

# 抗肿瘤血管抗体 AA98 功能片段 $V_H/\kappa$ 的 脲浓度梯度柱复性\*

张志强 林芸 阎锡蕴\*\*

(中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发重点实验室, 北京 100080)

**摘要** 利用稀释法、凝胶过滤、脲浓度梯度凝胶过滤 3 种方法研究了抗肿瘤血管抗体功能片段  $V_H/\kappa$  的体外复性。通过考察复性液中还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽 (GSH/GSSG) 比例、精氨酸浓度、pH 值、洗脱速度、变性液中蛋白质浓度、凝胶过滤脲梯度长度等因素, 发展了脲梯度凝胶过滤柱复性  $V_H/\kappa$  的方法。结果表明, 与传统的稀释法和柱复性法相比, 脲梯度法复性获得的  $V_H/\kappa$  的活性回收率和相对亲和力均有显著提高。

**关键词** 层析, 柱复性, 单链抗体

**学科分类号** Q503

大肠杆菌表达的重组蛋白质通常是以包涵体的形式存在。如何使这种无活性的肽链聚集体变成具有特定空间构象的功能蛋白质, 是分子生物学探讨的中心问题之一, 也是生产重组蛋白质的难点之一。包涵体复性的方法很多, 其中常用的方法是稀释法或透析法, 蛋白质活性回收率一般仅为 5%~20%<sup>[1]</sup>。存在的主要问题是在变性条件下, 肽链处于伸展状态, 当脱除变性剂时, 暴露在蛋白质外面的疏水侧链基团相互作用, 使得这些分子很容易发生聚集反应。因此控制肽链从变性液到复性液的过渡速度是避免蛋白质的聚集反应, 提高复性效率的关键。近年来发展起来的盐浓度梯度凝胶过滤蛋白质复性, 能获得更高的蛋白质活性回收率<sup>[2]</sup>。本实验室选用一株肿瘤血管单链抗体  $V_H/\kappa$  作为模式材料, 利用凝胶层析复性技术<sup>[3]</sup>, 根据蛋白质与小分子物质在凝胶过滤中迁移速度不同的原理, 研究尿素浓度梯度凝胶层析在基因工程抗体复性中的作用, 提供了一个具有参考价值的重组蛋白质复性方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料和主要仪器

**1.1.1 实验材料:** 重组质粒 pET21a  $V_H/\kappa$ 、大肠杆菌 BL21 (DE3) 及人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 为本室保存。抗体 AA98 及其抗原由本实验室制备和提纯。碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗鼠  $\kappa$  链抗体、十二烷基磺酸钠 (SDS) 及二硫苏糖醇 (DTT) 购于 Sigma 公司, 尿素购于北京化学试剂公司。显色底物 NBT/BCIP、对硝基酚磷酸

(PNPP) 及丙烯酰胺和亚甲双丙烯酰胺购自 Fluka 公司。硝酸纤维素 (NC) 膜购自 Amersham 公司。精氨酸、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 购于北京经科公司。Sephadex G-75 为 Pharmacia 公司产品。

**1.1.2 实验仪器:** UV-754 型紫外可见分光光度计 (上海第三分析仪器厂)。Bio-Rad 液相层析系统 Biologic LP、蛋白质电泳槽 Mini-PROBEAN II Cell、电转移槽和电泳仪 Power/Pac200 及酶联免疫检测仪 Model 550 Microplate Reader。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 包涵体的纯化和变性:** 重组 pET21a  $V_H/\kappa$  质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 37℃培养至  $A_{600} = 0.5$ , 加 1 mmol/L 异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达 4 h, 离心收集菌体, 超声破碎细胞, 离心即得包涵体沉淀。依次用 2.5 mol/L NaCl、0.5% Triton X-100 和 2 mol/L 的尿素洗涤沉淀, 最后将包涵体溶解于变性液 (pH 8.3, 50 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L DTT) 中, 4℃搅拌过夜。

**1.2.2 稀释法复性:** 将变性的包涵体逐滴加入复性液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 0.4 mol/L 精氨酸, 1 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 2 mmol/L EDTA) 中, 至包涵体终浓度约 50 mg/L。4℃静置 24 h 后, 用 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 透析 12 h。

