

# 源于大肠杆菌蛋白的表达、液相色谱复性与纯化新进展

王骊丽, 耿信笃\*

合成及天然功能性分子化学教育部重点实验室, 西北大学现代分离科学研究所, 陕西省分离科学重点实验室, 西安 710069

\* 通讯作者, E-mail: [xdgeng@nwu.edu.cn](mailto:xdgeng@nwu.edu.cn)

收稿日期: 2009-06-10; 接受日期: 2009-06-23

**摘要** 对近两年来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)的蛋白表达和用蛋白折叠液相色谱(protein folding liquid chromatography, PFLC)法对所形成的包涵体目标蛋白的复性并同时纯化的新近发展做了简要的介绍和评述。PFLC 法用于包涵体蛋白分离、纯化很广, 其特点是除了在色谱柱上将目标蛋白与其他组分分开, 还同时要在色谱柱上进行包涵体蛋白折叠。可以说, 现代生物技术中所用的大多数有价值蛋白产品的制备仍然有赖于不同机理的液相色谱(LC)法。而用 PFLC 法对源于 *E.coli* 的蛋白的制备方法更具可塑性和容易达到规模化, 其生成本可以成倍地降低。该文主要内容包括了 *E.coli* 蛋白的表达及样品前处理、PFLC 的实用范围、PFLC 的优化、PFLC 中的新技术、新设备和新方法、PFLC 的分子学机理、应用事例及对未来的展望。

**关键词**  
大肠杆菌  
蛋白折叠液相色谱法  
蛋白复性  
蛋白纯化  
液相色谱  
生物工程

## 1 引言

随着基因工程技术的诞生和发展, 人们可以通过细菌发酵、真核细胞培养、甚至整体动物培育等多种方式, 大量取得过去只能从组织中提取的珍稀蛋白, 用于研究或疾病的治疗。在近二十年来, 以酵母、中国仓鼠细胞(CHO)和昆虫等<sup>[1]</sup>真核细胞表达系统也获得了很大的进展。与真核表达系统相比, 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)克隆表达的原核系统的优点是操作简单, 产量高, 成本低<sup>[2]</sup>。因此, 以*E.coli*为宿主的表达系统仍然受到研究者的青睐<sup>[3]</sup>。但是, 由

于真核基因在原核细胞中所表达的产物缺乏翻译后加工, 即绝大多数真核细胞蛋白缺少自我复性的能力, 在溶液中不能自发形成有活性功能的空间结构, 成为不可溶解的、非活性聚集体的包涵体组分<sup>[4]</sup>。

包涵体是由错误折叠的多肽形成致密、非晶体性的蛋白沉淀物<sup>[5]</sup>, 是蛋白质的高效表达以及变性蛋白质的聚集结果, 存在于细菌的细胞质和外周质间隙之间<sup>[6]</sup>。真核基因在*E.coli*中所表达的蛋白质多肽链在折叠的过程中, 在错误折叠的多肽链和正确地折叠成可溶蛋白的分子之间存在着一个动力学过程(图 1)<sup>[7]</sup>。



图 1 包涵体形成的动力学过程<sup>[7]</sup>

包涵体体外蛋白质的复性一直是大量生产一些特定的、有生物活性功能的真核蛋白的技术“瓶颈”，也是制约以基因工程蛋白药物为主的生物技术成果走向产业化过程中的主要因素<sup>[8]</sup>。因此如何从所形成的包涵体中提取、复性和纯化目标蛋白就成为科学家一直在致力于要解决的难题<sup>[9]</sup>。而解决此问题，就必须同时从蛋白质的表达和分离纯化两方面考虑<sup>[10]</sup>。本文拟继前一篇评论之后<sup>[11]</sup>，对从 2006 年以来，源于 *E.coli* 高效表达及其包涵体蛋白在蛋白折叠液相色谱(protein folding liquid chromatography, PFLC)技术方面取得的进展进行评论。

## 2 *E.coli* 蛋白的表达及样品前处理

通常用基因工程技术从不同的宿主细胞中获得一个具有活性的治疗用重组蛋白药物或者研究用蛋白纯品，其整个过程包括上游技术(基因重组、克隆和表达的设计与构建)和下游技术(基因工程菌或细胞的大规模培养，目标蛋白的分离纯化工艺技术及放大等)两大组成部分。图 2 是一个从 *E.coli* 表达包涵体中获得活性功能蛋白的典型工艺路线。众多研究者一直从事于基因工程上、下游的研究工作，以期能寻找出人工辅助包涵体蛋白复性或者说体外蛋白质折叠、再折叠的新方法。

从包涵体中获得正确折叠蛋白，首先要将目标蛋白从固态的包涵体中转移到溶液中。因包涵体不溶于水，或盐的水溶液，必须要用极端 pH，去污剂，或有机溶剂来溶解。但通常采用高浓度的变性剂 8 mol/L 脯或 6~7 mol/L 盐酸胍的溶液来溶解包涵体，对于含有二硫键的蛋白还要同时加入适量的还原剂如 β-巯基乙醇、二硫苏糖醇，以打开蛋白分子内可能错误配对的二硫键以得到单体的多肽链。然后才能对处于分子状态的该变性的目标蛋白进行复性。对处于非折叠状态的多肽链而言，必须首先除去变性剂和还原剂，促使蛋白形成正确对接的二硫键，折叠恢复其天然构象和生物学活性<sup>[12]</sup>。通常认为这个过程并不复杂。但是，到目前为止，已发展了的各种体外辅助蛋白复性方法，如稀释法、透析法<sup>[13]</sup>、超滤、分子伴侣<sup>[14]</sup>、小分子添加剂<sup>[15]</sup>以及 LC<sup>[16]</sup> 等体外辅助方法<sup>[17]</sup>。然而，人们在实际研究中却发现，在体外折叠时，由于变性的蛋白分子存在着大量的疏水氨基酸残基，这些疏水氨基酸残基之间的相互作用，形成了

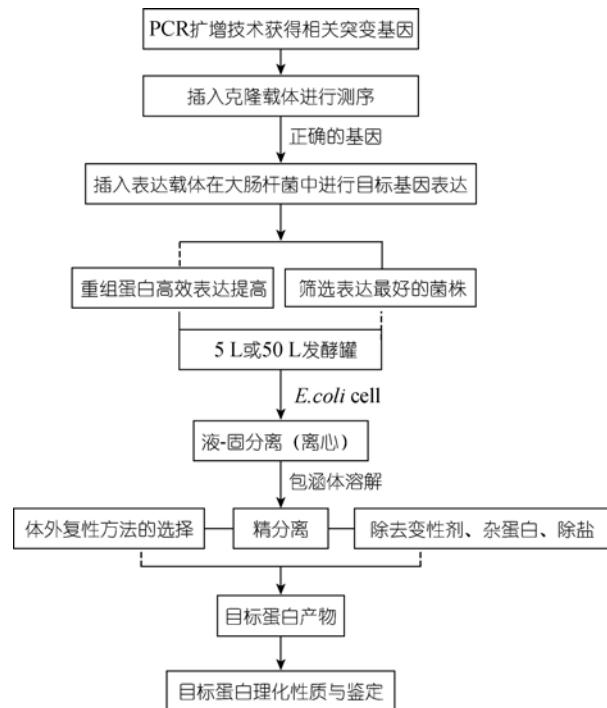


图 2 从大肠杆菌表达包涵体中获得活性功能蛋白的工艺路线

蛋白分子的错误折叠和聚集，其包涵体蛋白的复性效率都非常低<sup>[18]</sup>。因此，从一个 *E.coli* 中高效表达的包涵体蛋白中获得天然结构并具有天然的生理功能的蛋白质是相当困难的，使以包涵体形式存在大部分蛋白产物成为“看得见，却拿不到”的废品。因此，研究如何能提高包涵体蛋白的复性效率，已经成为成功获得基因工程蛋白药物和解析蛋白质立体结构的关键、具有重大的实际意义。

在真核细胞中新生肽链的形成伴随着一系列复杂的加工和成熟过程，最终才能成为具有生物活性的蛋白质。当然，多学科的交叉和渗透，这就提示人们可以通过基因、载体的不断改造，在设计、构建 *E.coli* 所表达蛋白时，就应当融入后续的纯化构想。例如各类的亲和标签<sup>[19]</sup>、人工分子伴侣<sup>[20]</sup>、分泌表达的蛋白等<sup>[21]</sup>。即当真核基因在 *E.coli* 中表达的形式不同时，选择 LC 的法也就不同。

### 2.1 真核基因在 *E.coli* 的表达方式及对包涵体形成的影响

目前，真核基因在 *E.coli* 中的表达方式主要有三

种, 细胞不溶性表达、细胞内可溶性和分泌性表达, 使外源基因常定位于胞质、周质空间、内膜或外膜和细胞外基质中。在以往大多数的有研究价值和用于生物药物所表达的蛋白质中, 主要为细胞内不溶性表达, 其表达的蛋白以不溶解性包涵体方式存在, 占总数的 80%以上。

为了克服包涵体的形成, 解决所生成的蛋白存在复性困难的问题, 探索外源蛋白在*E.coli*中的细胞内可溶性表达的研究日益增多<sup>[22]</sup>。一类是采用在外源基因表达的同时, 共表达分子伴侣和折叠酶(foldases)<sup>[23]</sup>。这些共表达的结果就有可能提供充分的辅助折叠支持<sup>[24]</sup>。如Haacke A等<sup>[25]</sup>新近又报道利用DnaK-DnaJ-GrpE系统和GroEL-GroES分子伴侣系统, 这些分子可以与被折叠的蛋白质相互作用并抑制其形成包涵体或发生聚集, 能够促进蛋白质折叠过程中的某些限速步骤, 同时增加可溶性蛋白的表达量。Paul S等<sup>[26]</sup>报道了*E.coli* GroEL/GroES 体外促进蛋白折叠的机制和一个 69 kDa *E.coli* 麦芽糖昔酶MalZ折叠情况。在ATP水解酶存在下折叠MalZ蛋白使折叠效率提高 7 倍。肽酰基-脯氨酸酰基(peptidyl-prolyl)的顺式/反式异构化也能改变细胞内这类分子的相对浓度, 对于重组蛋白的折叠和包涵体的形成可发挥重要的影响<sup>[27]</sup>。另一类是通过在分泌过程中切除蛋白质前面的信号肽后使生成的蛋白质的N末端氨基酸残基与天然的产物一致, 并在周质的空间中提供了一个氧化的环境, 以有利于二硫键的形成<sup>[28]</sup>。

