

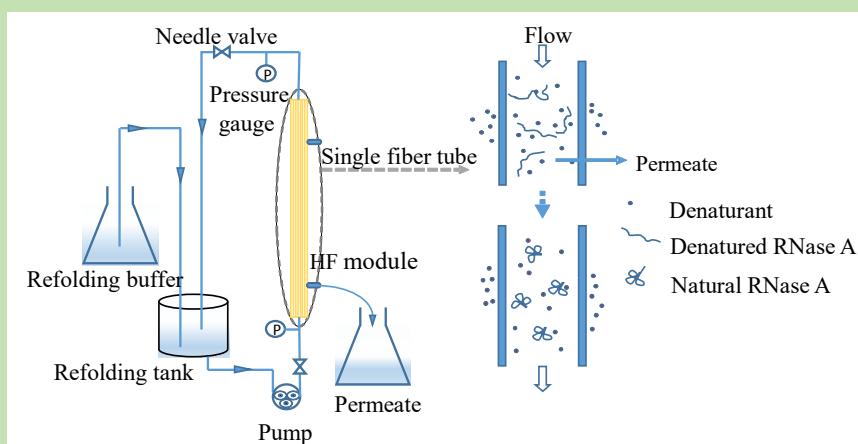
## Cross-flow ultrafiltration refolding of ribonuclease A

Xiangjuan WANG<sup>1,2</sup>, Xiunan LI<sup>2</sup>, Chao CHEN<sup>2</sup>, Zhiguo SU<sup>2</sup>, Guanghui MA<sup>2</sup>, Dawei ZHAO<sup>2\*</sup>,  
Rong YU<sup>1\*</sup>

1. Key Laboratory of Drug-Targeting and Drug Delivery System of the Education Ministry, Sichuan Engineering Laboratory for Plant-Sourced Drug and Sichuan Research Center for Drug Precision Industrial Technology, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

**Abstract:** Performance of cross-flow ultrafiltration refolding strategy based on hollow fiber membrane for ribonuclease A was investigated. To improve the refolding efficiency, effects of operating conditions of ultrafiltration refolding on the activity yield and mass recovery were studied. Parameters of RNase A concentration (A), transmembrane pressure (B), circulation velocity (C) were chosen as



the three test factors, with three level for each factor an  $L_9(3^4)$  orthogonal array was implemented. Results of the orthogonal test showed that these three factors had a significant influence on the activity yield of the ultrafiltration refolding of ribonuclease A, whether based on variance analysis or range analysis. However, results of ANOVA (Analysis of Variance) showed that the three factors had no significant effect on mass recovery rate of ultrafiltration of ribonuclease A. Therefore, the optimal conditions for ultrafiltration of ribonuclease A were  $A_1B_1C_2$ , that was, the concentration of refolding was 0.3 mg/mL, the transmembrane pressure was 34.0 kPa and the circulation velocity was 935 cm/min. Verification test was performed under the optimal conditions with the active yield of 92.31% and the mass recovery rate of 77.56%, respectively. Furthermore, the reliability of ultrafiltration refolding was confirmed by characterization of refolding products with circular dichroism, reversed-phase high performance liquid chromatography and high-performance gel filtration chromatography.

**Key words:** ultrafiltration refolding; ribonuclease A; activity yield; mass recovery; orthogonal test

收稿: 2020-02-06, 修回: 2020-03-06, 网络发表: 2020-03-17, Received: 2020-02-06, Revised: 2020-03-06, Published online: 2020-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 21506228; 21376248; 81773623; 81973226)

作者简介: 王向娟(1995-), 女, 四川省彭州市人, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质复性; 通讯联系人, 赵大伟, E-mail: dwzhao@ipe.ac.cn; 余蓉, E-mail: yurong@scu.edu.cn.

**引用格式:** 王向娟, 李秀男, 陈超, 等. 核糖核酸酶 A 的错流超滤复性. 过程工程学报, 2020, 20(12): 1455-1462.

Wang X J, Li X N, Chen C, et al. Cross-flow ultrafiltration refolding of ribonuclease A (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2020, 20(12): 1455-1462, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.220038.

# 核糖核酸酶 A 的错流超滤复性

王向娟<sup>1,2</sup>, 李秀男<sup>2</sup>, 陈超<sup>2</sup>, 苏志国<sup>2</sup>, 马光辉<sup>2</sup>, 赵大伟<sup>2\*</sup>, 余蓉<sup>1\*</sup>

