

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/49633685>

Spectroscopic Studies on Refolding Process in Vitro of Pan-Allergen Profilin in Coco Pollen

Article in *Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu* · September 2010

DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)09-2428-05 · Source: PubMed

CITATION

1

READS

24

6 authors, including:



Jie Xiao

20 PUBLICATIONS 50 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Jun Lu

Auckland University of Technology

92 PUBLICATIONS 989 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Hong Xu

Shenzhen University

36 PUBLICATIONS 1,074 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



lossless image encoding. [View project](#)



AMD screening [View project](#)

椰子花粉过敏原 profilin 蛋白体外重折叠过程的光谱学研究

罗海梅¹, 肖 杰¹, 邬玉兰², 刘志刚², Jun Lu³, 徐 宏^{1*}

1. 深圳大学化学与化工学院, 广东 深圳 518060

2. 深圳大学医学院过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060

3. School of Biological Science, The University of Auckland, 92019, Auckland, New Zealand/
NCIECP, Auckland University of Technology, Auckland, New Zealand

摘 要 在基因工程技术中, 采用原核表达系统获得的重组蛋白通常都是以包涵体的形式存在。利用圆二色性光谱、荧光光谱和同步荧光光谱对尿素诱导的重组椰子花粉泛过敏原 profilin 蛋白包涵体的复性过程进行了系统的光谱学研究, 得到了 profilin 蛋白复性过程的光谱学特征; 结合生物信息学方法, 通过对 profilin 蛋白的二级结构和三级结构的预测, 进一步分析了复性过程中 profilin 蛋白构象变化的特点, 初步建立了一种新的检测重组变应原蛋白复性程度的光谱学实验方法, 为重组蛋白包涵体复性机理的深入研究进行了有益的探索。

关键词 椰子花粉; 变应原; Profilin; 体外重折叠; 透析; 生物信息学

中图分类号: O657.3; R392-33 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)09-2428-05

引 言

椰子是一种热带、亚热带的常见植物, 在授粉季节会产生大量的花粉, 是我国华南地区的一种重要吸入性过敏原^[1]。椰子花粉过敏原 Profilin 还广泛存在于其他花粉和食物中, 导致过敏病人发生变态反应^[2]。通过基因工程表达得到的重组蛋白通常是以无生物活性的聚集体——“包涵体”的形式存在, 近年来发展了许多方法从包涵体中复性重组蛋白, 其中尿素浓度梯度方法已成功用于多种重组蛋白的复性^[3]。

光谱学方法是研究蛋白质高级结构的有力手段, 其中 CD 光谱是研究稀溶液中蛋白质构象的一种简单、快速和较准确的方法, 能够定量分析蛋白质中二级构象的含量^[4]; 荧光测试中的发射峰特征、荧光偏振、能量转移及荧光寿命等指标可以对蛋白质分子中荧光生色基团的结构及其微观环境提供有用信息, 且具有方法简便、灵敏性高, 选择性强, 样品用量少以及能够提供较多的光物理信息等优点^[5]; 同步荧光光谱可以区分荧光发色团色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)残基的特征光谱, 具有简化光谱、窄化谱带和减小光谱重叠等优点, 已经广泛应用于蛋白质结构和构象的研究。然而, 迄今为止, 在用光谱学方法特别是同步荧光光谱和 CD 光谱来

监测蛋白的复性过程光谱学特征的研究方面, 还鲜见报道^[6]。

本文按文献的方法^[1]表达纯化得到椰子花粉中泛过敏原肌动蛋白抑制蛋白(profilin)的包涵体, 用尿素浓度梯度方法进行复性, 通过荧光光谱、同步荧光光谱和 CD 光谱法对 profilin 蛋白复性过程进行光谱学表征, 并结合生物信息学方法, 通过对 profilin 蛋白的二级结构和三级结构的预测, 进一步分析了复性过程中 profilin 蛋白构象变化的特点, 初步建立起一种新的检测重组变应原蛋白复性的光谱实验方法, 并为重组蛋白包涵体复性机理的深入研究进行了有益的探索。上述研究对于与体内活性蛋白集聚现象有关的疾病治病机理和体内蛋白质的复性和重折叠机理的理解, 以及在分子水平上设计新型多功能蛋白也具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与材料

