

基质辅助的组氨酸-标签蛋白重折叠的优化

T. Dashivets¹, N. Wood², C. Hergersberg², . Danielsson³, J. Buchner¹, and M. Haslbeck^{1*}

¹ Department Chemie, Lehrstuhl für Biotechnologie, 慕尼黑工业大学, D-85747 加尔兴, 德国

² Biosciences Technologies, GE 全球研究中心, Niskayuna, 纽约, 12309, USA

³ GE Healthcare, 乌普萨拉, 瑞典

*通讯作者: Martin Haslbeck E-mail: martin.haslbeck@ch.tum.de

重组蛋白表达过程中不恰当的折叠会导致蛋白聚集, 并形成包涵体, 这也是蛋白科学领域中一个主要的瓶颈。这里, 我们讲述了一种快速的平行方法, 即基质辅助的重组组氨酸标签蛋白重折叠法。基质辅助的重折叠可通过 His MultiTrap™ FF 96孔板进行优化, 随后可放大至 HisTrap FF柱。该方法可对五种不同的蛋白进行有效地再折叠, 这其中包括有单体和寡聚蛋白。对于测试的五种蛋白, 基质辅助的重折叠策略证实具有和溶液重折叠策略相同甚至更好的效果。

介绍

当蛋白生成处于非生理状态下的高水平时, 由于疏水结构的暴露以及分子伴侣和折叠催化剂的失衡导致折叠和聚集之间产生竞争(1)。在这种状态下, 目标蛋白存在于不溶性的包涵体中。然而在整个蛋白生产策略中, 目标蛋白在包涵体中的沉积是非常具有优势的。在这里过表达的蛋白被高度富集并且高水平的外源性目标蛋白的潜在毒性也受到抑制。

目前还没有一种常规的合理的用于蛋白重折叠的策略。对于每种特定蛋白, 其影响重折叠的一些具有高度多样化的参数必需经过试验进行调整和测试(2)。基于稀释法进行重折叠的策略还是主流(3), 然而它的问题是最终会产生大量的稀释了的蛋白溶液($\mu\text{g/ml}$)。因此迫切需要一种通用的可使蛋白在高浓度水平进行重折叠的方法。

这里, 我们讲述一种循序渐进的策略(图1), 可以对固定好的组氨酸标签蛋白进行快速有效地重折叠(4)。

材料与amp;方法

候选蛋白见表1。为了使过程中所用到的缓冲液最小化, 我们建立一种新的, 循序渐进的优化策略(表1)。通过 His MultiTrap FF 板将未折叠蛋白溶解并分散在96孔板中。当所有的上样孔处于变性条件后, 基质上的蛋白采用不同的重折叠缓冲液进行孵育。最初, 当离子强度和添加剂被优化后对缓冲液系统和PH进行改变。每一步后具有最高重折叠效率的条件被选择用于下一轮筛选步骤。

对于每一块板, 保留三个孔作为参考, 其中加入同样量的天然蛋白。这些孔一直处于非变性环境, 并作为检测样品进行处理。天然样品的活性设定为100%。所有显示的数据为至少三次独立实验的平均值。

筛选实验中确定的优化缓冲液被用于在 HisTrap FF 1 ml 柱上对基质辅助的重折叠进行放大, 采用 AKTApurifier™ 层析系统完成整个操作过程。将可溶性蛋白(0.5 mg)上样, 蛋白在优化好的重折叠缓冲液中重折叠1小时。

表1.用于重折叠条件的组氨酸标签蛋白

蛋白	分子量 (Mr)	等电点 (PI)	四级结构
增强型绿色荧光蛋白 (eGFP)	28000	5.7	单体
铁氧还蛋白NADP+还原酶(FNR)	35000	6.2	单体
柠檬酸合酶(CS)	49000	8.1	二聚体
葡萄糖激酶(GLK)	35000	6.1	二聚体
β -半乳糖苷酶(β -Gal)	11600	5.3	四聚体