此外, 通过改变cDNA在被表达的多肽或目的蛋白与强亲和力配体以构成重组的融合蛋白。由于融合系统可以产生大量的可溶性蛋白, 因此, 使用基因融合表达系统在*E.coli* 中表达外源基因已越来越受到人们的欢迎。如表达β-半乳糖昔酶、谷胱昔肽-S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白(Trx)融合蛋白等<sup>[29]</sup>, 可以使用对配基蛋白的特异的抗体的亲和色谱(AFC)法能有效的纯化所融合的蛋白<sup>[30]</sup>。朱红裕等<sup>[31]</sup>全面综述了在 *E.coli* 中表达可溶外源蛋白的策略和进展, 作者通过这个评述以期提高具有生物活性的外源基因的可溶性表达水平。其中一些发展趋势仍然从表 1 可以看到, 例如应用最多还是pET系统的表达载体、融合蛋白的高效表达。因此, 获得细胞内可溶性表达系统

和高效分泌表达系统进行高表达, 就能够方便地利用LC法从培养基中分离出目的外源蛋白, 并且容易达到规模化。

## 2.2 高效表达的蛋白对包涵体形成的影响

*E.coli*的高密度培养是增加重组蛋白产率的最有效的方法。在增加菌体密度的同时提高蛋白的表达量, 可使形成的包涵体包裹得更紧密, 包涵体内目标蛋白也较纯, 从而有利于简化下游的纯化工艺<sup>[62]</sup>。

不同的 *E.coli* 菌株在培养条件(温度、培养基组成、诱导剂选择)和目的基因的表达能力上差异很大。因此, 研究者一方面通过降低诱导系统的成本, 优化每个表达系统来实现高密度、高表达, 达到工业化生物工艺的目的。如采用化学诱导剂(IPTG)诱导表达重组菌时, 其细胞生长的温度控制在 37℃左右时, 结果 80%以上 *E.coli* 表达的外源蛋白都生成包涵体的形式<sup>[63]</sup>。而另一方面人们又通过改变蛋白质的性质以及所处环境条件, 如在发酵过程中增加可溶性表达来减少包涵体的形成, 减低目的基因的过度表达和下游过程操作成本。Huang等<sup>[64]</sup>在控制的流加培养体系中研究了发酵*E.coli*重组D-乙内酰脲酶的培养条件对形成包涵体的影响, 在诱导表达时调节培养温度 32~27℃, 在此温度下维持质粒稳定生长以避免包涵体的形成。在低温条件下诱导表达, 可减少包涵体的形成, 所表达产物大部分存在于破碎后的上清液中, 使后续的纯化手续简化。Arie等<sup>[65]</sup>的实验却获得了意外的结果, 突变的*E.coli*麦牙糖共聚物蛋白(MalE31)在 30℃培养不影响包涵体的形成, 37℃形成致死因子, 但当温度升高到 42℃诱导表达时, 包涵体形成降解促使*E.coli*细胞继续生长。因此, 从这些结果提示, *E.coli*中包涵体的形成一种可能是在低温下蛋白质的合成速度减慢使折叠的速度也减慢。这样, 就有更多的机会进行正确的折叠, 从而会减少包涵体的形成<sup>[66]</sup>。另一种可能与外源蛋白在生成的过程中, 缺少某些协助因子或由于周围的物理环境不适有关, 使其难以连续进行次级键的形成, 中间产物相互凝集而积累成包涵体<sup>[67]</sup>。可以看出, 蛋白诱导表达过程机制是非常复杂的。也有研究发现在诱导时期, 流加方式的改变也有可能显著提高可溶性蛋白的表达量<sup>[68]</sup>。但是, 过度地使可溶解性的增加, 又可使发酵

表 1 2006~2009 年PFLC 复性与纯化蛋白实例<sup>a)</sup>

复性蛋白	来源或宿主	填料类型	复性与纯化方法	产品纯度(%)	复性蛋白效果	比活性或生物活性	出版年	文献
rhG-CSF	DH5 $\alpha$	Cu <sup>2+</sup>	AFC	97	A mass recovery 39%	2.3×10 <sup>8</sup> IU/mg	2009	[32]
TRAIL	BL21 (DE3)	Ni-NTA	AFC/SEC	98	N.R.	N.R.	2009	[33]
$\alpha$ -Chy	Purchased	PEG-600	HIC	N.R.	N.R.	N.R.	2009	[34]
hApaf-1	BL21 (DE3)	Sephadex G100	SEC	~100	N.R.	N.R.	2009	[35]
rhG-CSF	DH5 $\alpha$	Superdex 75	SEC	83	A mass recovery 30%	1.2×10 <sup>8</sup> IU/mg	2008	[36]
hDrll1	BL21 (DE3)	GSTrap	AFC/SEC	≥95	N.R.	N.R.	2008	[37]
rhIFN- $\gamma$	DH5 $\alpha$	PEG200	HIC/SEC	95	A mass recovery 92%	9.5×10 <sup>8</sup> IU/mg	2008	[38]
rhMK	BL21 (DE3)	S-Sepharose	IEC	98	6.2 (protein)	N.R.	2008	[39]
ATF5	BL21 (DE3)	GSTrap	AFC/ ultrafilter	N.R.	Total protein 89%	N.R.	2008	[40]
rhSCF	DH5 $\alpha$	SAX, (-SO <sub>3</sub> H)	IEC	96.3	A mass recovery 43 %	7.8 × 10 <sup>5</sup> IU/mg	2008	[41]
rhEGF	BL21(DE3)	Toyopearl-SP	IEC	>99	N.R.	5.0 × 10 <sup>5</sup> IU/mg	2008	[42]
Anti-CD25	BL21(DE3)	Ni-NTA/ Superdex 75	AFC/SEC	95	A yield of 15%	Relative activity 91%	2008	[43]
Streptokinase	BL21(DE3)	DEAE 650M/ Superdex 75	IEC/SEC	99	40 mg Total protein	1.5 × 10 <sup>5</sup> IU/mg	2008	[44]
rh IFN- $\gamma$	DH5 $\alpha$	PEG-200	HIC	95	A mass recovery 90%	N.R.	2007	[45]
rhG-CSF	DH5 $\alpha$	Q-Sepharose-FF	IEC	96	Recovery 49%	3.0×10 <sup>8</sup> IU/mg	2007	[46]
rhG-CSF	DH5 $\alpha$	Cu <sup>2+</sup>	AFC	97	32.0%	1.8	2007	[47]
$\alpha$ -Chy	Purchased	PEG-600	HIC	N.R.	A mass recovery 28.9%	≥51 U/mg	2007	[48]
rbEK	BL21 (DE3)	Ni-NTA	AFC	95	A yield of EK 40%	110 ± 10 U/mg	2007	[49]
lysozyme	Purchased	PGMA/EDMA	IEC	N.R.	A mass recovery 94%	N.R.	2007	[50]
rhIFN- $\gamma$	DH5 $\alpha$	PEG-600	HIC	95	A mass recovery 94.3%	N.R.	2007	[51]
rhGM-CSF	DH5 $\alpha$	SAX, (-SO <sub>3</sub> H)	IEC	N.R.	A mass recovery 58.8%	1.66×10 <sup>7</sup> IU/mg	2007	[52]
CsFLS	BL21 (DE3)	Ni <sup>+</sup> -NTA	AFC/ Ultra	N.R.	Overall yield 8.3%	Total activity 2160.9(U)	2007	[53]
VEGF(121)	BL21 (DE3)	Sephacy S-100	IEC/SEC	95	A yield of 81%	N.R.	2007	[54]
RHG1-LRR	BL21 (DE3)	Ni-NTA agarose	IMAC/ dialysis	—	yielded 0.2mg/ml protein	N.R.	2007	[55]
rhinterferon- $\lambda$ 1	BL21(DE3)	Ni-NTA agarose	AFC	95	N.R.	N.R.	2007	[56]
BIG- 3	BL21(DE3)	Sepharose 4B	AFC		N.R.	N.R.	2007	[57]
rhG-CSF	DH5 $\alpha$	Superdex 75	SEC(urea)	95	46.1%	1.0×10 <sup>8</sup> IU/mg	2006	[58]
mGM-CSF	BL21 (DE3)	N.R.	AFC	95	N.R.	5×10 <sup>6</sup> U/mg	2006	[59]
GnRH3	BL21(DE3)	DEAE-Sephacel/ Sephadex G-25	IEC/SEC	96	Yielded 0.045 %	N.R.	2006	[60]
rhSCF	DH5 $\alpha$	PEG400	HIC	95	A mass recovery 49%	1.24×10 <sup>7</sup> IU/mg	2006	[61]

a) N.R.= 未报道

rhG-CSF(Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor); TRAIL(Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand);  $\alpha$ -Chy( $\alpha$ -Chymotrypsin); hApaf-1(human apoptotic protease activating factor); hDrll1(human Delta-like1); rhIFN- $\gamma$ (Recombinant human interferon-gamma); rhMK(human midkine); ATF5(the bZIP domain of activating transcription factor 5); rhSCF(Recombinant human stem cell factor); rhEGF(Recombinant human epidermal growth factor); bEK(bovine enterokinase); rhGM-CSF(Recombinant human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor); CsFLS(Camellia sinensis); rhVEGF-121( recombinant human VEGF-121); RHG1-LRR(The extracellular domain of the protein); rhinterferon- $\lambda$ 1(Recombinant human interferon- $\lambda$ 1); BIG- 3(BMP-2-induced gene 3 kb); mGM-CSF(mouse granulocyte-macrophage colonystimulating factor); GnRH3(gonadotropin-releasing hormone)

产品的收率降低, 相应纯化的产率也低。获得高表达的目标蛋白最重要的是优选最佳表达系统, 简化制备工艺, 降低大规模化成本, 实现有价值重组蛋白的规模化生产。

### 2.3 样品前处理-包涵体的清洗和溶解

如前所述, 分离、纯化以包涵体形式表达的蛋白, 一般包括三个主要步骤: 包涵体的分离、洗涤、溶解以及包涵体蛋白的复性与纯化。以 *E.coli* 表达的目标蛋白多存在于胞内, 并产生聚集而成为致密颗粒。因此, 从培养细胞中收集后要进行破碎, 比较有效的方法是高压匀浆结合溶菌酶处理。高压匀浆破碎 *E.coli* 细胞常用于大规模的生产过程, 而超声波破碎技术用于实验室。也有报道用化学抽提的方法来替代机械破碎的方法<sup>[69]</sup>。通过离心和多次的洗涤就可得到包涵体, 并且在实验中也发现从新鲜发酵培养的细胞中提取的包涵体, 其蛋白的折叠产率(folding yield)往往最高(结果未报道)。

通常, 用很强的变性剂(如 8 mol/L 脯氨酸)溶解包涵体蛋白。这个过程是靠离子间相互作用破坏包涵体蛋白间氢键而增溶蛋白。常用的溶剂增溶强弱是不同的, 8 mol/L 脯氨酸 < 6~7 mol/L 盐酸胍 < 硫氰酸盐, 在研发有医用价值的蛋白药物中常选用尿素或盐酸胍。我们实验室利用 NaOH 法对不同的重组蛋白包涵体的溶解作了一些探讨, 成功的用于 rhSCF 等包涵体中<sup>[70]</sup>。

