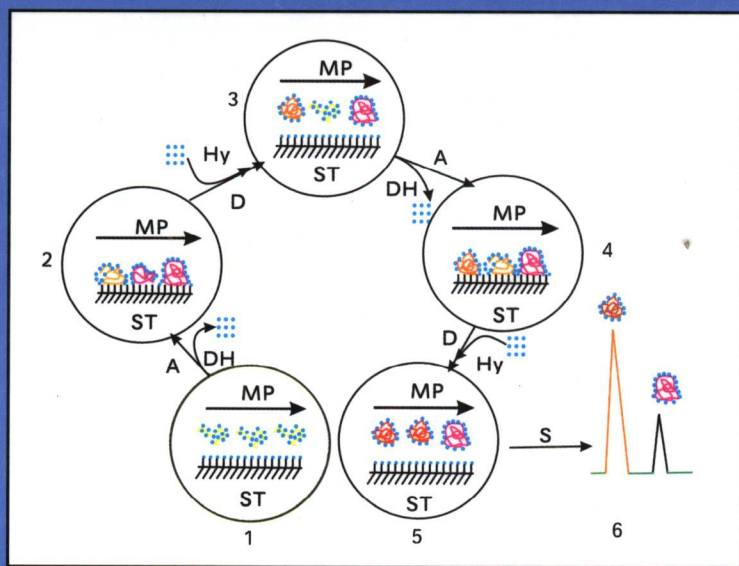


蛋白折叠液相色谱法

耿信笃 白泉 王超展 著



科学出版社

21 世纪科学版化学专著系列

蛋白折叠液相色谱法

耿信笃 白 泉 王超展 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书是第一部全面和系统地论述用液相色谱对变性蛋白折叠并同时
进行复性的专著,其内容涉及其原理、方法、设备、典型实验及其在化学、
化工、生物化学、分子生物学、基因工程及生物制药等方面的应用。除对
蛋白的分子结构及用于变性蛋白折叠的一般方法进行简要介绍外,本书主
要论述将液相色谱用于变性蛋白折叠、分子构象变化及其工业化中所遇到
的新理论、新方法、新设备和新技术。

本书可供化学、化工、生物化学、分子生物学、基因工程及生物制药
等领域科研人员、工程师参考,也可作为高等院校相关专业教师和研究生
用书。

图书在版编目(CIP)数据

蛋白折叠液相色谱法/耿信笃,白泉,王超展著. —北京:科学出版社,
2006

(21世纪科学版化学专著系列)

ISBN 7-03-016911-5

I. 蛋… II. ①耿…②白…③王… III. 蛋白-分子折叠-液相色谱
IV. Q51

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第011898号

责任编辑:黄 海 吴伶俐/责任校对:包志虹

责任印制:钱玉芬/封面设计:陈 敬

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2006年4月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2006年4月第一次印刷 印张:19 插页:1

印数:1—2 500 字数:368 000

定价:60.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

前 言

自有人类历史以来，人类的一切活动，如科技进步、生产力发展和社会文明等，都是由人来推动并服务于人类的，如提高人类的生活质量、治疗疾病和延长寿命等，这就使生命科学成为当今科技的带头学科之一。如果说当今科技中另外的几个带头学科，如材料科学、信息科学所涉及的是提高人类生活质量的话，那么，人类健康及长寿则是成为提高人们生活质量更为关注的问题。

生命的基础是蛋白。在生命起源中，尽管科学家对如何从无机物变成有机物，氨基酸的合成及氨基酸如何由肽链连接成长度不同的多肽链，或蛋白质的氨基酸序列以及如何从活性蛋白质演化成有生命的生物体都了解得比较清楚。然而，对于如何从蛋白的无生物活性的氨基酸序列折叠成具有生物活性的、三维或四维的空间结构，迄今仍不清楚。有人指出，“蛋白质分子知道如何从它的一维结构折叠成它的三维或四维结构，但科学家并不知道，这是对科学家真正的挑战”。这的确反映出科学家对蛋白分子折叠机理了解得还很少。仅就有关蛋白折叠是由热力学控制，还是由动力学控制的争论，迄今为止尚未定论，因此，有关蛋白质的结构与其生物活性关系等许多奥秘都未曾揭开。这就吸引了许多科学家用毕生的精力来研究它，并称其为蛋白质科学。

从应用角度来说，用基因工程技术，可以重组出许多治疗疑难病的重组人蛋白药物或疫苗，从而出现了一个新型的高技术产业——生物制药。然而，目前收获量最大的由大肠杆菌 (*E. coli*) 生产的重组人治疗蛋白药物的氨基酸序列（蛋白的一维结构）是正确的，而其三维或四维结构基本上是错的。如果采用此法生产这类药物，首先要设法对其进行再折叠或复性。