\* 国家高技术“863”计划资助项目 (102-09-0204)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 010-62633718, E-mail: yanxy@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2001-12-14, 接受日期: 2002-02-04

**1.2.3 凝胶过滤柱复性:** 采用 Sephadex G-75 层析柱 (10 mm × 1 000 mm), 变性的包涵体蛋白质浓度 2.5 g/L, 上样量 2.0 ml, 流动相为 50 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.4 mol/L 精氨酸, 1 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 1 mmol/L EDTA, pH 8.3, 流速 0.5 ml/min, 收集富含 V<sub>H</sub>/κ 的目标蛋白质峰, 作活性检测。

**1.2.4 脲浓度梯度柱复性:** 为制备脲浓度梯度凝胶柱, 先配两种缓冲液 A 和 B. 溶液 A 为 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.3), 0.4 mol/L 精氨酸, 2 mmol/L EDTA, 0.15 mol/L NaCl, GSH/GSSG = 1:1, 溶液 B 为 8 mol/L 的脲溶于缓冲液 A 中. 先用溶液 A 平衡 Sephadex G-75 柱, 再线性增加 B 的浓度. 当 B 在一定体积内达到 100% 时, 加入变性的包涵体蛋白质 2.0 ml, 并继续用溶液 B 进行洗脱, 收集富含 V<sub>H</sub>/κ 的目标蛋白质峰, 做活性检测。

**1.2.5 ELISA 测定 V<sub>H</sub>/κ 复性蛋白质的活性:** 取纯化的抗体 AA98 相应抗原蛋白质溶液, 调节 pH 值后包被 96 孔免疫板, 50 μl/孔, 湿盒内 4℃ 过夜. 用 5% 脱脂牛奶在 37℃ 封闭 2 h. 弃封闭液, 每孔加 50 μl 用磷酸缓冲液 (PBS) 稀释的复性 V<sub>H</sub>/κ 蛋白质溶液或抗体 AA98 (作对照), 湿盒内室温孵育 2 h. 用 PBST (含 0.05% Tween 20 的 PBS) 和 PBS 各洗 3 次. 加 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) - 羊抗鼠二抗, 50 μl/孔, 湿盒内室温 2 h 后, 用 PBST 和 PBS 洗涤. 用邻苯二酚 (OPD) 底物液显色 15 min, 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应后, 酶标仪测定 490 nm 吸光度。

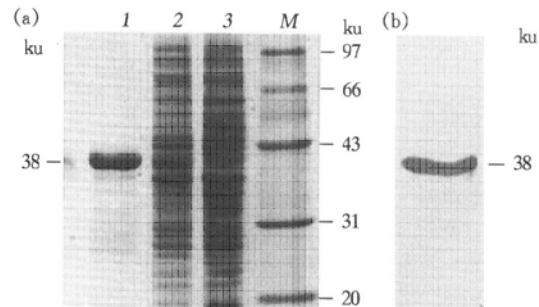
**1.2.6 V<sub>H</sub>/κ 与抗体 AA98 的相对亲和力比较:** 相对亲和力的比较参照 Macdonald 等<sup>[4]</sup>的方法. 抗体 AA98 对应的抗原提取液包被 96 孔酶标板, 5% 脱脂奶粉/PBS 封闭后, 分别加入 V<sub>H</sub>/κ 复性蛋白和抗体 AA98, 37℃ 温育 2 h, PBST 和 PBS 各洗板 3 次. 加入不同浓度的 NH<sub>4</sub>SCN 溶液各 50 μl, 室温放置 15 min, 用 PBS 洗板 3 次. 然后加碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗鼠 κ 抗体, 37℃ 温育 1 h, 用对硝基酚磷酸 (PNPP) 底物显色, Bio-Rad model 550 酶标仪上测定 A<sub>410</sub>. 以 A<sub>410</sub> 下降 50% 时相应的 NH<sub>4</sub>SCN 浓度作为相对亲和力的指数。

## 2 结 果

### 2.1 V<sub>H</sub>/κ 及包涵体的分离纯化

含有 pET21a V<sub>H</sub>/κ 的工程菌 BL21 (DE3) 经异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导 4 h 后, 收集

并超声破碎细胞, 经过反复离心和洗涤, 使包涵体纯度大于 90% (图 1a). 免疫印迹试验表明, 纯化包涵体中含有抗体 V<sub>H</sub>/κ, 它被碱性磷酸酶标记的抗鼠轻链抗体识别, 分子质量约 38 ku (图 1b).