J-815 型的圆二色光谱仪(Jasco 公司), F-4500 型荧光分光光度计(日立公司), FPLC 层析仪、层析柱(Amersham Pharmacia 公司), MK3 酶标仪(thermo electron 公司)。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自 Sigma 公司, HRP 标记的链霉亲和素购于 Vector 公司, 生物素标记羊抗

收稿日期: 2009-10-23, 修订日期: 2010-01-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570421, 30760082)和深港创新圈项目(CXQ2008026)资助

作者简介: 罗海梅, 女, 1985 年生, 深圳大学化学与化工学院硕士研究生 e-mail: luohaimai2008@163.com

* 通讯联系人 e-mail: xuhong@szu.edu.cn

人 IgE 抗体购自 KPL 公司, 大肠杆菌 *E. Coli* BL21(DE3) 购自 Invitrogen 公司。椰子花粉过敏病人阳性血清由海口市人民医院提供(经 Unit CAP 检测, 2 级以上), 并储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。实验用水为去离子水, 试剂其余均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

椰子花粉 profilin 重组蛋白的表达和纯化按文献[1]的方法进行。

1.2.1 椰子花粉重组蛋白的复性实验

将纯化的重组蛋白(浓度为 $3.135\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下分别对 $3, 2, 1, 0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的尿素、 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris·HCl(pH 8.5)的溶液透析 12 h, 然后再对 pH 8.5 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)透析 12 h。隔一定时间取样, 检测复性过程的荧光光谱、同步荧光和 CD 光谱。

1.2.2 CD 光谱实验

取复性实验中的椰子花粉蛋白样品, 用去离子水稀释为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 在室温下测定其远紫外区($190\sim 250\text{ nm}$)的 CD 光谱, 测量光径为 0.1 cm , 响应时间为 0.25 s , 夹缝宽度为 1 nm , 扫描速度 $500\text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, 灵敏度为 $5\text{ mdeg}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。每份样品重复扫描 3 次, 累加得到最后的 CD 谱图, 圆二色性以平均残基摩尔椭圆值(θ)表示, 单位为 $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ 。图谱经过仪器本底消除和溶液空白差减, 然后利用 CONTIN 软件分析谱图数据, 计算出重组蛋白中 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规则卷曲等二级结构的百分比含量^[7, 8]。

1.2.3 荧光光谱实验

依次从复性的椰子蛋白溶液中取样, 用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0 的 PBS 缓冲液稀释为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 进行荧光光谱测定。分别以 280 和 295 nm 的激发光激发, 记录椰子蛋白在 $300\sim 550\text{ nm}$ 之间的发射光谱。激发和发射狭缝均为 5 nm 。

1.2.4 同步荧光光谱实验

分别在固定发射波长间距 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 的条件下扫描样品中酪氨酸残基和色氨酸残基的同步荧光光

谱, 其他实验条件与荧光光谱实验相同。

1.2.5 蛋白结构的预测

用 SSpro 法分析 α 螺旋、 β 转角、无规则卷曲等二级结构^[9]。应用在线工具 SWISS-MODEL 预测蛋白的三级结构^[10, 11]。

1.2.6 ELISA 测定蛋白的生物活性实验^[12]

将 $1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 复性前后的椰子花粉蛋白按照布局加入到 96 孔板中, 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下包被过夜, 次日洗板。每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ BSA-PBS(2%)溶液, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h , 洗板。将椰子花粉过敏病人血清按 $1:20$ 的比例, 用 BSA-PBST(1% BSA-PBS, $1:2\text{ }000$ Tween)稀释后, 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h , 洗板 3 次; 生物素标记羊抗人 IgE 抗体用 BSA-PBST 稀释, 比例分别为 IgE($1:2\text{ }000$), IgM($1:2\text{ }000$), IgG($1:2\text{ }000$), IgA($1:1\text{ }000$), 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 稀释后的溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h , 洗板。用 StrTav-HRP buffer($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, $0.15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)按 $1:1\text{ }000$ 稀释, 每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h , 洗板。每孔中各加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 底物 A、B, 避光显色 10 min 后, 再加入 $50\text{ }\mu\text{L}$, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸终止显色反应, 用全自动酶标仪测定各孔在 490 nm 的光密度值。