由于包涵体来源于 *E.coli* 发酵的培养液中, 常需要从培养液中收获细胞并重新悬浮在缓冲液中以使细胞充分裂解和回收。因此, 为了从这个步骤能使所形成的包涵体得到回收, 有利于后续步骤操作更方便。目前, 研究人员主要进行了洗涤过程缓冲液组成、pH 值和包涵体蛋白的溶解过程等方面优化的策略<sup>[45]</sup>。早期, Bailey<sup>[71]</sup> 和 Patra<sup>[72]</sup> 等分别研究并改进了在 *E.coli* 中表达的人生长激素(rhGH)包涵体的预处理过程, 获得了不同溶剂对溶解 rhGH 包涵体影响的结果。Valente 等<sup>[73]</sup> 对 *E.coli* 表达的人干扰素- $\alpha$ 2b 包涵体的进行了研究, 优化了包涵体的分离和清洗每一个步骤包括细菌的裂解, 用较低浓度的蛋白变性剂洗涤包涵体以及 *E.coli* 细胞的溶解过程的回收率, 使其纯度从 60% 提高到 80% 以上, 复性质量回收率和活性回收率也显著增加。这些结果证实, 在优化条件下实

现包涵体初步回收, 不但可以达到分离和去除大部分杂质目的, 也可使目标蛋白在复性与纯化过程中有很高的质量回收率<sup>[74]</sup>。也可以说是获得具有潜在临床和工业应用价值的蛋白质前提之一。

### 3 蛋白折叠液相色谱

蛋白质的多肽链的一级结构就是其正确的氨基酸序列, 包括含有二硫键的准确位置。从肽链上氨基酸的  $\alpha$  碳伸出来的不同 R 侧链结构和性质, 决定了哪一个区段是  $\alpha$  螺旋, 哪一段是无规则结构及何处可以折叠。因此, 肽链产生后很快就自动地折叠成它的二级和三级结构, 即蛋白质的高级结构。而在 *E.coli* 中高效表达的包涵体蛋白, 往往不能自发折叠卷曲生成有一定空间结构和具有特定生物功能<sup>[75]</sup>。即包涵体主要是一种由不溶性目标蛋白构成的具有膜结构的非结晶型表达的聚集体, 这些基因表达产物的一级结构(即氨基酸序列)是正确的, 但其立体结构是错误的, 所以没有生物活性<sup>[76]</sup>。蛋白质的氨基酸序列组成决定了其性质、结构和功能上的差异, 这些差异也是进行包涵体蛋白复性与纯化的基础。为了从 *E.coli* 包涵体中获得有活性的纯重组蛋白, 科学家对包涵体的复性方法进行了大量研究, 其中最引人注目的便是蛋白折叠液相色谱(Protein folding liquid chromatography, PFLC)法, 在过去的两年内获得了长足的发展<sup>[77]</sup>。

用稀释法对蛋白复性是传统的方法之一, 然而活性损失很大。原因之一是变性蛋白分子在与变性剂分离或用复性缓冲液大量稀释的时候, 在尚未折叠成天然态的蛋白分子之前, 这些以变性态(伸展态)存在的蛋白分子间相互作用聚集成二聚体、三聚体或多聚体, 直至形成沉淀。理论和实践均表明, 只有处于非聚态(单体)的变性蛋白分子才有可能自发折叠成它的天然态<sup>[78]</sup>。当蛋白分子的绝大部分以聚集态存在时, 它自然就会形成沉淀, 蛋白分子当然无法折叠成天然态<sup>[79]</sup>。另外一种原因是动力学上的因素。有人提出, 在处于高能态的变性蛋白分子向低能态的天然蛋白自发折叠的途径(pathway)中可能存在能垒(energy barrier)<sup>[80]</sup>。如果这种讲法是正确的话, 上述的变性蛋白分子即便是以单体(单分子)形式存在, 亦无法自发折叠到它的天然态<sup>[81]</sup>。

如果能找到一种固体吸附剂, 它能在浓的变性剂溶液中牢固的吸附变性蛋白分子而不吸附变性剂, 这样的吸附达到平衡, 如首先进行液-固分离, 然后再用合适的溶液将吸附在该固相吸附剂表面上的以单体形式存在的变性蛋白分子洗脱下来, 创造一定的条件, 使其自发的折叠成它的天然态<sup>[82]</sup>。这样就会避免上述的蛋白分子聚集或沉淀出现。如果仍有少量聚集体或沉淀出现, 用此法也至少可以做到将沉淀减小到最低限度。换句话说, 可能提高变性蛋白折叠的效率。

如果能将该固体吸附剂做成色谱的固定相, 用有强洗脱能力的流动相洗脱从固定相表面洗脱该变性蛋白, 在洗脱过程中该变性蛋白便实现了复性。如有不能复性的蛋白, 则其还是以变性态存在, 它与天然蛋白在色谱柱上的保留特性不同, 在流动相洗脱的过程中就能达到与天然蛋白分离的目的。当然, 与此同时也会与其他杂蛋白分离, 这就有可能实现变性蛋白的复性与纯化同时进行的双重目的<sup>[83]</sup>。

如果还能设计一种固定相, 它不仅能吸附变性蛋白分子, 而且能在变性蛋白分子折叠的同时, 在分子水平上为变性蛋白分子提供足够高的能量, 以帮助变性蛋白分子克服上述在折叠途径中可能出现的能量垒, 则有可能实现在复性缓冲溶液中不能折叠(或称之为不可逆折叠, irreversibly folding)的变性蛋白<sup>[84]</sup>。能在此特定的液-固界面上实现再折叠(refolding)。这种在分子水平上为变性蛋白分子提供足的能量已报道高达  $10^2\text{--}10^3 \text{ kJ/mol}$  蛋白, 较通常的变性蛋白在缓冲溶液中的  $2\text{--}20 \text{ kJ/mol}$  高出了  $10^2$  的数量级<sup>[85]</sup>。

依上述的思路设计的PFLC用于对蛋白复性已有 20 年的历史, 它不仅已成为LC的一个分支和生物化学中的一种蛋白复性有效的方法和技术, 而且已用于规模化的生产中大规模的变性蛋白的复性并同时纯化。然而将该法正式命名为蛋白折叠液相色谱(PFLC)并定义为“将原本在溶液中进行的各种生物化学和物理化学过程放在LC中进行以实现了或增加复性效率, 或缩短其蛋白折叠时间的这种方法称其为蛋白折叠色谱法”是在两年前<sup>[86]</sup>。虽然该定义中似未包含用色谱蛋分离蛋白的含意, 然而分离是色谱固有的特征。此前关于PFLC已有两篇评论<sup>[11,77]</sup> 和专著<sup>[86]</sup> 出版。现仅对近二年以来在此领域中的新技术、

新方法和新设备的进展进行介绍和评述。

已报道的PFLC法主要有疏水相互作用色谱(HIC)法、离子交换色谱(IEC)法、尺寸排阻色谱(SEC) 法和亲合色谱(AFC)法四种方法应用于包涵体蛋白的纯化和体外蛋白折叠<sup>[11]</sup>。不同于通常的LC技术, 它除了在色谱柱上将目标蛋白与其他组分分开外, 还要在色谱柱上进行包涵体蛋白的折叠。近年来, 还相继出现了蛋白质复性与同时纯化装置(the unit for the simultaneous renaturation and purification of proteins, USRPP)<sup>[87]</sup>和一些新的PFLC方法, 如膨胀床吸附色谱(expanded bed adsorption chromatography, EBA)<sup>[88]</sup>、连续环形色谱 (continuous annular chromatography, CAC)<sup>[89]</sup>、模拟移动床色谱(Simulated moving bed chromatography, SMB)<sup>[90]</sup>、灌注色谱(perfusion chromatography)<sup>[91]</sup>等技术也被用于包涵体蛋白的大规模的复性并同时制备纯化中, 使多种 *E.coli* 表达的蛋白已在临床治疗中成功使用, 产生了巨大的社会效益和经济效益。大量研究也表明对于高浓度溶解的包涵体蛋白, 可以在色谱柱上得到复性<sup>[92]</sup>。

### 3.1 PFLC 的实用范围

科学家对 PFLC 首先提出的问题便是, 那些包涵体蛋白可用 PFLC 复性并同时进行纯化? 是否任何一种, 或哪几种 PFLC 都可用来进行目标蛋白复性并同时纯化? 从理论上讲, 任何一种包涵体蛋白均可用该四种 PFLC 方法中的任何一种来实现其复性并同时进行纯化, 只须选用其中的哪一种为最佳而已。

重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF)属于造血生长因子, 是在过去 10 多年中开发出来的最令人振奋的新药之一, 也是全球销量最好的 5 个基因药物之一。然而现有的生产方法却存在的复性率低和生产成本高的缺陷。如能将复性和纯化G-CSF合并为一步操作, 则生产成本便会大大地降低。然而, 因为 rhG-CSF 不仅疏水性很强, 而且分子中含有 5 个半胱氨酸残基, 除形成两个二硫键外, 还有一个游离的半胱氨酸残基<sup>[93]</sup>。因其包涵体的高浓度的脲、盐酸胍提取液一旦与水接触, 便立即产生沉淀, 这对其用包括了PFLC在内的各类复性方法带来了极大的困难。为发挥PFLC的优势, 王超展等选用了rhG-CSF为目标蛋白, 以寻求解决这一难题的方法。先后实现了用

表 2 几种 PFLC 法复性与纯化 rhG-CSF 包涵体结果比较

复性与纯化方法	添加剂	质量回收率(%)	纯度(%)	生物活性( $\times 10^8$ IU/mg)	参考文献
IEC	3.0 mol/L urea, 2.5 mmol/L GSH, 0.8 mmol/L GSSG	49.0	96	3.0	[46]
HIC	N.R. <sup>a)</sup>	42.6	96.8	2.1	[94]
SEC	15% glycerol (v/v), 2.5 mmol/L GSH, 0.8 mmol/L GSSG	30.0	83	1.2	[36]
脲梯度 SEC	15% glycerol (v/v), 2.5 mmol/L GSH, 0.8 mmol/L GSSG	46.1	N.R.	1.0	[58]
AFC	2.0 mol/L urea	32.0	97	1.8	[47]
AFC	3.0 mol/L urea	39.0	97	2.3	[32]

a) N.R.=未报道

PF-IEC<sup>[46]</sup>, PF-HIC<sup>[94]</sup>, PF-SEC<sup>[36,58]</sup>和 PF-AFC<sup>[32,47]</sup>复性并同时纯化rhG-CSF, 其结果列入了表 2.

从表 2 看出, 所有该四种常用的PFLC均可用于rhG-CSF的复性并同时纯化, 而且在 40 min以内, 除 SEC法外, 其他的三种PFLC法, 仅用一步便能达到纯度 $\geq 95\%$ , 比活 $\geq 1 \times 10^8$  IU/mg的目的. 然而, 从该表 2 中也能看到质量回收率均很低, 最高为 49%. 尽管使用了新的溶解rhG-CSF包涵体的方法以期提高其质量回收率, 但效果并不显著<sup>[36]</sup>. 周凯最近合成了一种新的固定相可将质量回收率提高到 68%<sup>[95]</sup>.