1. 靶向药物与释药系统教育部重点实验室(四川大学), 四川省植物来源工程实验室和四川省小分子药物精准化工程技术研究中心,

四川大学华西药学院, 四川 成都 610041

2. 中国科学院过程工程研究所生化国家重点实验室, 北京 100190

**摘要:** 针对重组蛋白高表达形成的包涵体, 基于中空纤维膜的错流超滤复性具有较大的应用潜力。为研究不同条件对基于中空纤维膜的错流超滤复性的影响, 以核糖核酸酶 A (RNase A) 为例, 以复性过程的活性收率和质量收率作为考察指标, 设计了 RNase A 复性初始浓度(A)、跨膜压力(B)、循环流速(C)的 3 因素 3 水平正交实验。结果表明, 错流超滤复性过程中, 以上复性条件对 RNase A 的质量收率基本没有影响, 对 RNase A 的活性收率具有显著影响, 其较优组合为 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>, 即 RNase A 复性初始浓度为 0.3 mg/mL、跨膜压力 34.0 kPa、循环流速 935 cm/min。在以上复性条件下, RNase A 的活性收率可达 92.31%, 质量收率为 77.56%。

**关键词:** 超滤复性; 核糖核酸酶 A; 活性收率; 质量收率; 正交实验

**中图分类号:** Q518.4      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1009-606X(2020)12-1455-08

## 1 前言

许多重组蛋白在大肠杆菌中的高表达导致了不溶性聚集体即包涵体的形成。包涵体是具有非天然构象的蛋白多聚体, 因此不具有生物活性。从包涵体中获得具有生物活性产物的操作一般包括四个步骤: 从大肠杆菌细胞中分离和提纯包涵体, 溶解包涵体, 将溶解后的包涵体蛋白重新折叠成天然构象, 对重新折叠的蛋白进行纯化。其中, 将包涵体蛋白重新折叠成具有生物活性的形式, 提高包涵体蛋白的复性收率至关重要。

目前最常用的包涵体复性方法包括稀释复性和透析复性, 其中稀释复性操作简单, 应用广泛, 但需要将蛋白浓度控制在较低水平(一般在 100 μg/mL 以下)以减少蛋白聚集; 透析复性过程变性剂的浓度逐渐降低, 在一定程度上能提高复性收率, 但操作费时, 且容易产生透析膜污染的问题。针对以上问题, 越来越多的新技术也应用到了包涵体的复性过程。如层析复性所需复性时间短, 可同时实现蛋白的复性与纯化; 高压复性<sup>[1]</sup>时高静水压力能破坏分子间的疏水和静电相互作用, 导致聚集物在非变性条件下解离, 可获得更高的复性率; 反胶束复性时蛋白质分子通过胶束彼此分离, 减少了分子间的相互作用, 阻止了蛋白的聚集。以上复性方法为蛋白质复性提供了新的思路, 但由于各种限制, 如所需耗材昂贵、操作条件苛刻、添加剂去除困难等, 目前还无法在工业生产中大规模应用。

错流超滤技术能够降低蛋白聚集体在膜上沉淀造

成的膜污染问题, 同时中空纤维膜具有装填密度大且易于放大的优点<sup>[2]</sup>, 因此基于中空纤维膜的错流超滤复性在工业应用上有很大的潜力。目前已有报道将错流超滤复性技术应用于 α-乳白蛋白<sup>[3]</sup>和重组人粒细胞集落刺激因子<sup>[4]</sup>。但迄今为止, 基于中空纤维膜的错流超滤复性研究有限, 超滤复性过程中的操作参数对复性效果的影响尚不清楚。

核糖核酸酶 A(RNase A)是一种核糖核酸内切酶, 由 124 个氨基酸残基组成, 在 26-84, 40-95, 58-110 和 65-72 位有四个天然二硫键, 分子量为 13.7 kDa。RNase A 具有广泛抗病毒作用, 在抑制细菌或病毒感染, 艾滋病治疗和肿瘤治疗等领域具有极大的开发前景<sup>[5-7]</sup>。另外, RNase A 是第一个被证明能够在其四个二硫键全部还原变性后还能恢复其天然构象的蛋白质<sup>[8]</sup>。因此, 本工作以 RNase A 为模型蛋白, 考察错流超滤复性过程中各操作参数对活性收率和质量收率的影响, 探索 RNase A 的最优复性条件, 为基于中空纤维膜的错流超滤复性提供进一步的理论基础。

## 2 实验

### 2.1 材料与试剂

Xampler UFP-3-E-4MA 中空纤维膜(美国 GE Healthcare 公司), 牛胰核糖核酸酶 A(Ribonuclease A from bovine pancreas, RNase A)和 2',3'-环胞嘧啶单磷酸腺苷(cCMP)均购自美国 Sigma 公司。还原型、氧化型谷胱甘肽(GSH, GSSG)、盐酸胍(GdnHCl)购自上海阿拉丁

试剂,三羟基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸(EDTA)、氯化钠(NaCl)均购自上海沪试试剂,巯基乙醇(山东西亚化学工业有限公司),上述试剂均为国产分析纯。乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司),三氟乙酸(色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司)。

