

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104725464 A

(43) 申请公布日 2015.06.24

(21) 申请号 201310705054.3

(22) 申请日 2013.12.20

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 郑春杨 王永宏 冯建敏 张琳
王琳

(51) Int. Cl.

C07K 1/113(2006.01)

C07K 1/18(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种蛋白质产品重复利用的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种蛋白质产品重复利用的方法,包括将蛋白质 PEG 修饰,待活性降低,产品超过有效期后,将其彻底做变性处理,并重折叠的步骤。其优点在于,可以提高蛋白质产品的重复利用次数,降低成本。而且,在重折叠步骤中,可以有效提高复性蛋白的浓度和成功率。该方法工序简单,无特殊添加剂要求,成本低,可用于日化和工业等方面蛋白质产品的重复利用,以应对苛刻的工况条件和更高的成本降低需求。

1. 一种蛋白质产品重复利用的方法,包括将蛋白质 PEG 修饰,待活性降低,产品超过有效期后,将其彻底做变性处理,并重折叠的步骤。

2. 根据权利要求 1 所述蛋白质产品重复利用的方法,其中:

非特异氨基修饰:将甲基对硫磷水解酶加入缓冲液 I 进行溶解,调节 pH 至 7-9,加入聚乙二醇修饰剂,蛋白和聚乙二醇修饰剂摩尔比为 1 : 5-1 : 50。所述缓冲液 I 为 0.02-0.2mol/L Tris-Cl 或磷酸盐缓冲液 (PB), pH7-9, 恒温状态下, 4°C -37°C 进行修饰;

N 端氨基修饰:将甲基对硫磷水解酶加入缓冲液 II 进行溶解,调节 pH 至 4-6,加入聚乙二醇修饰剂,蛋白和修饰剂摩尔比为 1 : 1-1 : 10 ;所述缓冲液 II 为 0.02-0.2mol/L NaAc-HAc 或磷酸盐缓冲液, pH4-6, 恒温状态下, 4°C -37°C 进行修饰;

或, 巯基修饰:将甲基对硫磷水解酶加入缓冲液 III 进行溶解,调节 pH 至 7-9,加入聚乙二醇修饰剂,蛋白和修饰剂摩尔比为 1 : 1-1 : 10 ;所述缓冲液 III 为 0.02-0.2mol/L Tris-Cl 或硼酸 - 硼砂缓冲液, pH7-9, 恒温状态下, 4°C -37°C 进行修饰。

所述 PEG 修饰甲基对硫磷水解酶的方法中,非特异氨基修饰所用的聚乙二醇修饰剂为 mPEG-SC5000、mPEG-SC10000、mPEG-SC20000 ;N 端氨基修饰所用聚乙二醇修饰剂为 mPEG-ALD5000、mPEG-ALD10000、mPEG-ALD20000 ;或, 巯基修饰所用的聚乙二醇修饰剂为 mPEG-MAL5000、mPEG-MAL10000、mPEG-MAL20000。

3. 根据权利要求 1 所述蛋白质产品重复利用的方法,其中,修饰时间为 3-24 小时。

4. 根据权利要求 1 所述蛋白质产品重复利用的方法,其中,修饰后的蛋白采用离子交换层析 DEAE Sepharose6FF 或 Q Sepharose6FF 纯化修饰组分,流动相为 0.05-0.2mol/L Tris-HCl 或磷酸盐缓冲液 pH6-9.5,添加 0-1.5M 氯化钠。

5. 根据权利要求 1 所述蛋白质产品重复利用的方法,其中,变性方法,使用变性剂 6M 盐酸胍或 8M 尿素和过量的还原剂处理,使蛋白质分子从原来有序的卷曲的紧密结构变为无序的松散的伸展状结构。复性方法,将变性蛋白与稀释复性缓冲液混合,放置过夜,通过降低变性剂和还原剂的含量,逐步恢复蛋白质分子活性。

一种蛋白质产品重复利用的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种蛋白质产品重复利用的方法,包括将蛋白质 PEG 修饰,待活性降低,产品超过有效期后,将其彻底做变性处理,并重折叠的步骤。其优点在于,可以提高蛋白质产品的重复利用次数,降低成本。而且,在重折叠步骤中,可以有效提高复性蛋白的浓度和成功率。

