DOI:10. 13880/j. cnki. 65-1174/n. 2026. 22. 017 文章编号:1007-7383(2026)05-0568-10

重组人 Neuritin 蛋白复性优化及初步结构表征的探究

张少轩[1],朱井玲[1],李煜[1],宋丹丹[2],魏韬艺[1],黄瑾[1*]
(1 石河子大学医学院,新疆 石河子 832000;2 杭州师范大学医学部,浙江 杭州 310036)

摘要:目的 通过蛋白质的变性-复性策略及活性鉴定,探讨重组人 Neuritin 蛋白的天然结构。**方法** 1)重组蛋白的表达、结构及活性鉴定:按照毕赤酵母操作手册完成重组子的诱导表达,经疏水层析完成蛋白纯化;利用 Western blot 鉴定其免疫原性,还原电泳鉴定其纯度,非还原电泳和分子排阻色谱鉴定其结构;利用课题组已建立的 CCK8 法测定细胞存活率来评价 Neuritin 蛋白活性。2)蛋白变性:选择变性剂尿素和 β-巯基乙醇,分别探讨变性剂浓度、变性时间和蛋白浓度对重组 Neuritin 蛋白变性的影响,经结构鉴定和活性检测,确定变性条件。3)蛋白复性:首先使用 Injection buffer 减少蛋白分子间的非特异性聚集;然后应用复性工作液,让蛋白自发地按照热力学最低能态进行重折叠。根据蛋白结构稳定性和活性恢复,确定复性条件。**结果** 1)诱导表达的 Neuritin 蛋白经疏水层析纯化后,Western blot 确定其免疫学活性,还原电泳鉴定纯度为 95%以上,非还原电泳的初步结构鉴定发现,该重组蛋白以二聚体为主,单体占比约 31. 37%。2)分别观察尿素及 β-巯基乙醇的浓度、变性时间和蛋白浓度对重组 Neuritin 蛋白变性的影响,最终确定了 Neuritin 蛋白完全变性的条件为 10 $mol \cdot L^{-1}$ 尿素、10 $mmol \cdot L^{-1}$ β-巯基乙醇作用于 0. 4 $\mu g \cdot uL^{-1}$ 的重组 Neuritin 蛋白 2 h。经进一步的分子排阻色谱实验和活性鉴定证实,在此条件下,蛋白空间结构充分去折叠、且活性完全丧失。3)蛋白复性结果显示,蛋白复性 12~36 h,其结构趋于恒定,呈现稳定的“以单体为主,含有少量的二聚体”的结构形式;复性 24 h,蛋白活性达到高峰。以此确定的蛋白复性条件,比较复性蛋白与变性前初始蛋白,活性检测显示,复性后的重组 Neuritin 蛋白活性升高;分子排阻色谱实验的结构鉴定结果显示,复性后蛋白单体占比约 73. 60%,与电泳鉴定结果一致,表明经上述变性-复性策略获得的结构稳定、活性增高的重组 Neuritin 蛋白更接近该蛋白的天然结构。**结论** “以单体为主,含有少量的二聚体”的稳定结构,接近重组 Neuritin 蛋白的天然状态。

关键词: Neuritin;蛋白天然结构;蛋白变性;蛋白复性;生物学活性鉴定
中图分类号:R341 **文献标志码:**A

Exploration of renaturation optimization and preliminary structural characterization of recombinant human Neuritin protein

ZHANG Shaoxuan[1], ZHU Jingling[1], LI Yu[1], SONG Dandan[2], WEI Taoyi[1], HUANG Jin[1*]
(1 School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China;
2 School of Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036, China)

Abstract: Objective To investigate the native structure of recombinant Neuritin protein through a denaturation-renaturation strategy and activity assessment. **Methods** 1) Expression, structural characterization, and activity evaluation of the recombinant protein: The recombinant strain was induced for expression according to the Pichia pastoris protocol, and the protein was purified using hydrophobic chromatography. Immunogenicity was confirmed by Western blot, purity was assessed by reducing SDS-PAGE, and protein structure was analyzed by non-reducing SDS-PAGE and size-exclusion chromatography. Protein activity was evaluated using the CCK8 assay established in our laboratory to measure cell viability. 2) Protein denaturation: Urea and β-mercaptoethanol were selected as denaturants, and the effects of denaturant concentration, denaturation time, and protein concentration on the denaturation of recombinant Neuritin protein were systematically investigated. Denaturation conditions were optimized based on structural analysis and activity testing.

收稿日期:2026-01-26
基金项目:国家重大新药创制项目(2019ZX09301161);国家自然科学基金项目(32060164);新疆生产建设兵团指导性科技计划项目(2025ZD007)
作者简介:张少轩(1999—),男,硕士研究生,专业方向为蛋白质功能与疾病。
*通信作者:黄瑾(1963—),女,教授,从事蛋白质功能与疾病方面的研究,e-mail:huangjin623@ 163. com。

3) Protein renaturation: First, an injection buffer was used to minimize non-specific aggregation between protein molecules; then, a renaturation buffer was applied to allow the protein to spontaneously refold according to the thermodynamically lowest energy state. Renaturation conditions were determined based on structural stability and recovery of biological activity. **Results** 1) After purification via hydrophobic interaction chromatography, the induced Neuritin protein showed immunological reactivity confirmed by Western blot, with a purity exceeding 95% as determined by reducing SDS-PAGE. Initial structural analysis by non-reducing SDS-PAGE revealed that the recombinant protein was predominantly in dimeric form, with monomers accounting for approximately 31.37%. 2) The effects of Urea and β-mercaptoethanol concentrations, denaturation time, and protein concentration on denaturation were examined. The optimal condition for complete denaturation was determined to be 10 mol·L^{-1} Urea and 10 mmol·L^{-1} β-mercaptoethanol acting on 0.4 μg·μL^{-1} recombinant Neuritin protein for 2 hours. Further size-exclusion chromatography and activity assays confirmed that under these conditions, the protein's spatial structure was fully unfolded and its biological activity was completely lost. 3) Renaturation experiments showed that after 12-36 hours, the protein structure stabilized, predominantly existing as monomers with a small proportion of dimers. Maximum activity was achieved at 24 hours of renaturation. Comparing the renatured protein with the original pre-denatured protein, activity assays indicated enhanced activity in the renatured form. Structural analysis by size-exclusion chromatography revealed that the renatured protein consisted of approximately 73.60% monomers, consistent with electrophoretic results. This indicates that the recombinant Neuritin protein obtained through this denaturation-renaturation strategy exhibits improved structural stability and higher activity, more closely resembling its native conformation. **Conclusion** A stable structure dominated by monomers with a minor fraction of dimers closely resembles the native state of recombinant Neuritin protein.