用这一系列 PFLC 方法对 rhG-CSF 的成功复性并同时进行纯化, 为解决源于 *E. coli* 表达的其他蛋白的类似难题, 的确起到了一种示范作用. 即包涵体蛋白均可用该四种 PFLC 方法中的任何一种来实现其复性并同时进行纯化, 只是所得效果可能不同而已.

### 3.2 PFLC 的优化

由于 PFLC 的操作与通常的 LC 的方法基本相同, 在 PFLC 发展的早期阶段, PFLC 常会被误认为仅为色谱柱简单的吸附变性的蛋白以防止变性的蛋白形成沉淀, 因此只要将变性的蛋白样品注入到合适的色谱柱上, 然后将目标蛋白洗脱下来, 该变性蛋白分子便会自己在折叠, 或复性. 多年来的实践证明, 情况并非如此, 必须对 PFLC 的实验条件进行优化<sup>[69]</sup>.

#### 3.2.1 固定相

从已报道的用各种 PFLC 方法对蛋白折叠的机理研究发现, 色谱固定相对蛋白质的柱上折叠起到了关键性的作用<sup>[87]</sup>. 因此, 色谱固定相对蛋白质折叠的贡献一直是一个研究的热点. 除色谱固定相的配基性质外, 固定相的基质对蛋白质折叠的影响也很大.

除硅胶基质的各类LC外, 一些聚合物基质<sup>[96]</sup>, 如交联聚甲基丙烯酸缩水甘油脂连续棒为基质的金属螯合色谱柱<sup>[97]</sup>以及甲基丙烯酸缩水甘油脂-甲基丙烯酸丁脂-己二酸二甲基丙烯酸脂三元共聚物合成的基质填料都被相应的研究而用于蛋白质复性与纯化研究<sup>[98]</sup>.

从固定相的配基性质来看, 近来“人工分子伴侣”而成为 PFLC 的固定相的配基是研究的热点之一<sup>[99]</sup>. 多种辅助因子包括聚乙二醇(PEG)、环糊精、精氨酸、脯氨酸、表面活性剂和去垢剂等<sup>[100]</sup>, 一些与蛋白质兼容性好的基质填料, 因均被具有抑制变性蛋白分子间疏水性相互作用、促进蛋白质复性的溶质, 其作用因类似于“人工分子伴侣”而成为PFLC的固定相的配基<sup>[101]</sup>. 自 1994 年 Phadtare 将分子伴侣 GroEL 固定在凝胶基质上实现了对谷氨酰氨合成酶(glutamine synthetase, GS)和微管蛋白(Tubulin, TU)蛋白的复性以来<sup>[102]</sup>, 人工分子伴侣的色谱固定相已被证实有利于蛋白的复性. 此后, Dong 等<sup>[103]</sup>采用固定化 GroEL 的色谱柱对还原变性溶菌酶进行了复性, 详细研究了流动相中的 GuHCl 浓度, 流速, 上样体积和上样浓度等因素对溶菌酶复性的影响, 所得活性回收率为 81%. 虽然分子伴侣是一种高效的促进蛋白折叠剂, 可大大提高蛋白质的复性效率, 将其固定在基质上就可以部分地克服稀释法中同时引入了杂蛋白(即分子伴侣)缺陷, 并可重复使用, 但是分子伴侣价格昂贵, 限制了其应用. Yoshimoto 等用固定化脂质体色谱(imobilized liposome chromatography)对碳酸酐酶、溶菌酶和核糖核酸酶 A 的复性进行了研究, 并认为脂质体可作为一种双水相系统, 具有人工分子伴侣的功能<sup>[104]</sup>. 近期, Hil'chuk 等<sup>[105]</sup>合成了

IFN-alpha2b 单链抗体与纤维素结构域(cellulose-binding domain, CBD)融合蛋白的固定相应用于 IFN-alpha2b 复性与纯化研究, 取得了很好的结果。

这里要特别提到的是用PFLC对含多个二硫键的还原变性蛋白的复性并同时纯化, 一直是分子生物学和PFLC中的难题。在前一篇评述论文的展望中特别提出这一难题及预计的解决方法。一些蛋白一直不能完全折叠, 或根本不能折叠, 尤其是在包涵体超过四对二硫键的蛋白, 在其复性过程中会形成大量错配的二硫键<sup>[77]</sup>。表3列出了出现不同巯基组合的数目, 对于一个含有四对二硫键的蛋白而言, 就存在 105 种配对的可能性。无论是在溶液中, 或是在LC柱上都难以实施蛋白的准确无误的复性或再折叠的。因此, 含多个二硫键的包涵体蛋白的复性仍然存在着很多的困难, 主要是复杂(95%的真核蛋白结构中都含有二硫键)、活性回收率不高(二硫键正确配对率低)、质量回收率低(复性的效率低)的问题。

表3 半胱氨酸的数目与二硫键的数目的组合数

半胱氨酸的数目	二硫键的数目	组合数
4	2	3
6	3	15
8	4	105
10	5	945
12	6	10395

用 PFLC 对含二硫键的包涵体蛋白的复性的另一难题是动力学问题。这就是蛋白质折叠时巯基氧化形成二硫键时很缓慢, 有时长达 8~24 h, 而 PFLC 一般只须 30 min。既便含二硫键的变性蛋白中的几对在 PFLC 中对接位置正确, 因未被完全氧化成牢固的二硫键, 一旦离开 PFLC 环境而流出柱外, 则可能“前功尽弃”, 从而最终影响蛋白的复性效率。

因此, 具体地说含有二硫键的包涵体蛋白在 PFLC 过程: ① 复性后的目标蛋白含量仍很低; ② 不同的蛋白因其本身结构和性质不同, 每一种重组蛋白所选择复性方法差异性非常很大, 这与Chen等<sup>[106]</sup>总结了部分标准蛋白与包涵体蛋白 PFLC 柱上折叠的工作一致的。Wang等<sup>[94]</sup>推测蛋白质的柱上折叠可能与固定相-目标分子之间相互作用力有关。

可喜的是新近周凯等<sup>[95]</sup>以硅胶为基质, 合成了以精氨酸和肌酸为末端的两种新型胍基蛋白折叠色谱固定相, 发现精氨酸型胍基色谱固定相对用 *E. coli* 表达的rhG-CSF进行了复性并同时纯化。在最优条件下, 将质量回收率从原有的用PF-SEC所获得的最高质量回收率 46.1% (见表 2)提高到 68%。从图 3 看出, 在 30 min 内, 通过一步复性纯化便能得到了纯度为 95% 的 rhG-CSF。相比于普通的阴离子色谱固定相, 精氨酸型胍基蛋白折叠色谱固定相不仅能实现一步复性并同时纯化rhG-CSF, 并将质量回收率提高了 20% 以上。

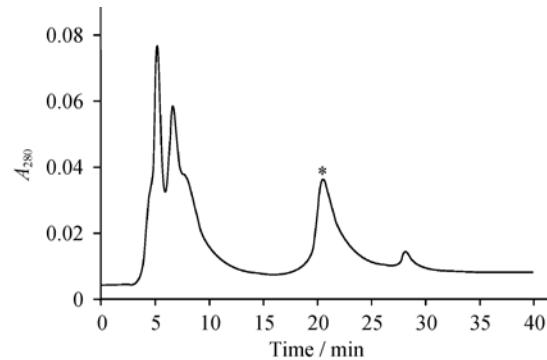


图3 精氨酸型胍基固定相的PF-IEC对rhG-CSF的复性并同时纯化色谱图<sup>[95]</sup>

流动相: A 液: 20 mmol/L Tris.HCl, 3 mol/L 脯, 2.5 mmol/L GSH, 0.8 mmol/L GSSG; B 液: 20 mmol/L Tris.HCl, 1.0 mol/L NaCl, 3 mol/L urea, 2.5 mmol/L GSH, 0.8 mmol/L GSSG; pH 8.0; 流速: 1.5 mL/min; 非线性梯度洗脱: 0~20% B 0~5 min, 20% B~20% B 5~15 min, 20% B~100% B 15~30 min, 100% B~100% B 30~40 min; 检测波长: 280 nm; \*: rhG-CSF

### 3.2.2 流动相

在变性蛋白折叠过程中, 流动相同样也起着非常重要的作用<sup>[107]</sup>。流动相的作用主要表现为: ① 除去变性环境; ② 与固定相一起诱导蛋白的折叠; ③ 提供给变性蛋白一个适宜的、组成连续变化的、可供选择的折叠环境, 并不断修正含有错误三维结构的折叠中间体; ④ 提供蛋白解吸附的能量并使折叠复性的蛋白以脉冲带的形式顺利流出色谱体系。由于在表达蛋白形成的包涵体是高浓度变性蛋白相互聚集的结果, 以往在重组蛋白复性过程中, 通常的策略是

试图降低蛋白质的浓度, 减少蛋白质的相互作用可以抑制包涵体的形成而促进蛋白质的复性。即有效地减少蛋白质之间的相互作用, 提高活性蛋白的产量和蛋白质复性率<sup>[108]</sup>。

在已经报道的大多数文献中, 通过在溶液、柱上复性过程中, 在流动相中添加低分子化合物, 如低浓度变性剂、分子伴侣、表面活性剂等以抑制变性蛋白聚集体的形成, 也能破坏蛋白错误折叠中间体的稳定性, 和增加折叠中间体和未折叠分子的可溶性来提高溶液中、柱上复性产率<sup>[109]</sup>。表 4 列出了一些常用的增加蛋白折叠和抑制蛋白聚集的添加剂。如 Jing Chen 等<sup>[110]</sup> 报道了低浓度脲、盐酸胍与精氨酸在 rhG-CSF 包涵体蛋白复性过程中抑制聚集情况以及共同效应, 当使用混合 2 mol/L 脲液和 0.5 mol/L 精氨酸可以使复性的 rhG-CSF 产量增加 2 倍。在用 PF-IEC 对变性蛋白复性时, 在流动相中有 3~4 mol/L 脲存在时能提高蛋白的复性效率, 如在  $\alpha$ -糜蛋白酶复性时, 发现在流动相中有 1 mol/L 脲时, 可获得最高比活性<sup>[111]</sup>。因此, 可以说, 至今还没有一种复性添加剂适合所有蛋白质, 通常的方法仍然是对某种蛋白质的复性必须反复实验。

**表 4 一些常用的增加蛋白折叠和抑制蛋白聚集的添加剂<sup>[109]</sup>**

化学名称	添加剂量	化学名称	添加剂量
聚乙二醇	0.1~0.4 g/L	L-精氨酸盐酸盐	0.4~0.8 mol/L
脲	2.0~4.0 mol/L	K-谷氨酸	~5 mol/L
盐酸胍	<1.0 mol/L	脯氨酸	~1 mol/L
甲脲	1.5~2.5 mol/L	甘油	20%~40%
乙脲	1.0~2.0 mol/L	山梨醇	20%~30%
甲酰胺	2.5~4.0 mol/L	蔗糖	~1 mol/L
甲酸甲酯	2.0~4.0 mol/L	海藻糖	~1 mol/L