技术背景

[0002] 与化学产品相比,蛋白质产品都面临结构不稳定、随着时间延长活性快速降低的问题,从而导致蛋白质产品有效期短、价格偏高。

[0003] 这种不稳定性有的来自物理因素,有的来自化学因素。最常见的不稳定性就是在一定的条件下,蛋白质的二级、三级和四级结构可能会发生变化,这会导致蛋白质聚集。蛋白质聚集会导致活性的损失或者降低,减少溶解性。在很多情况下,蛋白质的聚集是由于部分变性的蛋白质链的分子间交联。有研究表明聚合可能发生于蛋白质特定过渡态构象,而不是非特异性的结合。聚集过程大体分为三个步骤:引发,传递和终止。蛋白质聚集可以在热力学上减少溶剂和蛋白质暴露的疏水残基之间的不利作用。疏水相互作用对与蛋白质折叠和聚集都是主要的驱动力。蛋白质的折叠和聚集都代表了暴露于蛋白表面和埋藏蛋白内部的疏水残基的一种平衡。这种平衡非常的精细,改变蛋白质中的一个氨基酸可能会完全改变其聚集行为。

[0004] 蛋白质的聚集可以有很多的物理因素诱导,比如温度,离子强度,涡流,表面或界面吸附等等。这些因素可以增加蛋白的疏水表面,会导致蛋白质的聚集。例如,人重组角化细胞生长因子(rhKGF)在升温过程中会缓慢变性,会导致蛋白聚集进而沉降。浓度为 0.5mg/ml 的猪重组生长激素在 63℃ 时会发生沉淀。剧烈搅拌人重组生长因子溶液(0.5mg/ml, pH7.4)一分钟后有 67% 的蛋白质聚集为不可溶蛋白。

[0005] 化学降解和修饰会暴露出蛋白质的疏水表面,也会导致蛋白质的聚集。蛋白质颗粒直接的形成化学键合的聚合体,如胰岛素;也可以发生化学变化后聚集,比如人耻骨松弛激素在 His 和 Met 被氧化以后发生聚集。物理和化学聚合也可能同时发生。例如冷冻干燥的 β -半乳糖酶在储藏过程中可以发生二硫键的键合而聚集,同时由于非化学键合的相互作用也可形成可溶性的聚集体。

[0006] 蛋白质的聚集可以由单一的分子开始(单一分子或分子内过程),也可以由多个分子开始。单一分子过程包括 β -消除和链间二硫键的错位,比如水溶液中的白细胞介素-1 受体拮抗剂。多分子聚集过程包括牛血清白蛋白的巯基二硫键交换,胰岛素的巯基催化的二硫键交换。形成共价聚合的例子还有核糖核酸酶 A,非共价聚合的例子有破伤风类毒素。如果随着蛋白浓度的增加,聚集体所占的比例在增加,则此过程可能涉及多分子参与。

[0007] 综上,蛋白质产品本身会受到生产和储存环节不同物理、化学因素的影响逐渐失去活性。

[0008] 针对以上问题,聚乙二醇(PEG)修饰技术应运而生,通过将高分子 PEG 链,与蛋白

质结合,从而屏蔽和削弱部分物理和化学作用的影响,从而起到保护蛋白质、延长产品有效期的作用。PEG 修饰技术已经发展成熟,在生物医药方面已经多有尝试并且有产品上市,比如先灵葆雅公司的 PEG 修饰干扰素。然而对于日化和工业等方面,由于苛刻的工况条件和更高的成本降低需求,需要进一步探索延长有效期或者重复利用的方法。

[0009] 本发明则是从 PEG 修饰蛋白和蛋白质重折叠过程的角度,开发一种新的方法,包括将蛋白质 PEG 修饰,待活性降低,产品超过有效期后,将其彻底做变性处理,并重折叠的步骤。其优点在于,可以提高蛋白质产品的重复利用次数,降低成本。而且,在重折叠步骤中,可以有效提高复性蛋白的浓度和成功率。具体依据如下:

[0010] 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是由很多重复的氧乙烷基 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$) 结构单元组成的线形或带支链的中性惰性大分子聚合物,其 CAS 登记号为 25322-68-3,化学结构如下所示。

[0011] $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n-1}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$

[0012] PEG 有两个活性羟基,为避免在蛋白质修饰的过程中发生交联反应,人们经常选用一端被甲基封闭的聚合物即单甲氧基聚乙二醇 (monomethoxyl polyethylene glycol, mPEG) 对蛋白质进行化学修饰。但是 mPEG 的末端为羟基,反应活性较弱,在温和的条件下不能修饰在蛋白质的氨基酸残基上。所以应首先对 mPEG 的末端羟基进行衍生化处理,将羟基活化成亲电活性较高的官能团,使之能在温和的条件下能与蛋白质或多肽的氨基、巯基或其它亲核基团发生反应,而不损伤其生物学活性。

