

# Study on Denaturation and Renaturation for Inclusion Bodies of Recombinant Methyl Parathion Hydrolase

Xueting YANG, Yongze YUAN, Meng LOU, Ningning Zhang, Junzhong YANG, Hui Geng, Li Xiong, Deli LIU\*

Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Science, Huazhong Normal University, Wuhan, China, 430079

\* E-mail: [deliliu2002@yahoo.com.cn](mailto:deliliu2002@yahoo.com.cn)

**Abstract:** Methyl parathion hydrolase (MPD) is the key enzyme for methyl parathion degradation. MPD has been widely used to wipe off organophosphorus pesticides. Usually, recombinant MPD was expressed in *E.coli* BL21 cells predominantly as inclusion bodies with little active enzyme to collect. In this paper, we studied the denaturing of MPD inclusion bodies by urea as well as the protein renatured by diluting and dialyzing. We investigated the effect of urea concentration on the denature efficiency of MPD inclusion bodies and the certain factors affecting the efficiency of protein renaturation. These factors are including renature buffer components, pH, GSH/GSSG, and the protein concentration in the renature complex. The results suggested that the optimum urea concentration is 8 M for denature, and the optimum renature condition was 49 g/ml denature proteins diluted in Tris-HCl buffer (pH 8.5) plus 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG and 1.5 M urea. Consequently, the renatured MPD reached the electrophoresis purity and its activity was 2.4 U/ml. The specific activity of the MPD reached at 48.8 U/mg, and the renature ratio of the recombinant MPD was 12.5% comparing with the activity of that expressed as soluble proteins.

**Keywords:** Recombinant methyl parathion hydrolase; inclusion bodies; urea denaturation; renaturation

## 重组甲基对硫磷水解酶包涵体的变复性研究

杨雪婷, 袁永泽, 楼梦, 张宁宁, 杨俊忠, 耿辉, 熊丽, 刘德立\*

华中师范大学生命科学学院, 湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室 武汉 430079

\*E-mail: [deliliu2002@yahoo.com.cn](mailto:deliliu2002@yahoo.com.cn)

**摘要:** 甲基对硫磷水解酶 (MPD) 是甲基对硫磷降解途径的关键酶, 广泛应用于去除有机磷农药残留。重组 MPD 在大肠杆菌 BL21 中主要以包涵体形式表达, 活性酶蛋白制备效率低, 且不利于酶的分纯化。本研究采用尿素变性 MPD 包涵体, 变性酶蛋白在 4°C 下经稀释、透析复性。考察了尿素浓度对 MPD 包涵体变性效率的影响, 以及复性缓冲液组分、pH 和蛋白浓度对复性效率的影响。结果表明: 变性 MPD 包涵体的最佳尿素浓度为 8 M; 变性 MPD 复性的最佳条件为 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)、添加 5 mM GSH、0.5 mM GSSG 以及 1.5 M 尿素、蛋白浓度为 49 g/ml。在上述条件下, 复性 MPD 达到电泳纯, 活性为 2.4 U/ml, 比活力达到 48.8 U/mg, 与可溶性表达的 MPD 比较, 复性率为 12.5%。

**关键词:** 重组甲基对硫磷水解酶; 包涵体; 尿素; 变性; 复性

### 1 引言

有机磷农药是农业上广泛应用的一大类农药, 是农作物增产增收的重要保障, 但其中大多数品种是剧毒或高毒的化合物, 如对硫磷、甲基对硫磷、敌敌畏、杀螟松等<sup>[1]</sup>。有机磷农药残留污染土壤和水体环境, 严重威胁人类健康<sup>[2]</sup>。生物酶法去除有机磷农药残留

以其高效、安全、无二次污染等突出优点受到广泛关注。甲基对硫磷水解酶 (MPD) 是甲基对硫磷 (MP) 降解途径中的关键酶。MPD 除了高效作用于 MP, 还可降解乙基对硫磷、毒死蜱、杀螟松等多种有机磷农药, 具有良好的广谱性<sup>[3]</sup>。应用基因工程技术生产 MPD, 可为环境有机磷农药生物降解与农残检测提供必需的酶源。

