

技术与方法

功率超声方法对蛋白质包涵体的解聚*

王进 华子春 方勇 唐卫东 朱德煦

(南京大学生物化学系, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

冯若 朱昌平 黄金兰 陈兆华

(南京大学近代声学开放实验室, 南京 210093)

摘要 用低功率超声波辐照方法, 实现了在低浓度变性剂 (4 mol/L 尿素) 中对大肠杆菌体系表达产物缩短的人巨噬细胞集落刺激因子 (hM-CSF) 包涵体的解聚, 以期改进普遍采用的强烈变性剂 (8 mol/L 尿素) 溶解包涵体方法. 超声处理后的 SDS-PAGE 在分子量 17 000 上显示了与 8 mol/L 尿素溶解结果相同的条带. 表现出功率超声方法在基因工程包涵体解聚中的应用前景.

关键词 包涵体, 功率超声, 解聚

用原核细胞表达的基因工程产物普遍存在包涵体问题, 即表达产物蛋白质分子未能正确折叠而相互聚集形成稳定不溶性的多肽聚集微粒——包涵体^[1]. 为获得有活性的蛋白质产品, 关键之一是解聚包涵体. 目前普遍采用的方法是用强烈变性剂, 如用 6~8 mol/L 尿素或 7 mol/L 盐酸胍来溶解包涵体^[2]. 而高浓度变性剂的应用使得随后的蛋白质复性过程更为复杂, 成为基因工程研究中普遍面临的困难. 同时, 大量的试剂材料消耗和复杂的工艺过程还导致基因工程产品成本的大幅度提高. 本文首次采用低功率超声波辐照方法^[3]实现了在低浓度变性剂 (4 mol/L 尿素) 中对大肠杆菌体系表达产物缩短的人巨噬细胞集落刺激因子 (hM-CSF) 包涵体的解聚. 天然 hM-CSF 是一同源二聚体糖蛋白, 共含 18 个半胱氨酸, 表达产物还原状态下 SDS-PAGE 显示的单体分子量为 17 000^[4].

1 材料及方法

1.1 超声辐照系统

由频踪仪、功率放大器等输出可调节的电

信号激励变幅杆式 28.2 kHz 超声换能器产生超声辐照 (图 1).

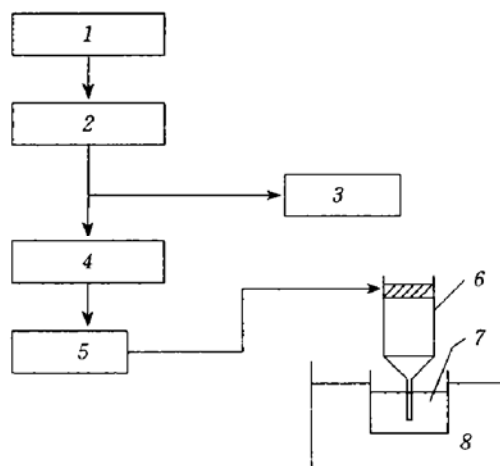


图1 超声辐照系统框图

1: 信号源; 2: 衰减器; 3: 监视器; 4: 放大器; 5: 适配器; 6: 超声换能器 (28.2 kHz); 7: 样品池; 8: 控温水浴 (冰水混和液).

1.2 hM-CSF 包涵体粗品

在大肠杆菌中发酵表达, 经超声破碎, 离心取沉淀^[4,5].

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1994-12-05, 修回日期: 1995-02-28

1.3 SDS-PAGE 凝胶电泳

样品缓冲液 125 mmol/L Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 10%甘油, 0.02%溴酚蓝, 4% 2-巯基乙醇; 5%堆集胶, 15%分离胶; 0.25%考马斯亮蓝 R250 染色; 标准蛋白(上海生物化学研究所东风生化技术公司): 磷酸化酶 B 94 000, 牛血清白蛋白 67 000, 肌动蛋白 43 000, 碳酸酐酶 30 000, 烟草花叶病毒外壳蛋白 17 500.

1.4 方法

用 4 mol/L 尿素清洗 hM-CSF 包涵体粗品数次以溶去膜蛋白及其他杂蛋白, 将清洗后的包涵体制成浓度为 10 g/L 的包涵体悬浮液(4 mol/L 尿素, 0.1 mol/L Tris-HCl, 50 mmol/L 2-巯基乙醇, pH8.0). 超声辐照(电)功率分别为 35 W 和 45 W, 频率为 28.2 kHz, 超声处理过程中样品置于 0℃ 水浴中, 辐照时间以混浊的悬浮液样品转变成透明液为度.

2 结果与讨论

将包涵体悬浮液受辐照处理后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 并以包涵体用 8 mol/L 尿素溶解的溶解液作对照, 即图 2 中第 5 列, 第 4 列为标准分子量蛋白, 第 1, 2, 3 列分别是对样品进行 45 W (电功率) 超声波辐照 6 min, 35 W 辐照 20 min 和 35 W、10 min 辐照的超

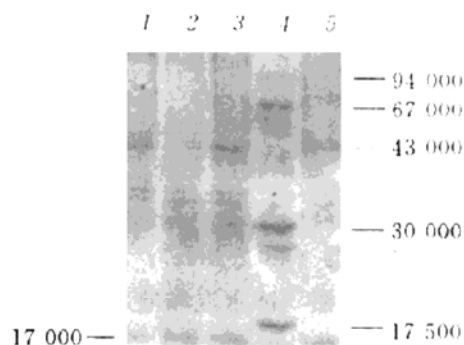


图 2 包涵体样品经不同条件超声波解聚后的 SDS-PAGE 分析

声处理结果. 电泳结果显示, 在 17 000 处均有清晰的条带, 表明包涵体已被松散, 打开, 成为可溶性的 hM-CSF 单体分子. 第 2 列显示出现了小分子量产物, 表明一定功率下过长时间的超声辐照引起了肽链的断裂. 试验表明, 小功率超声波对样品悬浮液无明显作用, 因此控制合适的超声辐照剂量对解聚效果是非常重要的.