虽然科学家采用了许多方法对变性蛋白进行复性，但一般折叠的成功率仅在 5%~15% 的范围，这就造成了这类药物药效高、成本极高、售价更高，大多数患者经济上承担不起，从而产生难以选择用此类药物进行治疗的问题。

有 5 次诺贝尔奖颁发给了对蛋白质科学研究有成就的科学家，在最近的 3 次（2002~2004 年）诺贝尔化学奖中，就有 2 次。当今各国投入大量的人力和财力用于蛋白质组学的研究，更是显示出蛋白质科学在当今科技发展中的重要地位。有 2 次诺贝尔化学奖专门颁发给了色谱科学家，并基于色谱的贡献，成就了另外相关的 12 次诺贝尔奖。那么，是否可以用色谱法解决蛋白折叠的问题呢？

笔者之一早在 20 世纪 80 年代就参加了我国的“863”高技术发展计划生物技术专题中的对重组人干扰素- γ 的纯化工作，在解决此问题的过程中发现液相色谱的确能用于对变性蛋白进行复性，而且效果之佳出乎预料。作为科学上的新

发现, 在 1991 年发表了第一篇用高效疏水色谱法进行变性蛋白复性并同时纯化的论文, 接着又于 1991 年在美国华盛顿召开的第 10 届国际蛋白、多肽及多糖的液相色谱会议上做了题为“高效疏水色谱是一种蛋白再折叠的工具”的大会报告, 表明了疏水色谱和尺寸排阻色谱均可用于对变性蛋白复性, 论文于 1992 年发表。两年后的 1994 年, 美国、捷克、日本等国科学家分别用离子交换、亲和色谱和尺寸排阻色谱对变性蛋白进行了复性, 迄今国际上已有多个研究小组进行这项研究。

这一方法受到国内外多个领域科学家的称赞, 他们期望该法对其研究工作有所帮助。在产业部门工作的工程师则期望早日能将其用于工业化生产。科学技术的进步最终是要为推动生产力发展和为人类进步服务的, 我们又经过 15 年的努力, 克服了种种困难, 设计了专门用于蛋白复性并同时纯化装置, 即变性蛋白复性与同时纯化装置 (USRPP) 或色谱饼, 使这一方法初步实现了工业化。

虽然在蛋白折叠和液相色谱两个领域中都出版过许多著作, 但迄今为止, 尚未见到有关用液相色谱对蛋白折叠这一新的特殊领域的专著。笔者之一作为该方法的提出者, 在以往出版的两部著作即《现代分离科学理论导引》和《计量置换理论及应用》中也对该法进行过描述, 但不详细, 更不是系统的论述。笔者深深地感到有必要, 也有义务将国内外这方面的工作进行系统总结, 在总结过程中再提高, 以便促进这一研究更深入和更快发展。希望《蛋白折叠液相色谱法》一书的出版能对在化学、化工、生化、基因工程和生物制药领域中从事教学、科学研究和进行生产的科技工作者及工程师有所帮助。

在过去 15 年中, 笔者在研究和发​​展蛋白折叠液相色谱法及其应用方面的研究经费是来自于国家有关部委及陕西省有关部门, 包括国家自然科学基金委员会的基础研究和高技术新概念项目、国家计划委员会高技术产业司下达并由陕西西大科林基因药业有限责任公司实施的产业化项目、科技部“863”生物技术项目和国家科技攻关项目、教育部留学回国人员资助项目、陕西省省长基金、陕西省计划委员会高技术产业化项目、陕西省科技厅、陕西省教育厅基础及应用研究项目及西北大学“211”工程重点建设项目。对于上述这些主管部门的关心、支持和帮助, 笔者在此一并表示衷心的感谢!

笔者因在蛋白折叠液相色谱方面的研究成果于 1993 年和 1998 年两次获得陕西省科技进步一等奖以及 1994 年美国匹兹堡第 10 届国际发明与博览会金奖, 在此对这些部门所给予笔者的肯定、鼓励和荣誉表示感谢。

在笔者过去的研究工作中, 我国及国际上老一辈的化学家和工作在各个领域的科学家都曾给予笔者以大力的支持和帮助, 他们对笔者寄予了很大的希望, 然而笔者所完成的只是期望中很少的一部分, 在此也谨向这些老一辈科学家的支持表示感谢! 对所做的不满意之处, 笔者表示歉意并请予以谅解。

笔者诚挚地感谢中国科学院高鸿院士、周同惠院士、陆婉珍院士, 北京大学

孙亦樑教授、茹炳根教授，中国军事医学科学院马立人教授以及北京理工大学的傅若农教授长期以来对此方面研究的支持，笔者同时也感谢西北大学卫引茂博士、申烨华博士、王骊骊博士对本研究做出的贡献。