应用大肠杆菌原核表达系统生产重组 MPD 易产生包涵体, 限制了活性目标蛋白的制备效率<sup>[4]</sup>。从包

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771429); 国家高新技术研究与发展计划项目(2007AA05Z417); 教育部博士点基金项目(20060511002)

涵体中高效回收活性蛋白是基因工程生产 MPD 需要解决的一个重要问题。目前,包涵体变性与变性蛋白的复性技术是从包涵体中回收活性蛋白的主要手段。运用包涵体变复性技术制备活性目标蛋白需要确定合适的变性与体外复性条件,不同蛋白所需的条件一般有所差别,目前还没有普遍实用的技术方案<sup>[5]</sup>。采用极端 pH 条件、高温、去污剂、高浓度无机盐或有机溶剂均可裂解包涵体,一般常用 6 M 盐酸胍或 8 M 尿素溶解包涵体<sup>[6]</sup>。相对于变性,包涵体裂解释放的目标蛋白在体外重新正确折叠、恢复活性则更为关键,在实践中也更加困难,是变复性技术制备活性蛋白的限制性因素。传统的稀释-透析复性法因其简便、易操作和条件因子易于控制的优点,一般实验条件下仍然具有实用价值<sup>[7]</sup>。

本文采用尿素变性 MPD 包涵体,研究变性剂浓度对包涵体裂解的影响,重点研究稀释变性液的蛋白浓度、透析液的 pH 和氧化-还原剂比例对 MPD 复性的影响。为应用包涵体变复性技术提高基因工程 MPD 活性蛋白的制备效率提供必要的理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 菌种、质粒 与主要试剂

含重组质粒 pET-mpd 的大肠杆菌 BL21(DE3)由本实验室保存。蛋白胨和酵母粉(Oxoid); 硫酸卡拉霉素和 IPTG(Amresco); 甲基 1605 标样(湖北沙隆达化工研究所); 氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽(GSH)(Amresco), 其余生化试剂均为分析纯,购自上海国药集团。

### 2.2 MPD 包涵体的制备

活化含有重组质粒 pET-mpd 的大肠杆菌 BL21(DE3),按 1%接菌量转入新鲜 LK(含有 50 mg/L Kan 的 LB)培养基,37℃、200 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6,加入 IPTG(终浓度为 1 mM)诱导 6 h,收集菌体,用 PBS 洗涤数次,冰浴、间歇超声波(0.5s-0.5s)处理 15 min,破碎细胞于 4℃、15,000 g 离心 30 min,上清为粗酶液,沉淀主要为 MPD 包涵体。将沉淀(粗制 MPD 包涵体)以洗涤缓冲液(2 M 尿素、50 mM Tris-HCl, 0.3 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.5% TritonX-100, pH 8.5)重悬,搅拌 20 min, 4℃、

15 000 g 离心 20min,收集沉淀重复洗涤一次,最后用 TE 缓冲液洗涤以去除 TritonX-100。洗涤后的 MPD 包涵体用于后继实验。

### 2.3 MPD 包涵体的变性

按 10 ml/g 的比例加入变性缓冲液,重悬 MPD 包涵体。剧烈震荡 1 h 以充分变性包涵体,之后,室温静置 2 h, 4℃、15 000 g 离心 20 min,上清为 MPD 包涵体变性液。变性缓冲液(pH 8.0): 50 mM Tris-HCl、0.5 mM EDTA、50 mM NaCl、5% (V/V) 甘油、50 mM DTT 和尿素。尿素终浓度为 4、6 或 8 M,以确定包涵体变性所需的最佳尿素浓度。

### 2.4 变性 MPD 复性

取适量包涵体变性液,缓冲液(50 mM Tris-HCl、0.5 mM EDTA、pH 8.0)稀释 5、10 或 20 倍,使变性液蛋白浓度不高于 100 g/mL。稀释变性液置于透析袋,4℃、复性缓冲液(50 mM Tris-HCl, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 0.5 mM EDTA, pH8.5)中透析。复性缓冲液更换三次,最后以 50 mM PBS 缓冲液(pH7.5)透析 12 h, 4℃、15 000 g 离心 20 min,收集上清液,检测 MPD 活性,确定复性效率。同时采用 SDS-PAGE 检测目的蛋白纯度。

