

不同因素对人 X 型磷脂酶 A2 包涵体重折叠的影响*

程洪强¹⁾ 张琛¹⁾ 胡红雨¹⁾ 许根俊^{1,2)**}

(¹⁾中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 中国科学院研究生院, 上海 200031;

²⁾浙江理工大学生命科学院, 杭州 310033)

摘要 人 X 型磷脂酶 A2 在大肠杆菌中的表达产物完全以不溶的包涵体形式存在. 用以前适用于人胰型 (IB 型) 磷脂酶 A2 的稀释重折叠方法, 并不能使它有效重折叠. 以初步纯化的包涵体为对象, 发现溶液的温度、pH 值和蛋白质浓度对 X 型磷脂酶 A2 体外重折叠有很大的影响. 研究了一些小分子化合物对 X 型磷脂酶 A2, 在高蛋白质浓度 (1 g/L) 下重折叠的影响, 发现 1 mol/L 的 L- 精氨酸能提高其重折叠效率达 6 倍多. L- 精氨酸的结构类似物 L- 瓜氨酸对 X 型磷脂酶 A2 的重折叠有较弱的改善, 而 L- 赖氨酸和 L- 精氨酸甲基酯则降低了 X 型磷脂酶 A2 的活性恢复. 结果表明, L- 精氨酸对蛋白质重折叠的帮助作用, 可能是通过精氨酸与折叠中间物的结合产生的, 精氨酸的胍基和羧基都是必需的, 其侧链胍基以其特殊的带电方式阻遏了重折叠过程中的积聚和分子间二硫键形成的反应.

关键词 人 X 型磷脂酶 A2, 包涵体, 重折叠, L- 精氨酸

学科分类号 Q51

哺乳动物分泌型磷脂酶 A2 (phospholipase A₂, EC 3.1.1.4) 能够水解甘油磷脂的 sn-2 酯键, 释放出自由脂肪酸和溶血磷脂. 分泌型磷脂酶 A2 的分子质量在 14~16 ku 之间, 富含二硫键, 催化活性需要毫摩尔浓度的 Ca²⁺. 目前, 已经鉴定了 9 种哺乳动物分泌型磷脂酶 A2^[1], 按照氨基酸序列及二硫键的配对方式进行分类, 分别是 IB、IIA、IIC、IID、IIE、IIF、V、X、XII^[2]. 人 X 型磷脂酶 A2 是从胎儿肺组织中克隆的, 成熟蛋白含有 123 个氨基酸残基, 等电点为 5.3, 前体的 N 端含有以双精氨酸残基结尾的 11 个氨基酸残基组成的前体肽. 它的 16 个半胱氨酸残基形成 8 个二硫键, 它含有 II 型酶特征的 C 端延伸部分, 但是没有 I 型酶特征的胰环 (pancreatic loops), 是一个新的种类^[3]. X 型磷脂酶 A2 能与膜结合, 水解膜上的磷脂酰胆碱, 产生花生四烯酸, 也可以同细胞表面的磷脂酶 A2 受体 (PLA₂R) 结合, 通过细胞内的信号传导促使细胞释放花生四烯酸, 引起细胞对炎症的响应^[4-6]. 但是体内细胞对炎症的响应是通过哪种方式引发的, 还没有定论.

外源蛋白在 *E.coli* 中的高表达往往形成包涵体, 为了得到有活性的蛋白质或酶, 一般先用高浓度的变性剂溶解包涵体, 再通过稀释或透析以恢复天然状态的高级结构^[7]. 在变性蛋白质重折叠的过

程中, 常产生积聚反应, 减少活性产物形成. 温度、蛋白质浓度和 pH 等因素, 对蛋白质重折叠有不同程度的影响^[8]. 含有多个二硫键的蛋白质, 由于二硫键配对具有多种可能性, 重折叠更为困难.

我们在 *E.coli* 中以包涵体的形式表达了人 X 型磷脂酶 A2. 先前使人 IB 型磷脂酶 A2 的包涵体重折叠的条件, 不适用于 X 型磷脂酶 A2. 蛋白质浓度、温度和 pH 对 X 型磷脂酶 A2 包涵体重折叠有很大的影响. 在不同的小分子添加物中, L- 精氨酸明显地提高了 X 型磷脂酶 A2 在高蛋白质浓度下的重折叠效率, L- 精氨酸的类似物 L- 瓜氨酸对 X 型磷脂酶 A2 的重折叠仅有较弱的改善, L- 精氨酸甲基酯则丧失了这种作用. L- 精氨酸改善蛋白质重折叠的作用, 主要是其特殊的带电方式抑制了蛋白质重折叠早期的积聚和分子间二硫键形成的反应.

1 材料和方法

1.1 材料

含有人 X 型磷脂酶 A2 基因的质粒购自 Incyte 公司. 引物合成和 DNA 测序由博亚生物工程有限公司.