由于水平有限，实际工作经验少，书中错误之处在所难免，望专家及读者能批评指正。

作 者

2005 年冬于西安

目 录

前言

第一章 绪论	1
§ 1.1 蛋白折叠液相色谱法的定义	1
§ 1.2 蛋白折叠液相色谱法的特色	2
§ 1.3 发展史	3
§ 1.4 本书的内容	6
参考文献	8
第二章 蛋白质的结构与构象变化	9
§ 2.1 概述	9
§ 2.2 蛋白质分子的化学结构	10
§ 2.3 蛋白质分子的空间结构	12
2.3.1 蛋白质二级结构	13
2.3.2 超二级结构	16
2.3.3 结构域	17
2.3.4 三级结构	17
2.3.5 四级结构	19
§ 2.4 稳定蛋白质分子构象的作用力	19
§ 2.5 蛋白质分子构象的研究方法	22
2.5.1 X射线衍射结构分析法	22
2.5.2 圆二色性光谱法	23
2.5.3 紫外差示光谱法	24
2.5.4 荧光光谱法	25
2.5.5 激光拉曼光谱法	26
2.5.6 氢同位素交换法	26
2.5.7 核磁共振法	26
参考文献	28
第三章 液相色谱对生物大分子构象变化的表征	29
§ 3.1 概述	29
§ 3.2 液相色谱中的计量置换保留理论	30
§ 3.3 Z 和 $\lg I$ 对生物大分子构象变化的表征	37
§ 3.4 RPLC 中 Z 和 $\lg I$ 对生物大分子构象变化的表征	39

3.4.1	Z 值与蛋白质相对分子质量	39
3.4.2	蛋白质构象的始末状态	40
3.4.3	RPLC 中甲酸浓度与生物大分子的构象变化	41
3.4.4	Z 值与离子对试剂	42
3.4.5	蛋白质热变性的表征	43
3.4.6	RPLC 中 Z 对白细胞介素-2 突变蛋白分子的构象变化的表征	45
3.4.7	不同变性态条件下 Lys 的构象表征	48
3.4.8	在 RPLC 中人工交联修饰蛋白保留行为及其 Z 和 lgI 值的表征	51
3.4.9	重组人干扰素- γ 在有孔与无孔反相硅胶固定相上保留行为的比较	52
§ 3.5	HIC 中蛋白分子构象的 Z 表征	53
3.5.1	HIC 中在变性剂存在条件下 Z 值的准确测定方法	54
3.5.2	脲浓度与蛋白质分子构象变化的 Z 表征	57
3.5.3	胍浓度与蛋白质分子构象变化的 Z 表征	58
3.5.4	Z 和 lgI 值的测定精度	60
§ 3.6	离子交换色谱中蛋白分子构象 Z 和 lgI 的表征	62
3.6.1	IEC 中变性蛋白与 Z 和 lgI 值的测定	62
3.6.2	不同变性状态下 Lys 的弱阳离子交换色谱保留	63
3.6.3	不同脲浓度下 Lys 与 Z 值	65
3.6.4	Z 对还原变性 Lys 活性回收率随脲浓度变化趋势	66
3.6.5	Z 对 Lys 分子构象变化的定量表征	67
3.6.6	lgI 对 Lys 分子构象变化的定量表征	67
3.6.7	不同构象 Lys 分子与固定相的亲合力	68
	参考文献	68
第四章	蛋白折叠	70
§ 4.1	概述	70
§ 4.2	包涵体	71
4.2.1	包涵体的特性及其形成原因	71
4.2.2	包涵体蛋白质的生产程序	72
4.2.3	包涵体的分离和纯化	73
4.2.4	包涵体的溶解	73
4.2.5	包涵体蛋白的复性	74
4.2.6	蛋白折叠的发展近况	74
§ 4.3	蛋白质的变性	76
§ 4.4	蛋白质的失活	78
§ 4.5	蛋白折叠中间体的研究	79
§ 4.6	蛋白折叠机理	81

4.6.1	热力学模型	82
4.6.2	动力学模型	83
4.6.3	蛋白多肽链折叠的模型介绍	84
§ 4.7	蛋白质的复性方法	90
4.7.1	稀释法	91
4.7.2	透析法	93
4.7.3	超滤法	94
4.7.4	新发展的复性方法	94
	参考文献	118
第五章	液相色谱法对变性蛋白的折叠	126
§ 5.1	概述	126
§ 5.2	各种 LC 复性的热力学基础-化学平衡	127
§ 5.3	排阻色谱	129
5.3.1	SEC 复性的原理	130
5.3.2	SEC 复性的影响因素	131
5.3.3	SEC 复性方法的改进	133
5.3.4	SEC 复性法的应用	137
5.3.5	重组人粒细胞集落刺激因子的 SEC 复性	138
§ 5.4	离子交换色谱	144
5.4.1	用弱阳离子交换色谱法复性溶菌酶	154
5.4.2	用强阴离子交换色谱法 (SAX) 复性并同时纯化 rhG-CSF	158
§ 5.5	亲和色谱	161
§ 5.6	疏水相互作用色谱	167
§ 5.7	各种 LC 复性方法的比较	169
§ 5.8	HPHIC 对变性蛋白的折叠与复性举例	170
5.8.1	HPHIC 对非还原变性蛋白的复性	170
5.8.2	HPHIC 对还原变性牛胰岛素的折叠	170
5.8.3	HPHIC 纯化并同时复性 <i>E. coli</i> 表达的重组牛朊病毒正常蛋白片断	173
5.8.4	HPHIC 对还原变性溶菌酶的复性	175
§ 5.9	HPHIC 进行蛋白折叠的分子学机理	177
5.9.1	变性蛋白在 HPHIC 固定相上的吸附及微区的形成——固定相对蛋白折叠的贡献	177
5.9.2	流动相对蛋白折叠的贡献	179
5.9.3	HPHIC 固定相和流动相的协同作用在蛋白折叠过程中的作用	179
5.9.4	HPHIC 法折叠蛋白与“人工分子伴侣”	182
§ 5.10	影响 HPHIC 对蛋白复性的因素	182

