

二硫键异构酶的纯化及其对 重组蛋白体外折叠的影响

徐明波 孟文华 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 自牛肝中纯化了蛋白二硫键异构酶(PDI), 并对重组蛋白的酶促折叠过程进行了探讨。结果表明, 在等摩尔PDI的催化作用下, 可使1mg/ml的IL-2的正确折叠率提高到58%以上, 比活性由 4×10^6 u/mg增加到 8.2×10^6 u/mg, PDI还能部分纠正二硫键错配的IL-2异构体成为正确折叠的IL-2和防止IL-2通过Cys的链间交联形成聚集体。GM-CSF在PDI催化下也有类似的结果。PDI作用的关键是它所催化的巯基-二硫键的交换反应。

关键词 重组蛋白, 折叠, 二硫键异构酶

二硫键的形成是蛋白质生物合成中后加工的关键步骤之一。尽管蛋白质分子中的二硫键早已被人们所知, 但对二硫键在蛋白质生物合成中的形成机制却了解甚少^[1,2]。在体外, 二硫键的形成速度是很慢的, 即使是最适条件下, 达到反应平衡一半的时间也需要10—30分钟, 这样就提示体内二硫键的形成是一个酶促过程。这个酶促现象早在1963年即已发现, 1983年Lambert^[3]自牛肝中纯化了二硫键异构酶(Protein disulfide isomerase, PDI, EC. 5. 3. 4. 1), 并进行了理化性质和酶促反应特性的研究, 近10年来主要围绕其催化机理、活性部位和多功能性进行研究, 获得了一些有意义的结果, 从而为二硫键形成机理的研究揭开了新的一页。PDI是一个分子量为114kDa的同二聚体(单体分子量为57kDa), 在内质网中含量丰富, 提示它与分泌有关, 它催化反应的方向与蛋白质底物的特性和环境的氧化还原状态有关。PDI不决定蛋白的折叠途径, 但可以纠正不正确的二硫键从而提高蛋白质的正确折叠率^[4]。为了观察PDI对重组蛋白体外折叠的影响及其机理, 我们在分离纯化PDI及其性能鉴定的基础上, 对其催化的重组蛋白的折叠反应进行了较系统的研究。

1 材料与方 法

1.1 材料

新鲜牛肝购自北京大红门牛羊肉联合加工厂。CM-Sepharose CL-6B、Sephadex G-25和DEAE-Sepharose CL-6B FF为瑞典Pharmacia公司产品。Spherisorb RP C-18 (0.46 × 20cm)色谱柱, 进口填料, 中国科学院大连化学物理研究所色谱中心装填。凝胶排阻色谱柱Gel300SW (0.75 × 30cm)为Waters公司产品。

1.2 PDI的分离纯化和活性测定

根据已发表的PDI的分子特性并参照Lambert^[3]的方法, 主要由热沉淀、硫酸铵分级

沉淀、阳离子和阴离子交换层析等 4 步组成。活性测定采用 PDI 激活二硫键混乱的 RNA 酶的方法^[5]。

1.3 PDI 催化的重组蛋白折叠反应

将 Cu^{2+} 复性的重组人白细胞介素-2 加入 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 25mmol/L KCl, 5mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的缓冲液 (TKM 缓冲液)^[5] 中终浓度为 1mg/ml, 然后加入不同浓度的 PDI 和 10^{-5} mol/L DTT, 25℃ 作用 10 小时, 以 RP-HPLC 确定其正确折叠率并进行活性检测。然后取样进行凝胶排阻 HPLC 检测。

错配的 IL-2 自半制备 HPLC 收集后旋转蒸发去除乙腈加入 TKM 缓冲液中, 使错配 IL-2 的终浓度为 0.2mg/ml, 加入等摩尔即 0.76mg/ml PDI 和 10^{-5} mol/L DTT, 25℃ 作用 10 小时, 测定 IL-2 活性。

PDI 催化粒单集落刺激因子 (GM-CSF) 折叠实验条件是在 IL-2 实验基础上进行的, 即用尿素抽提的 GM-CSF 包涵体蛋白经 Sephacryl S-200 纯化后, 以 1mg/ml 的浓度加入 TKM 缓冲液中, 然后加入 4mg/ml PDI 和 10^{-5} mol/L DTT, 25℃ 作用 10 小时, 测定活性并以不加 PDI 作用的上述体系中的 GM-CSF 活性作对照, 凝胶排阻 HPLC 检测分子状态。