2 结果与讨论

ELISA 实验测得的复性前后重组椰子花粉 Profilin 蛋白在 490 nm 的光密度值从 0.308 提高到 1.478 , 表明复性后的蛋白活性得到极大的增强, 推测其结构接近于天然的椰子花粉 Profilin 蛋白结构。

2.1 椰子花粉 profilin 蛋白的结构

鉴于目前还没有椰子花粉 Profilin 蛋白的晶体结构报道数据, 我们通过在线工具 SWISS-MODEL 来预测其三级结构(结构图未给出), 用生物信息学方法 SSPRO 法预测其二级结构。二级结构预测结果如图 1 所示。

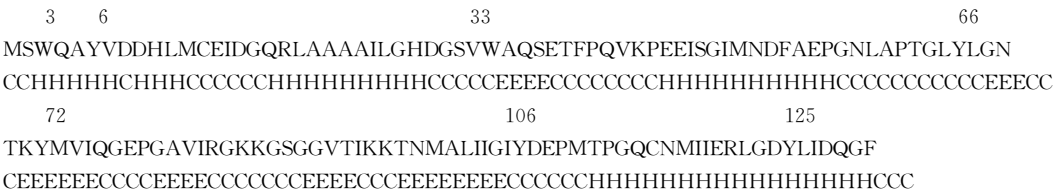


Fig. 1 Secondary structures of coco profilin predicted by SSPO method

蛋白分子中能发射荧光的 3 种氨基酸残基为色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe), 选择适当的发射波长, 可以忽略 Phe 的荧光。椰子花粉 Profilin 蛋白序列中含有 2 个 Trp 和 5 个 Tyr。三级结构预测结果显示, Profilin 蛋白中的 2 个色氨酸位于相邻的位置, 分属 α 螺旋和无规卷曲结构; 5 个酪氨酸散布在蛋白的不同部分, 其中 2 个属于 α 螺旋结构, 3 个属于 β 折叠结构; 除了 1 个 α 螺旋结构中的 Tyr 位于蛋白的表面外, 其余的 Trp 和 Tyr 均处于程度不同

的疏水环境中。二级结构预测方面, 第 3 位色氨酸、第 6 和 125 位酪氨酸属于 α 螺旋结构, 第 33 位色氨酸和第 66, 72 和 106 位酪氨酸都属于 β 折叠结构。比较二级结构和三级结构中关于二级结构的预测结果, 除了 1 个色氨酸在预测的三级结构中属于无规卷曲而在二级结构预测中为 β 折叠外, 其余的色氨酸和酪氨酸的预测结果一致; 另外, 从三级结构预测结果看, 该无规卷曲的色氨酸与 β 折叠结构相邻。

2.2 圆二色谱

蛋白质的二级结构主要有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规则卷曲, 在 CD 光谱中, 不同的二级结构吸收峰的位置和强弱都不相同。 α 螺旋结构在 192 nm 处有一正的谱带, 在 222 和 208 nm 处表现出两个负的特征肩峰谱带, 其中 222 nm 附近 θ 值的绝对值越大则表示分子中含有更多的 α 螺旋二级结构。 β 折叠的 CD 谱在 216 nm 处有一负谱带, 在 185 ~ 200 nm 有正谱带; β 转角在 206 nm 附近有正 CD 谱带。因此, 测定得到的蛋白质远紫外 CD 光谱, 能反映出蛋白质二级结构的信息^[13]。椰子花粉 profilin 重组蛋白复性过程中的 CD 光谱如图 2 所示。