Key words: Neuritin; native protein structure; protein denaturation; protein renaturation; biological activity characterization

Neuritin 是一种在神经发育和可塑性中发挥重要作用的神经营养因子[1],在中枢神经系统发育阶段,Neuritin 能维持神经元的存活、促进神经突起的生长和突触成熟[2-3];神经系统发育成熟后,Neuritin 在可塑性相关的脑区高表达,与学习记忆密切相关[4];在神经损伤中,Neuritin 蛋白能够促进神经纤维的再生、神经结构的重塑及神经功能恢复[5]。

本课题组长期从事重组 Neuritin 的制备及功能研究,利用毕赤酵母表达系统获得了高表达的重组 Neuritin 蛋白[6]。结果鉴定发现该蛋白以二聚体为主,存在少量单体、多聚体等多种形式。毕赤酵母作为常用外源分泌蛋白的表达宿主,虽具有翻译后修饰等优点[7],可通过"内质网-高尔基体"途径实现新生肽链的折叠、修饰及转运等[8],但在强启动子 AOX1 的驱动下,高效大量表达外源蛋白时,常常会因为分子伴侣和折叠酶相对不足,出现蛋白合成速率远超其正确折叠能力,导致暴露的疏水核心发生错误聚集,形成难以解离的多聚体和聚集体[9-11]。因此,上述重组 Neuritin 的结构是否代表其天然结构,需进一步明确。

Neuritin 为分子量约 10 kDa 的单链小蛋白,理论上,此类小分子量蛋白在完全变性的条件下,可依照其一级结构自发折叠形成天然空间结构。已有研究表明,在高浓度变性剂和强还原剂条件下,13.7 kDa 蛋白可完全解链,为去折叠的肽链单体;然后经缓慢复性引导其自发重折叠,最终获得接近天然结构并具有生物学功能的蛋白[12]。据此,本研究参照上述原理,采用变性-复性策略,结合结构鉴定和蛋白活性分析,探讨重组 Neuritin 蛋白的天然折叠形式,为重组 Neuritin 蛋白生物药研发中的有效结构分析、结构优化以及质量控制与评价奠定重要基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞及实验试剂耗材

小鼠海马神经元 HT22 购于复祥生物,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(以色列 Biological Industries 公司);含双抗 DMEM 培养基(凯基公司);TEMED、脱脂奶粉、胰酶细胞消化液、BCA 试剂盒(上海碧云天公司);酵母粉、胰蛋白胨(OXOID 公司);180 kDa Prestained Protein Marker(诺唯赞公司);YNB(US Biological Life Sciences 公司);20×PBS 缓冲液、盐酸胍、过硫酸铵、SDS(上海生工生物公司);PVDF 转印膜 0.2 μm、3 mol·L^{-1}醋酸钠(biosharp 公司);Tris、甲醇、NaOH、$(NH_4)_2SO_4$(国药集团);Neuritin 抗体(Abcam 公司 ab64186);山羊抗兔二抗 IgG-HRP 抗体(中杉金桥 ZB-2301);曝光液(伯乐公司);5%~20% SDS-PAGE 预制胶(ACE 生物公司);尿素(Biotopped 公司);EDTA(Diamond 公司);PMSF、GSSG、GSH、L-Arg (BBI 公司);β-巯基乙醇(Amresco 公司);考马斯亮蓝 R250(酷来搏公司);异丙醇、Tricine(麦克林公司);G 418 抗生素(酷来搏公司 CG5471); 0.22 μm 滤器(洁特公司 FPE204030);吐温-20、柠檬酸(沪试);(49.5%T,3%

C)制胶液(索莱宝公司);磷酸、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(天津鑫铂特公司);蛋白上样缓冲液非还原型、蛋白上样缓冲液还原型(雅酶公司);细胞计数试剂盒-8(CCK-8)(GLPBIO公司);十二水合磷酸氢二钠(沪试)10020318);0.22 μm水系滤膜(默克公司)。

1.1.2 实验仪器

CO_2培养箱(Thermo公司);高压蒸汽灭菌器(日本SANYO Labo Autoclave公司);低速离心机(江东仪器);4 ℃冰箱(海尔集团);液氮罐(Thermo公司);移液器(德国Eppendorf公司);XK26/20层析柱、AKTA™ start纯化系统(Cytiva公司);恒温摇床(上海智城公司);分光吸收读板机(Molecular Devices公司);电泳槽、半干转机、曝光机(伯乐公司);3 kD超滤管(Millipore公司);高倍显微镜(尼康公司);多功能酶标仪(Tecan Spark);X Bridge BEH SEC柱(125 Å,3.5 μm,7.8 mm×300 mm,美国Waters公司);生物安全柜、-80 ℃超低温冰箱、UltiMate 3000 HPLC(Thermo Fisher Scientific公司);Milli-Q超纯水仪(杭州景元科技有限公司);pH213-pH计(Hanna公司);1 000 mL抽滤套装(蜀牛);LH-85隔膜真空泵(临海永昊公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

完全培养基配制:45 mL DMEM培养基(含双抗),加入5 mL胎牛血清(FBS),于50 mL无菌离心管中混匀。培养方法:100 mm培养皿中加入8~10 mL完全培养基置于37 ℃,5% CO_2的培养箱中培养2 d至密度达到80%~90%左右,按胰酶的使用说明书要求,以1/4的传代比例在细胞传代后继续培养至对数生长期。

1.2.2 重组人Neuritin蛋白的制备

课题组前期建立毕赤酵母表达系统,制备重组人Neuritin蛋白[6]。将冻存的重组人Neuritin酵母重组子按1:50的比例接种到含1.0 mg·mL^{-1} G418的6 mL液体培养基中,在30 ℃、220 r·min^{-1}下,进行摇菌培养24~48 h直至菌液变得浑浊,保留2 mL无菌BMGY培养基,随后取5 mL的菌液加入到500 mL的BMGY培养基中,在30 ℃,220 r·min^{-1}下摇动培养菌液24~48 h,对比无菌BMGY培养基,直到测定BMGY培养基中菌液的OD 600值在2~6的范围内,收集BMGY菌液,4 500 r·min^{-1},常温离心10~15 min,弃上清并保留沉淀,将菌沉淀加入500 mL的BMMY培养基中重悬菌体,30 ℃、220 r·min^{-1}下培养72 h。甲醇每隔24 h补1次,每次补5 mL。在第72 h收集菌液,4 ℃条件下14 000 r·min^{-1}离心15~30 min,收集上清冰浴暂存,0.8 μm滤膜过滤,并进行100 kDa的膜包超滤,收集流出液于冰上;向超滤流出液中加入硫酸铵至0.25 mol·L^{-1},完全溶解,4 ℃提前静置2~3 h左右;利用预装在4 ℃的层析柜中的Phenyl sepharose 6 FF(HS)疏水层析柱和AKTA start系统纯化,平衡UV值为0后进行上样,再使用0.1 mol·L^{-1}柠檬酸与0.2 mol·L^{-1}的磷酸钠配成的缓冲溶液洗过5个柱体积,最后纯水洗脱,待UV值从100开始收集洗脱峰,收集液进行3 kDa超滤管超滤,以进行后续蛋白浓度测定,还原电泳,非还原电泳及Western Blot定性鉴定。

1.2.3 Western Blot分析

重组Neuritin纯化蛋白使用5%~20% SDS-PAGE梯度浓度的预制胶进行还原电泳,160 V 45 min。之后利用半干转膜方法进行转膜,23 V,25 min条件下转移至0.22 μm PVDF膜上;5%脱脂奶粉室温封闭2 h,使用Neuritin抗体(1∶1 000)在层析柜中4 ℃孵育过夜;待1×TBST洗膜4次每次10 min后,山羊抗兔二抗IgG-HRP抗体(1∶2 500)室温孵育2 h,再次1×TBST洗膜4次,每次10 min,利用Tanon 5200曝光机进行曝光。

1.2.4 电泳鉴定及考马斯亮蓝染色

还原电泳鉴定使用还原Loading Buffer上样,非还原电泳鉴定使用非还原Loading Buffer上样;5%~20% SDS-PAGE预制胶,电泳160 V,45 min。切胶后将凝胶置于纯水中,摇床60 r·min^{-1},5 min,弃纯水,加入考马斯亮蓝R 250,摇床60 r·min^{-1},30~60 min,回收染料,加入脱色液,脱色至目的条带清晰可见。