[0013] 当 PEG 修饰蛋白经历变性 - 重折叠 / 复性过程,PEG 链可以有效的促进重折叠效率,并且抑制该过程常见的聚集问题,这是因为 (1) PEG 在水溶液中会发生水合作用,每个氧化乙烷单元 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$) 能紧紧结合 2-3 个水分子。PEG 的这种水合作用还会随着其分子量的增大而升高,当分子量的继续升高时,PEG 链在溶液中会发生自折叠,形成较多类似蛋白质或多肽二级结构的折叠链段,这些 PEG 链段通过相互作用还会松散地结合本体溶液中游离的水分子。因而,使 PEG 修饰蛋白在复性过程中,快速发展成为“独立个体”;(2) PEG 的这种水合性质在溶液中还表现出较大的空间稳定效应。这种立体效应具体表现在弹性作用方面。当另一大分子物质接近 PEG 修饰的蛋白质表面时,由于 PEG 链段的运动受到束缚,造成构象熵的丢失产生弹性排斥力从而将大分子推开。这些力使溶液中其他分子很难与 PEG 修饰的大分子充分发生碰撞接触,从而在复性过程中有效抑制聚集体的形成。(3) PEG 分子的链段柔顺性是其良好性质的另一重要物理基础。PEG 良好的片段柔顺性使其不断改变构象以适应蛋白质的表面拓扑学结构,可以促进目的蛋白的正确折叠。

[0014] 尽管使用分子伴侣促进蛋白质复性的方式已经多有报道,分子伴侣这类蛋白首先由 Horwich 在 1989 年发现,主要作用是辅助部分折叠或不正确折叠的蛋白质,加速正确折叠的进行或提供折叠发生所需的微环境。但是,由于 (1) 分子伴侣只能在复性过程中使用,且对复性的促进效果有限、成本高;(2) 在蛋白质产品的正常使用周期内,缺乏保护作用,发生酶解和化学降解后,复性过程无法恢复活性、回收利用,相比之下,PEG 共价修饰的蛋白质产品在使用周期可以有效降低对蛋白链的降解,而且变性 - 复性过程,不需要添加剂,复性浓度高、收率显著提高,所以,将 PEG 修饰与复性耦合将是蛋白质产品重复利用的一种新途径。

发明内容

[0015] 本发明提供一种蛋白质重复利用方法,主要步骤为:

[0016] 非特异氨基修饰:将目的蛋白加入缓冲液 I 进行溶解,调节 pH 至 7-9,加入聚乙二醇修饰剂,蛋白和聚乙二醇修饰剂摩尔比为 1 : 5-1 : 50。所述缓冲液 I 为 0.02-0.2mol/L Tris-Cl 或磷酸盐缓冲液 (PB), pH7-9, 恒温状态下,4℃ -37℃ 进行修饰;

[0017] N 端氨基修饰:将目的蛋白加入缓冲液 II 进行溶解,调节 pH 至 4-6,加入聚乙二醇修饰剂,蛋白和修饰剂摩尔比为 1 : 1-1 : 10 ;所述缓冲液 II 为 0.02-0.2mol/L NaAc-HAc 或磷酸盐缓冲液, pH4-6, 恒温状态下,4℃ -37℃ 进行修饰;

[0018] 或, 巯基修饰:将目的蛋白加入缓冲液 III 进行溶解,调节 pH 至 7-9,加入聚乙二醇修饰剂,蛋白和修饰剂摩尔比为 1 : 1-1 : 10 ;所述缓冲液 III 为 0.02-0.2mol/L Tris-Cl 或硼酸 - 硼砂缓冲液, pH7-9, 恒温状态下,4℃ -37℃ 进行修饰;

[0019] 所述 PEG 修饰目的蛋白的方法中,非特异氨基修饰所用的聚乙二醇修饰剂为 mPEG-SC5000、mPEG-SC10000、mPEG-SC20000 ;N 端氨基修饰所用聚乙二醇修饰剂为 mPEG-ALD5000、mPEG-ALD10000、mPEG-ALD20000 ;或, 巯基修饰所用的聚乙二醇修饰剂为 mPEG-MAL5000、mPEG-MAL10000、mPEG-MAL20000。

[0020] 所述 PEG 修饰目的蛋白的方法,其中修饰时间为 3-24 小时。

[0021] 所述 PEG 修饰目的蛋白的方法,其中修饰后的蛋白采用离子交换层析 DEAE Sepharose6FF 或 Q Sepharose6FF 纯化修饰组分,流动相为 0.05-0.2mol/L Tris-HCl 或磷酸盐缓冲液 pH6-9.5,添加 0-1.5M 氯化钠。

[0022] 目的蛋白活性检测,活性低于企业标准底限后,进行变性 - 复性操作。变性方法,使用 6M 盐酸胍或 8M 尿素和过量的还原剂如巯基乙醇,使蛋白质分子从原来有序的卷曲的紧密结构变为无序的松散的伸展状结构。复性方法,将变性蛋白与稀释复性缓冲液混合,放置过夜,通过降低变性剂和还原剂的含量,逐渐促进目的蛋白折叠。整个复性过程,如无说明不添加任何对复性有增强作用的分子伴侣。仅在对比共价结合 PEG 与经典分子伴侣 - 溶液中游离 PEG 的复性促进效果时,在复性缓冲液中加入与共价结合 PEG 等量且相同分子量的游离 PEG。监测复性后目的蛋白的活性变化,活性高于企标出厂要求则为合格产品。