## 2.2 实验设备与分析仪器

QuixStand™ 台式膜过滤分离系统(美国 GE Healthcare 公司),Sorvall Legend Micro17 高速微量离心机(美国 Thermo 公司),AKTA Pure 蛋白质层析系统(美国 GE Healthcare 公司),Superdex™ 75 10/300 GL 凝胶过滤预装柱(美国 GE Healthcare 公司),HiTrap Desalting 5 mL 脱盐柱(美国 GE Healthcare 公司),J-810 圆二色光谱仪(日本 JASCO 公司),1260 Infinity II 高效液相色谱系统(美国安捷伦科技有限公司),Vydac TP C4 色谱柱(美国 GRACE 公司),Evolution 60 S 紫外可见分光光度计(美国 Thermo 公司)。

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 核糖核酸酶 A 的变性

变性缓冲溶液为 0.1 mol/L Tris-HCl (含 6 mol/L GdnHCl, 0.5% 巯基乙醇和 1 mmol/L EDTA, pH=8.0)。称取天然 RNase A 固体溶解于变性缓冲液中,浓度为 6 mg/mL,在室温放置 3 h 使 RNase A 彻底变性,然后置于 4℃ 冰箱中备用。

### 2.3.2 核糖核酸酶 A 的超滤复性

用台式膜过滤分离系统进行超滤复性,考虑到工艺的通用性和大规模生产实际中的可行性,并减少蛋白质

的特异性吸附,本研究选用了通用的 GE 公司生产的商品化改性聚砜中空纤维膜组件: Xampler UFP-3-E-4MA。膜组件的截留分子量 3 kDa,纤维膜根数 50 根,纤维膜内径 0.1 cm,膜面积 420 cm<sup>2</sup>,流路长度 30 cm。为保证目的蛋白的收率,选用膜的截留分子量小于目的蛋白相对分子质量的 1/3,保证超滤过程中 RNase A 被完全截留<sup>[9]</sup>。

超滤复性过程采用内压式操作,即溶液经压力差驱动,由内向外渗透过中空纤维膜成为透过液,而截留的物质则留在中空纤维内部。复性缓冲液为 75 mmol/L Tris-HCl (含 0.5 mmol/L GSSG, 1 mmol/L GSH, 1.0 mmol/L EDTA, pH=8.3)。变性 RNase A 溶液经变性缓冲液稀释至相应复性初始浓度后,置于复性反应器中。在超滤复性过程中,复性缓冲液经分离系统中的蠕动泵补加进入复性反应器中,复性反应器中的溶液经蠕动泵以一定的循环流速通过中空纤维膜后再流回复性反应器中,中空纤维膜可截留 RNase A,透过去除 GdnHCl 和巯基乙醇等小分子。同时,利用出口管路中的针型阀调节跨膜压力(TMP),控制滤出液的滤出速度。复性过程中,调节复性缓冲液的流加速度与滤出液的滤出速度相等,以保持复性溶液体积(100 mL)恒定。复性过程中定时取样,将样品离心后测其浓度和活性,当活性不再升高时停止复性操作。中空纤维膜组件示意图如图 1 所示,其中,  $p_1$  和  $p_2$  分别为进口端和出口端压力(Pa),由中空纤维膜组件两端压力表测得,压力表示数是相对于大气压力的值,即将大气压力定义为零点。 $p_3$  为环境大气压力(Pa),  $p_3=0$ 。  $TMP=(p_1+p_2)/2-p_3$ 。

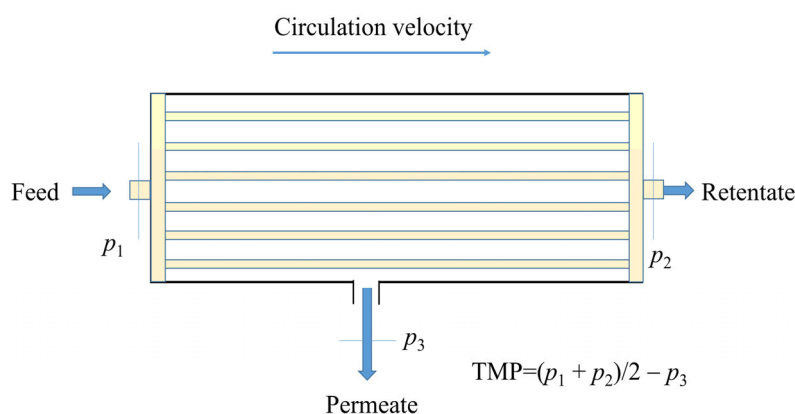


图 1 中空纤维膜组件示意图

Fig.1 Schematic diagram of hollow fiber membrane components

### 2.3.3 核糖核酸酶 A 浓度和活性的测定

RNase A 的浓度通过紫外可见分光光度计 280 nm

波长吸收值测定<sup>[10]</sup>。RNase A 的活性以 cCMP 为底物,采用 cCMP 法进行测定:向 950 μL 测活反应液(0.1 mol/L

Tris-HCl, 1.0 mmol/L EDTA, pH=5.0)中加入 50  $\mu$ L RNase A 溶液, 10  $\mu$ L cCMP 溶液(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 20 mg/mL cCMP, pH=7.0), 测定