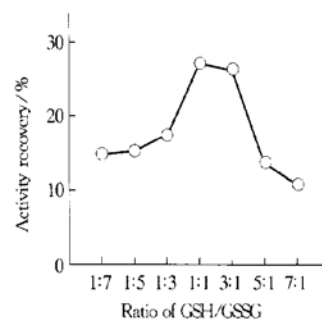
**Fig. 1 SDS PAGE analysis (a) and Western blotting analysis of the expression of V<sub>H</sub>/κ in E. coli (b)**

1: purified V<sub>H</sub>/κ inclusion body; 2: cell lysate of E. coli BL21a with pET21a-V<sub>H</sub>/κ; 3: cell lysate of E. coli BL21a with (pET21a); M: molecular mass marker.

### 2.2 稀释法复性条件的探索

通过优化稀释法中复性液各成分的浓度及理化条件, 为脲浓度梯度柱复性提供参考数据。

首先建立不同 GSH/GSSG 比例的复性体系, 检测复性产物的活性. 图 2 示 GSH/GSSG 不同比例对于复性效率的影响. 图 2 中横坐标为 GSH/GSSG 比值, 纵坐标为 V<sub>H</sub>/κ 复性的活性回收率. 我们发现当 GSH/GSSG 的比值为 1:1 时复性效果最好 (图 2).



**Fig. 2 The influence of the ratio of GSH/GSSG on the refolding of V<sub>H</sub>/κ**

精氨酸是一种较为常用的聚集抑制剂. 它的聚集抑制原理是可以破坏并溶解聚集和错误的折叠中间体, 从而稳定正确的折叠中间体<sup>[5]</sup>. 应用稀释法, 考察复性液 (1 mmol/L GSH, 1 mmol/L GSSG, 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.3) 中不同浓度

的精氨酸对  $V_H/\kappa$  复性的影响. 结果如图 3 所示, 当精氨酸的浓度为 0.4 mol/L 时,  $V_H/\kappa$  复性率达到最大, 继续增大精氨酸的浓度, 复性率反而有所下降, 说明高浓度的精氨酸可能使正确折叠的  $V_H/\kappa$  不能形成稳定的活性分子.

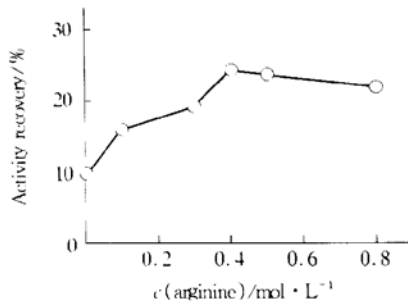


Fig. 3 The influence of arginine concentration on the refolding of  $V_H/\kappa$

复性液的 pH 值也是复性过程中的重要因素, 它对  $V_H/\kappa$  复性的影响, 可以通过检测复性后  $V_H/\kappa$  的蛋白质回收率来评价. 图 4 示在不同 pH 值下, 稀释法复性时  $V_H/\kappa$  回收率情况. 图 3 表明, pH 8.0~8.5 蛋白质的回收率最高, pH 小于 7.5 时, 大部分蛋白质将沉淀下来; pH 大于 9.0 时, 蛋白质在复性液中能稳定存在, 但透析后出现部分蛋白质沉淀. 说明  $V_H/\kappa$  合适的复性 pH 为 pH 8.0~8.5.

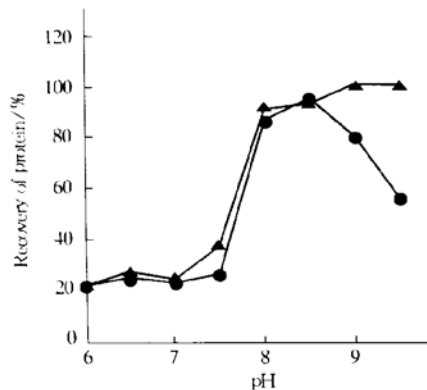


Fig. 4 The influence of pH on the recovery of refolded  $V_H/\kappa$

▲ — ▲: before dialysis; ● — ●: after dialysis.