2 结 果

2.1 牛肝 PDI 的分离纯化与鉴定

图 1 是 PDI 纯化过程的电泳图谱, 第 1 条是硫酸铵沉淀后的样品, 第 2 条是 CM 柱纯化后的样品, 第 3、4 条是纯化的 PDI 纯品, 第 5、6 条是最后一步分离去除的白蛋白。

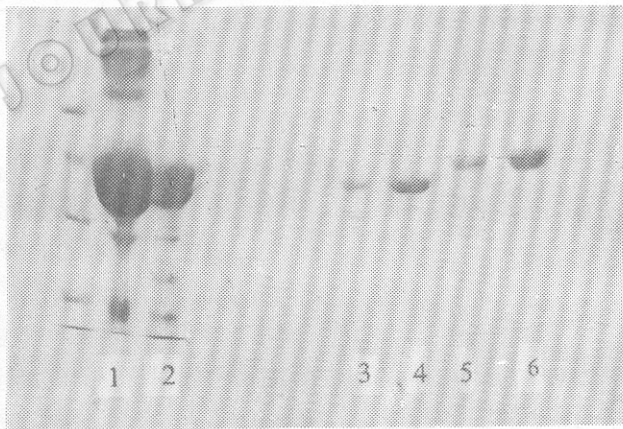


图 1 PDI 分离纯化的电泳图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of PDI during purification

(M, molecular markers from top are 94, 67, 45, 30kDa)

表 1 是自牛肝中分离 PDI 的结果, 500g 牛肝中可以分离到 120mg PDI 纯品。

PDI 在 SDS-PAGE 电泳上的分子量为 57kDa, 而在凝胶排阻 HPLC 上标定其分子量约为 110 kDa, 说明在近于天然条件下 PDI 的分子以同二聚体的形式存在。PDI 的等电点约为 4.1, 与文献报道的等电点接近。

表 1 牛肝 PDI 的分离纯化 (500 肝脏)

Table 1 Purification of PDI from bovine liver

	Protein (g)	PDI activity (units)	Specific activity (units/g)	Yield (%)
Homogenate	95	385	4.05	100
Heat-treatment Supernatant	15.6	310	19.9	80.5
55—85% satn- (NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	4.6	210	45.7	54.5
CM, pH5.4 eluate	0.8	140	175	36.4
DEAE, pH6.3 eluate	0.12	115	958	29.9

2.2 PDI 催化的重组蛋白的折叠

2.2.1 PDI 能明显增加重组蛋白的正确折叠率: 表 2 是不同浓度的 PDI 对 IL-2 比活性的影响 (IL-2 浓度为 1mg/ml), 随着 PDI 浓度的增加, IL-2 活性逐步提高。在约 4mg/ml 时达到峰值, 以后随着酶浓度的增高, 比活性又下降并接近于不加 PDI 的水平, PDI 达最高催化活性时其与底物的分子数之比为 1:1, 进一步的实验均在等摩尔浓度下完成。

表 2 不同浓度 PDI 25℃ 作用 10 小时对 rhIL-2 比活性的影响*

Table 2 Effects of different concentration of PDI (at 25℃ for 10h) on the specific activity of IL-2

PDI concentration (mg/ml)	Specific activity of IL-2 ($\times 10^6$ u/mg)
0	4.7
1.0	5.4
2.0	6.0
3.0	7.9
4.0	8.1
5.0	6.6
6.0	4.8

* Mean value of three measurement. IL-2 concentration 1mg/ml

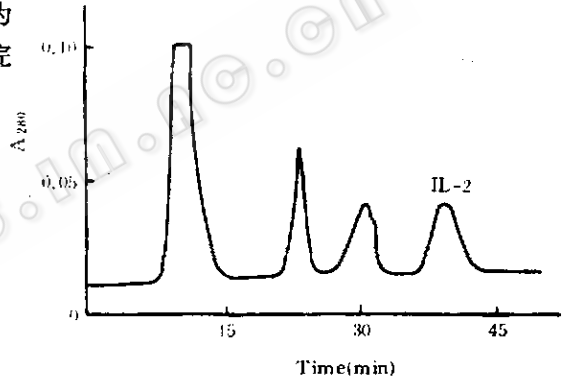


图 2 Cu²⁺ 氧化复性后, IL-2 的 RP-HPLC 图谱

Fig. 2 RP-HPLC analysis of IL-2 after Cu²⁺ oxidation (Loading 1mg IL-2)