### 2.5 甲基对硫磷水解酶活性及蛋白含量测定

酶活力测定参照文献<sup>[8]</sup>。酶活力单位定义:室温、1 min 内催化生成 1 μmol PNP 所需要的酶量。蛋白含量测定采用 Bradford 法<sup>[9]</sup>。以牛血清白蛋白为标准品制作标准曲线。

## 3 结果与分析

### 3.1 尿素浓度对 MPD 包涵体变性的影响

尿素浓度对 MPD 包涵体变性的影响如表 1 所示。随着尿素浓度提高,包涵体变性液中可溶性蛋白含量上升;当尿素浓度为 8M 时,变性上清中可溶性蛋白浓度达到 486 g/ml;变性上清中未检测到 MPD 活性。说明高浓度尿素有利于 MPD 包涵体裂解,释放更多的变性蛋白。

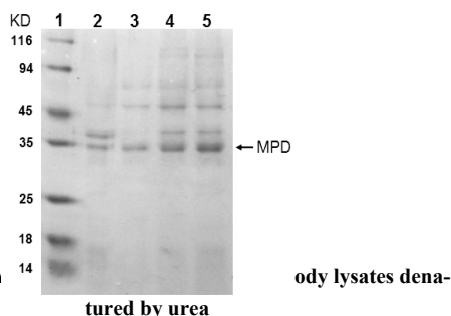
MPD 包涵体经不同浓度的尿素变性处理,SDS-PAGE 分析结果如图 1 所示。随着变性剂浓度上升,变性液中 MPD 蛋白量提高。8 M 尿素处理后,变性液中 MPD 含量最高,这与蛋白含量测定结果一致。

**Table 1. Soluble Protein Concentration and MPD Activity after Treating with Urea**

**表 1 尿素变性后的可溶性蛋白含量与 MPD 酶活性**

Urea Conc. (M)	Soluble Protein Conc. (g/ml)	MPD Activity (U/ml)
4.0	291	n.d
6.0	387	n.d
8.0	486	n.d

Note: n.d means not detect. (即未检出酶活力)



**Figure 1. SDS-PA**

ody lysates dena-  
tured by urea

1: standard protein marker; 2: crude enzyme supernatant of nature MPD; 3-5: MPD inclusion lysates denatured by 4, 6, and 8M urea; approximately 5 g protein was applied to each pot.

**图 1 MPD 包涵体尿素变性液的 SDS-PAGE 分析**

1: 标准分子量蛋白; 2: 非变性 MPD 粗酶液; 3-5: 4、6 与 8M 尿素处理后的 MPD 包涵体变性液; 每泳道的上样量均为 3 g 蛋白。

### 3.2 变性蛋白浓度对 MPD 复性的影响

溶液蛋白的聚集程度会影响变性蛋白的复性过程。本实验研究变性液中蛋白浓度对 MPD 复性的影响。将 8 M 尿素处理后的包涵体变性液稀释 5、10 与 20 倍,使其可溶性蛋白含量分别为 98、49 与 25 g/ml。上述稀释后的 MPD 变性液均采用透析法复性(表 2)。从表中可以看出,变性液蛋白浓度从 98 g/ml 降低至 49 g/ml, MPD 复性效率提高 1 倍以上。当变性液蛋白浓度进一步降低到 25 g/ml, MPD 复性效率则明显下降。说明尿素变性液适度稀释是促进 MPD 复性的必需要素。本实验有利于目的蛋白复性的溶液蛋白浓度为 49 g/ml。

### 3.3 pH、氧化-还原剂比例及尿素对 MPD 复性的影响

复性缓冲液 pH、氧化-还原剂比例以及尿素是影响 MPD 复性的重要因素。如图 2A 所示, pH8.5 条件下 MPD 复性效率相对最高,为复性的最适 pH。在该 pH 下研究了氧化-还原状态对 MPD 复性的影响(图