*国家自然科学基金资助项目 (39930060).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 021-54921257, E-mail: gjxu@sibs.ac.cn

收稿日期: 2004-08-26, 接受日期: 2004-10-31

司完成. 限制性内切酶等分子生物学试剂为 TaKaRa 公司产品. 表达质粒和表达菌株分别是 PET-3a 和 *E.coli* BL21(DE3). 超纯尿素、超纯盐酸胍是 USB 产品. 磷脂酶 A2 荧光底物 pyrene- C_{10} -PG[1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl) -sn-glycero-3-phosphoglycerol] (H-3809) 和 1-pyrenedecanoic acid (P-31) 购自 Molecular Probes 公司. DTNB [5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)] 和不含脂肪酸的 BSA (bovine serum albumin, essentially fatty acid free), γ - 肌基丁酸, 氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽(GSH), L- 瓜氨酸和 L- 鸟氨酸是 Sigma 公司产品, 乙基尿素和 L- 精氨酸甲基酯是 Fluka 公司产品. NTSB (2-nitro-5-thiosulfobenzoate)按照文献[9]方法制备并直接用于蛋白质的修饰.

1.2 方法

1.2.1 X 型磷脂酶 A2 表达质粒的构建. 含有人 X 磷脂酶 A2 cDNA 的质粒作为模板, 上游引物为 5' CGCATATGGGTATCCTGGAAGTGG 3', 下游引物为 5' CGAGATCTCAGTCACACTTGGGC 3', 按常规 PCR 反应条件扩增, PCR 产物直接接入经 *EcoR* V 酶切的 pBluescript SK (+)质粒中, 然后用 *Nde* I 和 *Bgl* II 双酶切, 回收的小片段 DNA 接入经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切的表达质粒 PET-3a 中, 得到表达质粒 PETgxPLA.

1.2.2 包涵体的纯化.

将表达质粒 PETgxPLA 克隆到 BL21(DE3) 中. 挑选阳性的单克隆, 培养过夜. 然后按 1:100 稀释接种于 2 L LB 培养基中(含有 50 mg/L 氨苄抗生素), 37℃培养至 A_{600} 值为 0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.01 mmol/L, 继续诱导 5 h 后离心收获菌体.

收集的细菌经超声处理并离心后, 得到包涵体. 包涵体悬浮于 1.5 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% Triton X-100 的溶液中, 经 2 次超声洗涤后, 沉淀部分溶解在 4 ml 8 mol/L 尿素, 0.3 mol/L Na_2SO_3 (pH 8.0) 溶液中. 充分溶解后加入 25 mmol/L NTSB 1.6 ml, 室温反应 40 min. 离心除去不溶部分, 上清通过预先用 5 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA 平衡的 G-25 柱(100 ml, Pharmacia 公司)除去过量的修饰剂. 合并蛋白质部分在 4℃先对水透析, 然后对 0.3% 的乙酸透析, 得到白色沉淀. 沉淀经水洗 2 次后, 冻干. 干粉直接用于下面的重折叠实验.

1.2.3 X 型磷脂酶 A2 的重折叠.

研究温度对重折叠的影响时, 将 8 mol/L 尿素

溶解的修饰蛋白 (10 g/L) 用重折叠液(50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L 半胱氨酸, 0.2 mmol/L 胱氨酸, pH 8.0) 按 1:100 稀释, 在不同的温度下保温, 每隔一定的时间取出一部分, 测定酶活性. 研究不同蛋白质浓度对重折叠的影响时, 尿素溶解的蛋白质 (100 g/L) 按不同的稀释比稀释到溶液中, 在 4℃放置 24 h 后, 测定酶活性. 观察 L- 精氨酸和其他添加物对磷脂酶重折叠的作用时, 尿素溶解的蛋白质 (10 g/L) 按 1:10 稀释入含有不同浓度添加物的重折叠溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L 半胱氨酸, 0.2 mmol/L 胱氨酸, pH 9.0) 中, 4℃放置 24 h 后测定酶活性. 重折叠溶液中 L- 瓜氨酸和肌基丁酸的最大浓度分别是 0.4 mol/L 和 0.2 mol/L, 乙基尿素的最高浓度是 0.7 mol/L.

把尿素溶解的蛋白质 (10 g/L) 用 pH 7.0 到 pH 10.0 的不同溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L 半胱氨酸, 0.2 mmol/L 胱氨酸) 按 1:100 稀释, 在 4℃放置 24 h 后测定酶活性. 同样的, 0.1 g/L 的蛋白在 pH 分别为 9.0, 8.4 和 7.5 的 3 个溶液中重折叠, 在相应的时间后取出一部分溶液, 用酸阻断反应, 经 centricon-10 (Millipore) 离心浓缩并换成 0.1 mol/L 磷酸钠 (pH 8.0), 6 mol/L 盐酸胍溶液, 测定蛋白质的自由巯基^[9].