5.10.1 固定相	183
5.10.2 流动相	184
5.10.3 色谱条件	187
§ 5.11 用 LC 法对蛋白复性的展望	191
参考文献	192
第六章 液-固界面上变性蛋白折叠自由能的测定	197
§ 6.1 概述	197
§ 6.2 液-固界面上蛋白折叠自由能测定的理论基础	198
§ 6.3 蛋白折叠自由能的测定	201
6.3.1 不同浓度变性剂存在下蛋白质的 $\lg I$ 和 Z 值	201
6.3.2 液-固界面上蛋白折叠自由能的测定	204
§ 6.4 蛋白折叠途径中能垒与能阱	207
6.4.1 能垒和能阱的定义	207
6.4.2 蛋白折叠途径中的能量表征	209
6.4.3 蛋白活性与 $\Delta\Delta G_F$	210
参考文献	212
第七章 变性蛋白复性与同时纯化装置	214
§ 7.1 概述	214
§ 7.2 短柱理论	215
7.2.1 短柱理论表达式的推导	216
7.2.2 短柱对生物大分子的分离效果	218
§ 7.3 色谱饼——变性蛋白复性与同时纯化装置	218
7.3.1 色谱饼的性能	220
7.3.2 不同规格色谱饼对标准蛋白的色谱分离	223
§ 7.4 色谱饼用于蛋白复性与同时纯化	223
7.4.1 色谱饼对核糖核酸酶 A 和溶菌酶的复性及同时分离	224
7.4.2 人血清白蛋白的快速纯化	224
7.4.3 用色谱饼纯化蛋清中溶菌酶	225
§ 7.5 快速蛋白纯化色谱柱	227
7.5.1 快速蛋白纯化柱的形状及结构	228
7.5.2 色谱柱的柱压	229
7.5.3 疏水型快速蛋白纯化柱对标准蛋白的分离	229
7.5.4 离子交换型快速蛋白纯化柱对标准蛋白的分离	231
7.5.5 柱寿命的测定	232
7.5.6 快速蛋白纯化柱质量负载的测定	233
§ 7.6 应用举例	234

7.6.1 疏水型快速蛋白纯化柱对变性溶菌酶的复性	234
7.6.2 快速蛋白纯化柱对猪心中细胞色素 c 的纯化	236
7.6.3 快速蛋白纯化柱对粗 α -淀粉酶的纯化	238
7.6.4 疏水型快速蛋白纯化柱对重组人干扰素- γ 的复性与同时纯化	241
§ 7.7 蛋白质复性及同时纯化的策略	244
7.7.1 用 HIC 复性蛋白的一般策略	244
7.7.2 用 IEC 复性蛋白的一般策略	245
参考文献	246
第八章 重组蛋白药物的复性与同时纯化及其工业化生产举例	248
§ 8.1 概述	248
§ 8.2 重组蛋白药物的复性与同时纯化	249
8.2.1 蛋白质复性及同时纯化装置对 IL-2-Ang 复性	249
8.2.2 重组人胰岛素原的复性及同时纯化	250
8.2.3 对某大学重组蛋白样品的纯化	250
8.2.4 蛋白质复性及同时纯化装置对 rhG-CSF 复性	251
8.2.5 重组人干细胞因子的复性并同时纯化	253
8.2.6 SAX 型快速蛋白纯化柱对重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 的复性并同时纯化	254
8.2.7 在工业上用疏水相互作用色谱复性和纯化干扰素- γ	258
8.2.8 膨胀床色谱用于蛋白复性	266
8.2.9 模拟移动床用于蛋白复性	268
8.2.10 连续环状色谱复性	270
参考文献	272
第九章 典型实验	274
§ 9.1 色谱饼的使用	274
§ 9.2 科林快速蛋白纯化柱的测试	275
§ 9.3 实验一 科林快速蛋白纯化柱柱效的检测	277
§ 9.4 实验二 科林快速蛋白纯化柱对猪心中细胞色素 c 的分离与纯化	280
§ 9.5 实验三 科林快速蛋白纯化柱对变性溶菌酶和核糖核酸酶复性与同时纯化	283
§ 9.6 实验四 科林快速蛋白纯化柱对重组人干扰素- γ 的复性及同时纯化	285
§ 9.7 实验五 色谱饼对标准蛋白分离性能的检测	288
§ 9.8 实验六 科林快速蛋白纯化柱对还原变性溶菌酶的复性	290