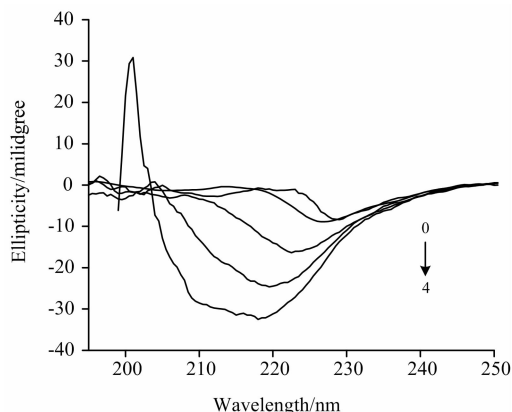


Fig. 2 Far-UV CD spectra of coco profilin

0: Recombination coco profilin; 1-4: Recombination coco profilin dialyzed against 50 mmol · L⁻¹ Tris · HCl (pH 8.5) buffer containing 3, 2, 1, 0.5 mol · L⁻¹ urea at 4 °C for 6 hours respectively

由图 2 可见, 复性前的蛋白 228 nm 有一负峰, 没有出现正峰; 随着复性的进行, 负峰逐步变宽, 并向 218 nm 蓝移; 复性完成后, 在 201 nm 处出现正峰, 并在 209 和 218 nm 处出现两个负肩峰。上述 CD 光谱特征说明在复性前, Profilin 蛋白主要是以无规卷曲和部分 β 折叠的形式存在; 随着复性的进行, 蛋白二级结构中的 α 螺旋逐渐增加, 有利于蛋白高级结构形成的 β 转角的含量也明显增加。根据复性后的 CD 光谱曲线, 利用 CONTIN 软件计算得到的复性后重组 Profilin 蛋白中各种二级结构的百分比含量如表 1 所示。由表 1 可见, 复性后的 Profilin 蛋白中 α 螺旋含量显著增加, β 转角的含量也明显增加, 而 β 折叠和无规则卷曲含量则相应减少。另外, 从平均残基摩尔椭圆度的强度来看, 复性后蛋白的 CD 谱的负峰明显增强, 也说明复性后的蛋白的二级结构相对于复性前的显著增加, 复性后蛋白折叠的程度更加紧密。

Table 1 Contents of secondary structures for denatured and renatured recombination coco profilin

Secondary structure	Denatured coco profilin/%	Renatured coco profilin/%
α -helix	14.3	29.4
β -sheet	31.3	13.1
β -turn	21.2	28.7
Random coil	33.2	28.9

远紫外 CD 光谱还能提供有关蛋白质三级结构的信息。Levitt 等报道了 4 种典型的蛋白质的三级结构模型^[14]: (1) 全 α 型: α 螺旋含量大于 40%, β 折叠含量小于 5%; (2) 全 β 型: β 折叠含量大于 40%, α 螺旋含量小于 5%; (3) $\alpha + \beta$ 型: α 螺旋及 β 折叠含量均大于 15%, 它们在空间上是分离的, 且超过 60% 的折叠链呈反平行排列; (4) α/β 型: α 螺旋和 β 折叠含量都大于 15%, 它们在空间上是相间的, 且超过 60% 的折叠链平行排列。Manavalan 等进一步报道了这 4 种三级结构各自不同的 CD 光谱特征^[15]。根据复性后 Profilin 蛋白的远紫外 CD 光谱的特征及其二级结构含量, 考虑到 CD 光谱中正、负信号的交叉位置高于 172 nm; 在 209 和 218 nm 处两个负的肩峰中, 218 nm 处的 CD 值更大, 我们推测复性后 Profilin 蛋白的三级结构更接近于 α/β 型。

2.3 荧光光谱

在蛋白质分子的 3 个荧光生色团中, Trp 的荧光强度最大, Tyr 次之, Phe 最小。Phe 的最大激发波长位于 257 nm, 由于蛋白质的荧光通常在 280 nm 或更长的波长被激发, Phe 在绝大多数实验条件下不被激发。在 270 ~ 290 nm 激发时, 不能忽略 Tyr 残基的贡献; 当激发波长大于 290 nm 时, 可认为荧光仅仅来自于 Trp 残基。以 280 nm 为激发波长, 椰子花粉蛋白的荧光光谱如图 3 所示。