## 4 新技术、新设备和新方法

$\alpha$ -糜蛋白酶是一种有自降解能力的酶。既便是在固态的  $\alpha$ -糜蛋白酶中, 依然会发现有降解的产物—多肽, 变性中间体, 甚至它的聚集体存在以及其的酶活也易测定。这些均为研究蛋白折叠提供了一个合适的体系。以脲变  $\alpha$ -糜蛋白酶被选为一个模型蛋白, 用 PF-HIC 对其进行折叠研究, 发现只有一个稳定的

折叠中间体, 并报告了两种 HIC 固定相对该脲变  $\alpha$ -糜蛋白酶有不同的复性效率<sup>[48]</sup>。还报告了用 SDT 中的三个线性参数对该脲变  $\alpha$ -糜蛋白酶的折叠中间体的定量表征<sup>[112]</sup>。为获得高的蛋白折叠效率, 必须要对蛋白折叠的中间体的性质进行仔细地研究。依据对脲还原变性的  $\alpha$ -糜蛋白酶过程中所产生的稳定的中间体的制备、在线分离和其特性定量表征方法。在此研究的基础上, 发现在流动相中有 1 mol/L 脲时,  $\alpha$ -糜蛋白酶的复性可获得最高比活。一些研究认为, 如储存时间久自然变性的稀贵蛋白就有可能有 PFLC 使其再复性。事实上用 PF-HIC 法对储存了一段时间的溶菌酶的复性后的活性回收率可高达 110%<sup>[113]</sup>。

在 PFLC 的放大研究方面, 继 EBA 被用于重组 LK68 的规模化制备复性并同时纯化外<sup>[114]</sup>之后, Jin 等还用 EBA 于 rhINF- $\gamma$  的复性并同时纯化<sup>[115]</sup>。Park 等<sup>[116]</sup>用 SMB, 以 SEC 为固定相(15.6 ml (1.78 mg/mL), 对溶菌酶进行了复性并同时纯化, 其质量回收率高达 96%, 活性回收率高达 96.2%。工业化的色谱饼(chromatographic cake), 或饼型色谱柱(caky column)曾用于 rhINF- $\gamma$  的复性并同时纯化, 当该色谱饼的厚度仅为 1.0 cm, 直径为 30 cm 时, 700 mL 的 7.0 mol/L 的盐酸胍(Gu.HCl) 样品溶液化(蛋白总量, 2 g), 用连续性泵注入该色谱饼, 在 3~4 h 内一步 PF-HIC 法, 便得到纯度 >95%, 比活 >2×10<sup>7</sup> IU/mg 的产品<sup>[96]</sup>。

在用 PFLC 提高蛋白质量回收率方面, 又有新的进展。无论采用表 2 所列的这四种方法中哪一种, 都存在一个共同的难题, 即用溶于 7.0 mol/L 盐酸胍或 8.0 mol/L 脲溶液的变性蛋白一旦进样到色谱柱上, 在其与水溶液接触就会产生沉淀, 蛋白复性只能从处在单分子状态的溶液的变性态进行复性, 所以形成沉淀后不仅影响蛋白折叠质量回收率和活性回收率, 而且沉淀会堵塞筛板。虽然在形成沉淀的情况下可用色谱饼以正常进行蛋白的复性并同时纯化工作, 但这些沉淀必须定时的清洗<sup>[87]</sup>。吴丹等报告了用高浓度的变性剂溶液在极低流速条件下对色谱柱进行清洗并再进样到色谱柱上以回收重组人干扰素- $\gamma$  (rh-IFN- $\gamma$ )<sup>[71]</sup>。然而, 这须耗较长的时间。为使其该清洗操作能自动进行, 一种在线单柱蛋白二维液相色谱分离装置可使该清洗和回收目标蛋白自动进

行<sup>[117]</sup>.

该仪器装置可使溶解的变性蛋白馏分收集在“样品收集器”, 或定量环组(每个 5 mL, 或 10 mL)中。该清洗操作可在流速极低的条件下, 在夜间进行, 并在该装置的低温 4°C 的样品箱中保存。然后再以该仪器上安装的在线进样装置, 实施在线缓冲溶液交换和再进样到该同一色谱柱上以实施目标蛋白的回收。该整个过程可实行色谱自动化控制由进样、收样系统、缓冲液交换、自动再进样和收样, 所有这些操作均在一个密闭的, 无污染的环境中进行。

近期报道了一种商品化的二维液相色谱柱(two dimensional liquid chromatographic column, 2D column), 用此色谱柱还建立了在线单柱二维色谱(two-dimensional liquid chromatography using a single column, 2DLC-1C)快速分离活性蛋白的LC新方法<sup>[118]</sup>。如图 4 所示的用此一根 2D LC 柱能代替两根HIC柱和弱阳离子交换(WCX)柱使用, 如用该 2D LC 柱对变性蛋白进行复性, 可在不必更换色谱柱的条件下, 用该两种色谱模式对目标蛋白进行复性。

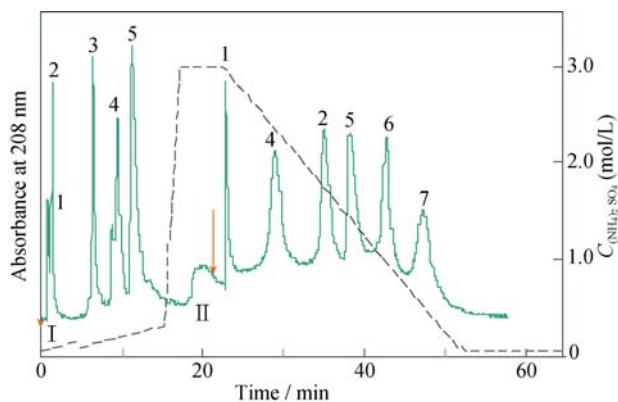


图 4 二次原样进样的IEC-HIC标准蛋白分离图<sup>[119]</sup>

色谱条件: 流速, 1 mL/min; 检测波长, 280 nm;

流动相 A: 3 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.5), 流动相B: 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.5);

非线性梯度, 0~15 min, 100% B~90% B; 15~17.5 min, 90% B~100% A; 17.5~22.5 min, 100% A; 22.5~52.5 min, 100% A~100% B; 第二次进样时间为 22 min;

1, 溶剂峰; 2, 肌红蛋白; 3, 核糖核酸酶; 4, 细胞色素-C; 5, 溶菌酶; 6,  $\alpha$ -淀粉酶; 7, 胰岛素

图中箭头两条表示两次进样处, 虚线为硫酸铵梯度洗脱模式, 其数值以右纵坐标表示

## 5 PFLC 的分子学机理

在前面的评述中, 不同LC方法对蛋白折叠的原理以及用于各种类型LC的从热力学平衡<sup>[93]</sup>和在色谱蛋白梯度洗脱过程中蛋白折叠的过程进行了评述<sup>[11]</sup>。本文着重从分子学机理对蛋白分子折叠机理研究进展进行描述。

### 5.1 蛋白对固定相间的分子定向作用

分子间的相互作用力十分复杂, 但对蛋白分子而言, 均具备是选择性的电荷吸引力(EA)还是非选择性的疏水相互作用(HI)力与固定相相互作用, 这完全取决于固定相表面分子结构及流动相的性质。最新的研究报告<sup>[120]</sup>表明, HI属长程作用力, 但当其与其他分子接近时, 则会以非选择性的吸引力使其靠近从而使其接触表面上的水合分子层被挤压出去, 这就成了计量置换理论(SDT)在HIC中水为置换剂的分子学基础<sup>[107]</sup>。在上述所用的 4 类PFLC 中除 AFC 为专用型色谱外, 而其他三类为通用型色谱。SEC 是依据分子大小进行分离, 分离效果最差, 而 HIC 和 IEC 为两大类作用力性质不同的通用型色谱。

又据最新研究发现, 蛋白在HIC中有IEC保留机理, 而IEC中又有HIC保留机理, 从而蛋白在保留过程中均具有“U”形洗脱曲线及随流动相中盐浓度的变化时, 蛋白与固定相相互作用的分子方向(分子定向作用)的连续改变, 从而改变了保留机理。基于蛋白分子的该二类性质完全不同的分子的定向作用, 当流动相中盐浓度发生从低盐浓度变化到高浓度时, 其SDT中的置换剂便从完全盐到水为置换剂, 这样一个连续的变化过程<sup>[121]</sup>。HIC和IEC是在蛋白分离中使用最广泛的两种LC法。由于氨基酸残基上的电荷可均匀地分布于蛋白质的表面, 在一定的pH值和离子强度的缓冲液中, 既能以适当的强度与阳离子结合也可以适当强度与阴离子结合达到分离。在蛋白折叠的IEC中, 变性蛋白质与固定相间的分子间的电荷作用, 这种EI作用力可导致变性的蛋白吸附在固定相表面, 在洗脱过程中进行吸附-解吸附-再吸附的复性, 并同时被纯化。同样蛋白分子中也含有疏水性氨基酸残基, 可与固定相表面上配基中的疏水性片段以HI作用将蛋白吸附在固定相表面, 在洗脱过

程中进行吸附-解吸附-再吸附的复性，并同时被纯化  
[\[119,121\]](#)

## 5.2 蛋白分子微区结构的形成

首先，以变性蛋白在HIC固定相表面上的再折叠为例以表明色谱固定相对蛋白折叠所起到的关键作用。虽然有过报道一些蛋白分子内部包含水并对分子构象起稳定作用，但大部分天然蛋白质分子的内部并不含有自由水<sup>[87]</sup>。一方面，当蛋白质分子变性时，蛋白质分子必须去折叠。如图5(a)所示的去折叠的蛋白质分子是如何在HIC固定相表面上形成微区结构和水合蛋白质分子的去水合作用。当蛋白分子被高效(HP)HIC固定相表面吸附时，蛋白质分子(蓝圆点)在分子水平上，从固定相表面上获得外加能量，加速了失水过程。天然蛋白质分子的疏水袋是埋在分子的内部。因此，有理由相信蛋白折叠应该是从分子内部的疏水袋开始的，这对形成含有大多数疏水氨基酸残基且结构正确的内部疏水区域是非常重要的。变性蛋白分子通过疏水氨基酸残基(红圆点)与固定相表面结合的特定方向而被吸附在固定相上。这些高密度疏水氨基酸残基就起着使蛋白分子形成具有正