第一章 绪 论

§ 1.1 蛋白折叠液相色谱法的定义

液相色谱 (liquid chromatography, LC) 与蛋白折叠 (protein folding) 是化学和生物化学中分别使用的两个术语, 而蛋白折叠液相色谱法却是一个鲜为人知的专有名词。1997 年, 英国剑桥大学的一个研究小组曾提出再折叠色谱 (refolding chromatography)^[1], 于 1999 年又提出氧化再折叠色谱 (oxidative refolding chromatography)^[2], 目的在于表明这是一个新的特别的方法。然而, 这两个术语不仅不确切 (至少应明确为 liquid chromatography), 而且没有对它们下定义。这里讲的蛋白折叠液相色谱法, 不仅是指在操作上只是将含变性蛋白样品溶液进样到 LC 柱上, 再从流出液中接收目标蛋白的这样一种简单的操作方法, 而是包含着如何将变性蛋白复性这样一个复杂过程在色谱柱上完成, 结合色谱有很好的分离效果的特点, 达到单独用通常复性方法和单独用通常液相色谱方法无法达到的蛋白复性, 并能同时与杂蛋白分离的效果。因此, 蛋白折叠液相色谱法可以定义为: 有液相和固相起协同作用的, 能实现蛋白折叠并满足质量控制所涉及的多种物理及化学过程的液相色谱法, 称之为蛋白折叠液相色谱法 (protein folding liquid chromatography, PFLC)。就其定义的含义讲, 蛋白折叠还包含其折叠过程中所涉及的蛋白分子构象变化及折叠成稳定中间体 (错误折叠)。这里要指出的 protein folding (蛋白折叠) 和 protein refolding (蛋白再折叠) 本是两个不同的概念。虽然二者均为从具有无序空间结构的、由氨基酸组成的肽链折叠成具有生物活性的天然蛋白结构的蛋白分子, 但后者特指是在研究蛋白折叠时, 将天然的蛋白先用不同的方法变性, 再设法使其折叠成原有的天然蛋白结构状态。在本书中用 LC 法所进行的折叠均为后者, 因其实质也是蛋白折叠, 且文献中也常将二者混用, 故本书中一律称蛋白折叠。

这个定义包括了四个方面的内容。① 固定相和流动相各自及其二者的协同作用对蛋白折叠均有不同贡献。② 必须能使目标蛋白完全或部分完成折叠。③ 所讲的质量控制包含了: 固定相表面的化学组成及空间结构对变性蛋白中特定氨基酸片段的选择性吸附以有利于形成正确的区域结构 (microdomain); 热力学稳定的区域结构, 或折叠中间体进入 LC 的流动相后, 能分别自动地成长, 并折叠成具有天然蛋白空间结构的目标蛋白, 而那些错误的蛋白区域结构、折叠中间体则会自动消失变成无序的去折叠状态; 正确折叠的目标蛋白与那些错误折叠的, 但很稳定的目标蛋白中间体的色谱分离。要指出的是, 并非指通常意义上的

用 LC 使目标蛋白与其他蛋白分离。④ 所指的多种物理或化学过程是包括可以生成沉淀（这是通常色谱法不能允许的）和溶解、氧化和还原、酸碱中和、缔合和解离等。这些通常只能在实验室中，在复相或均相溶液中才能进行的化学反应或物理过程。简而言之，可以将对蛋白复性所必需的化学或物理过程完全放在色谱柱上进行，并能在流出液中收获已完成复性的目标蛋白和去除不需要的、错误折叠的稳定的目标蛋白中间体、变性剂和其他种类型的杂蛋白。

由此看出，蛋白液相色谱折叠法不仅是一种新的蛋白折叠方法，而且是一种新的液相色谱方法。

§ 1.2 蛋白折叠液相色谱法的特色

依据 PFLC 的定义，可在 LC 柱上进行多种物理和化学过程，那么它就应显示出许多的、用单纯的在容器中进行通常的蛋白折叠，或单独用通常 LC 进行蛋白分离所实现不了的目的。换句话讲，具有特殊的功能。一个理想 PFLC 应同时具备如图 1-1 所示的以下四个功能，即除变性剂、变性目标蛋白复性、与杂蛋白分离、便于回收变性剂，或称为“一石四鸟”。一般只要 20~40min 就能完成这样一个“一石四鸟”的过程。此外，因为所用流动相可以连续改变其组成，故多种变性蛋白会各自“选择”适合自己的复性条件，一次色谱过程可使多种蛋白同时复性并实现纯化。