1.2.5 蛋白生物学活性的检测

参照文献的蛋白活性测定方法[13],用于实验的HT22细胞为统一代数冻存批次,且在复苏后经稳定传代2代后,以状态良好的第3代用于细胞实验,以保证细胞状态的一致性和实验结果的可靠性。HT22细胞无血清饥饿培养24 h后,加入0.4% FBS的DMEM维持培养基,等体积加入100 μL分别含终浓度为0、7、15、31、62、125、250、500、1 000、2 000、4 000 ng·mL^{-1}的Neuritin蛋白,48 h换液1次,72 h后按CCK8试剂盒说明书检测细胞存活率,细胞存活率(%)=(实验组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值)×100%。

1.2.6 重组Neuritin蛋白的变性

将变性剂加入初始蛋白液中,每管总体积定容

至 100 μL,充分震荡溶解混匀,放入 4 ℃冰箱 40 r·min^{-1}旋转 3 h[14]。取出后 4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心 5~10 min,取上清鉴定。不同尿素浓度的确定:在不同 EP 管中的 0.2 μg·μL^{-1}初始蛋白液[15],分别加入尿素至终浓度为:2、4、6、8、10 mol·L^{-1},并参照文献加入 10 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇[16],按照上述方法,取上清鉴定。不同 β-巯基乙醇浓度的确定:在不同 EP 管中,于 0.2 μg·μL^{-1}初始蛋白液中分别加入 β-巯基乙醇至终浓度分别为:0、2.5、5.0、7.5、10 mmol·L^{-1},按照前述已确认的方法,取上清鉴定。不同蛋白浓度的确定:在不同 EP 管中,加入蛋白至终浓度分别为:0.2、0.4、0.6、0.8 μg·μL^{-1},其余按照前述已确认的方法,取上清鉴定。不同反应时间的确定:按照前述已确定的条件,分别设置不同变性时间:0.25、0.5、1、2、4 h;按照前述已确认的方法,取上清鉴定。

1.2.7　重组 Neuritin 蛋白的复性

Injection buffer 含终浓度:3 mmol·L^{-1}盐酸胍、10 mmol·L^{-1}醋酸钠、10 mmol·L^{-1} EDTA,Hcl 调 pH 至 4.2。复性工作液含终浓度:100 mmol·L^{-1} Tris Hcl、0.4 mol·L^{-1}的精氨酸、2 mmol·L^{-1} EDTA、0.2 mmol·L^{-1} PMSF、0.5 mmol·L^{-1}氧化型谷胱甘肽(GSSG)、5.0 mmol·L^{-1}还原型谷胱甘肽(GSH),浓 Hcl 调 pH 至 8.0,4 ℃,磁力搅拌 200 r·min^{-1},至少 30 min 预冷,(还原型谷胱甘肽水溶液易被氧化、PMSF 水溶液不稳定,两者现配现用)。复性方法参照文献[17],变性蛋白液与 1.5 倍体积的 Injection buffer 混合,以 0.3~0.5 mL·min^{-1}的速度(约 3 s·滴$^{-1}$)逐滴缓慢滴加入 15 倍体积的复性工作液中,4 ℃层析柜搅拌,封口隔绝空气,将孵育液移入 50 mL 离心管中,4 ℃,12 000 r·min^{-1}离心 30 min,收集上清液于新的 50 mL 离心管中,即为复性蛋白混合液,4 ℃保存。不同复性时间:按上述复性方法,分别孵育变性蛋白 12、24、36 h,取上清鉴定[18]。

1.2.8　超滤浓缩

3 kDa 的超滤管使用 1×PBS 进行润洗,加入 10 mL 1×PBS 溶液,4 ℃,4 000 g 离心 8~10 min,加入纯化后的蛋白原液 10 mL,4 ℃,4 000 g,离心 8~10 min,离心结束后,震荡混匀内管浓缩液,浓缩至蛋白体积约为 250 μL。获得蛋白浓缩液进行 BCA 测浓度。超滤管使用 0.1 mol·L^{-1} NaOH 溶液中室温过夜,第二天使用 ddH_2O 轻轻冲洗内管,最后在内管和外管中注满 ddH_2O,4 ℃冰箱储存。

1.2.9　分子排阻色谱分析

分子排阻色谱(size-exclusion chromatography, SEC)用于分析重组 Neuritin 蛋白在不同状态下的分子大小分布。利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)进行分析,使用色谱柱 X Bridge BEH SEC 柱(125 Å,3.5 μm,7.8 mm×300 mm,美国 Waters 公司)。使用前经 HPLC 系统排气并洗针后,先使用 10%的甲醇水溶液过柱 14 个柱体积,再使用纯水过柱 14 个柱体积,最后使用流动相平衡 14 个柱体积,至 UV 280 nm 处的检测波长稳定。流动相为 100 mmol·L^{-1}磷酸钠缓冲液,pH 7.0;使用前经 0.22 μm 滤膜抽滤并超声脱气。流速设置为 0.8 mL·min^{-1},柱温及样品盘温度均控制在 5 ℃,上样体积为 10 μL,蛋白样品浓度约为 0.4 μg·μL^{-1}。首先进行流动相的空白检测,确认无杂峰后,再进行蛋白样品及空白的检测,待检测完毕后使用纯水溶液过柱 14 个柱体积,再使用 10%的甲醇过注 14 个柱体积,关机保柱。

1.2.10　统计学方法分析

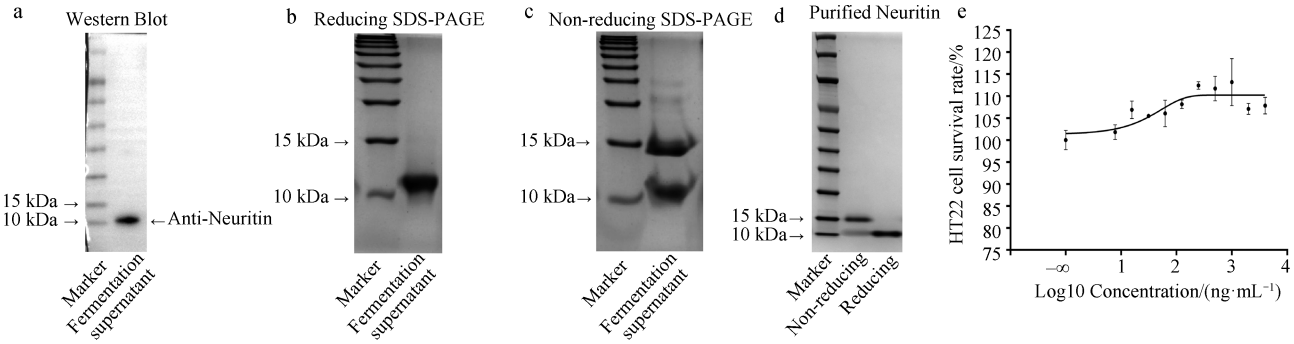
对于每个实验条件,至少进行 3 次独立实验。使用 GraphPad Prism 9 软件对数据进行分析,并以均值±标准差($\bar{X}\pm S$)表示。在进行统计测试之前,会确认数据的正态性和方差的齐性。两组之间的比较使用 Student's t 检验(T-test);一个自变量且有 3 组或更多组之间的差异比较使用单因素方差分析(ANOVA);两个自变量且每个因素有多个水平之间的差异比较使用双因素方差分析(Two-way ANOVA),统计学显著性的阈值设定为 $P<0.05$,采用以下符号标记显著性水平:ns 表示无统计学显著性($P>0.05$);* 表示 $P<0.05$;** 表示 $P<0.01$;*** 表示 $P<0.001$;**** 表示 $P<0.0001$。

