

不同。而且这些方法尚处于开发的早期阶段,基本上仍是经验性的。有时由于保密原因,有些数据也不完整,但可以制定一些一般的标准来进行比较。这些标准应当包括: a. 稳定性至少要增加 1—3 个数量级; b. 应对各种酶失活因素(物理、化学及生物学因素)都有保护作用; c. 稳定化不应减少酶活力或改变酶的专一性; d. 稳定化方法应适合于各类蛋白质; e. 方法应在体内、体外都适用; f. 从经济角度看,方法应具有放大的潜力。

从这些标准看,随机共价修饰的方法(如将 PEG 连到酶上)显然不能令人满意。蛋白质工程法和选择抗体保护法更符合这些标准,具有普遍性。从难易程度和花费上看,后者显然优于前者。疏水固定化法虽然刚刚用于酶稳定研究,但具有普遍性。固定化对酶活力影响很小,更主要的是,此法简单易行,一般的实验室容易做到。我们相信,增加酶稳定性的新方法和新观念将进一步鼓励旨在这方面研究、并在实践中获得应用。

参 考 文 献

- 1 Tombs M P. *J Appl Biochem*, 1985; 7: 3
- 2 Oshima T. *J Biol Chem*, 1982; 257: 9913
- 3 D'Souza V T *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 673
- 4 Bryan P *et al. J Cell Biochem UCLA Symp Mol Cell Biol*, 1989; Suppl. 13A: 66
- 5 Luisi P L. *Angew Chem Int Edn Engl*, 1985; 24: 349
- 6 Srivastava R S. *et al. Biotech Bioeng*, 1987; 29: 901
- 7 Zaks A *et al. Science*, 1984; 224: 1240
- 8 Martinek K *et al. Biochim Biophys Acta*, 1977; 485: 13
- 9 Mozhaev V V *et al. Enzyme Microb Technol*, 1984; 6: 50
- 10 Shami E Y *et al. TIBTECH* 1989; 7: 186
- 11 Wetzel R. *Protein Eng*, 1988; 2: 169
- 12 Cheetham J. *Protein Eng*, 1988; 2: 170
- 13 Otero C *et al. Appl Biochem Biotech*, 1988; 19: 163
- 14 Klivanov A M. *Anal Biochem*. 1979; 93: 1
- 15 Cao S G. *et al. Acta Pharm Sinica*, 1990; 25(10): 732
- 16 Hollecker M *et al. Biochim Biophys Acta*, 1982; 701: 359
- 17 Mozhaev V V *et al. Vestn MGU (Bull. Moscow State Univ.) Ser Khim.* 1986; 27: 304
- 18 Shikshnis V A *et al. Dokl Akad Nauk SSSR*, 1986; 288: 1508
- 19 Mozhaev V V *et al. Eur J Biochem*, 1988; 173: 147
- 20 Martinek K *et al. Adv Enzymol*, 1985; 57: 179

原 核 基 因 工 程 中 的 包 涵 体

徐 明 波 姚 志 建

(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)

提 要

包涵体是原核基因工程的特有产物,其中表达的蛋白产物是以无活性、不溶解的形式存在。包涵体特性、蛋白回收及活性恢复是生物工程研究的重要课题。文章对包涵体特性、回收及产物提取、重组蛋白的复性及纯化作了综述。

关键词 包涵体,蛋白复性,基因工程产物

十几年前,人们制备蛋白质的方法还主要依靠从天然组织或细胞中提取。而现在人们可以通过基因工程的方法,在细菌中生产大量有价值的活性蛋白和多肽。然而,许多蛋白质在高表达状态下是以不溶解、无活性的形式存在,它们在细菌胞浆中聚合形成包涵体。对包涵体特性、包涵体蛋白回收以及活性的恢复是生物

工程的重要课题。

1 重组大肠杆菌中包涵体的特性

大肠杆菌中的包涵体由于其密度高,折光性强很容易用相差显微镜或暗视野显微镜观察

到。一般呈球形结构^[1], 主要成分为表达产物, 其它成分包括 RNA 聚合酶的四个亚基, 外膜蛋白 OmpC、OmpF 和 OmpA, 16S 和 23S rRNA, 环状和缺口质粒 DNA 以及脂质、肽聚糖、脂多糖等^[2], 表达产物所占比例与克隆基因、启动子、质粒载体、发酵条件及培养基成分有关。包涵体的形成原因尚不完全清楚, 其可能原因如表 1 所示。