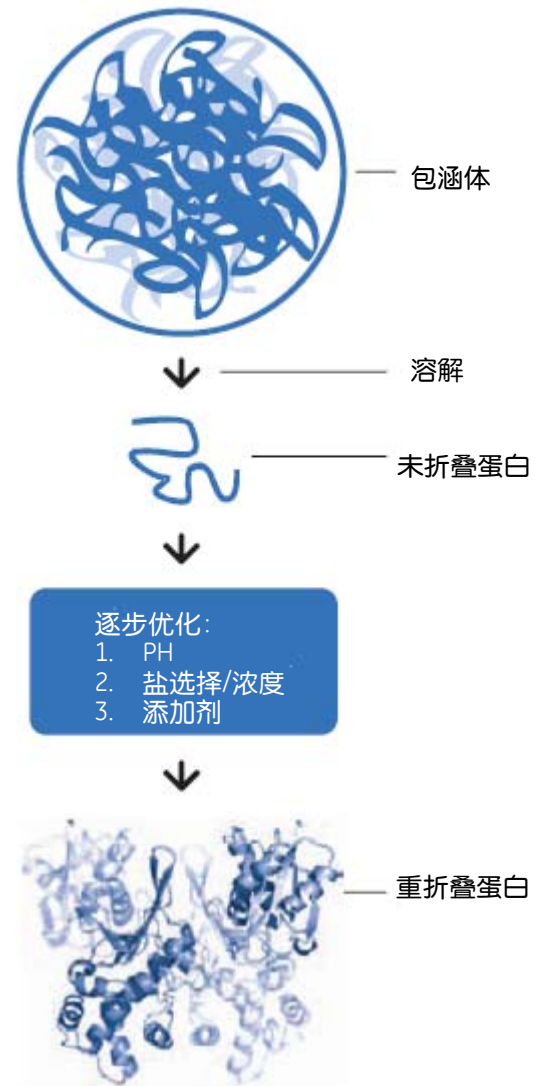
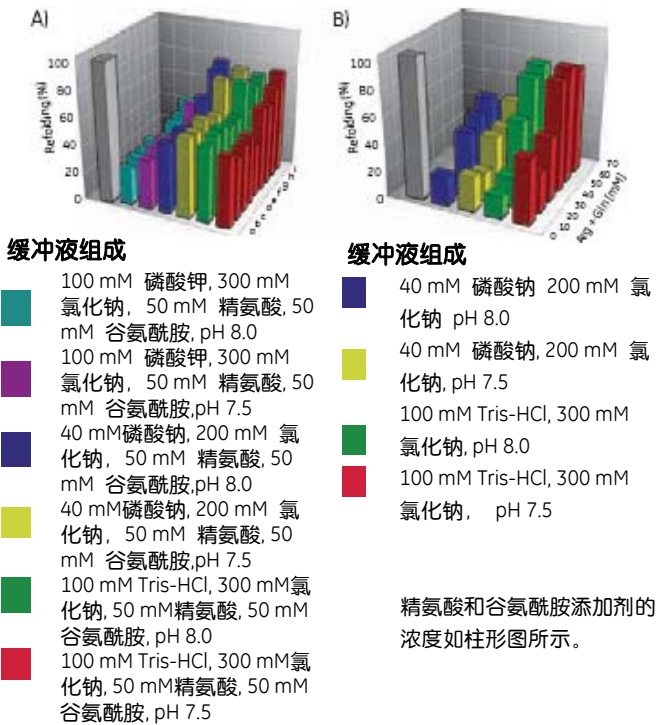


图1.基质辅助的重折叠逐步优化示意图。显示的蛋白结构为GLK。

结果

图2示最终用于组氨酸标签的GLK和CS的筛选步骤。两种蛋白重折叠的收率在70%到80%之间。



添加剂

- a - 100 mM 蔗糖
- b - 200 mM 蔗糖
- c - 0.01% PEG 6000
- d - 5% 甘油
- e - 5% 环糊精
- f - 10 mM 环糊精
- g - 2 mM DTE
- h - 2 mM 三氯乙基磷酸酯
- i - 5 mM 三氯乙基磷酸酯

图2. 基质辅助的组氨酸标签蛋白重折叠。 A) 基质辅助的组氨酸标签GLK重折叠的最终优化方案。 B) 基质辅助的组氨酸标签CS重折叠的最终优化步骤。

而大的寡聚蛋白质β-半乳糖苷酶(β-Gal)也通过His MultiTrap FF进行基质辅助的重折叠测试。已知β-Gal在变性后很难进行重折叠, 采用在溶液中的标准方案几乎检测不到有重折叠。然而, 基质辅助策略使得优化好的β-Gal重折叠率可达20%到30%(图3)。