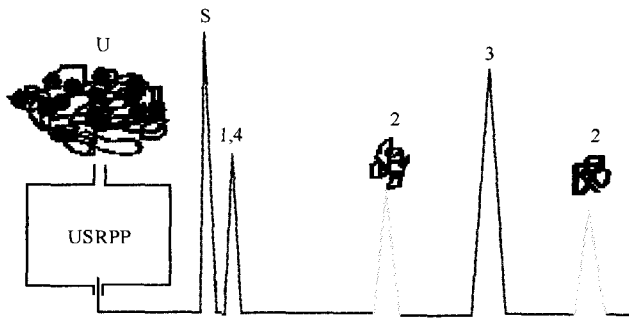


图 1-1 理想的蛋白折叠液相色谱法的“一石四鸟”功能示意图^[4]

U. 变性蛋白; S. 溶剂; 1. 变性剂溶液; 2. 复性蛋白; 3. 杂蛋白; 4. 回收变性剂

用通常的稀释法进行变性蛋白复性时，无法除去变性剂和杂蛋白。由于稀释不可避免地会产生一些目标蛋白的沉淀，不仅造成目标蛋白的回收率低，而且通常要放置过夜后离心，因此在该法复性后，还得再进行粗分离后进行精分离。如果用透析法对变性蛋白复性，一般需要 24h，且期间要多次更换透析缓冲液，该法虽然能除去绝大多数的变性剂，但不能完全除去变性剂，更不能与杂蛋白分离。

§ 1.3 发展史

在 20 世纪 80 年代后期,作者之一参加了我国“863”计划生物技术专题,承担了对用 *E. coli* 表达的重组人干扰素- γ (rhIFN- γ) 制备规模的液相色谱的分离和纯化。当时就将用 7.0mol/L 盐酸胍 (GuHCl) 包涵体中提取的 rhIFN- γ 溶液,不经粗纯化直接进样到高效疏水色谱 (HPHIC) 柱上直接进行纯化。令我们吃惊的是,目标峰竟然有极高的生物活性,虽然当时得到的目标产品的纯度仅为 85%,但比活已高达 5.7×10^7 IU/mg。换句话讲,HPHIC 可用于 rhIFN- γ 的纯化并同时复性。这一结果在 1989 年的“863”生物技术年会上做了报告,并在 1991 年正式发表论文^[3],这是首次用 HPHIC 法于重组人治疗蛋白的复性并同时纯化,这一科学上的重要发现表明 LC 法有可能成为一种新的蛋白折叠工具。为此,又选择了蛋白分子质量为 14.4~63kDa^① 的溶菌酶 (Lys)、牛血清蛋白 (BSA)、核糖核酸酶 (RNase) 及 α -Amy 四种标准蛋白,用 HPHIC 法进行复性并同时分离,发现前三者能完全复性,而后者仅能进行部分复性。用 SEC 法进行对照,结果表明,用 SEC 法也可进行变性蛋白复性并同时纯化,但效果不如 HPHIC。这一结果于 1991 年 11 月在美国华盛顿召开的第 10 届国际蛋白、多肽及多糖的液相色谱会议 (ISPPP) 上做了大会报告,引起了与会许多科学家的强烈反应,并于 1992 年在 *Journal of Chromatography* 杂志发表^[4]。在该杂志编辑部送来的评审意见中写道“A method in described to refold proteins by means of hydrophobic interaction chromatography. The idea is fascinating, because, as mentioned on page 8 (指手稿中页码编号), the hydrophobic surface of the stationary phase and the mobile phase with continuous composition may provide a suitable environment for refolding of a protein and acceleration of the refolding process. The method is very simple and be optimized for a give protein. Therefore, this work is interesting and important. It is original in that no other papers dealing with this method have emerged during the past 5 years as has been verified by a computer aided search.” [阐明了一种用疏水色谱进行蛋白折叠的方法,这种想法是迷人的,因为正如在第 8 页 (指手稿中页码) 中提到的,固定相表面和可连续改变组成的流动相,可提供蛋白适合的复性环境并加速其折叠过程。因此,该研究是令人感兴趣的和重要的。用计算机对过去 5 年来的查寻,证明该研究属源头创新。] 这一高度的评价无疑是对我们在科学上的新发现的充分肯定和鼓励。