0.01 g/L, 0.1 g/L 和 1 g/L 3 个不同浓度的 X 型磷脂酶 A2 在含和不含 1 mol/L 的 L- 精氨酸溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L 半胱氨酸, 0.2 mmol/L 胱氨酸, pH 9.0) 中, 4℃放置 24 h 后进行非还原 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并用考马斯亮蓝染色.

1.2.4 X 型磷脂酶 A2 活性的测定. X 型磷脂酶 A2 的酶活性在 Hitachi F-4010 荧光仪上测定^[11], 底物为用水浴超声方法制备的 2 μ mol/L Py- C_{10} -PG 脂质体. 测活液在 30℃保温 5 min 后, 加入酶溶液, 记录荧光变化. 激发波长 345 nm, 发射波长 398 nm. 酶的活性是用每分钟释放 1-pyrenedecanoic acid 的 μ mol 数表示.

1.2.5 光散射的测定. 蛋白质积聚用光散射测定, 在 Hitachi F-4010 荧光仪上进行, 激发波长和发射波长都为 360nm. 进行重折叠实验前, 所有溶液都经过滤(MILLEX-GV 0.22 μ m filter, Millipore) 处理.

2 结 果

人 X 型磷脂酶 A2 cDNA, 经 PCR 反应扩增并克隆到表达载体后, 测序表明其序列和文献报道的

结果一致^[3]. 人 X 型磷脂酶 A₂ 和人 I B 型磷脂酶 A₂ 相似, 它们在 *E.coli* 中表达的产物, 是以包涵体的形式存在. 我们按照人 I B 型磷脂酶 A₂ 的稀释方法重折叠时, 虽然不发生积聚沉淀, 但是不能纯化到有活性的酶. 分子筛柱层析和非还原 SDS 凝胶电泳结果显示重折叠产物主要形成了分子间的二硫键.

用小分子的二硫键化合物代替氧来作为氧化剂, 把变性的蛋白质稀释到含有不同比例的 GSH/GSSG 或 CysH/CyssyC, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 的溶液中, 蛋白质浓度为 0.1 g/L, 在 4℃ 保温 24 h, 酶活力的恢复情况见表 1. 不含巯基氧化还原对和含有等摩尔巯基氧化还原对时, 基本上都没有得到有活性的酶, 当 GSH(CysH):GSSG(CyssyC) 比为 10 时, 恢复的酶活性最大. 以后的实验均在 CysH/CyssyC 的比值为 10 时进行.

Table 1 The recovered enzyme activity of human group X phospholipase A₂ after refolding, in the presence of GSH/GSSG and CysH/CyssyC

GSH(4 mmol/L) /GSSG	Relative activity	Cysteine(2 mmol/L) /Cystine	Relative activity
10:1	0.94	10:1	1.00
5:1	0.86	5:1	0.70
2:1	0.64	2:1	0.35
1:1	0.01	1:1	0.01
0:0	0.00		

2.1 温度对 X 型磷脂酶 A₂ 重折叠的影响

从 X 型磷脂酶 A₂ 包涵体在 3 个不同温度下的重折叠曲线可以看出, 人 X 型磷脂酶 A₂ 活性的恢

复, 达到平衡是一个相当缓慢的过程(图 1). 提高温度缩短达到平衡所需要的时间: 在 37℃, 20℃ 和 4℃ 下, 分别需要大约 5 h, 8 h 和 18 h; 活性恢复的程度随温度的升高而降低: 4℃ 下重折叠后恢复的酶活性大约是 37℃ 下的 4 倍.

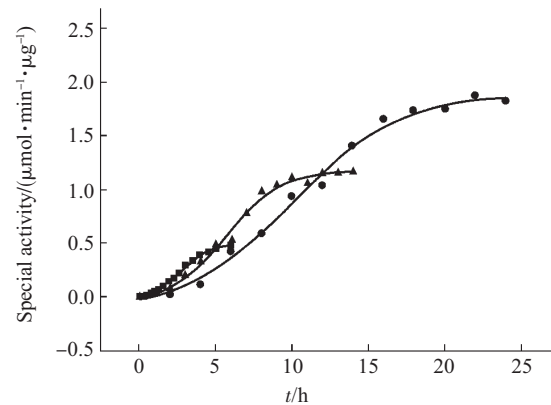


Fig.1 Dependence of human group X phospholipase A₂ refolding on temperature
Refolding was carried out at 4℃ (●), 20℃ (▲) and 37℃ (■) respectively.