2　结果与分析

2.1　重组 Neuritin 蛋白的诱导表达及结构分析

pPIC9K-Neuritin 酵母重组子诱导表达后的上清,经 Western blot 鉴定于 10 kDa 处出现 Neuritin 蛋白特异条带(图 1a)。此上清的 SDS-PAGE 鉴定结果显示:还原电泳仅 10 kDa 处出现明显条带,与 Western blot 鉴定结果一致(图 1b),与 Neuritin 单体的分子量一致;非还原电泳则在 10 kDa 处和 15 kDa 处出现 2 个条带(图 1c)。表达上清经纯化后,电泳鉴定结果显示:纯化蛋白的还原电泳仅于 10 kDa 处出现条带,纯度可达 95%及以上;而非还原电泳分

别于 10 kDa 处和 15 kDa 出现 2 个条带(图 1d),与发酵液的鉴定结果一致,说明纯化过程对蛋白的结构形式没有影响。由于重组 Neuritin 蛋白还原后均为 10 kDa,从分子量推算,15 kDa 处可能是其二聚体;重组 Neuritin 纯化蛋白经活性鉴定,具有生物学功能(图 1e)。



a:Neuritin 酵母重组子诱导表达上清液的 Western Blot 鉴定;b:Neuritin 酵母重组子诱导表达上清的还原电泳鉴定;c:Neuritin 酵母重组子诱导表达上清的非还原电泳鉴定;d:重组 Neuritin 纯化蛋白的非还原电泳及还原电泳鉴定;e:重组 Neuritin 纯化蛋白的活性鉴定。

图 1 重组 Neuritin 蛋白的制备及鉴定

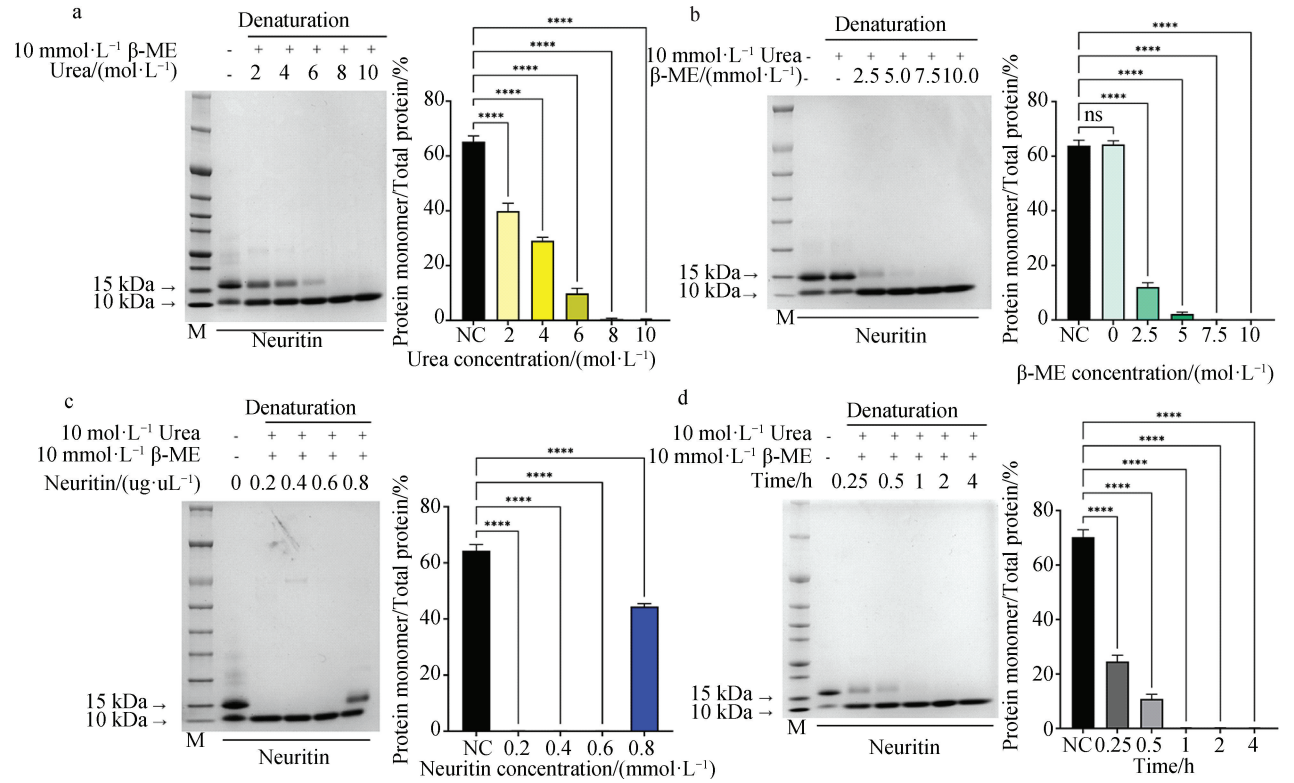
Figure 1 Preparation and characterization of recombinant Neuritin protein

2.2 重组 Neuritin 蛋白变性条件的确立

实验中重组 Neuritin 蛋白完全变性的判断标准为:在非还原电泳条件下,该蛋白呈现单一单体形式;同时失去生物活性。

2.2.1 变性剂浓度的确定

尿素浓度的确定:重组 Neuritin 蛋白经不同浓度的尿素和 10 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇作用 3 h,观察重组 Neuritin 蛋白结构的变化,非还原电泳鉴定结果显示(图 2)。



a: 不同尿素浓度对重组 Neuritin 蛋白变性的影响及量化结果,数据以均值±标准差表示,组间比较采用 ANOVA 检验; **** 表示 $P<0.000\ 1$;

b:不同 β-巯基乙醇浓度对重组 Neuritin 蛋白变性的影响及量化结果,数据以均值±标准差表示,组间比较采用 ANOVA 检验; **** 表示 $P<0.000\ 1$;

c:不同浓度重组 Neuritin 蛋白的变性鉴定及量化结果,数据以均值±标准差表示,组间比较采用 ANOVA 检验; **** 表示 $P<0.000\ 1$;

d:不同变性时间对重组 Neuritin 蛋白变性的影响及量化结果,数据以均值±标准差表示,组间比较采用 ANOVA 检验; **** 表示 $P<0.000\ 1$。

图 2 不同变性条件下重组 Neuritin 蛋白的结构鉴定(非还原 SDS-PAGE)

Figure 2 Structural identification of recombinant Neuritin protein under different denaturation conditions (non-reducing SDS-PAGE)

2～6 mol·L^{-1}尿素浓度组在 10 kDa 与 15 kDa 处，依然有 2 条蛋白条带；而 8～10 mol·L^{-1}的尿素浓度组只在 10 kDa 处出现一条蛋白条带（图 2a），说明 8 mol·L^{-1}以上的尿素浓度可使重组 Neuritin 蛋白完全变性，而 8 mol·L^{-1}以下的尿素浓度，蛋白不能完全变性。鉴于 8 mol·L^{-1}可能处于反应临界值，最终选择 10 mol·L^{-1}尿素作为本实验中重组 Neuritin 蛋白的变性条件。