1991 年在华盛顿召开的第 10 届 ISPPP 大会上报告时,大会上就有人提及该法放大到生产规模的可能性问题。从那时起,我们就开始思索并着手解决三个问

① 1Da=1.660 54 $\times 10^{-27}$ kg, 下同。

题：① 如何扩大应用范围；② 进行放大到生产规模的问题；③ 为何用 HPHIC 法对有些蛋白，如 α -淀粉酶的复性只能达到部分复性的结果？对一些蛋白能完全复性？对另外一些蛋白，完全不能复性？这就提出了用 HPHIC 对蛋白复性的机理等有关的理论研究课题。放大生产的最大障碍则是来自于一些变性蛋白，遇到盐水溶液的流动相就会产生沉淀，这样就导致柱压急剧升高，或堵塞柱头，或毁坏色谱柱等难题的产生。特别是疏水性很强的蛋白，如重组人治疗蛋白，就可能沉淀。如 rhIFN- γ 、重组人细胞激落刺激因子 (rhG-CSF)，又如 7mol/L 盐酸胍 (GuHCl) 和 8mol/L 脲等的变性剂溶液，在遇到盐水溶液时情况更是如此。

在笔者意识到该法对未来基因工程制备蛋白药物贡献时，立即申请了“一种变性蛋白复性并同时纯化的方法”等两项发明专利^[5,6]，并已获得批准。

1992 年，在法国召开的国际色谱研讨会上做了“HPHIC 对变性蛋白折叠机理研究”的报告^[7]。后于 1993 年和 1994 年连续两年在美国《分析化学》上分别在其应用发展评论卷以“Separation and Analysis of Peptides and Proteins”（蛋白和多肽的分离和分析）为标题^[8]和在学科发展评论卷以“Liquid Chromatography: Theory and Methodology”（液相色谱：理论和方法论）为标题又给予了高度的评价：In a unique practical application, Geng and Chang used HIC successfully as a means to separate denaturing agents from proteins such that protein refolding is facilitated in the HIC environment（作为一种特殊的用途，耿和常用疏水色谱法成功地将变性剂与蛋白折叠中的那些蛋白分离，从而使在疏水色谱环境中容易进行蛋白折叠）^[9]。

笔者论文发表两年后的 1994 年，捷克的科学家 J. Suttner 等用了强阴离子交换色谱 (SAX) 对 HPV16E7MS2 融合蛋白成功地实现了复性^[10]。美国科学家 M. H. Wernner 用尺寸排阻色谱对 *E. coli* 制备的宿主整合因子 (integration host factor)、核糖核酸酶 A (RNase -A)、rhETS-1 和 Rhodanese 进行了复性^[11]，以及日本的两个研究组，即 Taguchi 等^[12]和 Phadtare 等^[13]分别用离子交换色谱法对 Rhodanese、Tubulin 以及 Glutamine synthetase、Human ETS-1 protein 进行了复性。1994 年 5 月，在美国召开的第 10 届国际发明与博览会 (INPEXTMX) 上，以上成果“New technology of renaturation with simultaneous purification of therapeutic proteins produced biotechnology”（基因工程生产的重组治疗蛋白复性并同时纯化新工艺）荣获金奖（图 1-2）。

1997 年，英国剑桥大学的一个研究组在将人工分子伴侣等三种组分键合在固定相表面后，对用其他方法根本无法复性的 Cyclophilin 进行复性，并提出一个专有名词——折叠色谱法 (refolding chromatography)^[1]，1999 年又提出了一个新名词——氧化折叠色谱法 (oxidative refolding chromatography)^[2]。如前所述，这两个名称并不准确。

1997 年，我们又在北京举办的亚太生物工程会 (Asia-Pacific Biochemical

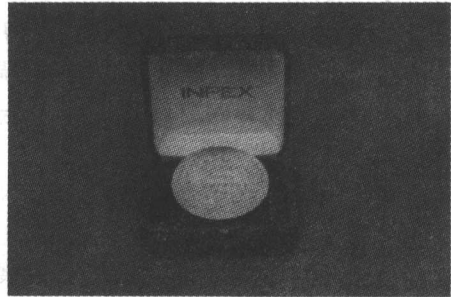
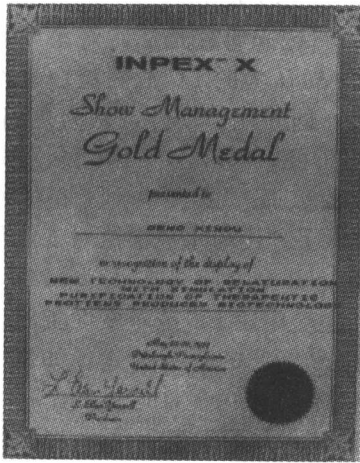


图 1-2 1994 年在美国召开举办的第 10 届国际发明与新产品博览会 (INPEX™X) 上获金奖证书及奖章 (见彩图 1)