反应液在 292 nm 下的吸光度, 通过吸光度值的增长速率计算 RNase A 的活性。质量收率和活性收率的计算方法分别见式(1)和(2):

$$\text{质量收率} = (\text{复性液中的 RNase A 总质量} / \text{变性前该样品液中的 RNase A 总质量}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{活性收率} = (\text{复性液中的 RNase A 比活} / \text{变性前该样品液中的 RNase A 比活}) \times 100\% \quad (2)$$

### 2.3.4 错流超滤复性正交实验设计

超滤过程的 RNase A 复性初始浓度、跨膜压力、循环流速是影响超滤效果的最重要因素。目前对 RNase A 的复性研究中蛋白浓度范围一般为 0.2~2.0 mg/mL, 且超滤复性过程中 RNase A 浓度高于 0.7 mg/mL 易造成蛋白质沉淀, 堵塞中空纤维膜; 跨膜压力太小易造成变性剂脱除速率较低, 导致复性时间过长, 而压力太大则会损害中空纤维膜组件, 超出膜的操作适用条件; 超滤操作的循环流速过低时会引起膜表面严重的浓差极化, 流速太高时会造成流体剪切力太大从而破坏蛋白质结构。因此, 综合考虑, 本研究以 RNase A 复性初始浓度(A)、跨膜压力(B)和循环流速(C)作为本次实验的实验因子,

各设置 3 个水平, 用  $L_9(3^4)$  正交实验优化 RNase A 错流超滤复性条件, 并用 SPSS 20.0 对所有因素进行统计分析。正交实验因素与水平见表 1。跨膜压力实际是连接在中空纤维膜两端的进口和出口压力之和的平均值。压力表的单位为 psi, 实验中通过出口管路上的针型阀调节设定跨膜压力为 5.0, 10.0, 15.0 psi, 换算成公制单位即为 34.0, 68.9, 103.0 kPa。循环流速通过蠕动泵控制: 测定选用管路条件下蠕动泵的转速和流量之间的线性关系曲线:  $y=3.67x$  ( $R^2=0.997$ ), 将实验设定的转速 70, 100, 130 r/min 代入上述关系式中, 计算得出对应的流量, 根据选用的中空纤维膜组件的参数进行换算, 得到循环流速分别为 654, 935, 1215 cm/min。

表 1 超滤复性正交实验因素水平表

Table 1 Horizontal table of orthogonal experimental factors of ultrafiltration refolding

Level	Factor			
	RNase A initial concentration/(mg/mL), A	Transmembrane pressure/kPa, B	Circulation velocity/(cm/min), C	Blank, D
1	0.3	34.0	654	1
2	0.5	68.9	935	2
3	0.7	103.0	1215	3

### 2.3.5 圆二色光谱表征

复性的 RNase A 在 AKTA Pure 蛋白质层析系统上, 用 HiTrap Desalting 5 mL 脱盐柱除去变性和复性缓冲液中的小分子化合物, 层析过程流速为 0.5 mL/min, 上样量为 50  $\mu$ L, 层析缓冲液为 50 mmol/L 磷酸缓冲液(PBS), pH=7.4, 洗脱并收集含目标蛋白质的洗脱峰。变性 RNase A 的层析纯化步骤与复性 RNase A 相同, 层析缓冲液为 50 mmol/L PBS 和 6 mol/L GdnHCl, 且 pH=7.4。

在 Jasco J-810 圆二色光谱仪上进行 RNase A 的圆二色光谱的检测<sup>[11]</sup>。将纯化后的 RNase A 用相应的层析缓冲液调整蛋白质质量浓度为 0.2 mg/mL。以缓冲液作为空白对照, 用 1 mm 石英比色皿, 扫描波长范围 190~250 nm, 数据间隔 1 nm, 扫描速度 200 nm/min, 每个样品扫描 3 次。

### 2.3.6 高效凝胶过滤色谱分析(SEC)

采用 AKTA Pure 蛋白质层析系统进行样品分析。色谱条件: 层析柱为 Superdex™ 75 (300 mm×10 mm i.d.) 分析柱, 流动相(20 mmol/L PBS, 0.15 mol/L NaCl,

pH=7.0), 上样量 500  $\mu$ L, 时间 40 min, 洗脱流速 0.5 mL/min, 检测波长 280 nm。

### 2.3.7 反相高效液相色谱分析(RP-HPLC)

采用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统进行样品分析。色谱条件: 色谱柱 Vydac TP C4 (250 mm×4.6 mm i.d.), 流动相为含 0.1 vol% 三氟乙酸的乙腈和水, 线性梯度洗脱以乙腈:水(体积比)从 5:95 增加至 95:5, 上样量 100  $\mu$ L, 时间 30 min, 流速 1 mL/min, UV 检测波长 280 nm。

## 3 结果与讨论

### 3.1 错流超滤复性正交实验的结果分析

#### 3.1.1 正交实验的极差分析

错流超滤复性各组实验所得活性收率和质量收率结果见表 2。实验因子与指标的关系如图 2 所示。其中  $K_1, K_2, K_3$  分别为因素水平 1, 2, 3 的活性收率平均值,  $R$  为各因素的极差。 $k_1, k_2, k_3$  分别为因素水平 1, 2, 3 的质量收率平均值,  $r$  为各因素的极差。