β-巯基乙醇浓度的确定：重组 Neuritin 蛋白经不同浓度的 β-巯基乙醇和 10 mol·L^{-1}尿素作用 3 h，观察重组 Neuritin 蛋白结构的变化（图 2b），非还原电泳鉴定结果显示：0～5.0 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇浓度组在 10 kDa 与 15 kDa 处，依然有 2 条蛋白条带，而 7.5～10.0 mmol·L^{-1}的 β-巯基乙醇浓度组只在 10 kDa 处出现蛋白条带，说明 7.5 mmol·L^{-1}以上的 β-巯基乙醇浓度可使重组 Neuritin 蛋白完全变性。鉴于 7.5 mmol·L^{-1}可能处于反应临界值，最终选择 10.0 mmol·L^{-1}的 β-巯基乙醇浓度作为本实验中重组 Neuritin 蛋白的还原条件。

2.2.2　重组 Neuritin 蛋白的变性浓度确定

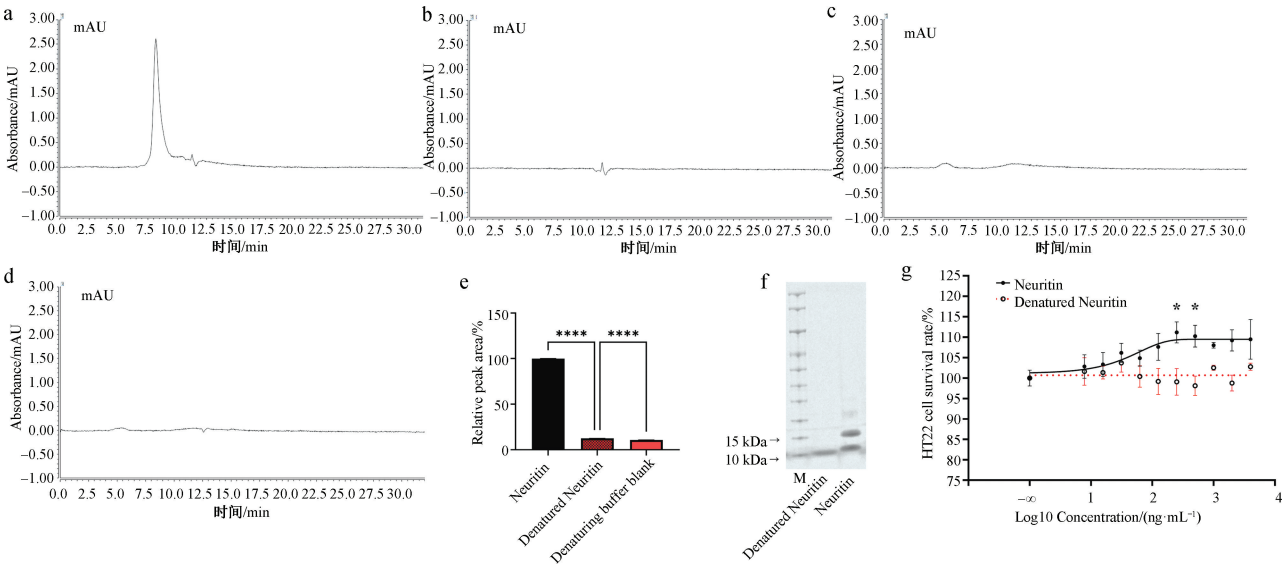
以上述确定的变性剂的条件作用于不同浓度的重组 Neuritin 纯化蛋白 3 h，非还原电泳鉴定结果显示：蛋白浓度为 0.2～0.6 μg·μL^{-1}时，仅 10 kDa 处出现蛋白条带，而蛋白浓度在 0.8 μg·μL^{-1}时，10 kDa 与 15 kDa 均出现了蛋白条带，可以说明重组 Neuritin 蛋白终浓度在 0.2～0.6 μg·μL^{-1}时，可完全变性还原，而蛋白终浓度升高到 0.8 μg·μL^{-1}时，蛋白不能完全变性还原，最终选择变性反应的重组 Neuritin 蛋白浓度为 0.4 μg·μL^{-1}（图 2c）。

2.2.3　变性时间的确定

0.4 μg·μL^{-1}的重组 Neuritin 蛋白在已确定的变性条件下，观察不同变性时间对其变性的影响，非还原电泳鉴定结果显示：随着变性时间延长，15 kDa 处蛋白条带逐渐变浅，甚至消失，变性 2～4 h，仅 10 kDa 处出现蛋白条带（图 2d），说明重组 Neuritin 蛋白二聚体消失，2～4 h 的变性时间均可作为重组 Neuritin 蛋白完全变性的条件，为避免变性时间过长对蛋白一级结构的影响，故选择 2 h 作为本实验中重组 Neuritin 蛋白变性的最佳时间。

2.2.4　变性蛋白的 SEC-HPLC 及活性鉴定

进一步的分子排阻色谱（SEC-HPLC）实验结果显示：变性前初始重组 Neuritin 蛋白排除溶剂 1×PBS（图 3b）影响，出现两个主峰（图 3a），根据分子量推算，前面的为二聚体，后面的为单体；而溶于变性工作液的变性后重组 Neuritin 蛋白，则未见明显洗脱峰出现（图 3c、图 3e），且排除了变性工作液的影响（图 3d），说明其空间结构已被彻底破坏。



a：变性前初始重组 Neuritin 蛋白及溶剂 1×PBS 的分子排阻色谱结果；b：1×PBS 空白对照的分子排阻色谱结果；c：变性重组 Neuritin 蛋白及溶剂变性工作液的分子排阻色谱结果；d：变性工作液空白对照的分子排阻色谱结果；e：变性前初始蛋白与变性蛋白、变性工作液的相对峰面积分析（变性前初始蛋白总峰面积 100%归一化），数据以均值±标准差表示，组间比较采用 ANOVA 检验；**** 表示 $P<0.000\ 1$。f：重组 Neuritin 蛋白变性前后的结构鉴定（非还原电泳）；g：重组 Neuritin 蛋白变性前后 HT22 细胞存活率检测的拟合曲线，数据以均值±标准差表示，组间比较采用 Two-way ANOVA 检验；* 表示 $P<0.05$。

图 3　变性前后重组 Neuritin 蛋白的鉴定比较

Figure 3　Identification and comparative analysis of recombinant Neuritin proteins before and after denaturation

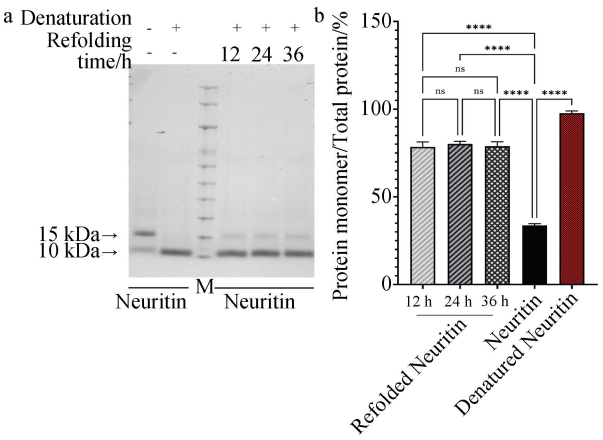
利用疏水层析除去高浓度的变性剂,CCK8 检测变性重组 Neuritin 蛋白对 HT22 细胞存活的影响。结果发现:与未变性重组 Neuritin 蛋白相比,变性重组 Neuritin 蛋白各浓度的细胞存活率均低于未变性蛋白,特别在 Neuritin 蛋白有效浓度范围 250~500 ng·mL^{-1}具有显著下调($P<0.05$,图 3f、3g);说明变性重组 Neuritin 蛋白基本丧失生物学功能。

结构鉴定结合活性鉴定,最终确定的重组 Neuritin 蛋白完全变性的条件为 10 mol·L^{-1}尿素、10 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇,作用于 0.4 μg·μL^{-1}重组 Neuritin 蛋白 2 h。