2.2 pH 对 X 型磷脂酶 A₂ 重折叠的影响

不同 pH 下 X 型磷脂酶 A₂ 蛋白的活力恢复情况如图 2b 所示. 可以看出, 在中性 (pH 7.0) 和近中性 (pH 7.5) 的溶液中, 恢复的酶活性均很低, 而随着碱性增强, 恢复的酶活性也随之提高. 从图 2 看出, X 型磷脂酶 A₂ 蛋白的自由半胱氨酸残基消失的速度和重折叠液的 pH 有关, 在 pH 9.0 和 pH 8.4 时, 蛋白质上自由巯基消失一半的时间大约为 30 min, 而在 pH 7.5 时, 大约为 150 min. 比较图 1 中 4℃ 下的重折叠曲线可以看出, 180 min 后,

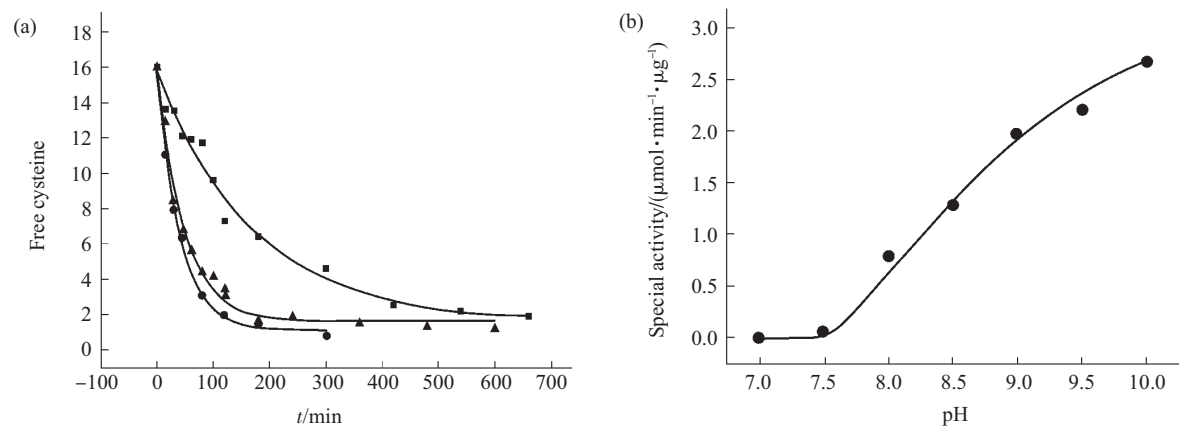


Fig.2 Formation of disulfide bonds during human group X phospholipase A₂ refolding
(a) Refolding was carried out at pH 9.0 (●), pH 8.4 (▲) and pH 7.5 (■) respectively. (b) showed the pH dependence of the enzyme activity recovery from pH 7.0 to 10.0.

X型磷脂酶 A2 蛋白的自由巯基全部消失, 而此时酶活性很低. 在 X 型磷脂酶 A2 重折叠过程中, 二硫键形成的速度比酶活力恢复的速度要快得多.

2.3 蛋白质浓度对 X 型磷脂酶 A2 重折叠的影响

在重折叠的过程中, 分子间的二硫键和蛋白质积聚的形成, 都会降低活性蛋白的回收率. 蛋白质浓度对 X 型磷脂酶 A2 重折叠的影响见图 3, 随着蛋白质浓度的提高, 重折叠效率呈指数下降. 在

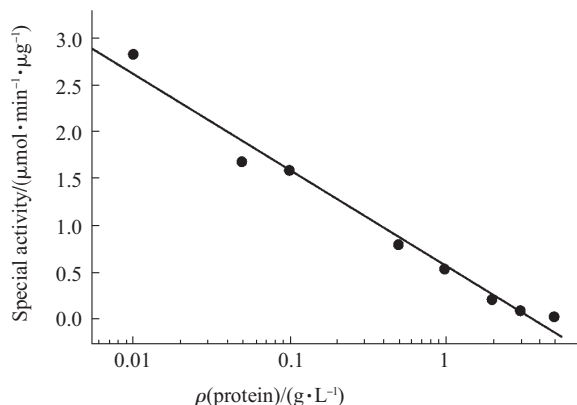


Fig.3 Dependence of human group X phospholipase A₂ refolding on protein concentration

1 g/L 时, 重折叠后恢复的酶活性是蛋白质浓度为 10 mg/L 时的 20%, 蛋白质浓度为 3 g/L 以上时, 基本不能恢复酶活性.