确的三维结构所必需的内部疏水袋的作用<sup>[87]</sup>。

当然，蛋白质分子也有可能形成不正确的三维结构。蛋白分子形成的区域结构和折叠中间体过程的示意图如图5(b)所示。疏水氨基酸残基(红色)结合到HPIHC固定相表面上，亲水氨基酸残基(黄色)则面向流动相。该变性蛋白分子很牢固地结合在固定相表面以形成稳定的络合物，因此即使蛋白质分子还剩余有一些疏水区，但因这些牢牢固定的蛋白分子不能相互作用，当然也就不会发生蛋白质分子间的相互聚集。因为肽链骨架是刚性的，HPIHC固定相提供的能量能够顺着肽链传递到变性蛋白质分子的其他氨基酸残基。这样，最初没有和固定相接触的氨基酸通过氨基酸残基间的相互作用而脱水。已经证明区域结构形成过程中伴随着脱水过程。

图5所示的只是蛋白分子仅被HIC作用的结果，事实上当进行梯度洗脱时，蛋白质U型洗脱曲线<sup>[121]</sup>，是一个HIC和IEC混合机理作用的共同结果。由于不同氨基酸残基所含的疏水性氨基酸残基和等电点各不相同，结果会使不同蛋白在不同盐浓度范围实施其复性，从而可在一个梯度洗脱条件下对多个变性蛋白进行复性并同时分离。

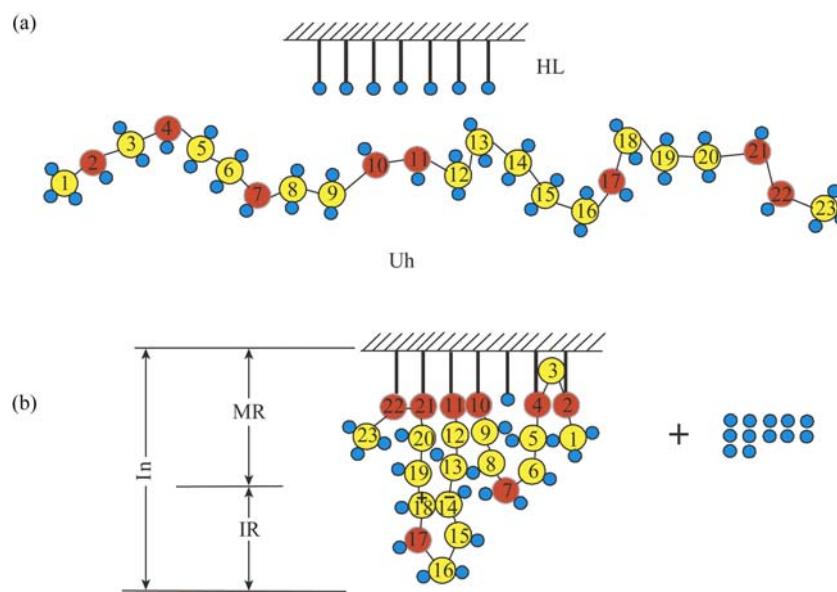


图5 HPIHC中变性蛋白失水和形成蛋白折叠中间体的模型示意图<sup>[87]</sup>

(a) 去折叠的蛋白质分子在 HIC 固定相表面上形成微区结构示意图；

(b) 蛋白分子形成的区域结构和折叠中间体过程示意图

●——疏水氨基酸残基；●——亲水氨基酸残基；●——水分子；——疏水色谱固定相配基

## 6 应用事例

表 1 列出了具有代表性的 30 种新的PFLC方法的应用实例, 涉及PF-HIC、PF-SEC、PF-IEC和PF-AFC 及其中两种以上LC的联用均为蛋白复性并同时纯化。通常, 评价一个从包涵体中获得的有活性蛋白, 最重要的参数就是纯度和复性的效率, 或者说质量回收率(Mass recovery)和生物活性回收率(Specific bioactivity)。但如果是大规模的生产产品, 还要考虑生产成本。PFLC的各类方法也是如此<sup>[122]</sup>。从表 1 中的实例看到, 对于特定的一个包涵体蛋白, 复性的合适条件因蛋白质的不同而变化, 并不能保证复性蛋白质的产量都很高, 要完全复性的确是很难的。另外, 无论选用何种机理的PFLC, 除原文中未列纯度外, 从表 1 看出, 所有复性并纯化后的蛋白的纯度均达到 95%以上, 满足于治疗或诊断化蛋白质纯度的要求。

在表 1 所列的 30 种方法中, 只有第一种 LC 可视其为 PFLC 法。所以, 在这 30 种方法中, PF-AFC 和 PF-IEC 用得最多, 各为 12 和 9 次, 其次是 PF-HIC, 6 次, 而 PF-SEC 仅为 3 次。一个令人吃惊的事实是, 在所有的产品的纯度均满足  $\geq 95\%$  的情况下, 其所用 PFLC 的次数均  $\leq 2$ , 其中有 19 种方法仅用一种 PFLC, 占中数的 65%。与从非 *E. coli* 表达的具有天然蛋白活性的重组蛋白相比较而言, 该源于 *E. coli* 表达的重组蛋白的纯化难度要小得多, 其生产成本当然也要低得多。然而, 由于 PF-AFC 法的特点促使人们构

建了许多带有纯化标记或标签的重组蛋白, 采用一步或多步骤应用于包涵体蛋白的复性与纯化中, 当然, AFC 使用会增大后续成本, 难于进行产业化。所以, PF-IEC 和 PF-HIC 有可能成为 PFLC 的大规模化的方法。

## 7 展望

总而言之, 重组蛋白的复性是一个长期困扰基因工程技术的重大问题, 至今未得到彻底解决。其中这也是制药工业产业化所面临的难题, 这一领域一直是国内外众多研究院所和大公司竞相投资研发的重点之一。因此, 在基因工程制药领域, 如果能够解决重组蛋白的复性效率和生产成本, 将会产生较大的社会经济效益。

在 PFLC 法中, HIC 和 IEC 这两种模式的 PFLC 都具有温和的色谱条件, 接近于人体的生理条件等优点, 可以保持蛋白的生物活性。在许多包涵体蛋白复性与纯化被广泛采用, 常常组合成 HIC-IEC 二维 LC 技术。对含多个二硫键的还原变性蛋白的复性并同时纯化还是分子生物学和 PFLC 中的难题, 虽然在前一篇评述论文的展望中特别提出这一难题及预计的解决方法, 目前也取得了一些进展, 但还有一段很长的路要走。PFLC 的规模化才刚刚开始, 有待更多的工程师去开发和应用。

**致谢** 本工作得到现代分离科学陕西省重点实验室基金(编号: 05JS60)和陕西省分析化学重点学科建设基金资助, 白泉教授对本文的撰写提出了宝贵意见, 特此一并致谢。

## 参考文献

- Yin J C, Li G X, Ren X F, Herrler G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol*, 2007, 127: 335—347 [[DOI](#)]
- Vermasvuori R, Koskinen J, Salonen K, Sirén N, Weegar J, Dahlbacka J, Kalkkinen N, von Weymann N. Production of recombinant HIV-1 nef protein using different expression host systems: A techno-economical comparison. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(1): 95—102 [[DOI](#)]
- Jana S, Deb J K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(3): 289—298 [[DOI](#)]
- Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Postepy Biochem*, 2006, 52(4): 448—456
- Singh S M, Panda A K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*, 2005, 99(4): 303—310 [[DOI](#)]
- Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(11): 1399—1408 [[DOI](#)]

- 7 Clark E D. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12: 202—207
- 8 Gonzalez-Montalban N, Natalello A, García-Fruitós E, Villaverde A, Doglia S M. *In situ* protein folding and activation in bacterial inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(4): 797—802[\[DOI\]](#)
- 9 Swietnicki W. Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Curr Opin Biotech*, 2006, 17: 367—372[\[DOI\]](#)
- 10 Cabrita L D, Bottomley S P. Protein expression and refolding—a practical guide to getting the most out of inclusion bodies. *Biotechnol Annu Rev*, 2004, 10: 31—50[\[DOI\]](#)
- 11 Geng X D, Wang C Z. Protein folding liquid chromatography and its recent developments. *J Chromatogr B*, 2007, 849: 69—80[\[DOI\]](#)
- 12 Singh S M, Panda A K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*, 2005, 99(4): 303—310[\[DOI\]](#)
- 13 Dong X Y, Shi G Q, Li W, Sun Y. Modeling and simulation of fed-batch protein refolding process. *Biotechnol Prog*, 2004, 20(4): 1213—1219[\[DOI\]](#)
- 14 Rinas U, Hoffmann F, Betiku E, Estapé D, Marten S. Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2007, 127(2): 244—257[\[DOI\]](#)
- 15 Das U, Hariprasad G, Ethayathulla A S, Manral P, Das T K, Pasha S, Mann A, Ganguli M, Verma A K, Bhat R, Chandrayan S K, Ahmed S, Sharma S, Kaur P, Singh T P, Srinivasan A. Inhibition of protein aggregation: Supramolecular assemblies of arginine hold the key. *PLoS ONE*, 2007, 2(11): 1176—1185[\[DOI\]](#)
- 16 Li F, Dong P J, Zhuang Q F. Novel column-based protein refolding strategy using dye-ligand affinity chromatography based on macroporous biomaterial. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(20): 4383—4387[\[DOI\]](#)
- 17 Lee S H, Carpenter J F, Chang B S, Randolph T W, Kim Y S. Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure. *Protein Sci*, 2006, 15(2): 304—313[\[DOI\]](#)
- 18 Sonoda H, Sugimura A. Improved solubilization of recombinant human growth hormone inclusion body produced in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(10): 2675—2680[\[DOI\]](#)
- 19 Patwardhan A V, Goud G N, Koepsel R R, Ataa M M. Selection of optimum affinity tags from a phage-displayed peptide library Application to immobilized copper (II) affinity chromatography. *J Chromatogr A*, 1997, 787(1-2,7): 91—100[\[DOI\]](#)
- 20 Zhang Q M, Wang C Z, Liu J F, Wang L L. A novel protein refolding method integrating ion exchange chromatography with artificial molecular chaperone. *Chin Chem Lett*, 2008, 19(5): 595—598[\[DOI\]](#)
- 21 Cabrita L D, Dai W, Bottomed S P. A family of *E. coli* expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 12—20[\[DOI\]](#)
- 22 Christos A K, Saul J S, Christine R D, Christos A. Panagiotidis, chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, 2009, 440(1-2): 9—15[\[DOI\]](#)
- 23 de Marco A. Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nat Protoc*, 2007, 2(10): 2632—2639[\[DOI\]](#)
- 24 Kamna J, Arshad J, Debendra K S. Immobilized chaperones: A productive alternative to refolding of bacterial inclusion body proteins. *Process Biochem*, 2008, 43: 587—597[\[DOI\]](#)
- 25 Haacke A, Fendrich G, Ramage P, Geiser M. Chaperone over-expression in *Escherichia coli*: Apparent increased yields of soluble recombinant protein kinases are due mainly to soluble aggregates. *Protein Expr Purif*, 2009, 64(2): 185—193[\[DOI\]](#)
- 26 Paul S, Singh C, Mishra S, Chaudhuri T K. The 69 kDa *Escherichia coli* maltodextrin glucosidase does not get encapsulated underneath GroES and folds through trans mechanism during GroEL/GroES-assisted folding. *FASEB J*, 2007, 21(11): 2874—2885[\[DOI\]](#)
- 27 Aumüller T, Fischer G. Bioactivity of folding intermediates studied by the recovery of enzymatic activity during refolding. *J Mol Biol*, 2008, 376(5): 1478—1492[\[DOI\]](#)
- 28 de Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2009, 8(1): 26—29[\[DOI\]](#)
- 29 Waugh D S. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(6): 316—320[\[DOI\]](#)
- 30 Zou Z R, Cao L Y, Zhou P, Su Y, Sun Y H, Li W J. Hyper-acidic protein fusion partners improve solubility and assist correct folding of recombinant proteins expressed in *Escherichia coli*. *J Biotech*, 2008, 135: 333—339[\[DOI\]](#)
- 31 朱红裕, 李强. 外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达策略. *过程工程学报*, 2006, 6(1): 150—154
- 32 Wang C Z, Wang L L, Geng X D. Refolding and purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor expressed in *Escherichia coli* using protein folding liquid chromatography. *Chin J Chromatogr*, 2007, 25(4): 514—517[\[DOI\]](#)