图 2 为仅有 Cu²⁺ 作为巯基氧化剂时 1mg/ml 的 IL-2 的反相 HPLC 图谱, 活性 IL-2 峰占 IL-2 吸收峰总面积的 30%, 活性测定结果 IL-2 的比活性为 4×10^6 u/mg。在 PDI 的作用下, 二硫键错配的 IL-2 分子的两个洗脱峰明显减少 (IL-2 的进样量相同), 两种错配异构体峰面积之和仅为等量 IL-2 蛋白总吸收面积 (图 2) 的 42%, 也就是说活性 IL-2 峰的面积增加到 58% 以上 (图 3), 在 PDI 的进一步作用下, 实测 IL-2 的比活性增加到 8.2×10^6 u/mg。

2.2.2 PDI 能够纠正二硫键错配的 IL-2 异构体: IL-2 两种异构体的比活性均 $< 4 \times 10^4$ u/mg, 经等摩尔的 PDI 在 25℃ 作用 10 小时后其比活性达到 3.3×10^6 u/mg 水平, 这一结果表明 PDI 可以部分纠正二硫键错配的 IL-2 异构体 成为具有正确折叠的 IL-2。

2.2.3 PDI 可以防止 IL-2 通过 Cys 的链间交联形成聚合物: 凝胶排阻 HPLC 表明, 在

Cu²⁺-氧化复性的条件下，IL-2 单体仅占 60%，其余是通过链间二硫键的交联形成的 IL-2 二聚体和三聚体。在 PDI 作用下，聚合体的比例明显减少，而单体量增加到 86% (见图 4a, b)。

2.2.4 PDI 对 GM-CSF 折叠的催化作用：由于 GM-CSF 折叠过程中二硫键的错误配对所形成的异构体不能在 RP-HPLC 上相互分离，因此我们只能通过比活性和凝胶排阻 HPLC 来反映，在 1mg/ml 浓度下用 Cu²⁺-氧化复性，GM-CSF 比活性为 4.2×10^6 u/mg, GM-CSF 单体峰面积占 62%，PDI 催化下，可使比活性提高到 6.7×10^6 ，单体峰面积增加到 87%。

3 讨论

我们在 Lambert^[3)] 等工作基础上，建立了自牛肝中纯化 PDI 的方法。Lambert 等的纯化路线中存在两个缺陷。一是应用透析次数太多，这样不仅使分离时间大大延长，而且每一步透析均会使 PDI 大量沉淀并能使它的活性降低，我们将三次透析改为 SephadexG-25 凝胶过滤同样能够完成脱盐和缓冲液交换等作用。这样不仅使 PDI 回收率增加 10%，而且比活性也提高到了近 1000u/g 蛋白。第二个缺陷是原分离材料质软，在上盐梯度时胶的体积缩小，导致流速减慢，分离效率下降。

PDI 最初是在肝脏中发现的，最近的研究表明，它主要存在于肝脏胰脏这类蛋白质合成较旺盛的组

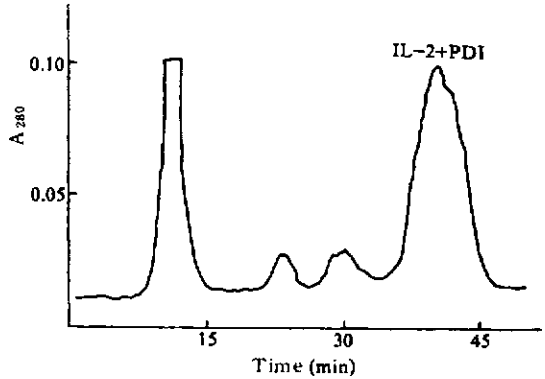


图 3 Cu²⁺-氧化复性后，IL-2 再加等摩尔 PDI 和 10⁻⁵ mol/L DTT，25 C 作用 10 小时后的 RP-HPLC 图谱

Fig. 3 RP-HPLC chromatogram of equal molar PDI acting on Cu²⁺ oxidative IL-2 (Loading 1mg IL-2)