### 2.3 $V_H/\kappa$ 普通柱复性

采用 Sephadex-G75 层析柱复性  $V_H/\kappa$  包涵体蛋白, 蛋白质回收率为 87%.

### 2.4 脲浓度梯度复性 $V_H/\kappa$

根据凝胶过滤中小分子的停留时间长, 大分子停留时间短的基本原理, 预先通过入口流动相中脲

的梯度变化, 在凝胶过滤柱中从上到下形成相应的脲梯度变化. 上样后, 由于蛋白质在柱中停留时间比脲短, 变性蛋白质在柱中运动时, 经历了变性剂浓度均匀递减而复性剂浓度均匀递增的过程, 从而使蛋白质逐步折叠成具有天然结构的功能蛋白质, 达到理想的复性. 本研究根据  $V_H/\kappa$  分子质量特点选择 Sephadex G-75 凝胶为复性介质.

梯度凝胶过滤的脲梯度长度是影响复性的重要因素. 当梯度长度为 0 时, 脲梯度凝胶过滤复性就同普通凝胶过滤复性完全一致; 而当梯度的长度超过一定值后, 在柱的出口处, 部分复性的包涵体蛋白质同变性液出现重叠, 包涵体蛋白质达不到完全复性的效果. 理想的情况应该是: 在柱的出口处包涵体蛋白质同梯度前沿刚好完全分离, 同时也使层析柱床得到充分的利用. 图 5 是脲和  $V_H/\kappa$  在凝胶过滤中的停留时间. 当层析流动相速度为 2.0 ml/min 时, 脲开始流出的时间为 60 min 左右, 而  $V_H/\kappa$  峰在 25 min 左右出完. 因此, 理想的梯度长度应该是 70 ml 左右.

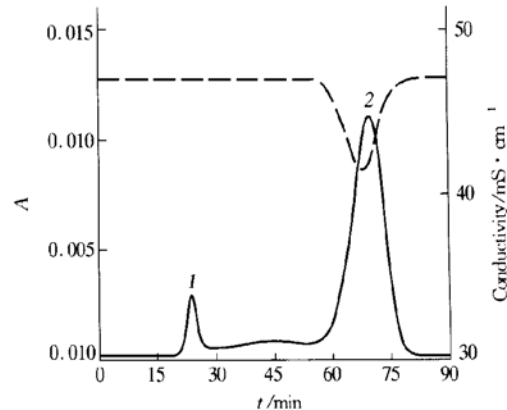
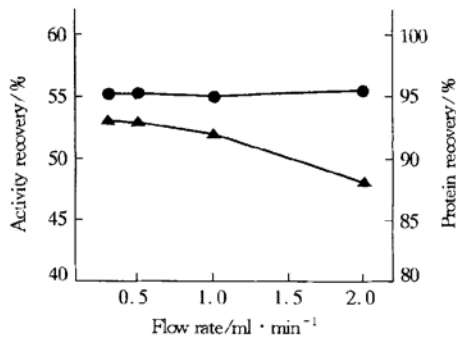


Fig. 5 The retention time of urea and  $V_H/\kappa$  on the gel filtration column

10 mm × 1 000 mm Sephadex G-75 column, loading 1.5 g/L × 2.0 ml. The mobile phase is 50 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mol/L NaCl, pH 8.3, elution rate 2.0 ml/min. 1:  $V_H/\kappa$ ; 2: urea. —: UV; - - -: conductivity.

当脲梯度长度确定后, 变性剂的脱除和蛋白质的复性就与洗脱液的流速有关. 从图 6 中可以看出, 流速的变化对蛋白质回收率影响不大, 而对蛋白质活性回收率有明显的影响. 流速越低活性回收率越高, 这可能是由于流速低时变性剂尿素脱除得更加缓慢温和, 因而有利于蛋白质的正确折叠. 另一方面, 虽然低流速可以提高  $V_H/\kappa$  的活性回收率, 但操作时间会延长. 我们注意到, 当流速低于

0.5 ml/min时, 活性回收率的提高已不显著, 因此 0.5 ml/min 的流速是  $V_H/\kappa$  复性的最佳选择.