- 33 Wang D M, Shi L M. High-level expression, purification, and *In Vitro* refolding of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 157: 1—9 [[DOI](#)]
- 34 Ke C Y, Li J J, Liu Z L, Geng X D. A new approach for characterizing the intermediate feature of  $\alpha$ -chymotrypsin refolding by hydrophobic interaction chromatography. *Int J Mol Sci*, 2009, 10: 616—628 [[DOI](#)]
- 35 Nageswara R P, Gullipalli D, Abani K B. Bacterially expressed recombinant WD40 domain of human Apaf-1. *Protein Expr Purif*, 2009, 67: 53—60 [[DOI](#)]
- 36 Wang C Z, Wang L L, Geng X D. Renaturation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor produced from *Escherichia coli* using size exclusion chromatography. *J Liquid Chromatogr & Related Tech*, 2006, 29: 203—217 [[DOI](#)]
- 37 Shi Z X, He F, Wang L L, Liang Y M, Han H, Wang C Z, Zhao Q, Geng X D. Expression, refolding, and purification of a truncated human Delta-like1, a ligand of Notch receptors. *Protein Expr Purif*, 2008, 59: 242—248 [[DOI](#)]
- 38 吴丹, 高栋, 白泉, 耿信笃. 重组人干扰素 $\gamma$ 的制备与鉴定. *色谱*, 2008, 26(2): 206—211
- 39 Zhang Z H, Du L J, X D, Zhu S Y, Wu M Y, Lu H L, Yu Y, Han W. Expression and purification of bioactive high-purity human midkine in *Escherichia coli*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, 10(2): 79—86 [[DOI](#)]
- 40 Ciaccio N A, Moreno M L, Bauer R L, Laurence J S. High-yield expression in *E. coli* and refolding of the bZIP domain of activating transcription factor 5. *Protein Expression Purif*, 2008, 62: 235—243 [[DOI](#)]
- 41 Wang C Z, Liu J H, Wang L L, Geng X D. Solubilization and refolding with simultaneous purification of recombinant human stem cell factor. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, 144: 181—189 [[DOI](#)]
- 42 Sharma K, Cherish B P V, Sasidhar P, Srinivas V K, Krishna M V, Krishna E. Recombinant human epidermal growth factor inclusion body solubilization and refolding at large scale using expanded-bed adsorption chromatography from *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif*, 2008, 60: 7—14 [[DOI](#)]
- 43 Wang H J, Dai J X, Li B H, Fan K X, Peng L, Zhang D P, Cao Z G, Qian W Z, Wang H, Zhao J, Guo Y J. Expression, purification, and characterization of an immunotoxin containing a humanized anti-CD25 single-chain fragment variable antibody fused to a modified truncated *Pseudomonas exotoxin A*. *Protein Expression Purif*, 2008, 58: 140—147 [[DOI](#)]
- 44 Cherish B P V, Srinivas V K, Krishna M V, Krishna E. Renaturation, purification and characterization of streptokinase expressed as inclusion body in recombinant *E. coli*. *J Chromatogr B*, 2008, 861: 218—226 [[DOI](#)]
- 45 Wu D, Wang C Z, Geng X D. An approach for increasing the mass recovery of proteins derived from inclusion bodies in biotechnology. *Biotechnol Progr*, 2007, 23: 407—413 [[DOI](#)]
- 46 Wang C Z, Wang L L, Geng X D. Renaturation with simultaneous purification of rhG-CSF from *Escherichia coli* by ion exchange chromatography. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21: 1291—1296 [[DOI](#)]
- 47 Wang C Z, Wang L L, Geng X D. Optimization of refolding with simultaneous purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor from *Escherichia coli* by immobilized metal ion affinity chromatography. *Biochem Eng J*, 2009, 43: 197—202 [[DOI](#)]
- 48 Liu Z L, Ke C Y, Li J J, Geng X D. Contribution of solid-phase to urea-denatured  $\alpha$ -chymotrypsin Folding. *Acta Chimica Sinica*, 2007, 65(21): 2411—2416
- 49 Tan H D, Wang J X, Zhao Z B. Purification and refolding optimization of recombinant bovine enterokinase light chain overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif*, 2007, 56: 40—47 [[DOI](#)]
- 50 Chen G, Gong B L, Bai Q, Geng X D. Preparation of medium cation exchange stationary phase of polymeric matrix and their chromatographic properties. *Chin J Chem*, 2007, 25(1): 77—82 [[DOI](#)]
- 51 吴丹, 王超展, 耿信笃. 蛋白折叠液相色谱法中流动相对重组人干扰素 $\gamma$ 质量回收率的影响. *色谱*, 2007, 25(2): 197—202
- 52 Bai Q, Chen G, Liu J B, Geng X D. Renaturation and purification of rhGM-CSF with ion-exchange chromatography. *Biotechnol Prog*, 2007, 23: 1138—1142
- 53 Lin G Z, Lian Y J, Ryu J H, Sung M K, Park J S, Park H J, Park B K, Shin J S, Lee M S, Cheon C I. Expression and purification of His-tagged flavonol synthase of *Camellia sinensis* from *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif*, 2007, 55(2): 287—292 [[DOI](#)]
- 54 Hu Z M, Ma L, Zhou M Q, Gao J M, Wang X N. Refolding and purification of recombinant human VEGF-121 expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *J South Med Univ*, 2006, 26(8): 1083—1086
- 55 Ahmed J A, David A. Lightfoot. Soybean disease resistance protein RHG1-LRR domain expressed purified and refolded from *Escherichia coli* inclusion bodies: Preparation for a functional analysis. *Protein Expression Purif*, 2007, 53: 346—355 [[DOI](#)]
- 56 Li M, Huang D. On-column refolding purification and characterization of recombinant human interferon- $\lambda$  1 produced in *Es-*

- cherichia coli*. Protein Expression Purif, 2007, 53: 119—123 [[DOI](#)]
- 57 李丹, 李立文, 孟国林, 毕龙, 孙嘉荣, 刘民, 胡蕴玉. BIG-3 的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备与鉴定. 科学技术与工程, 2007, 7(4): 3519—3522
- 58 Wang C Z, Wang L L, Geng X D. High recovery refolding of rhG-CSF from *escherichia coli* using urea gradient size exclusion chromatography. Biotechnol Progr, 2008, 24(1): 209—213 [[DOI](#)]
- 59 温茜, 马骊, 苏瑾, 罗微, 王小宁. 小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的表达、纯化与鉴定. 南方医科大学学报, 2006, 26(8): 1124—1127
- 60 Xu J S, Zhu Z, Duan P. Cloning, expression, and purification of a highly immunogenic recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) chimeric peptide. Protein Expression Purif, 2006, 50: 163—170 [[DOI](#)]
- 61 Wang L L, Wang Z, Geng X D. Refolding with simultaneous purification of recombinant human stem cell factor expressed in *Escherichia coli* by high performance hydrophobic interaction chromatography. Biotechnol Lett, 2006, 28: 993—997 [[DOI](#)]
- 62 Studier F W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif, 2005, 41(1): 207—234 [[DOI](#)]
- 63 Fu W, Lin J, Cen P. Enhancement of 5-aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using batch and fed-batch culture system. Bioresour Technol, 2008, 99(11): 4864—4870 [[DOI](#)]
- 64 Huang J H, Hsu W H, Chen C W. Effects of culturing conditions on production of D-hydantoinase from recombinant *Escherichia coli*. J Microbiol Immunol Infect, 2004, 37(6): 313—321
- 65 Wang F W, Liu Y D, Chen J, Su Z G. Chromatographic refolding of proteins: Molecular action and column control. China Particuology, 2005, 3(6): 337—342 [[DOI](#)]
- 66 Li R Y, Cheng C Y. Investigation of inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* with a bioimaging system. J Biosci Bioeng, 2009, 107(5): 512—515 [[DOI](#)]
- 67 Parul G, Anand G, Saroj M, Tapan K C. Enhancement of over expression and chaperone assisted yield of folded recombinant aconitase in *Escherichia coli* in bioreactor cultures. J Biosci Bioeng, 2009, 107(2): 102—107 [[DOI](#)]
- 68 Kischnick S, Weber B, Verdino P, Keller W, Sanders E A, Anspach F B, Fiebig H, Cromwell O, Suck R. Bacterial fermentation of recombinant major wasp allergen Antigen 5 using oxygen limiting growth conditions improves yield and quality of inclusion bodies. Protein Expr Purif, 2006, 47(2): 621—628 [[DOI](#)]
- 69 Dasari V K R, Are D, Jogganapally V R, Mangamoori L N, Adibhatla K S B R. Optimization of the downstream process for high recovery of rhG-CSF from inclusion bodies expressed in *Escherichia coli*. Process Biochem, 2008, 43(5): 566—575 [[DOI](#)]
- 70 Wang C Z, Liu J H, Wang L L, Geng X D. Solubilization and refolding with simultaneous purification of recombinant human stem cell factor. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 144(2): 181—189
- 71 Bailey S M, Blum P H, Meagher M M. Improved homogenization of recombinant *Escherichia coli* following pretreatment with guanidine hydrochloride. Biotechnol Prog, 1995, 11(5): 533—539 [[DOI](#)]
- 72 Patra A K, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg L C, Panda A K. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2000, 18(2): 182—192 [[DOI](#)]
- 73 Valente C A, Monteiro G A, Cabral J M, Fevereiro M, Prazeres D M. Optimization of the primary recovery of human interferon alpha2b from *Escherichia coli* inclusion bodies. Protein Expr Purif, 2006, 45(1): 226—234 [[DOI](#)]
- 74 Špela P, Vladka G P, Radovan K, Menart V. Medium pH affects size and density of inclusion bodies resulting in different extractability of the target protein. J Biotech, 2007, 131(2): S188—S195
- 75 Marston F A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Biochem J, 1986, 240(1): 1—12
- 76 Mitraki A, King J. Amino acid substitutions influencing intracellular protein folding pathways. FEBS Lett, 1992, 307(1): 20—25 [[DOI](#)]
- 77 Geng X D, Wang L L. Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs. J Chromatogr B, 2008, 866: 133—153 [[DOI](#)]
- 78 Ventura S, Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. Trends in Biotechnology, 2006, 24(4): 179—185 [[DOI](#)]
- 79 Carrió M M, Villaverde A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. FEBS Letters, 2001, 489(1): 29—33 [[DOI](#)]
- 80 Godoy-Ruiz R, Henry E R, Kubelka J, Hofrichter J, Muñoz V, Sanchez-Ruiz J M, Eaton W A. Estimating free-energy barrier heights for an ultrafast folding protein from calorimetric and kinetic data. J Phys Chem B, 2008, 112(19): 5938—5949 [[DOI](#)]
- 81 Akmal A, Muñoz V. The nature of the free energy barriers to two-state folding. Proteins, 2004, 57(1): 142—152 [[DOI](#)]
- 82 Geng X D, Zhang Y J. Caky chromatographic column and the method for producing it and its applications, US patent 7, 208, 085 B2, 2007
- 83 Geng X D, Zhang Y J. A kind of Chromatographic Cake and its Manufacturing Method and Application, EP 1 396 721 B1, 2008