2.4 小分子添加物对 X 型磷脂酶 A2 重折叠的影响

蛋白质在体内折叠, 往往需要有分子伴侣和折叠酶的帮助. 在体外重折叠过程中, 一些小分子添加物对蛋白质重折叠有明显的帮助作用^[8]. 在高浓度蛋白质(1 g/L)情况下, 我们试验了一些化合物, 0.1 g/L BSA、1 mol/L L-精氨酸、2 mol/L 脯氨酸、6 mmol/L Ca²⁺、1 mol/L NaCl、20% 甘油和 2 mol/L 尿素对重折叠的影响, 结果表明 BSA 和甘油都不影响 X 型磷脂酶 A2 的重折叠. 酶活性必需的钙离子也不影响 X 型磷脂酶 A2 的重折叠. Samuel 等^[12]报道高浓度脯氨酸能帮助溶菌酶在体外的重折叠, 在我们的实验中, 它却降低 X 型磷脂酶 A2 重折叠过程中的活力恢复. 唯有 L-精氨酸能够帮助 X 型磷脂酶 A2 重折叠, 可以使其活力的恢复提高 6 倍多, 相同浓度的 NaCl 降低重折叠的效率, 活性的恢复为原来的 20%. 我们研究了不同 L-精氨酸浓度下 X 型磷脂酶 A2 重折叠的情况, 从图 4a 看出,

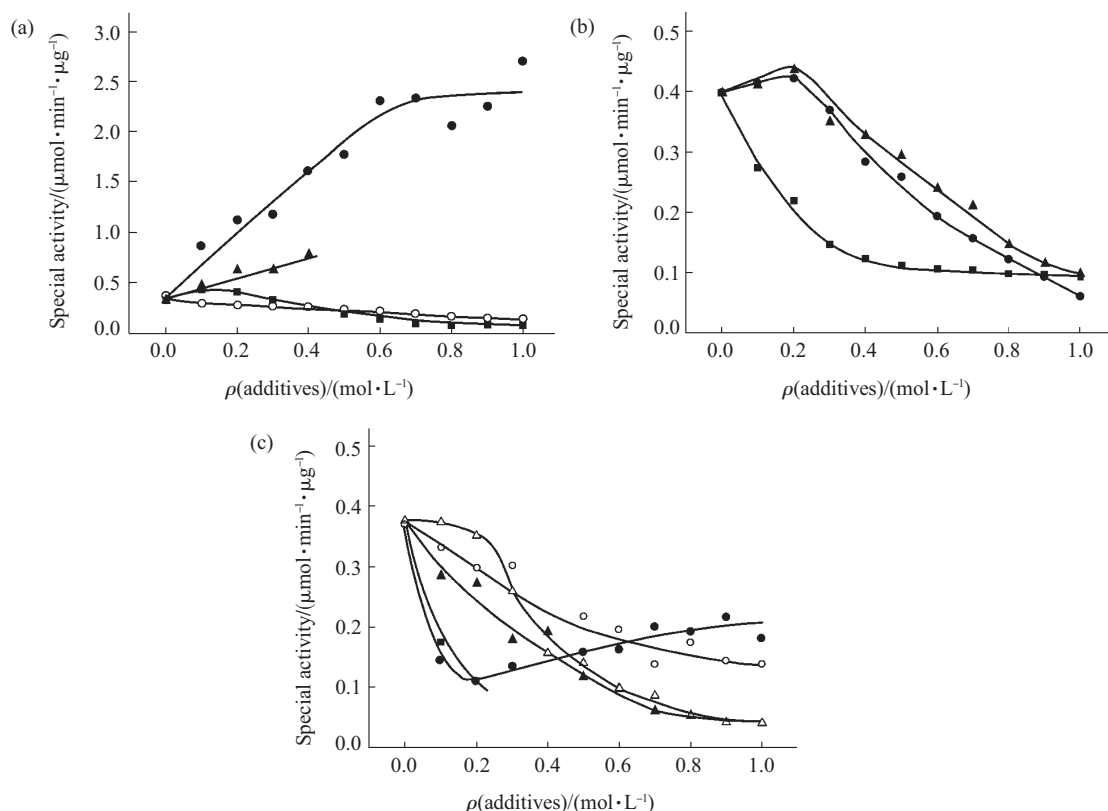


Fig.4 Effects of L-arginine and additives on the of human group X phospholipase A₂ refolding. Refolding was carried out at 4°C. (a) in the presence of L-arginine (●), L-citrulline (▲), L-ornithine (■) and L-lysine (○); (b) in the presence of NaCl (●), NaAc (▲) and KCl (■); (c) in the presence of GdnCl (●), ethylurea (▲), guanidine butyric acid (■), L-arginine methyl ester (○) and proline (△). The concentration of proline should be from 0 to 5 mol/L.