超声波对包涵体的作用机理目前尚未见有报道, 我们初步认为包涵体的解聚主要与超声的空化效应^[3]有关, 由溶于包涵体悬浮液中的空气构成空化核, 当辐照超声强度超过一定阈值时, 空化核被激活进行非线性振荡或经历膨胀、被压缩直至崩溃的过程. 空化效应伴随产生的冲击波、声流等, 破坏包涵体中蛋白质分子的链内及链间次级键, 从而使包涵体松散、解聚而释放出蛋白质分子. 当空化效应增强时会导致化学键的断裂, 产生小分子物质. 也有人认为声场中大分子化学键的断裂是由于被超声波加速了的溶剂小分子与大分子之间的磨擦力引起的.

实验结果表明适当剂量的超声辐照可使包涵体在低浓度变性剂中解聚而溶解为蛋白质分子, 避免了高浓度变性剂的使用而简化表达产物的后处理过程. 显示了功率超声方法应用于基因工程中包涵体解聚技术的前景.

参 考 文 献

- 1 Taylor G, Hoare M, Gray D R *et al.* Bio/Technol. 1986; 4: 553
- 2 Fischer B, Sumner I, Goodenough P. Biotechnol Bioengin. 1993; 41: 3
- 3 冯 若, 李化茂. 声化学及其应用. 合肥: 安徽科技出版社, 1992: 68
- 4 Yamanishi K, Takahashi M, Nishida T *et al.* J Biochem. 1991; 109: 404
- 5 Maniatis T. Molecular cloning; a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989: 17. 3

The Dissociation of Protein Inclusion Bodies by High Intensity Ultrasound. Wang Jin, Hua Zichun, Fang Yong, Tang Weidong, Zhu Dexu (Department of Biochemistry, Nanjing University, National Key Laboratory of Phar

maceutical Biotechnology, Nanjing 210093, China); Feng Ruo, Zhu Changping, Huang Jinlan, Chen Zhaohua (*Modern Acoustics Open Laboratory*, Nanjing University, Nanjing 210093, China).

Abstract Human macrophage colony stimulating factor (hM-CSF) inclusion bodies expressed in *E. coli* were dissociated successfully by high intensity ultrasound in a suspension of

4 mol/L urea instead of using 8 mol/L urea as solvent. The SDS-PAGE of suspension samples processed by ultrasound shows the same band at 17 000 as that solubilized by 8 mol/L urea. The results show the possibility of developing a new ultrasonic technique for the dissociation of inclusion bodies.

Key words inclusion bodies, high intensity ultrasound, dissociation

长臂生物素对硝基苯酯的合成

王升启 朱宝珍

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 以羰基二咪唑为催化剂, 生物素与 6-氨基己酸甲酯反应生成生物素-6-氨基己酸甲酯, 该化合物通过酸碱萃取与原料分离, 皂化后生成生物素氨基己酸. 生物素氨基己酸在吡啶存在下与三氟乙酸对硝基苯酯进行转酯反应即得生物素对硝基苯酯. 最后经光谱、色谱及核酸杂交证实了长臂生物素对硝基苯酯的化学结构和生物学活性.

关键词 生物素对硝基苯酯, 核酸杂交, 羰基二咪唑

生物素活泼酯类化合物广泛用于核酸、蛋白质等生物分子的非放射性标记. 其标记物不仅可用作各种正常、异常基因和蛋白质检测的探针或信号分子, 而且近年来还被用于特定核酸和蛋白质的亲和色谱分离或分析^[1~5]. 目前普遍采用的生物素活泼酯是长臂和短臂琥珀酰亚胺酯. 由于合成路线的限制, 这两种化合物不仅合成及纯化困难, 而且产率和反应活性也较低. 短臂生物素对硝基苯酯的合成虽然在一定程度上解决了反应活性和纯化等问题, 但由于立体位阻的原因, 其标记物检测的灵敏度不如长臂活泼酯高. 为解决上述问题, 我们合成了长臂生物素对硝基苯酯.

1 材料和方法

1.1 材料

生物素为 Fluka 公司产品; 三氟醋酐为

Aldrich 公司产品; 对硝基苯酚为北京星光化工厂产品; 6-氨基己酸为北京化工厂产品; 羰基二咪唑为 Sigma 公司产品. 除特殊说明外所用试剂均为分析纯.

元素分析仪为 CARLO ERBA 1106 型, 质谱仪为 MAT711 型, 核磁共振仪为 JNM GX-400 型. 熔点用毛细管法测定 (温度计未校).

1.2 方法

1.2.1 氨基己酸甲酯 (I) 的合成^[6]: 于 -5°C 将 8 ml SOCl_2 搅拌下滴入 60 ml 无水甲醇中, 5 min 后, 加入 13 g 6-氨基己酸, 加完后逐渐升温至 40°C , 继续反应 4 h. 反应完毕, 减压蒸去甲醇. 残留物用甲醇-乙醚重结晶得化合物 (I) 16.4 g (90.1%).

熔点 (m. p.): $124\sim 125^{\circ}\text{C}$

质荷比 (m/e): 181.5 (基峰)