以活性收率为考察指标比较表 2 极差  $R$  的大小, 可见  $R_B>R_A>R_C$ , 由此可知影响活性收率因素顺序为  $B>A>C$ , 即跨膜压力>RNase A 复性初始浓度>循环流速。由图 2(a)可知, 跨膜压力的优劣顺序为水平 1>水平 2>水平 3, RNase A 复性初始浓度的优劣顺序为水平 1>水平 2>水平 3, 循环流速的优劣顺序为水平 2>水平 1>水平 3。所以当以活性收率为考察指标时, 选择  $A_1B_1C_2$  为 RNase A 超滤复性的较优条件, 即 RNase A 复性初始浓度 0.3 mg/mL、跨膜压力 34.0 kPa、循环流速 935 cm/min。

以质量收率为考察指标时比较表 2 极差  $r$  的大小, 可见  $r_B>r_A>r_C$ , 由此可知, 影响质量收率的因素顺序为跨膜压力>RNase A 复性初始浓度>循环流速。由图 2(b)可知, 跨膜压力的优劣顺序为水平 3>水平 2>水平 1, RNase A 复性初始浓度的优劣顺序为水平 1>水平 2>水平 3, 循环流速的优劣顺序为水平 3>水平 2>水平 1。以质量收率为考察指标时, 较优条件为  $A_1B_3C_3$ , 即 RNase A 复性初始浓度 0.3 mg/mL、跨膜压力 103.0 kPa、循环流速 1215 cm/min。

表 2 错流超滤复性正交实验结果  
Table 2 Orthogonal experimental results of cross-flow ultrafiltration refolding

Experiment No.	A	B	C	Activity yield/%	Mass recovery rate/%
1	0.7	103.0	654	61.90	77.76
2	0.3	68.9	1215	80.00	90.00
3	0.7	34.0	1215	71.42	66.67
4	0.3	103.0	935	76.92	84.38
5	0.5	103.0	1215	57.14	88.89
6	0.7	68.9	935	73.33	77.87
7	0.5	68.9	654	75.00	78.42
8	0.5	34.0	935	85.71	77.55
9	0.3	34.0	654	90.89	71.85
$K_1$	82.60	82.67	75.93		
$K_2$	72.62	76.11	78.65		
$K_3$	68.88	65.32	69.51		
$R$	13.72	17.35	9.14		
$k_1$	82.10	72.02	76.01		
$k_2$	81.62	82.09	79.93		
$k_3$	74.10	83.68	81.85		
$r$	8.00	11.66	5.84		

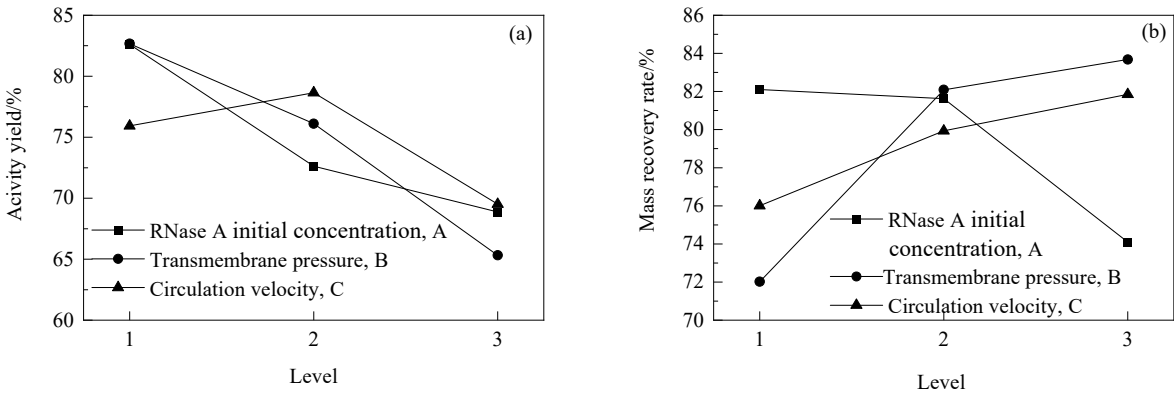


图 2 活性收率因子和质量收率因子与其指标的关系  
Fig.2 The relationships between factors and activity yield indexes, factors and mass recovery rate indexes

3.1.2 正交实验的方差分析

利用 SPSS 20.0, 进行  $L_9(3^4)$  正交实验结果的方差分析, 活性收率结果见表 3, 质量收率结果见表 4。

由表 3 可知, 以活性收率为考察指标时, 各因素  $P$  值均小于 0.050, 对 RNase A 超滤复性活性收率的影响均显著。此外 III 型平方和越大, 对活性收率影响越大。