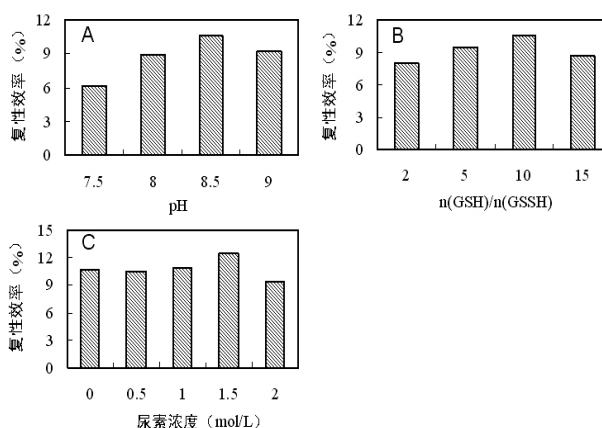
2B)。向复性缓冲液(即透析液)中添加不同配比的 GSH 与 GSSG,形成不同的氧化-还原剂比例。当 GSH/GSSG 为 10.0 时,MPD 复性效率相对最高。

**Table 2. The Effect of Soluble Protein Concentration on the Efficiency of Protein Renaturation**

**表 2 蛋白浓度对变性 MPD 复性效率的影响**

Protein Conc. (g/ml)	MPD Activity (U/ml)	Specific Act. (U/mg)	Efficiency (%)
98	0.99	10.1	5.2
49	2.03	41.4	10.6
25	0.91	36.4	4.8

Note: the efficiency of protein renaturation (%) is defined as the activity of renatured MPD /the activity of crude enzyme supernatant.



**Figure 2. Effect of pH, oxidation-reduction ratio and urea on the renatured efficiency of MPD**

A, B, and C represent the effect of pH, oxidation-reduction ratio, and urea, respectively.

**图 2. pH、氧化-还原剂比例及尿素对 MPD 复性的影响**

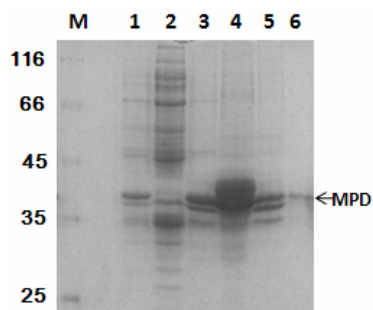
A,B 和 C 分别为 pH、氧化-还原剂比例和尿素对 MPD 复性的影响

在上述 pH 与溶液氧化-还原剂比例下,向复性缓冲液中添加低浓度的尿素,测定了 MPD 复性效率(图 2C),结果发现 1.5 M 尿素可促进 MPD 复性,2 M 尿素则不具有促进效应。

### 3.4 MPD 变复性的 SDS-PAGE 分析

MPD 包涵体经 8 M 尿素变性后,采用本实验确定的最佳稀释-透析复性条件(变性液蛋白浓度、复性缓

冲液的 pH、氧化还原剂比例和尿素浓度) 获得活性 MPD。SDS-PAGE 分析结果如图 3, 8 M 尿素处理下, MPD 包涵体裂解效率较高, 目的蛋白几乎全部从包涵体转移到上清液中; 复性液中目的蛋白条带明显增强, 说明稀释-透析过程不仅可复性 MPD, 还可有效地纯化该蛋白。



**Figure 3. SDS-PAGE analysis of denaturation and renaturation of MPD inclusion body**

M, standard protein marker; 1, total protein; 2, crude enzyme supernatant and precipitation of recombinant MPD; 3-4, supernatant and precipitation of MPD inclusion lysised by 8 M urea; 5, re-natured MPD

### 图 3. MPD 包涵体变复性的 SDS-PAGE 分析

M: 标准分子量蛋白; 1: 全菌蛋白; 2 和 3 分别是 MPD 粗酶上清和沉淀; 4 和 5 分别是 8 M 尿素变性 MPD 包涵体后的上清液与沉淀; 6: MPD 复性液。