重折叠酶的比活和 L-精氨酸浓度的关系为一近似饱和曲线,说明 L-精氨酸和折叠中间物可能存在结合,在 0.6 mol/L L-精氨酸时重折叠过程开始达到平衡.为了进一步了解 L-精氨酸对 X 型磷脂酶 A2 重折叠的帮助作用,我们在 X 型磷脂酶 A2 重折叠的过程中加入了 L-精氨酸的类似物, L-赖氨酸, L-瓜氨酸和 L-鸟氨酸,其中仅有 L-瓜氨酸对 X 型磷脂酶 A2 的活力恢复有较弱的帮助作用(图 4a).其他氨基酸,包括 L-甘氨酸(未给出数据),脯氨酸和 L-精氨酸甲基酯(图 4c)都降低了 X 型磷脂酶 A2 重折叠的效率.提高重折叠溶液的离子强度,如加入 NaCl, NaAc 和 KCl,也降低 X 型磷脂酶 A2 蛋白重折叠的效率(图 4b).X 型磷脂酶 A2 含有 7 个二硫键,在低浓度的盐酸胍溶液中相当稳定.人 I B 型磷脂酶 A2 可以在低浓度胍中重折叠,我们在重折叠溶液中也添加低浓度的盐酸胍,结果表明,0.1 mol/L 的盐酸胍明显降低了 X 型磷脂酶 A2

的重折叠效率.乙基尿素和 γ -脯基丁酸同样降低了 X 型磷脂酶 A2 的重折叠效率(图 4c).

2.5 L-精氨酸对重折叠的影响

从图 5a 可以看出, L-精氨酸并不影响重折叠达到平衡需要的时间,1 g/L 的人 X 型磷脂酶 A2 在含和不含 L-精氨酸的重折叠液中,在 4℃ 下都需要约 10 h 达到重折叠平衡.在低浓度的 L-精氨酸范围内,提高精氨酸浓度,增加积聚程度,在高浓度的 L-精氨酸范围内,提高精氨酸浓度,降低积聚程度(图 5d).从图 5c 可以看出积聚反应发生在重折叠过程的早期,1 mol/L 的 L-精氨酸几乎可以完全抑制积聚反应.但是 L-精氨酸对重折叠过程中二硫键的形成过程没有影响(图 5b).X 型磷脂酶 A2 在体外重折叠特别容易形成分子间的二硫键,即使重折叠是在比较低的蛋白质浓度下(0.01 g/L)进行(图 6),也有一定程度的高分子质量产物的形成,而 L-精氨酸的存在抑制了分子间二硫键的形成.

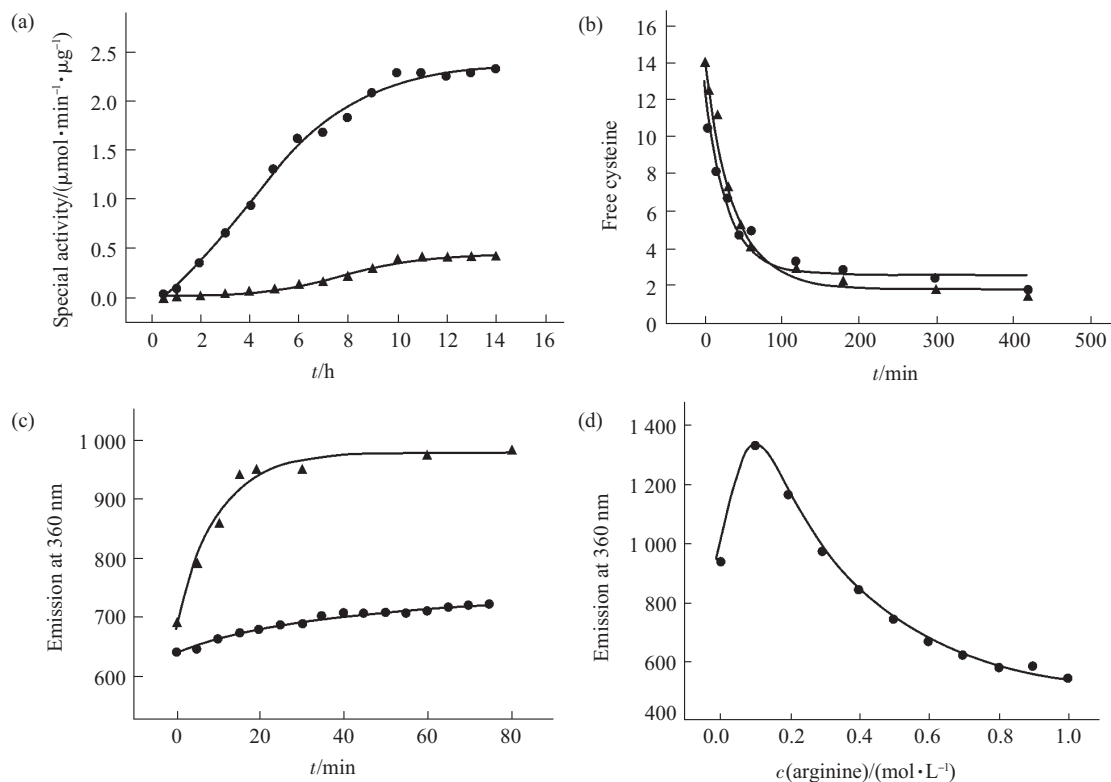


Fig.5 The refolding of human group X phospholipase A₂ in the presence (●) and absence (▲) of L-arginine

The refolding was followed by enzyme activity (a), free cysteine disappearance (b) and light scattering (c, d).