2.3 重组 Neuritin 蛋白复性条件的确立

2.3.1 变性后的重组 Neuritin 蛋白复性条件的确立

参照文献的复性方法,观察不同的复性时间其结构变化。非还原电泳结果显示:随复性时间延长,复性 12~36 h 的蛋白,分别在 10 kDa、15 kDa 处出现蛋白条带(图 4a),且单体/总蛋白灰度值比值趋于恒定,约在 70%~80%(图 4b)。



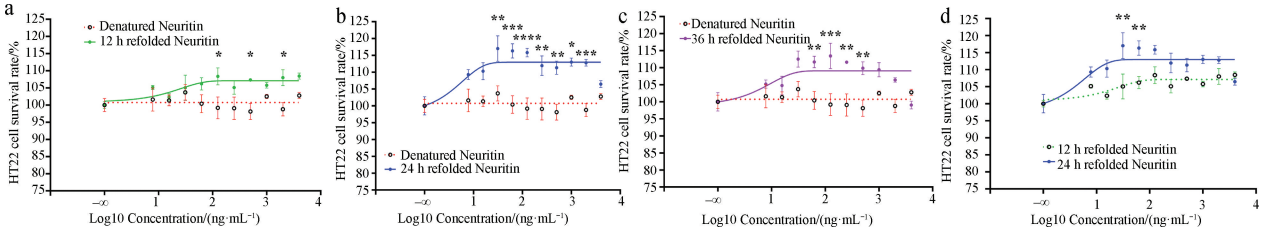
a:不同复性时间的复性重组 Neuritin 蛋白非还原 SDS-PAGE 鉴定结果;b:不同复性时间的复性重组 Neuritin 蛋白单体/总蛋白占比量化结果;数据以均值±标准差表示,组间比较采用 ANOVA 检验;ns, $P>0.05$; **** 表示 $P<0.0001$。

图 4 复性后重组 Neuritin 蛋白的结构鉴定

Figure 4 Structural identification of the refolded recombinant Neuritin protein

2.3.2 重组 Neuritin 复性蛋白的活性鉴定及最佳复性时间的确定

复性蛋白纯化后,进行活性鉴定,观察不同复性时间 Neuritin 蛋白的活性变化。结果显示:复性 12~36 h 的重组 Neuritin 蛋白在有效浓度内的生物学活性均高于变性重组 Neuritin 蛋白的生物学活性(图 5a—5c),差异具有统计学意义。随着复性时间延长,复性蛋白活性提高,24 h 时达最高,与复性 12 h 相比具有显著提升($P<0.01$,图 5d),而复性 36 h 蛋白的生物学活性略有下降,故选择 24 h 为变性重组 Neuritin 蛋白最佳的复性时间。



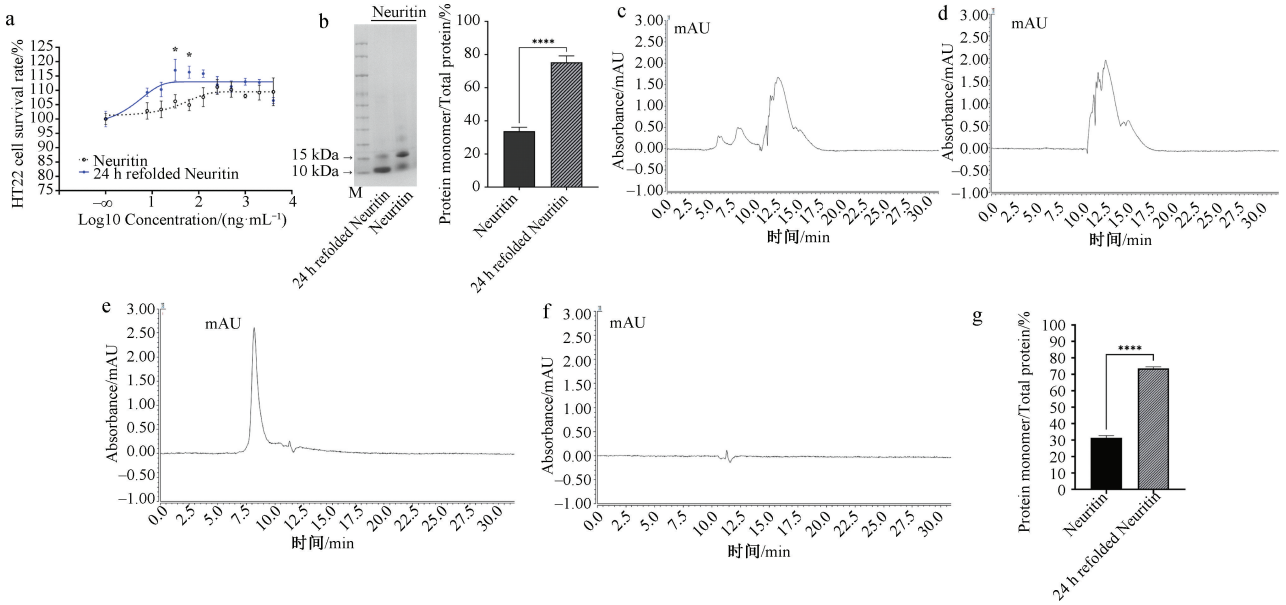
a~c:复性 12~36 h 的重组 Neuritin 蛋白 HT22 细胞存活率检测的拟合曲线及在相同浓度下与变性蛋白的活性比较;数据以均值±标准差表示,组间比较采用 Two-way ANOVA 检验;ns, $P>0.05$; * 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$; *** 表示 $P<0.001$; **** 表示 $P<0.0001$;d:复性 12 h、24 h 的重组 Neuritin 蛋白 HT22 细胞存活率检测的拟合曲线及在相同浓度下两者之间的活性比较;数据以均值±标准差表示,组间比较采用 Two-way ANOVA 检验;ns, $P>0.05$; ** 表示 $P<0.01$。

图 5 复性后重组 Neuritin 蛋白的活性鉴定

Figure 5 Identification of the activity of refolded recombinant Neuritin protein after refolding

2.3.3 复性重组 Neuritin 蛋白与变性前初始重组 Neuritin 蛋白的活性及结构比较

与变性前初始重组 Neuritin 蛋白相比,复性 24 h 的重组 Neuritin 蛋白的生物学活性有所提高,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 6a);结构鉴定结果(非还原电泳)显示:变性前初始重组 Neuritin 蛋白以二聚体为主,单体仅占总蛋白的 30%~40%左右,而复性 24 h 的蛋白以单体为主,单体占总蛋白的 70%~80%(图 6b)。进一步的分子排阻色谱(SEC-HPLC)实验结果显示:变性前初始重组 Neuritin 蛋白排除溶剂 PBS(图 6f)影响,出现两个主峰(图 6e),根据分子量推算,前面的为二聚体,后面的为单体,分别对其峰面积进行量化计算,单体占比约 31.37%(图 6g)。与复性工作液峰空白对照(图 6d)相比,复性 24 h 重组 Neuritin 蛋白在其之前也出现两个主峰(图 6c),峰面积量化结果单体占比约 73.60%(图 6g),受复性工作液中精氨酸等影响[19],两个主峰的位置略有前移。



a：变性前初始蛋白与复性 24 h 重组 Neuritin 蛋白的活性比较（HT22 细胞存活率），数据以均值±标准差表示，组间比较采用 Two-way ANOVA 检验；* 表示 $P<0.05$；b：变性前初始蛋白与复性 24 h 重组 Neuritin 蛋白结构比较（非还原鉴定和单体/总蛋白占比分析），数据以均值±标准差表示，组间比较采用 T 检验；**** 表示 $P<0.0001$；c：复性 24 h 重组 Neuritin 蛋白及其溶剂复性工作液的分子排阻色谱结果；d：复性工作液空白对照的分子排阻色谱结果；e：变性前重组 Neuritin 蛋白及溶剂 1×PBS 的分子排阻色谱结果；f：1×PBS 空白对照的分子排阻色谱结果；g：变性前初始蛋白与复性 24 h 重组 Neuritin 蛋白的单体/总蛋白占比分析（SEC-HPLC 单体峰面积/总峰面积），数据以均值±标准差表示，组间比较采用 T 检验；**** 表示 $P<0.0001$。