[0023] 本发明优点在于,可以提高蛋白质产品的重复利用次数,降低成本。而且,在重叠步骤中,可以有效提高复性蛋白的浓度和成功率。此重复利用工序简单,无特殊添加剂要求,成本低。建议用于日化和工业等方面蛋白质产品的重复利用,以应对苛刻的工况条件和更高的成本降低需求。

附图说明

[0024] 图 1 为复合干扰素制备过程检测组图,A. 发酵产物检测 (1-2 分别为诱导前、后全菌 ;3-4 分别为细胞裂解上清、沉淀), B. 复性产物的离子交换分离, C. SDS-PAGE 检测产物的二硫键形成情况;

[0025] 图 2 为复合干扰素 PEG 共价修饰的组图,D. PEG 定点修饰产物的分离图谱,E. 分离过程的 SDS-PAGE 检测 (P1、P2 分别对应图 D 中色谱分离峰 ;R 为修饰反应混合物), F. PEG 修饰产物的质谱分析不同修饰度;

[0026] 图 3 变性 - 复性过程监测图,A. 对比复合干扰素、B. 复合干扰素 + 游离 PEG (分子

伴侣)、C. PEG 修饰复合干扰素三个试验组,检测在传统稀释复性过程后,蛋白回收率和活性回收率;

[0027] 图 4 复性蛋白浓度对复性效果的影响监测图,A. 复合干扰素,C. PEG 修饰复合干扰素;

[0028] 图 5 共价结合 PEG 促进折叠原理分析图,A. 传统稀释复性加分子伴侣,B. 共价结合 PEG

具体实施方式

[0029] 本发明涉及一种蛋白质产品重复利用的方法,包括将蛋白质 PEG 修饰,待活性降低,产品超过有效期后,将其彻底做变性处理,并重折叠的步骤。用于日化和工业等方面蛋白质产品的重复利用,以应对苛刻的工况条件和更高的成本降低需求。

[0030] 具体地说,本发明的方法如下:

[0031] (1) 发酵重组目的蛋白的大肠杆菌,菌体破碎后,收取上清液直接纯化,或者收集包涵体通过复性后纯化获得目的蛋白。

[0032] (2) 对目的蛋白进行 PEG 修饰。其中,非特异氨基修饰:将目的蛋白加入缓冲液 I 进行溶解,调节 pH 至 7-9,加入聚乙二醇修饰剂,蛋白和聚乙二醇修饰剂摩尔比为 1 : 5-1 : 50。所述缓冲液 I 为 0.02-0.2mol/L Tris-Cl 或磷酸盐缓冲液 (PB), pH7-9,恒温状态下,4°C -37°C 进行修饰;N 端氨基修饰:将目的蛋白加入缓冲液 II 进行溶解,调节 pH 至 4-6,加入聚乙二醇修饰剂,蛋白和修饰剂摩尔比为 1 : 1-1 : 10;所述缓冲液 II 为 0.02-0.2mol/L NaAc-HAc 或磷酸盐缓冲液, pH4-6,恒温状态下,4°C -37°C 进行修饰;或,巯基修饰:将目的蛋白加入缓冲液 III 进行溶解,调节 pH 至 7-9,加入聚乙二醇修饰剂,蛋白和修饰剂摩尔比为 1 : 1-1 : 10;所述缓冲液 III 为 0.02-0.2mol/L Tris-Cl 或硼酸-硼砂缓冲液, pH7-9,恒温状态下,4°C -37°C 进行修饰;所述 PEG 修饰目的蛋白的方法中,非特异氨基修饰所用的聚乙二醇修饰剂为 mPEG-SC5000、mPEG-SC10000、mPEG-SC20000;N 端氨基修饰所用聚乙二醇修饰剂为 mPEG-ALD5000、mPEG-ALD10000、mPEG-ALD20000;或,巯基修饰所用的聚乙二醇修饰剂为 mPEG-MAL5000、mPEG-MAL10000、mPEG-MAL20000。修饰反应时间为 3-24 小时。

[0033] (3) 修饰后的蛋白采用离子交换层析 DEAE Sepharose6FF 或 Q Sepharose6FF 纯化修饰组分,流动相为 0.05-0.2mol/L Tris-HCl 或磷酸盐缓冲液 pH6-9.5,添加 0-1.5M 氯化钠。