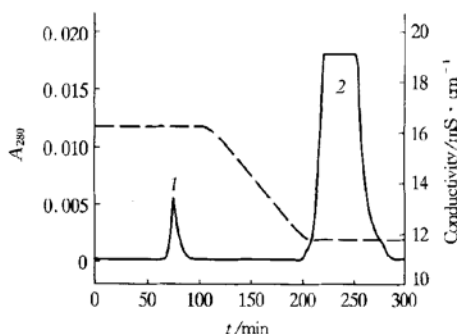


**Fig. 6 The influence of flow rate on the refolding of  $V_H/\kappa$  with column**

10 mm × 1 000 mm Sephadex G-75 column, loading 2.5 g/L × 2.0 ml, the buffer A is 50 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.4 mol/L arginine, 3 mmol/L GSH, 1 mmol/L GSSG, 2 mmol/L EDTA, pH 8.3, the mobile phase B is in mobile phase A containing 8 mol/L urea. After equilibrated with A, in 70 ml volume, the concentration of B was increased from 0% to 100% by linear gradient 70 ml. Then load the sample and elution with buffer B. ▲ — ▲: activity recovery; ● — ●: protein recovery.

实验表明, 当增加变性液中蛋白质浓度时, 得到的复性蛋白质活性回收率有所下降, 但影响不显著. 这可能是由于在梯度凝胶过滤中, 尿素浓度足够抑制样品量增加时的聚集作用.

脲浓度梯度柱复性  $V_H/\kappa$  包涵体的图谱如图 7 所示. 图 7 中峰 1 为复性好的  $V_H/\kappa$ , 峰 2 为 DTT.



**Fig. 7 The refolding of  $V_H/\kappa$  with urea gradient**

10 mm × 1 000 mm Sephadex G-75 column, loading 2.5 g/L × 2.0 ml, the buffer A is 50 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.4 mol/L arginine, 3 mmol/L GSH, 1 mmol/L GSSG, 2 mmol/L EDTA, pH 8.3, the mobile phase B is mobile phase A containing 8 mol/L urea. After equilibrated with A, in 70 ml volume, the concentration of B was increased from 0% to 100% by linear gradient. Flow rate 0.5 ml/min. 1:  $V_H/\kappa$ , 2: DTT. —: UV; - - -: conductivity.

### 2.5 各种复性方法的比较

我们利用三种不同复性方法对抗体  $V_H/\kappa$  进行研究, 比较蛋白质回收率和活性回收率, 结果如表 1 所示. 可以看出三种复性方法在蛋白质回收率方面的差别不显著, 而在复性蛋白质生物活性方面的区别十分明显. 脲浓度梯度法获得的复性蛋白质活性是稀释法获得的复性蛋白质活性的 2 倍. 说明脲梯度法有效抑制了变性  $V_H/\kappa$  的聚集, 促进了  $V_H/\kappa$  包涵体蛋白的正确折叠.

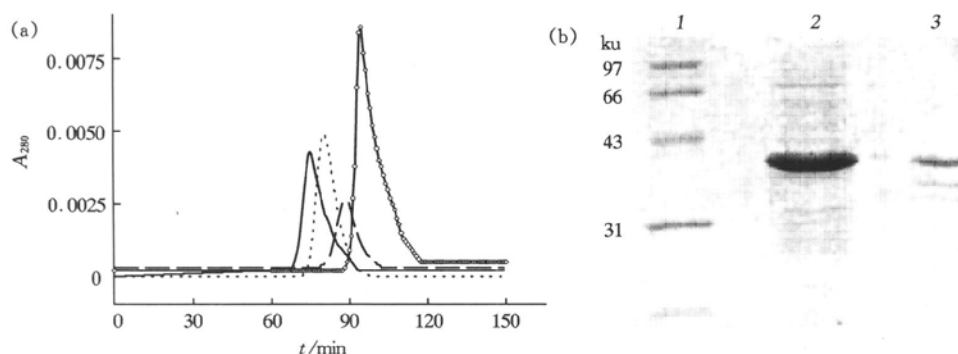
**Table 1 The comparison of the refolding of  $V_H/\kappa$  with different protocols**

Refolding method	Recovery of $V_H/\kappa$ / %	Activity recovery of $V_H/\kappa$ / %
Dilution	90.7	28.3
Normal column	87.2	43.7
Urea gradient	95.3	52.9