图 6　复性后的重组 Neuritin 蛋白与变性前初始重组 Neuritin 蛋白的比较

Figure 6　Comparison of recombinant Neuritin protein after renaturation with the initial recombinant Neuritin protein before denaturation

3　讨论

重组 Neuritin 蛋白存在单体、二聚体以及少量多聚体的结构形式，这些结构形式是否代表其天然结构，尚需进一步明确。由于 Neuritin 蛋白为单链小分子蛋白，而小分子蛋白的天然结构形成主要依赖于其一级结构，理论上在其多肽链充分舒展后，可自然折叠形成天然结构[20-21]。因此，本文首先摸索并确定重组 Neuritin 蛋白的完全变性条件，使 Neuritin 蛋白一级结构充分展开。然后在适宜的复性条件下，观察其自然折叠后的结构形式，并通过生物活性鉴定，进一步佐证其复性后的结构是否接近天然状态，为重组 Neuritin 蛋白的有效结构分析提供重要支撑。

复性条件的确定是本研究的核心环节。体外复性的基本逻辑在于避开毕赤酵母自身折叠系统在高表达压力、底物超载以及非宿主蛋白结构适配性不足等多重因素下所导致的聚集“陷阱”，人为创造一条热力学最优的折叠路径。具体而言，先将蛋白从混乱的聚集状态中暂时解离，借助理想的化学环境重新引导其恢复正确构象：首先，利用高浓度变性剂（如尿素、盐酸胍）将已形成的多聚体或错折叠体完全解聚为一级结构的单链，从而彻底重置错误构象，消除一切错误折叠信息；随后逐步去除变性剂，通过精确调控缓冲液 pH、氧化还原对（如 GSH/GSSG 比例）、温度及添加剂（如精氨酸以抑制聚集），在极低蛋白浓度下为蛋白提供充足的时间和空间，使其自发地按照热力学最低能态——天然结构——进行重折叠[22-24]。整个策略围绕让正确构象成为唯一优势构象而设计，并回避了胞内分子拥挤和修饰环境的干扰。

同时，重组蛋白的活性鉴定对判断变性-复性过程是否朝着正确方向进行具有重要意义。Neuritin 属于神经营养因子家族。药典中关于神经营养因子的活性鉴定方法主要有两类：一类基于促进神经元突起生长的原理，如 NGF 的活性评价；另一类基于维持神经元存活的原理，如 BDNF 的活性评价。本课题组前期基于 Neuritin 促进神经突起生长的特性，采用鸡胚背根神经节和 PC12 细胞，以突起生长为指标评价其活性[25-26]。但该方法操作烦琐、重复性有限，难以满足生物药活性检测便捷化和标准化的实际需求。为此，我们改用 CCK8 法测定细胞存活率来评价 Neuritin 蛋白活性。结果显示，CCK8 法测得的细胞存活率与突起生长实验结果具有良好的一致性，表明 CCK8 法在该蛋白的活性评价中可有效替代形态学观察指标[13]，且更为简便、稳定，适用

于生物药的质量控制研究。

实验过程中,首先需要解决变性条件的确定问题,即如何使重组 Neuritin 蛋白完全变性、让多肽链充分展开? 尿素和盐酸胍是两种常用的蛋白变性剂,均可削弱维持蛋白质空间结构的氢键和疏水键,但二者理化性质存在差异。前期实验选择盐酸胍时,发现它会与电泳液中的 SDS 反应生成白色沉淀,干扰结构鉴定的电泳条带分析。而尿素作为强水合剂,能破坏蛋白质表面水化层,稳定蛋白质去折叠状态[27],且不会与电泳液中的 SDS 反应生成沉淀,故本研究选择尿素作为变性剂。同时,为确保蛋白质一级结构充分展开,需用还原剂 β-巯基乙醇打开其结构中的二硫键。我们分别以不同浓度的尿素和 β-巯基乙醇处理变性前的初始蛋白,最终确定的完全变性条件为 10 $mol\cdot L^{-1}$ 的尿素和 10 $mmol\cdot L^{-1}$ 的 β-巯基乙醇(图 2a、图 2b)。

此外,变性过程中需合理选择初始蛋白浓度,蛋白浓度过高会超过变性剂的变性能力,过低则降低实验效率。以已确定的变性剂浓度处理不同浓度的蛋白,结果显示,0.6 $\mu g\cdot \mu L^{-1}$ 浓度及以下的蛋白均可充分变性,我们最终确定的蛋白变性浓度为 0.4 $\mu g\cdot \mu L^{-1}$(图 2c)。在此基础上,进一步考察了变性时间的影响。在上述确定的条件下,2~4 h 均可使 Neuritin 蛋白完全变性。因尿素溶液存放过久易分解,可能影响变性蛋白的结构[28],反应时间不宜过长。因此,选择 2 h 作为本实验的变性时间(图 2d)。

由以上变性条件(10 $mol\cdot L^{-1}$ 尿素、10 $mmol\cdot L^{-1}$ β-巯基乙醇作用于 0.4 $\mu g\cdot \mu L^{-1}$ 的重组 Neuritin 蛋白 2 h),获得的变性后重组 Neuritin 蛋白,进一步的分子排阻色谱(SEC-HPLC)实验结果显示:无特征洗脱峰(图 3c),说明其空间结构已被彻底破坏,肽链呈充分展开状态。众所周知,蛋白质的功能由其空间结构决定,完全变性的蛋白理应丧失其功能(生物活性)。因此,我们对变性蛋白进行了活性验证。活性验证结果显示,与变性前相比,变性后的 Neuritin 蛋白活性显著下降(图 3f~图 3g),进一步证实,上述变性条件获得的 Neuritin 蛋白已变性失活。

复性过程中,蛋白质浓度的增加对错误聚集的形成具有指数效应,因此重折叠过程需在低蛋白浓度下进行[28]。根据文献的复性策略,我们首先使用 Injection buffer 稳定 pH 并缓冲变性蛋白浓度骤降的瞬时变化,以减少蛋白分子间的非特异性聚集[29]。然后应用复性工作液,使蛋白自发地按照热力学最低能态(天然结构状态)进行重折叠,防止其相互聚合,消除其他离子对蛋白复性的干扰作用,稳定重折叠的结构[30]。复性后的重组 Neuritin 结构鉴定的结果显示:与变性蛋白相比,复性 12 h 后,其结构已发生明显变化,随着复性时间延长,其结构趋于恒定,12~36 h 间,其单体/总蛋白灰度值的比值稳定在 70%~80%(图 4a、图 4b)。复性蛋白折叠的正确性可通过活性检测间接反映。进一步的生物活性实验表明:与变性蛋白相比,复性 12 h 后,重组 Neuritin 蛋白的活性显著升高(图 5a),复性 24 h,蛋白活性达到高峰,36 h 时略有下降(图 5a~图 5d),说明重组 Neuritin 蛋白复性 24 h 为最佳复性时间。