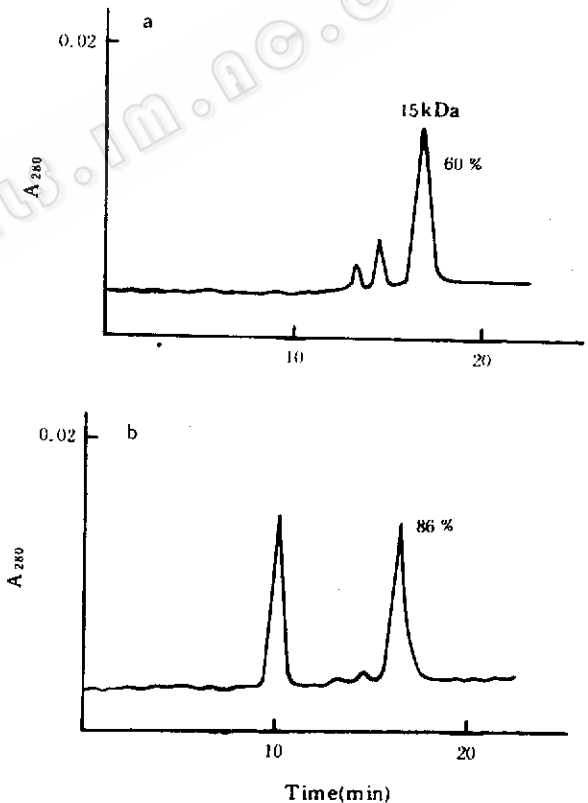


图 4 在 Cu²⁺ (a) 和在 PDI 作用下 (b) IL-2 的分子排阻色谱图

Fig. 4 Gelfiltration chromatogram of Cu²⁺ oxidative (a) and PDI acting on (b) IL-2 (IL-2 Loading 10mg)

织中。PDI 能够催化蛋白质天然二硫键的生成,二硫键的异构和二硫键还原^[6],对于部分还原的蛋白质分子,如本文中的 IL-2,在温和的氧化条件下(溶解的氧气, Cu^{2+} 或氧化及还原的谷胱甘肽混合物),PDI 能够催化天然二硫键的形成。这一过程分两步进行首先是还原蛋白的氧化,然后是 PDI 催化的巯基二硫键的交换反应。PDI 能够进一步提高 IL-2 比活性和正确折叠率的原因也是第二步反应的结果。

含有错配二硫键的氧化型 IL-2,在温和的还原条件下(10^{-5}mol/L DTT),蛋白质二硫键异构酶可以催化二硫键的异构反应,从而使错配 IL-2 的比活性由 $4 \times 10^4 \text{u/mg}$ 提高到 $3.3 \times 10^6 \text{u/mg}$,这就间接地提示至少有 20% 的错接 IL-2 生成了二硫键正确配对的 IL-2 分子。这个实验是根据 PDI 测活反应给我们的启示而进行的。对于 PDI 能减少 IL-2 聚合体的形成原因,我们认为主要是由于在一定的还原条件下利用了 PDI 对蛋白质的还原作用。看来对多种 PDI 催化活性来讲, PDI 的异构作用是主要的。

参 考 文 献

- [1] Wetlauffer D B and Ristow SS. *Annu Rev Biochem*, 1973, **42**: 135.
- [2] Creighton TE. *Prog Biophys Mol Biol*, 1978, **33**: 231.
- [3] Lambert N and Freedman R B. *Biochem J*, 1983, **213**: 225.
- [4] Nillsson B. *Annu Rev Microbiol*, 1991, **45**: 607.
- [5] Lambert N and Freedman R B. *Biochem J*, 1983, **213**: 235.
- [6] Freedman R B *et al.* *Biochem Soc Trans*, 1984, **12**: 929.

Effects of the Protein Disulfide Isomerase on the Refolding of Recombinant Proteins *in vitro*

Xu Mingbo Meng Wenhua Ma Xiankai

(*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*)

Abstract To increase ratio of correctly folded recombinant proteins, we purified the protein disulfide isomerase (PDI) from bovine liver, and studied the effects of enzyme catalyzed refolding process. Our results indicate that the correct folding ratio of IL-2 increased from 30% to 58% under the action of equal molar of PDI, with the specific activity of IL-2 increased from $4 \times 10^6 \text{u/mg}$ to $8.2 \times 10^6 \text{u/mg}$. PDI can also partially correct the mismatched IL-2 molecules to the correct folding status and further more, PDI can prevent the formation of oligomer due to interchain disulfide bonds. With similar mechanism, PDI can increase the specific activity of GM-CSF.

Key words Recombinant protein, refolding, PDI