另外, 我们注意到通过不同方法获得的  $V_H/\kappa$  在 Sephadex G-75 凝胶柱中的停留时间不同 (图 8a). 脲梯度复性时  $V_H/\kappa$  在柱中的停留时间最短, 其次是普通柱复性的, 而已复性的  $V_H/\kappa$  再次上 Sephadex G-75 凝胶柱时其停留时间最长. 这是由于变性液中的  $V_H/\kappa$  未折叠, 呈线性状态. 当采用脲梯度复性时, 脲的浓度递减, 线性  $V_H/\kappa$  逐渐折叠, 到柱底部时形成球状非线性分子, 其停留时间最短. 在普通柱复性过程中, 线性  $V_H/\kappa$  在层析柱的顶部就与脲等小分子分离,  $V_H/\kappa$  很快就完成折叠, 形成球状分子, 因此在柱中的绝大部分时间都是以球状分子的形式存在, 故停留时间相对较长. 而复性好的  $V_H/\kappa$  是球状蛋白, 在柱中没有折叠过程, 停留时间为三者中最长. 实际上,  $V_H/\kappa$  在柱中停留时间的变化, 映射出了变性  $V_H/\kappa$  的复性过程, 变性液逐渐地稀释, 有利于蛋白质的复性.

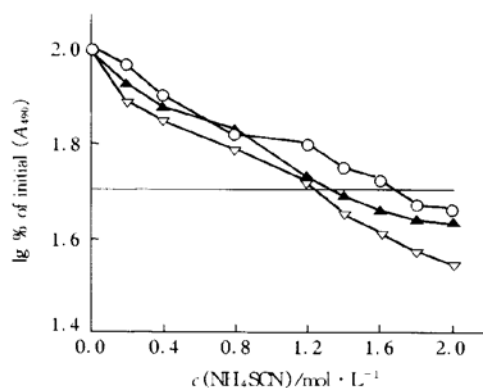
值得注意的是, 本实验中, 无论  $V_H/\kappa$  是以包涵体的形式存在还是以活性蛋白形式存在, 在复性柱中的停留时间均稍小于 BSA 的停留时间. 通过分子质量标准曲线的测定, 发现在溶液中,  $V_H/\kappa$  的实际分子质量在 70 ku 左右, 复性前后的  $V_H/\kappa$  溶液作电泳分析, 结果如图 8b 所示. 图 8 中 1 为蛋白质分子质量标准, 2 为复性前的  $V_H/\kappa$  包涵体, 3 为复性后的  $V_H/\kappa$ . 电泳反映出的  $V_H/\kappa$  分子质量为 38 ku, 因此可以推测,  $V_H/\kappa$  在溶液中是以双体的形式存在.

稀释法、柱复性法获得的  $V_H/\kappa$  与 AA98 相对亲和力的比较如图 9 所示。对于稀释法获得的复性  $V_H/\kappa$ ，其相对亲和力指数是 1.25。对于梯度复性法是 1.32。对于抗体 AA98，亲和力指数约 1.7。



**Fig 8** The retention of BSA,  $V_H/\kappa$  before refolded and after refolded on the Sephadex G 75 column (a) and the SDS PAGE analysis of  $V_H/\kappa$  before and after refolded (b)

10 mm × 1 000 mm Sephadex G-75 column, elution rate 0.5 ml/min, 1: Protein molecular mass marker; 2:  $V_H/\kappa$  before refolded; 3:  $V_H/\kappa$  after refolded. —: refolding  $V_H/\kappa$  by gradient; ----: refolding  $V_H/\kappa$  by normal column; ·····: refolded  $V_H/\kappa$ ; ○—○: BSA.



**Fig 9** Measurement of relative affinity of  $V_H/\kappa$  and AA98 by ELISA using thiocyanate elution

▽—▽:  $V_H/\kappa$  refolded by dilution; ▲—▲:  $V_H/\kappa$  refolded by gradient; ○—○: AA98.