[0034] (4) 对纯化获得的组分进行 SDS-PAGE 检测,确定目的蛋白的 PEG 修饰情况,检测目的蛋白修饰前后的活性。

[0035] (5) 活性低于企业标准底限后,进行变性-复性操作。变性方法,使用 6M 盐酸胍或 8M 尿素和过量的还原剂如巯基乙醇,使蛋白质分子从原来有序的卷曲的紧密结构变为无序的松散的伸展状结构。复性方法,变性蛋白与稀释复性缓冲液混合,放置过夜,通过降低变性剂和还原剂的含量,逐渐促进目的蛋白折叠。整个复性过程,如无说明不添加任何对复性有增强作用的分子伴侣。仅在对比共价结合 PEG 与经典分子伴侣-溶液中游离 PEG 的复性促进效果时,在复性缓冲液中加入与共价结合 PEG 等量且相同分子量的游离 PEG。监测复性后目的蛋白的活性变化,活性高于企标出厂要求则为合格产品。

[0036] 以下结合附图举实施例作进一步说明,实施例中是以 mPEG-MAL20000 为例对复合干扰素(菌种由北京百川飞虹生物科技有限公司提供,专利号 ZL200810101309.4)进行修饰。

[0037] 实施例一

[0038] 重组菌的培养、复性和纯化:

[0039] 菌株保存在 -80°C 。用灭菌的接种针刮拭冻结的甘油管表面,然后立即把粘附在接种针上的细菌划于含 $100\mu\text{g/ml}$ Amp 的 LB 琼脂平板表面,于 37°C 培养过夜。挑取单菌落,分别接种于3个装有 100ml LB 培养液的 500ml 摇瓶中, 37°C ,摇床 240rpm 培养,测 OD600 达 1.0 时转接 3L 液体 LB 培养基(转接前加入 $100\mu\text{g/ml}$ Amp),同样条件下培养,OD600 达 1.0 时作为二级种子液转入 100L 发酵罐。 37°C 环境下发酵,发酵过程中调节转速与通气量保持氧饱和度在 $20\% -60\%$,在 OD600 为 1.0 到 2.0 时以 1mM IPTG 诱导,期间保持氧饱和度在 $20\% -60\%$,pH 在 $7.0 -7.4$, (氨水和盐酸调节)。发酵过程中若有大量气泡,用消泡剂或灭菌的大豆油 $0.5\text{ml} -1.0\text{ml}$ 消泡。在单纯依靠转速与通气量不能调节氧饱和度在 $20\% -60\%$ 时,则补料。诱导约 $4 -8$ 小时后下罐,OD600 为 $6.0 -20.0$ 。 5000rpm , 30min 离心收集菌体,冷冻保存或直接进行以下的实验。

[0040] 取一定量菌体,以 $1 : 6$ (W : V)的比例用破菌液充分悬浮,在冰浴中超声破碎,超声功率 300W ,超声 4 分(超 5 秒,间隔 5 秒),停 3 分,反复 5 次。破菌完毕后 12000rpm , 30min 离心,收集沉淀。上清及沉淀均取样电泳。将上述沉淀按 $1 : 5$ (W/V)的比例用包涵体洗涤液充分悬浮至形成均匀浑浊液,于 12000rpm 离心 20min ,收集沉淀。同样方法成分洗涤 2 次,最后洗涤的包涵体称重。各次上清及沉淀均取样电泳。称取洗涤后包涵体按 $1 : 5$ (W/V)的比例用变性剂悬浮并搅拌 3 小时。然后于 12000rpm 离心 20min ,收集上清,上清及沉淀均取样电泳。一定量变性蛋白,按最终蛋白浓度为 0.1mg/ml 的比例缓慢加入相应的复性缓冲液中。全部加入后室温放置一夜。

[0041] 用 2 个柱体积(CV)的缓冲液A平衡层析柱;整个层析过程流速为 10mL/min , 280nm 监测。复性蛋白透析脱盐后的,调 $\text{pH}4.5$,离心或膜过滤除去蛋白聚集体,然后直接上事先平衡好的 CM Sepharose FF 柱,流速 100cm/h ,梯度洗脱并分段收集复性完全组分。以上各步骤监测见图1,通过氧化和还原 SDS-PAGE 电泳,确定收集的洗脱组分为复性完全、结构正确的复合干扰素。

[0042] 实施例二

[0043] PEG 修饰采用 Mal-mPEG 修饰剂进行定点修饰, Mal-mPEG 修饰剂分子量为 20KD ,修饰条件为:缓冲液采用 Tris-HCl , $\text{pH}8.5$,修饰剂与复合干扰素摩尔比为 $10 : 1$,修饰温度为 4°C ,修饰时间为 6h 。