## 4 讨论

本研究报道了通过变复性技术从 MPD 包涵体中回收活性目标蛋白的方法。包涵体含有脂类、脂多糖核酸和杂蛋白, 影响其溶解和复性<sup>[10]</sup>。因此, 我们采用含有 2 M 尿素和 TritonX -100 的缓冲液洗涤包涵体, 除去部分杂质。洗涤后, 包涵体在 8 M 尿素作用下的裂解效率明显提高。研究表明, 不同的包涵体复性措施与效果不一, 必须针对特定蛋白的理化特点, 摸索其最佳复性条件<sup>[11]</sup>。本文研究了蛋白浓度、pH、氧化-还原体系以及添加尿素对 MPD 变性蛋白体外复性效率的影响, 确定其最佳复性条件为: Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)、添加 5 mM GSH、0.5 mM GSSG 以及 1.5 mol/L 尿素、蛋白浓度为 49 mg/ml。在最适复性条件下, 复性 MPD 比活力为 48.8 U/mg, 且达到了电泳纯 (图 3)。说明稀释-透析过程不仅可复性 MPD, 还可有效地纯化该蛋白。

研究表明, 包涵体复性体系 pH 一般大于 7.0, 绝大多数蛋白最适复性 pH 在 8.0-9.0<sup>[12]</sup>。本实验证明, MPD 复性效率在 pH8.5 最高, 而在接近中性条件下 (pH7.5)

的复性效率仅为最适 pH 下的 60% (图 2A)。蛋白质聚集度是影响复性的重要因素, 过度聚集不利于复性。控制变性液蛋白浓度在 10-100 g/ml 或更低通常有利于复性<sup>[7,13]</sup>, 本研究中, 变性液蛋白浓度为 49 g/ml 时, MPD 复性效率较高 (表 2)。复性效果还取决于变性蛋白在体外重折叠过程中能否形成正确而稳定的二硫键。这与复性缓冲液的氧化还原剂比例密切相关, 本实验证明 5 mM GSH 与 0.5 mM GSSG 配比有利于复性 (图 2B)。在复性缓冲液中加入较低浓度的尿素可促进 MPD 复性 (图 2C), 可能是尿素能够抑制蛋白中间态分子聚集而提高天然构象的形成比例<sup>[14]</sup>。

本文采用尿素变性结合稀释透析法复性可有效地从包涵体中回收活性 MPD, 实验确定了变性剂的最佳作用浓度以及复性所需的优化条件。为提高 MPD 基因工程酶生产效率, 满足生物技术降解环境有机磷农药污染物对酶的需求提供了必要的理论依据。

## References (参考文献)

- [1] Gill L, Ballesteros A. Degradation of organophosphorous nerve agents by enzyme-polymer nanocomposites: efficient biocatalytic material for personal protection and large-scale detoxification [J]. *Biotechnol Bioeng*. 2000, 70(4): 400-410.
- [2] Chen W, Mulchandani A. The use of live biocatalysts for pesticide detoxification [J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16: 71-76.
- [3] Liu Z, Li SP. Mutation breeding of methyl parathion degrading strain DLL-1 [J]. *Soil Science*. 2003, 40(2): 293-300.
- [4] Agen AJ, Hatton TA, Wang DI. Protein refolding in reverse micelles [J]. *Biotech and Bioeng*, 1989, 35: 955-965.
- [5] Xu J, Takakuwa N, Nogawa M, *et al*. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC2327 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49: 718-724.
- [6] De Bernardez CE. Protein refolding for industrial process [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12: 202-207.
- [7] Zhang XY, Zhang HY. Expression and renaturation of recombinant porcine carboxypeptidase B in *E.coli* [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 17 (1): 39- 44.
- [8] Chu XY, Wu NF, Deng MJ, *et al*. Purification and characterization of organophosphorus hydrolase OPHC2 in *Pichia pastoris*: [J]. 2006, 49: 9-14.
- [9] Li ZW. *Biochemical principles and methods* [M]. 2 Version. Beijing: Beijing University Press, 2000.
- [10] Cowley DT, Mackin RB. Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin [J]. *FEBS Lett*, 1997, 402: 116-124.
- [11] De Bernardez CE. Refolding of recombinant proteins [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, 9 (2): 157-163.
- [12] Fischer B, Sumner I, Peter G. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 41 (1): 3-13.
- [13] Zhang G, Chang XH. Refolding of the ovarian anti-idiotypic single chain antibody 6B11ScFv and mouse HSP70 fusion protein expressed by *E.coli* [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2009, 4(6): 424-428.
- [14] Fang M, Huang HL. Study of Inclusion body protein renaturation in vitro [J]. *Biological Engineering*, 2001, 17 (6): 608-614.