### 3 讨 论

文献报道, *E. coli* 分泌表达的抗孕酮  $V_H/\kappa$  可在胞周质腔中通过二硫键形成  $(V_H/\kappa)_2$  双体结构<sup>[6]</sup>。Wu 等<sup>[7]</sup>的稀释法复性中, 未注意到双体结构的形成。而本实验柱层析复性中, 检测到了  $V_H/\kappa$  双体结构的形成, 可能的原因有三方面。a. 稀释法获得的  $V_H/\kappa$  并未充分复性, 而柱层析方法使  $V_H/\kappa$  的正确折叠更完全。柱复性过程更类似于

这说明, 脲梯度凝胶柱法可以使  $V_H/\kappa$  复性更完全; 同时, 复性后的  $V_H/\kappa$  对抗原的亲和力要低于原抗体 AA98。

分泌在胞周质腔中的线性  $V_H/\kappa$  的折叠。b. 分泌在胞周质腔中的  $V_H/\kappa$  及柱复性中的  $V_H/\kappa$  的相对浓度较高, 有利于分子间相互作用形成双体, 稀释法复性时, 蛋白质浓度相对较低, 不利于双体结构的形成。c. 双体结构可能不是通过二硫键形成, 而是其他分子间相互作用导致, 因而仅仅通过电泳无法推测出双体结构的形成。

在凝胶过滤层析中, 大分子如蛋白质等在柱中移动速度快, 小分子的移动速度慢。普通柱复性的活性回收率低的一个主要原因是当蛋白质与变性剂分离时, 蛋白质容易聚集。变性液中的脲可以阻止这种聚集的发生, 但高浓度的脲对蛋白质折叠有强的破坏作用。L-精氨酸是较理想的抑制聚集, 对正确折叠的蛋白质影响也较小。本文试验脲梯度复性, 由于在柱床中形成了脲递减、精氨酸浓度不变的分布, 使得不破坏折叠  $V_H/\kappa$  的同时, 聚集也得到了有效的抑制, 因此,  $V_H/\kappa$  的活性回收率得到明显的提高。

### 参 考 文 献

- 1 Marston F A O. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1986, **240** (1): 1~12
- 2 Gu Z Y, Su Z G, Janson J C. Urea gradient gel filtration chromatography enhanced the protein refolding. *J Chromatogr A*,

- 2001, **918** (2): 311~ 318
- 3 Werner M H, Clore G M, Gronenborn A M, *et al.* Refolding proteins by gel filtration chromatography. FEBS Letters, 1994, **345** (2~ 3): 125~ 130
- 4 Macdonald R A, Hosking C S, Jone C L. The measure of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. J Immunol Method, 1988, **106** (2): 191~ 194
- 5 Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. Curr Opin Biotechnol, 1998, **9** (5): 497~ 501
- 6 He M, Kang A S, Hamon M, *et al.* Characterization of a progesterone binding, three domain antibody fragment ( $V_H/\kappa$ ) expressed in *E. coli*. Immunology, 1995, **84**: 662~ 668
- 7 吴小平, 杨东玲, 张志强, 等. 抗肿瘤血管三结构域单链抗体  $V_H/L$  的构建与表达. 生物工程学报, 2001, **17** (1): 50~ 54  
Wu X P, Yang D L, Zhang Z Q, *et al.* Chin J Biotech, 2001, **17** (1): 50~ 54

## Expression and Refolding of an Anti-tumor Antibody AA98 Fragment $V_H/\kappa$ \*

ZHANG Zhi Qiang, LIN Yun, YAN Xi Yun\*\*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** The functional fragment  $V_H/\kappa$  of an anti-tumor antibody AA98 was refolded *in vitro* by dilution refolding, gel filtration chromatography and urea gradient gel filtration, respectively. Concerning various factors in the renaturing buffer, such as GSH/CSSG ratio, arginine concentration, pH, flow rate, protein concentration in denaturing buffer and linear gradient, a urea gradient gel filtration method for  $V_H/\kappa$  refolding was established. As a result, compared with the traditional dilution refolding and gel filtration, the activity recovery of  $V_H/\kappa$  obtained by urea gradient gel filtration was significantly improved.

**Key words** chromatography, gel refolding, antibody fragment

\* This work was supported by a grant from The State 863 High Technology R&D Project of China (102-09-0204).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-62633718, E-mail: yanxy@sun.im.ac.cn

Received: December 14, 2001 Accepted: February 4, 2002