表 1 大肠杆菌包涵体形成的可能原因

尚未得到证据	被大肠杆菌识别为异体蛋白 产生速率高, 无足够时间使多肽链折叠
已获部分证据	胞质中表达产物浓度高形成非特异沉淀 细胞内的还原环境使二硫键不能形成而影响蛋白折叠 缺乏哺乳动物细胞的翻译后修饰酶 缺乏蛋白折叠的酶 (如 PDI、PPI、硫氧化还原蛋白) 肽链缺乏屈曲性和高级结构不稳定

包涵体的形成除以上与宿主有关的原因外, 与表达产物的性质及结构也有关。某些大肠杆菌自身的蛋白在高表达状态下也能形成包涵体。分子间二硫键的错配可促使包涵体形成, 但某些分子内不含半胱氨酸的蛋白仍能形成包涵体。已有证据表明, 蛋白分子中脯氨酸的含量与包涵体的形成直接相关^[3]。蛋白高级结构与包涵体形成的关系还不清楚。

2 包涵体的回收及产物提取

回收包涵体通常首先将其与细胞壁、膜片和胞内蛋白分离。细胞破碎完全与否直接影响包涵体回收的纯度。而细胞破碎的难易通常与宿主细胞种类及生长状态有关, 高压匀浆、加砂研磨以及超声粉碎等方法一次很难使细胞完全破碎, 这样便使部分未破碎细胞混入包涵体, 给后期纯化带来困难。由于包涵体对上述的破碎方法均不敏感, 故可对含有包涵体的大肠杆菌进行反复几次的匀浆和超声, 并经离心和悬浮清洗, 这种反复的匀浆和超声可使包涵体与细胞碎片及可溶性蛋白完全分离^[4]。

包涵体与胞浆蛋白的分离可用一般的液固分离方法如离心和过滤等, 但包涵体与细胞碎

片的分离具有一定的难度。文献曾经报告, 5000 g, 离心 10min 即可使大多数包涵体沉淀。工业规模的连续离心方法更有利于包涵体的回收, 已有作者给出了大规模纯化包涵体的经验公式^[5]。差速离心方法尽管可解决部分包涵体的纯化^[6], 但在实践中, 大多数包涵体与细胞碎片粘连在一起, 很难分离, 这种现象的原因尚不清楚。

酚抽提^[7]和硫酸链霉素沉淀^[8]等方法, 可去除包涵体中的大部分核酸; 而破碎包涵体以前用温和的去垢剂 (如 Triton X-100) 或低浓度变性剂 (尿素) 等处理可去除脂质及部分膜蛋白。经过这些处理后, 再进行包涵体的溶解将会给后期的纯化带来许多方便。但以上操作单元如差速离心、沉淀和洗涤等方法成本较高, 因而当表达产物含量很高或表达产物与杂质蛋白的理化性质相差悬殊时, 有人主张将匀浆后的离心沉淀物直接溶解纯化^[9]。

表 2 萃取包涵体蛋白的方法

试 剂	应用实例
盐酸胍 (5—8mol/L)	胰岛素 A、B 链 牛生长激素 尿激酶
尿素 (6—8mol/L)	γ -干扰素 牛凝乳酶原
SDS	β -干扰素 白细胞介素-2
碱性 pH (>9.0)	牛凝乳酶原 牛生长激素
乙腈/丙酮	T4 reg A 蛋白

表 2 列出了常用于萃取包涵体蛋白的方法, 它们溶解包涵体的原理和效果各异。变性剂如尿素和盐酸胍是通过离子间的相互作用, 使蛋白变性、高级结构破坏; 极端 pH 可使肽侧链之间分离; 而去垢剂和有机溶剂破坏了肽侧链间的疏水作用。大多数的溶解试剂如盐酸胍、酸碱溶液或离子性去垢剂溶解的包涵体, 其产物在复性前的初步纯化时只能应用凝胶过滤色谱; 相反, 尿素溶解包涵体后可以进行更多的选择, 首先可用离子交换色谱去除核酸、磷脂和根据蛋白本身电荷的差异对蛋白进行初步分