影响 RNase A 的错流超滤复性的因素依次为跨膜压力>RNase A 复性初始浓度>循环流速,与极差分析结果一致。

RNase A 的活性收率随跨膜压力减小而增大。超滤复性与稀释复性相比,最大的差别在于变性剂浓度降低的快慢。稀释复性过程中,变性剂的浓度瞬时从变性浓度降至低浓度,不能为复性中间体的形成和转换提供充足的时间。在超滤复性过程中,变性剂的脱除速率主要由跨膜压力决定,跨膜压力越小,变性剂脱除速率越慢。RNase A 含 4 对二硫键,复性过程包含二硫键重排和折叠成正确的天然结构两个过程,复性过程复杂且相对缓慢。跨膜压力越小,越有利于折叠中间体的形成并转化为正确的三维结构,提高活性收率。RNase A 复性初始浓度对活性收率有重要影响。蛋白质的正确折叠是一级反应,而聚集是二级或二级以上的反应,受蛋白质浓度影响较大<sup>[12]</sup>。RNase A 在复性过程中,变性蛋白及部分折叠蛋白质表面的疏水性氨基酸残基之间发生相互作用,

蛋白浓度越高,疏水作用加强,形成了更多的可溶性聚集体,导致复性 RNase A 的比活降低。所以 RNase A 复性初始浓度越高,活性收率越小。蛋白质活性收率随循环流速呈先增加后减少的趋势。循环流速过低时,RNase A 在膜表面的非特异性吸附增加,且浓差极化现象使靠近膜表面的蛋白质浓度偏高,不利于天然态蛋白质的形成。但循环流速过高时,流体对 RNase A 的剪切力增加,导致可溶性聚集体形成,降低了活性收率。

以质量收率为考察指标时,各因素  $P$  值均大于 0.050,均无显著性差异。方差结果表明三种因素对质量收率的影响均不显著。原因可能是因为 RNase A 具有良好的溶解性,变性 RNase A 及复性中间体也不易生成不可溶性聚集体<sup>[13]</sup>。在基于中空纤维膜的错流超滤复性过程中,RNase A 复性初始浓度降低主要由于流体对 RNase A 剪切力的影响。当跨膜压力越小时,变性剂降低的速度越缓慢,复性所需时间越长,剪切力作用时间越长,导致了活性收率的降低。

表 3 活性收率的方差分析表  
Table 3 ANOVA table of activity yield

Source	Sum of squares of type III	Freedom, DF	Mean square, MS	$F$	$P$
A	301.910	2	150.955	44.387	0.022
B	460.640	2	230.320	67.724	0.015
C	131.922	2	65.961	19.395	0.049
Error	6.802	2	3.401		

表 4 质量收率的方差分析表  
Table 4 ANOVA table of mass recovery rate

Source	Sum of squares of type III	Freedom, DF	Mean square, MS	$F$	$P$
A	120.386	2	60.193	2.856	0.259
B	239.769	2	119.884	5.689	0.150
C	53.223	2	26.612	1.263	0.442
Error	42.148	2	21.074		

3.2 复性 RNase A 的检测

3.2.1 复性 RNase A 的圆二色谱分析

圆二色谱在远紫外区(190~250 nm)的谱图提供了蛋白质二级结构方面的信息。不同状态 RNase A 的圆二色谱测量结果如图 3 所示。其中 222 和 208 nm 两处的特征吸收峰分别对应  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠的含量。222 nm 处摩尔椭圆率的绝对值越大, $\alpha$  螺旋的含量越多;208 nm 处摩尔椭圆率的绝对值越大, $\beta$  折叠的含量越多。由图可以看出,变性 RNase A 的圆二色光谱(因 210 nm 之前的信号受 6 mol/L GdnHCl 影响未显示)与天然 RNase A 不同,表明 RNase A 已完全变性。复性 RNase A 与天然 RNase A 的圆二色光谱基本一致,表明经超滤复性后 RNase A 的  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠已基本恢复,证明基于中空

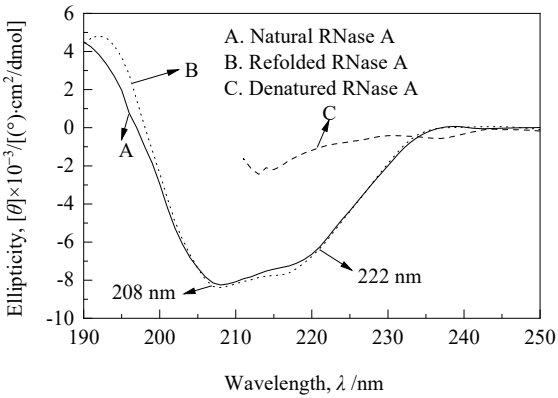


图 3 不同状态 RNase A 的圆二色光谱  
Fig.3 Circular dichromatic spectra of RNase A under different states

纤维膜的错流超滤技术可成功实现 RNase A 的复性。

3.2.2 复性 RNase A 的 SEC 和 RP-HPLC 分析

反相高效液相色谱可用于确定二硫键是否正确形成<sup>[14]</sup>, 高效凝胶过滤色谱可用于确定空间结构是否正确形成。不同状态 RNase A 的 SEC 和 RP-HPLC 结果如图 4 所示。可以看出, 变性 RNase A 在 SEC 中早于天然

