*, 2000, **37**(1): 57 - 64
- [5] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**(1): 156 - 159
- [6] Gao Y(高音), Yang ZW(杨志伟), Hua ZL(华振玲) et al. Cloning and expression of human protein disulfide isomerase cDNA in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1999, **15**(3): 349 - 354
- [7] Lambert N, Freedman B. Kinetics and specificity of homogenous protein disulfide-isomerase in protein disulfide isomerase and in thio-protein-disulphide oxide-reduction. *Biochem J*, 1983, **213**(1): 235 - 243
- [8] Puig A, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme. *J Biol Chem*, 1994, **269**(10): 7764 - 7771
- [9] Guo LX(郭良栋), Qian SX(钱世钧), Ye J(叶军) et al. Studies on the culture conditions of engineered strain of human lysozyme. *Acta Microbiol Sinica*(微生物学报), 1997, **38**(1): 53 - 57
- [10] Goldberg ME, Rudolph R, Jaenike R. A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry*, 1991, **30**(11): 2790 - 2797
- [11] Song J, Quan H, Wang C. Dependence of the anti-chaperone activity of protein disulfide isomerase on its chaperone activity. *Biochem J*, 1997, **328**(3): 841 - 846

- 290 26 – 50
- [13] Bucciantini M , Giannoni E , Chiti F *et al.* . Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases . *Nature* , 2002 , **416** 507 – 511
- [14] Carrió M , Villaverde A . Role of molecular chaperone in inclusion body formation . *FEBS lett* , 2003 , **537** (1) : 215 – 221
- [15] Puig A , Gilbert HF . Anti-chaperone behavior of BiP during the protein disulfide isomerase-catalyzed refolding of reduced and denatured lysozyme . *J Biol Chem* , 1994 , **269** (41) : 25889 – 25896
- [16] Hart FU , Manajit K , Hartl H . Molecular chaperones in the cytosol : from nascent chain to folded protein . *Sciences* , 2002 , **295** 352 – 358

Expression and Characterization of Protein Disulfide Isomerase-related Protein A

ZHOU Hai-Ping JIA Cui-Juan ZHANG Yu-Ying*

(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China*)

Abstract Protein disulfide isomerase-related protein A (PRPA) was highly expressed (about 34%) in *Escherichia coli* by inserting the whole PRPA cDNA into the vector pET23b . After expression , the purified protein was acquired through ammonium fractional precipitation and Bio-Rex 70 chromatography . PRPA shows low disulfide isomerase activity (only about 1/250 of that of hPDI) , decreases the reactivation yield of denatured and reduced lysozyme either in redox and non-redox Hepes buffer or redox PBS buffer and facilitates the aggregation of denatured and reduced lysozyme . Fluorescence spectra of PRPA indicate that PRPA has more hydrophobic groups at surface than that of hPDI , and which can be used to explain why PRPA has anti-chaperone activity during the refolding of denatured and reduced lysozyme .

Key words protein disulfide isomerase-related protein A , anti-chaperone , protein refolding

Received : 12-12-2003

This work was supported by Grant from Chinese National Natural Science Fund (No. 3997003) .

* Corresponding author . Tel : 86-10-62626769 ; E-mail : zhangyy@sun . im . ac . cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>