离。处于溶液状态的重组蛋白仍可能发生分子间的共价缔合,这时需用一定的还原剂(如 DTT, β -巯基乙醇、S-磺酸盐)来防止。

多种因素影响包涵体的溶解效果,如 pH、作用时间、缓冲液的离子强度、溶解包涵体试剂的浓度及其与所溶解蛋白的比例,是否存在还原剂及磷酸衍生物等。值得重视的是,所有这些方法都是在极端条件下进行的,应尽量缩短其作用时间来减少对目标蛋白的破坏作用。

尽管包涵体中的多数成份(包括肽聚糖、脂多糖、脂质、核酸和膜蛋白等)在上述剧烈萃取条件下均被溶解,但这些杂质在适于蛋白折叠的条件下溶解性极差,在重组蛋白复性过程中杂质即形成沉淀,可通过离心或过滤方法去除。

3 重组蛋白的复性

如上所述,包涵体中的重组蛋白是没有生物活性的,而剧烈的萃取条件又使蛋白的高级结构完全破坏,类似于蛋白质热变性。蛋白质复性动力学的研究在五、六十年代曾是热门课题,近年来重组 DNA 技术引出了包涵体这一特殊产物,使得蛋白质复性的研究又成了近几年的热门课题^[10]。该问题的研究以至最终阐明不仅在蛋白质化学理论上,而且在生物工程产业中将产生巨大影响。

获得正确高级结构的复性蛋白通常占很小的比例而且随着分子量的增加而减少,这一问题未曾很好解决,致使许多人避开包涵体而选择其它表达载体和宿主。有人改进了包涵体的溶解方法,在 5%(V/V) 醋酸中蛋白缓慢萃取使蛋白的溶解和复性在一个单元中完成^[11]。复性策略有两种^[12],一种是根据经验探索,另一种是根据已有理论指导。前一种策略的完成需要大量的复性条件优化工作,包括离子强度、pH、产物的浓度和纯度、时间及稀释倍数等,由于体系中有多种试剂和多种参数,各种参数对复性的影响变得非常微妙^[13]。可通过产物的溶解性、PAGE, HPLC, CD 谱及核磁共振等方法来确定复性产物的分子状态,通过活性分析、免疫或受体分析来评价复性效果。后一种策略必

须在对该蛋白高级结构形成因素进行系统研究的基础上进行,现在人们已知的蛋白结构形成的知识还很局限,使这种策略在推广上受到一定的限制,有必要对此进行一系列基础研究。

分子内固有二硫键的形成在高级结构中所起的作用目前尚未得到一致的结论。某些蛋白如牛生长激素,二硫键的形成与否不影响其高级结构的形成^[14]。而另一些蛋白在正确的二硫键形成前不会有稳定的高级结构。粒单系集落刺激因子在两对二硫键还原后近紫外 CD 谱无高级结构特征,而远紫外区显示近于正常的 α 螺旋二级结构^[15]。有时二硫键形成后高级结构并未形成或处于中间状态,必须把握二硫键形成的时机以利于蛋白的复性。横向尿素梯度电泳证实氧化的蛋白在尿素浓度达 5mol/L 时出现蛋白的变性,而在 3mol/L 时高级结构仍保持稳定。实践证明在 3mol/L 尿素以下对变性的包涵体蛋白复性及二硫键形成(应用氧化性巯基试剂、铜离子等)能够达到满意的效果^[16]。

虽然大多数蛋白均可在体外自发折叠而复性,但越来越多的研究表明体内存在着参与蛋白折叠过程的一类蛋白,根据它们是否依赖 ATP 而分为两类,前者包括一些护送蛋白(chaperonins),如热休克蛋白,后者如蛋白二硫键异构酶及顺反异构酶等^[17],这类蛋白在体外复性中的作用正为人们所关注。

4 复性蛋白的纯化

包涵体的形成对分离纯化产生了一系列影响,其中有利方面包括:可去除几乎全部的胞内可溶性蛋白,避免了蛋白酶的水解作用。不利方面包括:变性剂和去垢剂不易操作且价格昂贵,它们可引起蛋白质的不可逆修饰从而影响分离分析,但不影响其免疫性能;蛋白的复性需进行稀释及浓缩等处理,浓缩过程中伴有蛋白质水解和沉淀;复性过程中易形成异构体。