RNase A 出峰, 是因为 RNase A 还原变性时, 肽链伸展, 疏水残基暴露, 水化半径增大。变性 RNase A 在 RP-HPLC 中出峰晚于天然 RNase A, 因为 RNase A 还原变性时, 二硫键打开, 疏水性增强。而复性后的 RNase A 与天然 RNase A 的 SEC 和 RP-HPLC 出峰位置基本一致, 证明 RNase A 的结构已恢复。

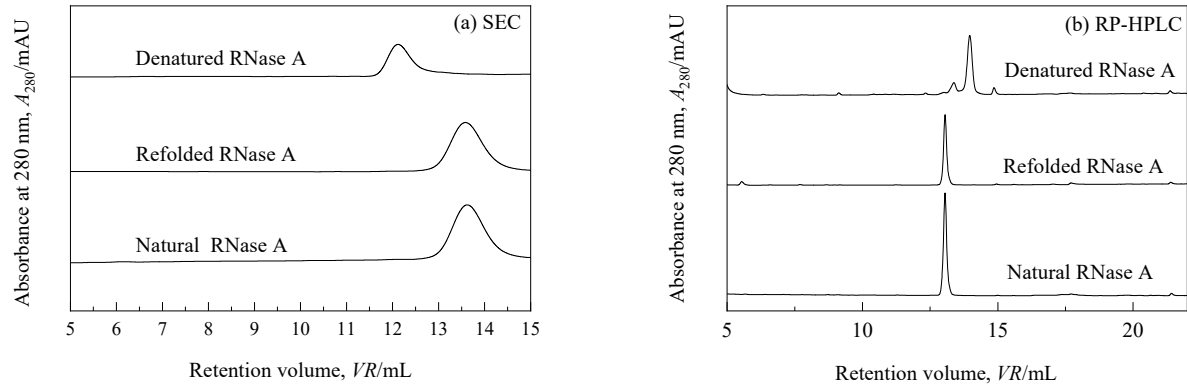


图 4 不同状态 RNase A 的 SEC 和 RP-HPLC 分析结果  
Fig.4 Analysis results of RNase A in different states by SEC and RP-HPLC

3.3 最优化结果的检验

在进行极差分析和方差分析时, 质量收率和活性收率最优条件结果不一致。考虑到在蛋白质复性时, 活性的恢复更重要。因此在实际应用中, 按照上述较优活性收率条件 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>, 即蛋白浓度 0.3 mg/mL、跨膜压力 34.0 kPa、循环流速 935 cm/min 条件下, 进行 RNase A 错流超滤复性优化结果的检验, 结果取 3 次平行实验的平均值, 得到的复性 RNase A 质量收率为 77.56%(相对标准偏差 RSD 值为 0.99%), 活性收率可达 92.31%(RSD 值为 1.45%)。结果表明错流超滤复性技术具有良好的重复性, 为该复性技术的生产应用提供了指导和参考。

表 5 中列举了文献已报道的典型 RNase A 复性方法及收率。稀释复性操作简单, 但复性初始浓度低; 反胶束复性和人工分子伴侣辅助复性能够在较高浓度条

件下操作, 但复性完成后需要去除表面活性剂或人工分子伴侣, 增加了工艺步骤; 层析复性近年来研究较多并成功应用于生产中, 不仅能在高浓度下复性, 且能同时实现蛋白质的复性与纯化, 但在层析柱上复性存在稀释效应, 当复性 RNase A 时, 活性收率也略低。

本研究中 RNase A 超滤复性较优初始浓度为 0.3 mg/mL, 虽然初始浓度相对较低, 但从正交实验结果可以看出, 在非最优条件下, 如提高复性浓度至 0.7 mg/mL, 质量收率仍可达 77%以上, 不仅操作时间比其他方法短, 且本研究中复性反应液体积为 100 mL, 一次复性总量即可达 70 mg。虽然提高 RNase A 复性初始浓度会降低超滤复性的质量收率和活性收率, 但实验结果与文献中的数据仍然具有可比性。

表 5 RNase A 不同复性方法的结果比较  
Table 5 Comparison of results of different refolding methods of RNase A

Method	RNase A initial concentration/(mg/mL)	Operating time/h	Activity yield/%
Dilution refolding <sup>[15]</sup>	0.12	20	~60%
Reverse micellar dialysis <sup>[16]</sup>	2.00	48	>90%
Artificial chaperone <sup>[17]</sup>	0.90	14	77%
Refolding by HPSEC <sup>[18]</sup>	2.00	N/A	~60%
Cross-flow ultrafiltration	0.30	10	>90%

Note: N/A is not available.