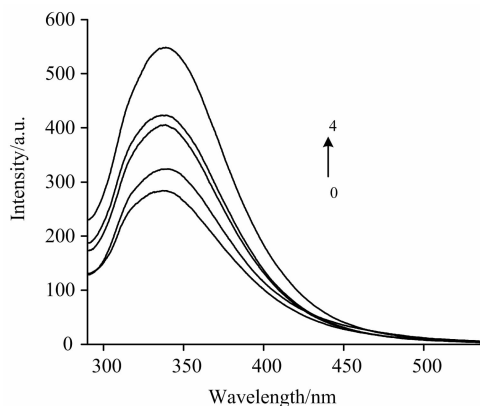


Fig. 3 Fluorescence emission spectra of coco profilin

0: Recombination coco profilin; 1-4: Recombination coco profilin dialyzed against 50 mmol · L⁻¹ Tris · HCl (pH 8.5) buffer containing 3, 2, 1, 0.5 mol · L⁻¹ urea at 4 °C for 6 hours respectively

由图 3 可知, 随着复性的进行, 椰子花粉 Profilin 蛋白的荧光逐渐增强。蛋白在复性之前, 因为维持蛋白三级结构的疏水键和氢键被破坏, 亚基肽链结构趋于松散, 含有荧光生色团的氨基酸大多暴露在溶剂中, 故荧光较弱; 根据蛋白三级结构的预测结果, 完全复性之后的蛋白中只有 1 个酪氨酸暴露在蛋白分子表面, 其他 2 个色氨酸和 4 个酪氨酸都不同程度地被包埋在蛋白分子内部, 这些荧光生色团因此可以避免与溶剂分子的碰撞, 导致其荧光强度增强。

另一方面, 通过考察 α 螺旋和 β 折叠的结构特征, 发现 β 折叠往往含较多的非极性残基, 并埋在蛋白质内部形成疏水核心; 而 α 螺旋通常是两性的, 亲水面位于表面, 疏水一侧朝向蛋白质内部^[16]。尽管 CD 光谱的实验结果显示, 复性

后的二级结构中, β 折叠明显减少, α 螺旋明显增加, 根据二级结构预测, 完全复性后的花粉 Profilin 蛋白的 7 个主要的荧光生色团中, 3 个处于 α 螺旋结构, 4 个属于 β 折叠结构。因此, 从二级结构看, 复性后的荧光生色团更多地处于疏水环境中, 也会导致荧光增强。

2.4 同步荧光光谱

当选择的发射波长与激发波长差为 15 nm 时, 蛋白质的

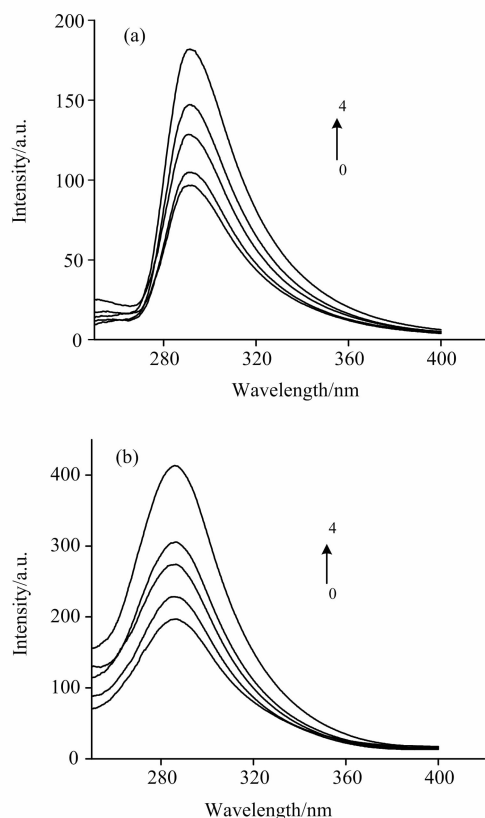


Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of coco profilin

0: Recombination coco profilin; 1-4: Recombination coco profilin dialyzed against 50 mmol · L⁻¹ Tris · HCl (pH 8.5) buffer containing 3, 2, 1, 0.5 mol · L⁻¹ urea at 4 °C or 6 hours respectively. (a): $\Delta\lambda = 15$ nm; (b): $\Delta\lambda = 60$ nm