蛋白质复性后其纯化在策略上与可溶性蛋白相同。产物与杂质首先通过分析手段确定其理化性质的差异,然后利用这些差异进行分离制备。如许多残留在提取液中的杂质蛋白多为

溶解的部分膜蛋白,其分子结构内含有穿膜的疏水部分,而包涵体内重组蛋白一般亲水性较强,因此复性后可利用疏水作用色谱将二者分离。非蛋白类杂质通常是一些酸类物质(如核酸、磷脂、脂多糖),可利用阴离子交换色谱去除。利用表达产物与杂质等电点的差异也可将两类物质分离,多数的人重组蛋白,如干扰素等的 pI 大于 7.0,而大肠杆菌膜蛋白的 pI 值一般小于 7.0,因而可在 pH 7.0—8.0 之间用阴离子交换色谱来纯化。

同样,许多大肠杆菌宿主蛋白质在 pH 小于 5 时溶解性较差,而产物对酸稳定,可以有选择地利用酸沉淀的方法去除部分杂质。

在复性过程中往往形成部分产物的衍生物,如共价或非共价聚合体、错配的二硫键衍生物,以及化学修饰物等。通常聚合体的溶解性较差,可用沉淀的方法去除;也有部分聚合体呈可溶状态或形成病毒颗粒大小的絮状沉淀,可用色谱方法去除。

白细胞介素-2 复性过程中易形成二硫键错配,这些错配的异构体亲水性较白介素-2 大,可通过反相或疏水色谱进行分离;而复性不完全的还原型白介素-2 的疏水性较天然白介素-2 大,也可用同样的方法分离^[18]。干扰素在复性过程中往往含有少量巯基衍生物,以磺基丙氨酸或与谷胱甘肽形成的二硫键方式存在,可通过反相或酸沉淀的方法去除^[19]。

应该注意,某些提取包涵体的方法可能对以后的色谱过程产生影响,如用 SDS 萃取包

涵体蛋白,由于 SDS 与蛋白呈共价结合从而改变了蛋白的带电状态及分子的疏水性能,它明显改变了蛋白分子在离子交换、疏水、反相色谱上的保留行为,对此必须采取相应的措施,从纯化策略上加以调整。

由于原核表达系统的众多优点,所以至今人们还在大量应用,但原核基因工程的发展依赖于对包涵体以及蛋白质变性复性等问题的阐明^[20-22]。

参 考 文 献

- 1 Schoner RG *et al.* *Bio/Technology*, 1985; **3**: 351
- 2 Hartley DL *et al.* *Biochem Soc Trans*, 1988; **16**: 101
- 3 Schein CH *et al.* *Bio/Technology*, 1989; **7**: 1141
- 4 Builder SE *et al.* *United States Patent* no. 4620948, 1986
- 5 Fish N M *et al.* *Biochem Soc Trans*, 1988; **16**: 102
- 6 Maston FAO *et al.* *Bio/Technology*, 1984; **2**: 800
- 7 Sarmientos P S *et al.* *Cell*, 1988; **52**: 1337
- 8 Poulsen C *et al.* *Eur J Biochem*, 1989; **185**: 433
- 9 Kung H F. *United States Patent* no. 4476049, 1986
- 10 Burton S J. *Eur J Biochem*, 1989; **179**: 379
- 11 Battig F A *et al.* In: Battig F A *et al.* eds, *6th Inter Symp on HPLC of proteins and peptides*, New York: Academic Press, 1986: 801
- 12 Doonan S *et al.* *Biochem Soc Trans*, 1990; **18**: 231
- 13 Olsen K C. *United States Patent* no. 4518526, 1985
- 14 Holtzman T F *et al.* *Biochemistry*, 1986; **25**: 6907
- 15 Wingfield P *et al.* *Eur J Biochem*, 1988; **173**: 65
- 16 Schrimsher J L *et al.* *Biochem J*, 1987; **247**: 195
- 17 Viitanen PV *et al.* *Biochemistry*, 1990; **29**: 5665
- 18 Tsuji T *et al.* *Biochemistry*, 1987; **26**: 3129
- 19 Honda S. *J Biotechnol*, 1987; **5**: 39
- 20 Chang B Y *et al.* *J Bacteriol*, 1990; **172**: 3257
- 21 Lee T C *et al.* *J Biol Chem*, 1990; **265**: 7472
- 22 Tomasselli A G *et al.* *Biochemistry*, 1990; **29**: 264

抗 癌 基 因:Rb

党 进 军

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

提 要

介绍有关视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma,简称 Rb)基因研究的最新进展。已经证明 Rb 基因异常与某些肿瘤发生密切相关。其编码产物具有抑制细胞增殖