综上所述, 错流超滤复性有以下特点: 活性收率高、复性时间较短; 复性过程中复性反应液体积始终保持不

变,后续不需要进行浓缩等额外步骤。中空纤维膜易放大,此法将具有大规模生产应用的可能性。

## 4 结论

探索了基于中空纤维膜的错流超滤技术复性RNase A的方法,并通过正交实验,分别以活性收率和质量收率为指标,对超滤复性操作条件进行优化,确定了RNase A错流超滤复性最佳条件,得到以下结论:

(1) 错流超滤复性操作条件中的RNase A复性初始浓度、跨膜压力、循环流速对RNase A的活性收率有显著影响。影响活性收率因素顺序为跨膜压力>RNase A复性初始浓度>循环流速。错流超滤复性操作条件中的蛋白浓度、跨膜压力、循环流速对RNase A的质量收率影响不大。

(2) 以活性收率较优条件作验证,即RNase A复性初始浓度0.3 mg/mL、跨膜压力34.0 kPa、循环流速935 cm/min条件下,活性收率可达92.31%,质量收率为77.56%。

(3) 圆二色光谱、高效凝胶过滤色谱和反相高效液相色谱分析结果表明基于中空纤维膜的错流超滤技术可成功复性RNase A。

(4) 与其他方法相比,基于中空纤维膜的错流超滤技术复性RNase A操作简单、稳定可靠,质量收率和活性收率高,可为后续利用错流超滤技术复性蛋白质提供指导和参考。

## 参考文献

- [1] Ribó M, Font J, Benito A, et al. Pressure as a tool to study protein-unfolding/refolding processes: the case of ribonuclease A [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2006, 1764(3): 461–469.
- [2] Demeuse M T. 15-Production and applications of hollow fibers [M]//Eichhorn S J, Hearle J W S, Jaffe M, et al. *Handbook of textile fibre structure*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2009: 2, 485–499.
- [3] Ryś S, Muca R, Kołodziej M, et al. Design and optimization of protein refolding with crossflow ultrafiltration [J]. *Chemical Engineering Science*, 2015, 130: 290–300.
- [4] Zhao D, Liu Y, Wang Y, et al. Membrane combined with hydrophilic macromolecules enhances protein refolding at high concentration [J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(7): 1129–1134.
- [5] Kordalivand N, Li D, Beztsinna N, et al. Polyethyleneimine coated nanogels for the intracellular delivery of RNase A for cancer therapy [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 340: 32–41.
- [6] Prats-Ejarque G, Lu L, Salazar V A, et al. Evolutionary trends in RNA base selectivity within the RNase A superfamily [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1170.
- [7] Rosenberg H F. RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2008, 83(5): 1079–1087.
- [8] Garel J R. Early steps in the refolding reaction of reduced ribonuclease A [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1978, 118(3): 331.
- [9] 王健, 叶波平. 超滤技术在蛋白质分离纯化中的应用 [J]. *药学进展*, 2012, 36(3): 116–122.
- [10] Wang J, Ye B P. Application of ultrafiltration technique in protein separation and purification [J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2012, 36(3): 116–122.
- [11] Creighton T E. Intermediates in the refolding of reduced ribonuclease A [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1979, 129(3): 411–431.
- [12] Raman B, Ramakrishna T, Rao C M. Effect of the chaperone-like alpha-crystallin on the refolding of lysozyme and ribonuclease A [J]. *FEBS Letters*, 1997, 416(3): 369–372.
- [13] Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler H, et al. Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation [J]. *Bio/Technology*, 1991, 9(9): 825–829.
- [14] 冯崔香, 邓丽刚, 闫征, 等. 精氨酸对牛胰核糖核酸酶氧化复性的时相性抑制作用 [J]. *生命科学研究*, 2014, 18(1): 12–20.
- [15] Feng C X, Deng L G, Yan Z, et al. Phase-specific inhibition of arginine on the oxidative regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A [J]. *Life Science Research*, 2014, 18(1): 12–20.
- [16] Jungbauer A, Kaar W. Current status of technical protein refolding [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 128(3): 587–596.
- [17] 谭培生, 罗曼, 盛清, 等. 体外重折叠核糖核酸酶A及其荧光结构表征 [J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2006, (5): 483–488.
- [18] Tan P S, Luo M, Sheng Q, et al. Refolding of ribonuclease A *in vitro* and conformational characterization by spectrofluorimetry [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2006, (5): 483–488.
- [19] Ono T, Nagatomo M, Nagao T, et al. Nonaggregating refolding of ribonuclease A using reverse micellar dialysis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89(3): 290–295.
- [20] Han G J, Dong X Y, Sun Y. Purification effect of artificial chaperone in the refolding of recombinant ribonuclease A from inclusion bodies [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 77: 15–19.
- [21] 黄亚渝, 童卫, 郭立安, 等. 还原变性核糖核酸酶的高效液相色谱复性 [J]. *第四军医大学学报*, 2005, (15): 1423–1426.
- [22] Huang Y Y, Tong W, Guo L A, et al. Refolding of reduced/denatured ribonuclease by high performance liquid chromatography [J]. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 2005, (15): 1423–1426.