[0044] 先用上样缓冲液(50mM Tris-HCl, $\text{pH}8.5$)平衡层析柱(约 5 个柱体积),取修饰后样品过滤后的上清液上阴离子交换柱,上样线性流速 4ml/min 。待上样完毕后用上样缓冲液(50mM Tris-HCl, $\text{pH}8.5$)淋洗,淋洗线性流速为 4ml/min ,洗至 280nm 吸收回归基线。用洗脱缓冲液(50mM Tris-HCl, 1M NaCl, $\text{pH}8.5$)从 $0 -100\%$ 梯度纯化修饰后样品,洗脱线性流速为 5ml/min ,冲洗 10 个柱体积,分别收集洗脱峰。洗脱峰进行 SDS-PAGE 电泳和质谱检测。以上各步骤监测见图2,结果表明,收集组分为 PEG 修饰复合干扰素。

[0045] 实施例三

[0046] 根据中华人民共和国药典(2005年版三部)规定,采用细胞病变抑制法在细胞水平检测复合干扰素及其 PEG 修饰产物的活性和活性变化。原理:依据干扰素可以保护人羊膜细胞(WISH)免受水泡性口炎病毒(VSV)破坏的作用,用结晶紫对存活的人羊膜细胞(WISH)进行染色,于波长 570nm 处测定其吸光度,可得到干扰素对人羊膜细胞(WISH)的保护效应曲线,依此测定干扰素生物学活性。人羊膜细胞(WISH)被 VSV 病毒进攻时,能保护一半的细胞不被攻击的干扰素稀释度的倒数为 1 个活性单位。检测变性-复性操作前初始值,复合干扰素活性为 $5.44 \times 10^8 \text{U/mg}$, PEG 修饰复合干扰素活性为 $5.2 \times 10^7 \text{U/mg}$ 。

[0047] 实施例四

[0048] 变性液(50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 6M 盐酸胍, pH8.5)中,最后加入总体积 1%的 β -巯基乙醇,变性时间 9h。室温离心(8000 \times g 离心 30min),取上清液。将复性溶液蛋白浓度保持在 0.2mg/ml。依稀释体积配制复性液(50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.5), 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷。复性保持 4 $^{\circ}\text{C}$ 操作。将预冷复性液置于磁力搅拌器上,将磁力搅拌器转速调整至搅拌无气泡产生即可,取包涵体变性液逐滴加入复性液中,滴加速度保持在 2ml/min。包涵体变性液滴加完成,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 48h。4 $^{\circ}\text{C}$ 离心(8000 \times g 离心 30min),取上清液,所得上清即为复性液。

[0049] 进行变性-复性过程监测,对比复合干扰素、复合干扰素+游离 PEG(分子伴侣)、PEG 修饰复合干扰素三个试验组,在传统稀释复性过程后,蛋白回收率和活性回收率,结果见图 3。由图可见,共价结合的 PEG 链可以有效的促进目的蛋白复性,蛋白回收率和活性回收率都接近 100%。而相比之下,未共价结合 PEG 或者添加游离的 PEG 蛋白回收率和活性回收率仅为 30%左右。

[0050] 实施例五

[0051] 传统稀释复性的正确折叠率一般不超过 30%,正确折叠的蛋白质的得率低通常是由于多肽链之间的聚集作用,蛋白质的浓度是影响蛋白质聚集的主要因素,因而,一般浓度控制在 0.1-1mg/ml;如果变性蛋白加入复性液中过快,容易形成絮状沉淀。为此,传统稀释复性法面临处理体积大、有效浓度低、复性后错误折叠产物和聚集体的分离压力大等主要问题。针对以上问题,在共价 PEG 结合可以显著促进目的蛋白的复性效果,使蛋白回收率和活性回收率接近 100%的基础上,通过试验测定复性蛋白浓度可以提高的上限,以减少重复利用的处理体积。结果见图 4,可见,共价 PEG 结合后,复合干扰素的复性浓度不但突破常规 0.1-1mg/ml 的范围,而且在浓度达到 2mg/ml 尚可以起到促进正确折叠、抑制聚集的作用。

[0052] 分析原理如下,如图 5 所示,传统稀释复性或添加分子伴侣,是在复性过程中随机的与蛋白质接触起到促进正确折叠、抑制聚集的作用。但是,一旦错配体或者聚集体形成,这些随机作用是没有纠错功能的。与之相比,共价结合 PEG 则是在分子尺度上,保护目的蛋白单分子,表现在以下三个方面,(1)PEG 在水溶液中会发生水合作用,每个氧化乙烷单元(-CH₂-CH₂-O-)能紧紧结合 2-3 个水分子。PEG 的这种水合作用还会随着其分子量的增大而升高,当分子量的继续升高时,PEG 链在溶液中会发生自折叠,形成较多类似蛋白质或多肽二级结构的折叠链段,这些 PEG 链段通过相互作用还会松散地结合本体溶液中游离的水分子。因而,使 PEG 修饰蛋白在复性过程中,快速发展成为“独立个体”;(2)PEG 的这种水合性质在溶液中还表现出较大的空间稳定效应。这种立体效应具体表现在弹性作用方面。当另一大分子物质接近 PEG 修饰的蛋白质表面时,由于 PEG 链的运动受到束缚,造成构象熵的丢