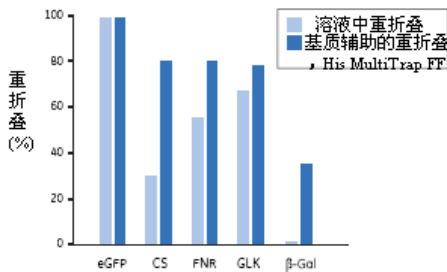


图3. 比较五种组氨酸标签蛋白在溶液和基质方法中重折叠的效率。 图中显示的是每种蛋白在最佳重折叠缓冲液中的收率。

就五种被测的组氨酸标签蛋白而言, 与溶液中进行的重折叠相比, 采用His MultiTrap FF进行的基质辅助的重折叠具有相等甚至更好的重折叠效果。尤其在寡聚蛋白质中其折叠效率较溶液中具有明显的提高。

此外, 在优化的缓冲液中采用His MultiTrap FF进行的重折

叠过程可通过His MultiTrap FF柱进行简单的放大, 无需经过进一步的工艺参数优化步骤即可获得良好的收率(图4)。

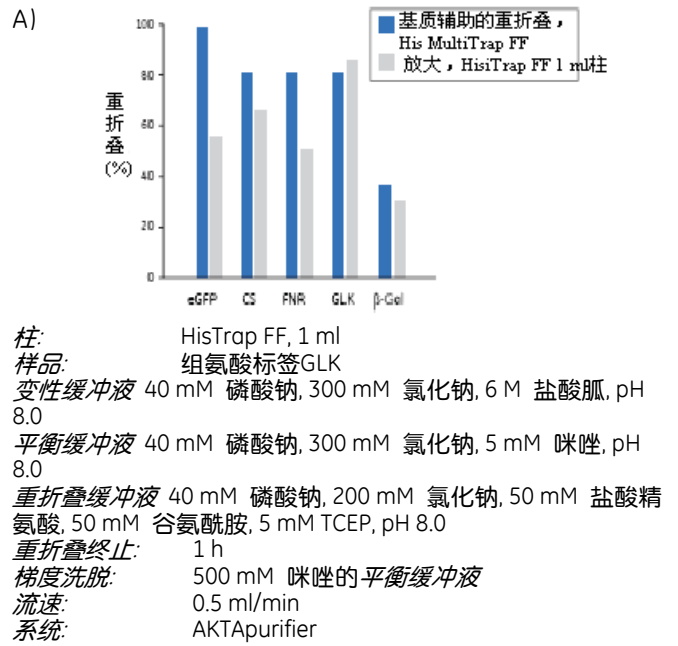


图4. A) 采用His MultiTrap FF进行基质辅助的重折叠与HisiTrap FF 1 ml柱进行重折叠放大的重折叠效率比较。 每个实例中, 采用的缓冲液均为缓冲液筛选过程中确定的最佳缓冲液。 B) 用HisiTrap FF 1 ml柱进行的组氨酸标签蛋白在柱重折叠以及放大后通过优化好的洗脱缓冲液对蛋白进行良好的洗脱。

结论

本研究提供一个合理的策略, 对不溶形式表达的蛋白的重折叠进行优化。逐步优化过程减少了实验的次数, 也随之减少了筛选的时间。此外, 重折叠过程可直接被放大, 无需对工艺参数进行进一步的优化即可获得良好的结果。

参考文献

- Lilie, H. et al. Advances in refolding of proteins produced in E. coli. Curr. Opin. Biotechnol. 9, 497-501 (1998).
- Mayer, M. and Buchner, J. Refolding of inclusion body proteins. Methods Mol. Med. 94, 239-254 (2004).
- Buckle, A. M. et al. The matrix refolded. Nat. Methods, 2, 3 (2005).
- Dashivets, T. et al. Rapid matrix-assisted refolding of histidine tagged proteins. ChemBioChem, 10, 869-76 (2009).

订货信息

产品	编码
His MultiTrap FF	28-4009-90
HisiTrap FF, 5 × 1 ml	17-5319-01

想了解更多关于组氨酸标签蛋白纯化和富集产品的信息, 请登录www.gelifsciences.com/protein-purification