- 84 耿信笃, 张静, 卫引茂. 在液-固界面上变性蛋白折叠自由能的测定. 科学通报, 1999, 44(19): 2046—2049
- 85 Meinke J H, Hansmann U H. Free-energy-driven folding and thermodynamics of the 67-residue protein GS-alpha(3)W-A large-scale Monte Carlo study. *J Comput Chem*, 2009, 4 [Epub ahead of print]
- 86 耿信笃, 白泉, 王超展. 蛋白折叠液相色谱法. 北京科学出版社, 2006. 1—8
- 87 Geng X D, Bai Q. Mechanism of simultaneously refolding and purification of proteins by hydrophobic interaction chromatographic unit and applications. *Sci Chin, Ser B: Chem*, 2002, 45: 655—669 [[DOI](#)]
- 88 Sharma K, Babu P V, Sasidhar P, Srinivas V K, Mohan V K, Krishna E. Recombinant human epidermal growth factor inclusion body solubilization and refolding at large scale using expanded-bed adsorption chromatography from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2008, 60(1): 7—14 [[DOI](#)]
- 89 Schlegl R, Iberer G, Machold C, Necina R, Jungbauer A. Continuous matrix-assisted refolding of proteins. *J Chromatogr A*, 2003, 1009(1-2): 119—132 [[DOI](#)]
- 90 Gueorguieva L, Vallejo L F, Rinas U, Seidel-Morgenstern A. Discontinuous and continuous separation of the monomeric and dimeric forms of human bone morphogenetic protein-2 from renaturation batches. *J Chromatogr A*, 2006, 1135(2): 142—150 [[DOI](#)]
- 91 Verhees P, ten Haaf M R, Lindner N, Verrrips C T, de Haard J J. Beneficial properties of single-domain antibody fragments for application in immunoaffinity purification and immuno-perfusion chromatography. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1624(1-3): 21—28
- 92 Geng X D, Bai Q, Zhang Y J, Li X, Wu D. Refolding and purification of interferon-gamma in industry by hydrophobic interaction chromatography. *J Biotechnol*, 2004, 113: 137—149 [[DOI](#)]
- 93 马清钧. 生物技术药物. 北京: 化学工业出版社, 2002. 195—199
- 94 王超展. 重组牛朊病毒和人粒细胞集落刺激因子的色谱复性并同时纯化. 博士学位论文. 西安: 西北大学化学系, 2004. 29—42
- 95 周恺. 新型肽基蛋白折叠色谱固定相的合成及其对 rhG-CSF 的复性纯化研究. 硕士学位论文. 西安: 西北大学化学与材料科学学院, 2009. 31—43
- 96 Gong B L, Ke C Y, Geng X D. Preparation of weak cation exchange packings based on monodisperse poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) beads and their chromatographic properties. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 375(6): 769—774
- 97 Wei Y M, Huang X D, Liu R X, Shen Y H, Geng X D. Preparation of a monolithic column for weak cation exchange chromatography and its application in the separation of biopolymer. *J Sep Sci*, 2006, 29(1), 5—13 [[DOI](#)]
- 98 Gong B L, Wang L L, Wang C Z, Geng X D. Preparation of hydrophobic interaction chromatographic packings based on monodisperse poly (glycidylmethacrylate-co- ethylenedimethacrylate) beads and their application. *J Chromatogr A*, 2004, 1022: 33—39 [[DOI](#)]
- 99 Chaudhuri T K, Verma V K, Maheshwari A. GroEL assisted folding of large polypeptide substrates in *Escherichia coli*: Present scenario and assignments for the future. *Prog Biophys Mol Biol*, 2009, 99(1): 42—50 [[DOI](#)]
- 100 Bajorunaite E, Cirkovas A, Radzevicius K, Larsen K L, Sereikaite J, Bumelis V A. Anti-aggregatory effect of cyclodextrins in the refolding process of recombinant growth hormones from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Int J Biol Macromol*, 2009, 44(5): 428—434 [[DOI](#)]
- 101 Wang F, Liu Y, Ma G, Su Z. Glycerol-Assisted hydrophobic interaction chromatography improving refolding of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, Jan 25. [Epub ahead of print]
- 102 Phadtare S, Fisher M T, Yarbrough L R. Refolding and release of tubulins by a functional immobilized GroEL column. *BBA-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1994, 1208(1): 189—192 [[DOI](#)]
- 103 Dong X Y, Yang H, Sun Y. Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. *J Chromatogr A*, 2000, 878(2): 197—204 [[DOI](#)]
- 104 Yoshimoto M, Shimanouchi T, Umakoshi H, Kuboi R. Immobilized liposome chromatography for refolding and purification of protein. *J Chromatogr B*, 2000, 743(1-2): 93—99 [[DOI](#)]
- 105 Hil'chuk P V, Okuniev O V, Pavlova M V, Irodov D M, Horbatuk O B. Obtaining of ScFv-CBD fusion protein and its application for affinity purification of recombinant human interferon alpha2b. *Ukr Biokhim Zh*, 2006, 78(2): 52—61
- 106 Chen Y, Leong S S. Adsorptive refolding of a highly disulfide-bonded inclusion body protein using anion-exchange chromatography. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(24): 4877—4886 [[DOI](#)]
- 107 耿信笃. 计量置换理论及应用. 北京: 科学出版社, 2004. 265—284
- 108 Chen J, Liu Y D, Wang Y J, Ding H, Su Z G. Different effects of L-arginine on protein refolding: suppressing aggregates of hydrophobic interaction, not covalent binding. *Biotechnol Prog*, 2008, 24(6): 1365—1372 [[DOI](#)]

- 109 Yasuda M, Murakami Y, Sowa A, Ogino H, Ishikawa H. Effect of additives on refolding of a denatured protein. *Biotechnol Prog*, 1998, 14(4): 601—606 [[DOI](#)]
- 110 Chen J, Liu Y D, Li X N, Wang Y J, Ding H, Ma G H, Su Z G. Cooperative effects of urea and L-arginine on protein refolding. *Protein Expr Purif*, 2009, 66(1): 82—90 [[DOI](#)]
- 111 Liu Z L, Ke C Y, Geng X D. Investigation of the folded intermediates of the urea-unfolded  $\alpha$ -chymotrypsin by protein folding liquid chromatography. *J Nanchang University (Natural science)*, 2006, 30: 572—573
- 112 Liu Z L, Ke C Y, Geng X D. Influence of high-performance hydrophobic interactionm chromatographic stationary phase on refolding of urea-denatured  $\alpha$ -chymotrypsin, *Chin J Anal Chem.*, 2009, 28: 34—37
- 113 耿信笃, 白泉, 王超展. 蛋白折叠液相色谱法. 北京: 科学出版社, 2006. 175—177
- 114 Choi W C, Kim M Y, Suh C W, Lee E K. Solid-phase refolding of inclusion body protein in a packed and expanded bed adsorption chromatography. *Process Biochem*, 2005, 40: 1967—1972 [[DOI](#)]
- 115 Jin T, Guan Y X, Yao S J, Lin D Q, Cho M G. On-column refolding of recombinant human interferon-gamma inclusion bodies by expanded bed adsorption chromatography. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(4): 755—760 [[DOI](#)]
- 116 Park B J, Lee C H, Mun S Y, Koo Y M. Novel application of simulated moving bed chromatography to protein refolding. *Process Biochem*, 2006, 41: 1072—1082 [[DOI](#)]
- 117 张会强. 在线蛋白二维液相色谱仪及应用. 硕士学位论文. 西安: 西北大学化学与材料科学学院, 2009. 31—43
- 118 柯从玉, 耿信笃. 活性蛋白液相色谱快速分离新方法. 2008, 53(5): 614—616
- 119 Geng X D, Ke C Y, Chen G, Liu P, Wang F, Zhang H Q, Sun X. On-line separation of native proteins by two-dimensional liquid chromatographyusing a single column. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 3553—3562 [[DOI](#)]
- 120 Despa F, Berry R S. Hydrophobe-water interactions: Methane as a model. *Biophys J*, 2008, 95(9): 4241—4245 [[DOI](#)]
- 121 Liu P, Yang H Y, Geng X D. Mixed retention mechanism of proteins in week anion-exchange chromatography. *J Chromatogr A*, 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.06.080, in press
- 122 Walsh G. Proteins biochemistry and biotechnology. John Wiley and Sons Ltd, 2001. 104—120

## Recent development of the expression, renaturation and purification of proteins sourcing from *E. coli*

WANG LiLi & GENG XinDu<sup>\*</sup>

Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecular Chemistry of Ministry of Education, Institutur of Modern Separation Science, Northwest University, Shaanxi Key laboratory of Modern Separation Science, Xi'an 710068, China

**Abstract:** The development of the expression, renaturation and purification of proteins sourcing *E. coli* by protein folding liquid chromatography (PFLC) in past two years was briefly reviewed. PFLC has been widely employed for the separation and purification of inclusion body proteins. Besides the separation of the target protein from impure proteins, it has a character that the inclusion body proteins can be simultaneous renaturation. The preparative method of the most novel proteins employed in the modern biotechnology is generally carried out by liquid chromatography. Moreover, PFLC is more flexible for accomplishing the purification of protein producing from *E. coli*. When PFLC is used for enlarging protein purification to large scale, the expense of producing proteins may be greatly decreased. The review paper includes the expression of the target proteins, the sample pre-treatment of inclusion bodies, the wide range of applications. It also contains the process optimization, new technology, new methods, new equipments, and the molecular mechanism during PFLC process, some examples, and PFLC in future.

**Keywords:** *Escherichia coli*, protein folding liquid chromatography, protein renaturation, protein purification, liquid chromatography, biotechnology