失产生弹性排斥力从而将大分子推开。这些力使溶液中其他分子很难与 PEG 修饰的大分子充分发生碰撞接触,从而在复性过程中有效抑制聚集体的形成。(3)PEG 分子链的柔顺性是其良好性质的另一重要物理基础,使其不断改变构象以适应蛋白质的表面拓扑学结构,可以促进目的蛋白的正确折叠。从而,使 PEG 修饰与复性耦合成为蛋白质产品重复利用的一种新途径。

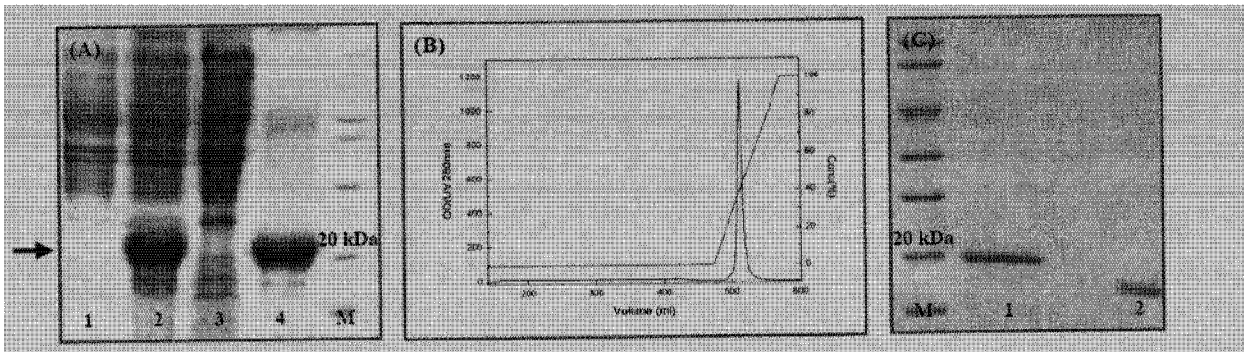