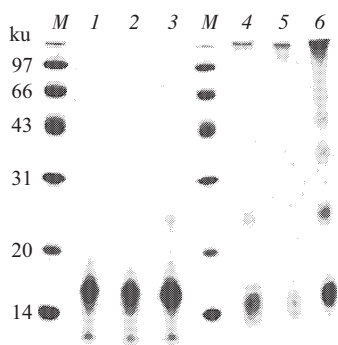


Fig.6 Aggregation was inhibited by L-arginine

Refolded protein was analyzed by 15% SDS-PAGE under non-reducing conditions and stained by Coomassie brilliant blue. *M*: protein molecular mass marker (ku). The protein concentration was 0.01 g/L, 0.1 g/L and 1 g/L in lane 1, 4, lane 2, 5, and lane 3, 6 respectively. 1, 2, 3: refolded human group X phospholipase A₂ in the presence of 1 mol/L arginine; 4, 5, 6: refolded human group X phospholipase A₂ in the absence of L-arginine.

3 讨 论

人X型磷脂酶A₂在*E.coli*中以包涵体的形式表达. 用人I B型磷脂酶A₂的稀释重折叠方法(蛋白质浓度>1 g/L), 能从1 L培养物中得到10 mg以上纯化的蛋白质. 同属于哺乳动物分泌型磷脂酶A₂亚族的人X型磷脂酶A₂在相同的条件下, 不能有效重折叠. FPLC分子筛和非还原SDS凝胶电泳结果表明, 不能有效重折叠的原因, 主要是分子间二硫键的形成, 产生了高分子质量的化合物. 人I B型磷脂酶A₂和人X型磷脂酶A₂在序列上具有很高的同源性, 晶体也显示有相似的高级结构^[3], 但是它们的重折叠行为不同. 重折叠是一个较为复杂的过程, 一级结构的细微变化可能会使蛋白质在折叠过程中产生不同的中间物, 产生不同的副反应途径.

我们研究了3种因素对人X型磷脂酶A₂重折叠的影响, 结果表明: 蛋白质浓度, 温度和溶液的pH值都对人X型磷脂酶A₂重折叠有显著的影响. 蛋白质浓度升高, 重折叠效率呈指数下降, 也容易形成分子间二硫键和积聚. 温度不仅影响重折叠的速度, 也影响重折叠的效率. 在低温下, 重折叠较慢, 但是酶的活性回收较高. 在中性和弱碱性条件下, 二硫键形成的速度较慢, 酶活性恢复的程度较低; 碱性pH下二硫键形成的速度较快, 酶活性恢复的程度也比较高.

从图5可以看出, 大部分巯基的消失是在50 min内发生的, 而活性的恢复要缓慢得多. 精氨酸存在下, 1 h后可以观察到活性的再生, 没有精氨酸存在下, 活性的再生要到4 h后观察得到, 而重折叠达到平衡需要8~10 h. 积聚的大量形成主要在20 min内完成. 人X型磷脂酶A₂含有16个半胱氨酸, 配对成8个二硫键. 因此, 首先形成的几个二硫键可能没有正确配对, 人X型磷脂酶A₂是处于一种折叠的中间状态, 它具有暴露的疏水面和易进行交换的二硫键, 一旦分子间的疏水面接触, 它很容易形成积聚或形成具有分子间二硫键的大分子. 通过二硫键的交换, 产生正确配对的二硫键可能是该酶重折叠过程的一个重要因素.

L-精氨酸用来提高包涵体的重折叠效率已有很多报道^[14,15], Arakawa等^[16]发现, L-精氨酸通过阻止热变性蛋白在重折叠过程中的积聚来提高重折叠的效率. 在我们的研究中, L-精氨酸能帮助脲变性的人X型磷脂酶A₂重折叠. 精氨酸上胍基的正电荷与蛋白质上带负电荷的羧基相互作用, 一方面使得折叠中间物减少了分子间的疏水相互作用. 同时, 我们也注意到Cys48, Cys121附近有谷氨酸和天冬氨酸的存在, 而两者间的二硫键是I型酶没有, X型酶特有的, I型酶的重折叠能较高地恢复酶活性^[7]. 精氨酸的结合也使得这些半胱氨酸不再参与早期二硫键的形成, 从而减少了积聚的产生.

此外, L-赖氨酸和L-鸟氨酸对重折叠都没有促进作用, 说明了胍基的静电相互作用对阻遏积聚形成有着重要的作用. 精氨酸甲基酯没有相应地帮助重折叠的效应, 也支持精氨酸结合部位附近的疏水相互作用是形成积聚物的关键部位. 详细的机制还有待于进一步工作的证实.