Engineering Conference, October, 20~30, 1997, Beijing, China) 上做了报告,并在名为《生物工程:迈向生物工程世纪》(Biochemical Engineering: Marching forward the century of biochemical) 的会议论文集中发表了题为“蛋白复性并同时纯化装置 [Renaturation and purification of proteins (USRPP)],或称其为色谱饼 (chromatographic cake)”的论文阐明了如何对变性蛋白进行复性^[14,15]。用该 USRPP 的最大优点是,除了它仍具备通常色谱柱所有的如图 1-1 所示的“一石四鸟”功能外,还有色谱柱根本不可能具有的、能在进样或色谱过程中形成沉淀的条件下,进行正常的蛋白复性和纯化^[16,17]。这看起来似乎只是一个纯技术的问题,其实在理论上还必须解决两个问题:①在如此的 USRPP 上,目标蛋白分离和复性纯化是否会受影响?如果有,有多大的影响?②在如此大直径的 USRPP 中,通用色谱中的“柱壁效应”对蛋白分离和复性有无影响?或到底有多大影响?这或许首先要建立一个有关蛋白质分离的“短柱理论”和解决蛋白复性动力学问题。笔者所在研究所首先用实验证实在 LC 中蛋白的分离以及蛋白复性基本与色谱柱长无关的结论^[17],并有两篇博士论文“蛋白质复性及同时纯化理论、装置及应用”^[16]和“制备型色谱饼理论、性能及应用研究”^[17]就是对这一问题的回答。这两篇博士论文的贡献就在于研究结果表明用该 USRPP 有可能放大到工业化的程度。

2000 年,笔者所在研究所首次测定了变性蛋白在用于变性蛋白折叠的 HPHIC 固定相表面的折叠自由能^[18],并发现固定相表面能为变性蛋白分子提供比通常蛋白复性缓冲液中高 $10\sim 10^2$ 个数量级的能量进行折叠,有利于变性蛋白分子克服可能存在的能垒 (energy barrier),为 HPHIC 对变性蛋白折叠取得好

的效果提供了理论基础。在此基础上，2001年我们发表了题为“疏水色谱对变性蛋白复性并同时纯化机理及应用”的论文^[19]。这一研究是从微观角度阐明了用 HPHIC 进行蛋白折叠的分子学基础。这比一般认为的 LC 法对蛋白复性仅是防止变性蛋白分子聚集或沉淀的观点进深一步，即除此作用外，认为是固定相、流动相以及二者间的协同作用，促使变性蛋白折叠。2003年，为纪念欧共体生物工程学会成立 25 年，在瑞士巴塞尔召开的第 11 届“欧洲生物工程学术报告会”上，在“生物工程发展战略进展”专题下做了“用疏水色谱法对工业化生产重组人干扰素- γ 复性并同时纯化”的大会报告，并全文收录在 *Journal of Biotechnology* 特辑中^[20]。这一研究是首次在工业生产中用 LC 法对变性蛋白进行复性并同时纯化。对其在工业生产中 rhIFN- γ 生产工艺的重大改进，如图 1-3 所示。至此，从 20 世纪 90 年代初发现 LC 法能对变性蛋白复性这样一个科学上的新发现到设计并制作特殊的 USRPP，发展成高技术并用于工业化，共用了 15 年的时间。

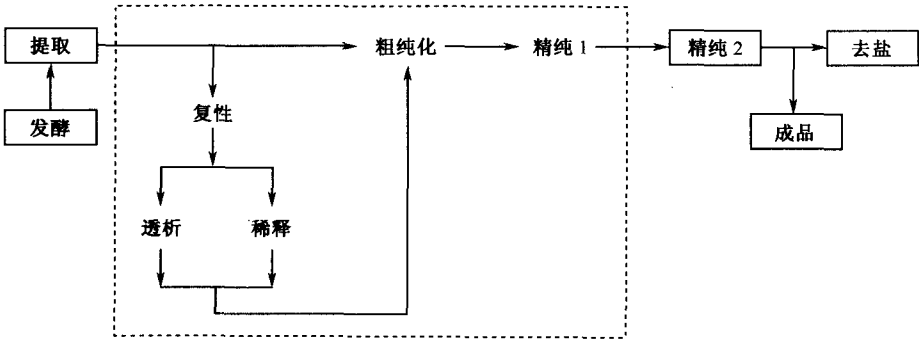


图 1-3 USRPP 缩短重组蛋白下游工艺示意图

图中的实线部分为通常的变性蛋白的先复性而后纯化的工艺路线图，而矩形虚线框则表示用 USRPP 一步可实现的效果

§ 1.4 本书的内容

为使读者对蛋白折叠液相色谱法 (PFLC) 有一个初步的认识，在本书第一章绪论中对这新术语进行了详尽说明，目的是让读者一方面充分认识到 PFLC 法的复杂性，另一方面是在讲述该 PFLC 法优点的同时，又能激发读者的好奇心并积极参与和开发这一新的研究领域。讲述 PFLC 法发展史，一方面要让读者知道该 PFLC 法的发展过程，以增加读者的知识和智慧，另一方面也能再次使读者认识到科学研究的目标最终是要为社会发展、提高人类生活质量服务的。

蛋白复性是蛋白分子从无序到有序的立体结构的变化，为了能使读者更好地了解这一过程，第二章专门讲述了蛋白质的结构及分子构象变化，包括蛋白分子