图 1

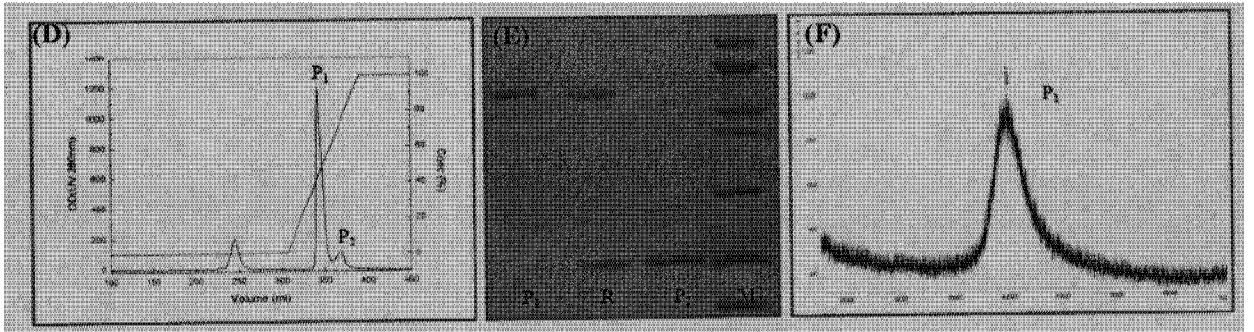


图 2

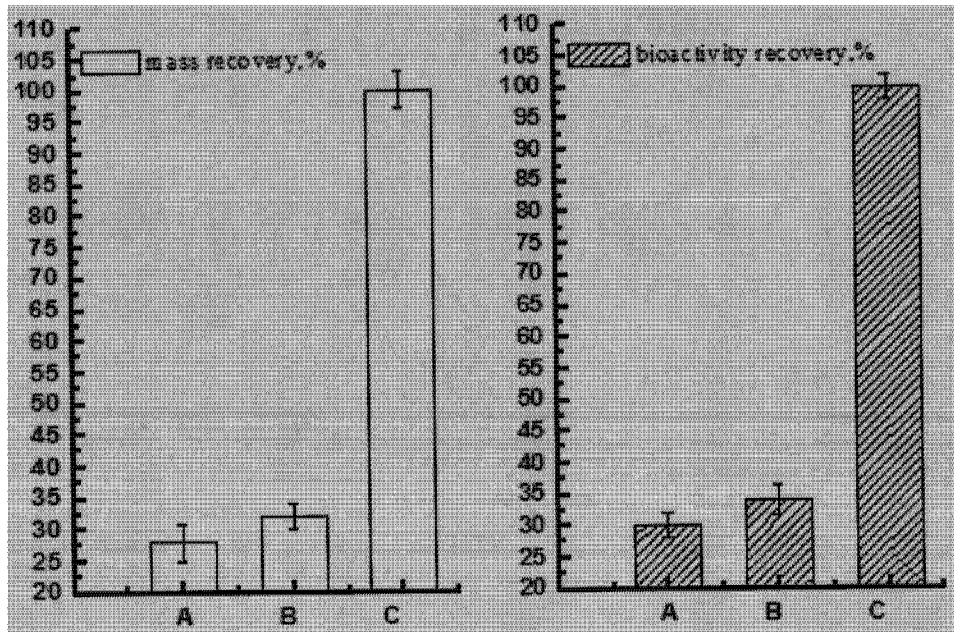


图 3

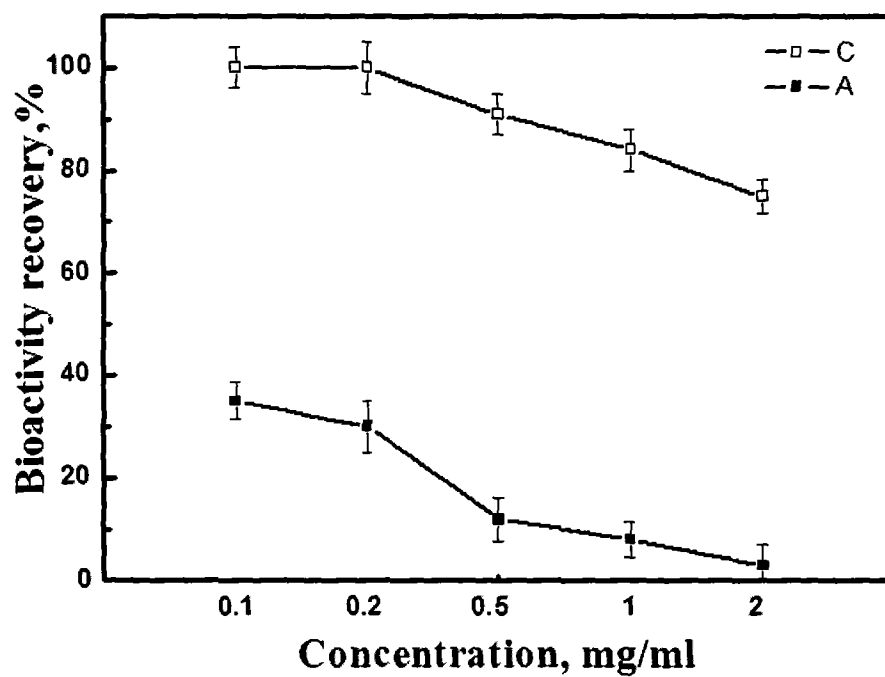


图 4

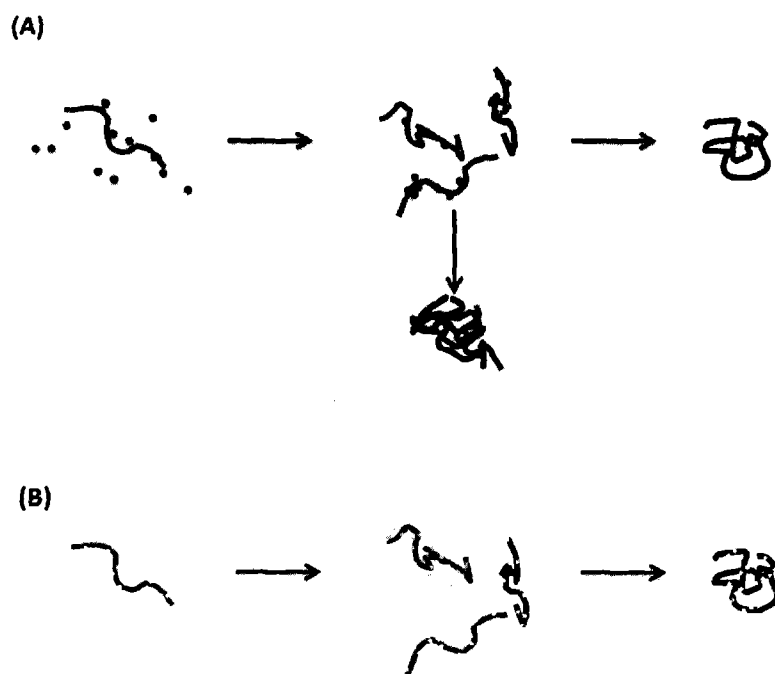


图 5