最后,我们比较了复性蛋白与变性前初始蛋白的结构和活性。结果显示,复性后的重组 Neuritin 蛋白生物学活性增高(图 6a)。在结构上,分子排阻色谱(SEC-HPLC)实验进一步证实,变性前初始重组 Neuritin 蛋白以二聚体为主,含少量单体(图 6e);复性 24 h 后的重组 Neuritin 蛋白以单体为主,含少量二聚体(图 6c)。与非还原电泳的初步鉴定结果一致。理论上,越接近天然结构的蛋白,其构象越稳定,生物活性也越高[31]。据此可以推论,结构稳定且生物学活性较高的蛋白,更接近于天然状态。复性后的重组 Neuritin 蛋白结构稳定且生物学活性增高,说明复性过程朝正确的折叠方向进行,提示重组 Neuritin 蛋白复性后形成的"以单体为主,含有较少的二聚体"的稳定结构,接近于重组 Neuritin 蛋白的天然状态。

综上所述,本文通过优化蛋白变性-复性实验条件,探究重组人 Neuritin 蛋白天然折叠状态下的结构特征,不仅能够为该蛋白高分辨率空间结构解析提供数据支撑,也为其后续结构改造、功能优化等相关研究奠定重要理论与实验基础。而 Neuritin 蛋白空间构象及动态构象变化的全面揭示,仍有待后续开展更为系统、深入的研究。

参考文献(References)

[1] Naeve G S, Ramakrishnan M, Kramer R, et al. Neuritin: A gene induced by neural activity and neurotrophins that promotes neuritogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(7): 2648-2653.

[2] Putz U, Harwell C, Nedivi E. Soluble CPG15 expressed during early development rescues cortical progenitors from apoptosis [J]. Nature Neuroscience, 2005,8(3):322-331.

[3] Nedivi E, Wu G Y, Cline H T. Promotion of dendritic growth by CPG15, an activity-induced signaling molecule [J]. Science, 1998, 281(5384):1863-1866.

[4] Cantallops I, Haas K, Cline H T. Postsynaptic CPG15 promotes synaptic maturation and presynaptic axon arbor

elaboration in vivo [J]. Nat Neurosci, 2000,3(10):1004-1011.
[5] Gao R, Li X Y, Xi S S, et al. Exogenous neuritin promotes nerve regeneration after acute spinal cord injury in rats[J]. Hum Gene Ther, 2016,27(7):544-554.
[6] Zhang Y H, Zhang S J, Xian L L, et al. Expression and purification of recombinant human neuritin from Pichia pastoris and a partial analysis of its neurobiological activity in vitro [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015,99(19):8035-8043.
[7] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expressionin Pichia pastoris: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(12): 5301-5317.
[8] Wang X J, Wang X M, Teng D, et al. Recombinant production of the antimicrobial peptide NZ17074 in Pichiapastoris using SUMO3 as a fusion partner [J]. Lett Appl Microbiol, 2014,59(1): 71-78.
[9] Garvey M. Non-mammalian eukaryotic expression systems yeast and fungi in the production of biologics [J]. J Fungi (Basel), 2022,8(11):1179.
[10] Wu D, Ma D, Hao Y Y, et al. Incomplete formation of intramolecular disulfide bond triggers degradation and aggregation of human consensus interferon-alpha mutant by Pichia pastoris [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010,85(6):1759-1767.
[11] Wu D, Chu J, Hao Y Y, et al. Incomplete protein disulphide bond conformation and decreased protein expression result from high cell growth during heterologous protein expression in Pichia pastoris[J]. J Biotechnol, 2012,157(1):107-112.
[12] Melkonian A V, Wralstad E C, Raines R T, et al. Anfinsen redux: Ribonuclease folding in the single-molecule regime [J]. J Am Chem Soc, 2025,147(43):39026-39030.
[13] 王宿洁,宋丹丹,李煜,等. 重组人 Neuritin 蛋白生物学活性的定量分析方法[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2022,40(5):611-619.
Wang Sujie, Song Dandan, Li Yu, et al. A quantitative analysis method for the biological activity of recombinant human Neuritin protein [J]. Journal of Shihezi University Natural Science, 2022,40(5):611-619.
[14] Medur Gurushankar M S, Dalvi S, Venkatraman P. Snapshots of urea-induced early structural changes and unfolding of an ankyrin repeat protein at atomic resolution [J]. Protein Sci, 2022,31(12):e4515.
[15] Naz H, Shahbaz M, Haque M A, et al. Urea-induced denaturation of human calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV: A combined spectroscopic and MD simulation studies [J]. J Biomol Struct Dyn, 2017, 35(3):463-475.
[16] Narahari A, Swamy M J. Tryptophan exposure and accessibility in the chitooligosaccharide-specific phloem exudate lectin from pumpkin (Cucurbita maxima). A fluorescence study [J]. Photochem Photobiol B, 2009, 97(1):40-47.
[17] Altman J D, Davis M M. MHC peptide tetramers to visualize antigen-specific T cells [J]. Curr Protoc Immunol, 2016,115(1):1731-1734.
[18] Wang J, Lu D N, Lin Y, et al. How CTAB assists the refolding of native and recombinant lysozyme [J]. Biochemical Engineering Journal, 2005,24(3):269-277.
[19] Das U, Hariprasad G, Ethayathulla A S, et al. Inhibition of protein aggregation: Supramolecular assemblies of arginine hold the key [J]. PLoS One, 2007,2(11):e1176.
[20] Anfinsen C B. Principles that govern the folding of protein chains [J]. Science, 1973,181(4096):223-230.
[21] Mecha M F, Hutchinson R B, Lee J H, et al. Protein folding in vitro and in the cell: From a solitary journey to a team effort [J]. Biophys Chem, 2022,287(8):106821.
[22] Arakawa T, Tsumoto K. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003,304(1):148-152.
[23] Gurbhele-tupkar M C, Perez L R, Silva Y, et al. Rate enhancement of the oxidative folding of lysozyme by the use of aromatic thiol containing redox buffers [J]. Bioorg Med Chem, 2008,16(5):2579-2590.
[24] Sankar K, Jia K J, Jernigan R L, et al. Knowledge-based entropies improve the identification of native protein structures [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(11): 2928-2933.
[25] 张树军,赵臣,黄凤兰,等. Neuritin 蛋白的纯化及其对 PC12 细胞和鸡胚 DRG 神经元生长的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2014,30(2): 217-221.
Zhang Shujun, Zhao Chen, Huang Fenglan, et al. Purification of Neuritin protein and its effect on the growth of PC12 cells and chick embryo DRG neurons [J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2014,30(2): 217-221.
[26] Zhang S, Huang Y H, Zhu J L, et al. Expression of hNeuritin protein in a baculovirus expression system and the analysis of its activity [J]. Gene, 2018,647(20):129-135.
[27] Sagle L B, Zhang Y J, Litosh V A, et al. Investigating the hydrogen-bonding model of urea denaturation [J]. J Am Chem Soc, 2009, 131(9), 9304-9310.
[28] Buscajoni L, Martinetz M C, Berkemeyer M, et al. Refolding in the modern biopharmaceutical industry [J]. Biotechnology Advances, 2022,61(9):108050.
[29] Ho J G S, Middelberg A P J, Ramage P, et al. The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient [J]. Protein Sci, 2003,12(4):708-716.
[30] Ohtake S, Kita Y, Arakawa T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011,63(13):1053-1073.
[31] Velasco L, Dublang L, Moro F, et al. The complex phosphorylation patterns that regulate the activity of hsp70 and its cochaperones [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17):4122.

(责任编辑:唐慧)