致谢 感谢中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所的黄圣兵和宣海星同学在脂质体制备上给予的指导.

参 考 文 献

- 1 Six D A, Dennis E A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1488** (1~2): 1~19
- 2 Gelb M H, Valentin E, Ghomashchi F, *et al.* Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A₂. *J Biol Chem*, 2000, **275** (51): 39823~39826
- 3 Cupillard L, Koumanov K, Mattei M G, *et al.* Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase

- A₂. J Biol Chem, 1997, **272** (25): 15745~15752
- 4 Mounier C M, Ghomashchi F, Lindsay M R, *et al.* Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups II A and X secreted phospholipase A₂ occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A₂-alpha. J Biol Chem, 2004, **279** (24): 25024~25038
 - 5 Bezzine S, Koduri R S, Valentin E, *et al.* Exogenously added human group X secreted phospholipase A₂ but not the group I B, II A, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells. J Biol Chem, 2000, **275** (5): 3179~3191
 - 6 Morioka Y, Saiga A, Yokota Y, *et al.* Mouse group X secretory phospholipase A₂ induces a potent release of arachidonic acid from spleen cells and acts as a ligand for the phospholipase A₂ receptor. Arch Biochem Biophys, 2000, **381** (1): 31~42
 - 7 Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E.coli*. Curr Opin Biotech, 1998, **9** (5): 497~501
 - 8 Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, *et al.* Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. Protein Expr Purif, 2003, **28** (1): 1~8
 - 9 Thannhauser T W, Konishi Y, Scheraga H A. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. Anal Biochem, 1984, **138** (1): 181~188
 - 10 Ellman G L. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. Arch Biochem Biophys, 1958, **74** (2): 443~450
 - 11 Yarger D E, Patrick C B, Rapoport S I, *et al.* A continuous fluorometric assay for phospholipase A₂ activity in brain cytosol. J Neurosci Method, 2000, **100** (1~2): 127~133
 - 12 Samuel D, Kumar T K, Ganesh G, *et al.* Proline inhibits aggregation during protein refolding. Protein Sci, 2000, **9** (2): 344~352
 - 13 Pan Y H, Yu B Z, Singer A G, *et al.* Crystal structure of human group X phospholipase A₂. Electrostatically neutral interfacial surface targets zwitterionic membranes. J Biol Chem, 2002, **277** (32): 29086~29093
 - 14 Oneda H, Inouye K. Refolding and recovery of recombinant human matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from inclusion bodies expressed by *Escherichia coli*. J Biochem (Tokyo), 1999, **126** (5): 905~911
 - 15 Wright E, Serpersu E H. Isolation of aminoglycoside nucleotidyltransferase (2")-Ia from inclusion bodies as active, monomeric enzyme. Protein Expr Purif, 2004, **35** (2): 373~380
 - 16 Arakawa T, Tsumoto K. The effects of arginine on refolding of aggregated protein: not facilitate refolding, but suppress aggregation. Biochem Biophys Res Commun, 2003, **304** (1): 148~152
 - 17 Cheng H Q, Xu G J. The role of propeptide in the refolding of human group I B phospholipase A₂. Acta Biochim Biophys Sin, 2004, **36** (9): 583~588

Effects on Human Group X Phospholipase A₂ Inclusion Bodies Folding*

CHENG Hong-Qiang¹⁾, ZHANG Chen¹⁾, HU Hong-Yu¹⁾, XU Gen-Jun^{1,2)**}

⁽¹⁾Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

⁽²⁾College of Life Science, Zhejiang University of Sciences, Hangzhou 310033, China)

Abstract Human group X phospholipase A₂ is a member of mammalian secretory phospholipase which belongs to phospholipase A₂ superfamily. It has been expressed in a form of inclusion bodies in *E.coli*. It could not refold efficiently as human pancreatic phospholipase A₂ (group I B) merely by diluting the protein unfolded in 8 mol/L of urea. The refolding reaction of human group X phospholipase A₂ *in vitro* was depended on temperature, pH and protein concentration. A number of additives have been tested, among which L-arginine was the most efficient effector in improving the refolding of human group X phospholipase A₂, and its structural analogs, L-citrulline, had less effect. L-lysine and L-arginine methyl ester could not improve phospholipase A₂ refolding. In addition, L-arginine inhibited the formation of aggregates and of intramolecular disulfide bonds. These results showed that both carboxyl and guanidyl residues of L-arginine were essential for improving protein refolding.

Key words human group X phospholipase A₂, inclusion body, refolding, L-arginine

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39930060).

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-21-54921257, E-mail: gjxu@sibs.ac.cn

Received: August 26, 2004 Accepted: October 31, 2004