荧光主要由酪氨酸(Tyr)发射产生, 此时酪氨酸的荧光峰基本不受色氨酸的干扰; 当选择发射波长与激发波长差为 60 nm 时, 蛋白质则主要表现为色氨酸(Trp)的荧光。因为发光氨基酸残基的最大发射波长的位置及其强度与氨基酸所处环境的疏水性有关, 所以由最大发射波长和发射强度的改变可判断发光氨基酸残基以及蛋白质构象的变化^[17]。椰子花粉 Profilin 蛋白复性过程的同步荧光光谱如图 4 所示。

由图 4 可知, 酪氨酸残基的最大发射峰波长由复性前的 292.4 nm 变为复性后 291.2 nm, 色氨酸残基的最大发射峰波长由复性前的 287.2 nm 变为复性后 285.4 nm, 均发生蓝移, 并且色氨酸残基最大发射峰波长蓝移更多; 从发射峰强度看, 与复性前相比, 色氨酸残基复性后荧光强度增加也较酪氨酸残基更显著, 说明复性后酪氨酸和色氨酸残基所处的微环境疏水性均增加, 并且色氨酸残基附近微环境疏水性的增加更加明显。

根据 Profilin 蛋白三级结构预测结果, 蛋白分子中的 2 个色氨酸残基分别位于空间位置相邻的 α 螺旋和无规卷曲(在二级结构预测中的 β 折叠)结构; 蛋白分子中 5 个酪氨酸残基中的 2 个属于 α 螺旋结构, 另外 3 个属于 β 折叠结构, 且位置彼此分离。尽管色氨酸残基不论是数目, 还是其中 β 折叠结构的含量均较酪氨酸残基少, 但同步荧光光谱实验表明, 色氨酸残基附近构象的变化更大, 该现象是否与蛋白质的活性位点相关联, 有待后续实验进一步证实。

3 结 论

通过对椰子花粉重组 Profilin 蛋白复性过程的荧光光谱、同步荧光和 CD 光谱实验研究, 得到了 Profilin 蛋白复性过程中构象的变化与光谱学特征; 结合生物信息学方法对这些光谱学特征进行了合理的解释。通过上述研究, 初步建立了一种新的检测重组变应原蛋白复性的光谱学实验方法, 为重组蛋白包涵体复性机理的深入研究进行了有益的探索。上述研究对于与体内活性蛋白集聚现象有关的疾病的致病机理和体内蛋白质的复性和重折叠机理的理解, 以及在分子水平上设计新型多功能蛋白都具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] MENG Guang, YAO Min, LIU Zhi-gang et al(孟 光, 姚 敏, 刘志刚, 等). Immunological Journal(免疫学杂志), 2009, 25(6): 532.
- [2] WU Kai-wei, YU Xiao, LIU Zhi-gang, et al(吴凯威, 余 晓, 刘志刚, 等). Soybean Science(大豆科学), 2007, 26(1): 1.
- [3] YU Rui-song, HUANG Jian-zhen, LI Zhen(于瑞嵩, 黄建珍, 李 震). Acta Agriculturae Shanghai(上海农业学报), 2006, 22(4): 33.
- [4] HUANG Han-chang, JIANG Zhao-feng, ZHU Hong-ji(黄汉昌, 姜招峰, 朱宏吉). Chemistry Bulletin(化学通报), 2007, 70: 501.
- [5] YAN Mei, CHEN Xin, SUN Shu-ting, et al(颜 梅, 陈 欣, 孙舒婷, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(6): 1322.
- [6] ZHANG Xue-zhong, WU Xiao-xia, WANG Da-wei, et al(张学忠, 吴晓霞, 汪大为, 等). Chinese Biochemical Journal(生物化学杂志), 1993, 9(6): 648.
- [7] Provencher S W, Glockner J. Biochemistry, 1981, 20(1): 33.
- [8] Van Stokkum I H, Spoelder H J, Bloemendal M, et al. Analytical Biochemistry, 1990, 191(1): 110.
- [9] Cheng J, Randall A Z, Sweredoski M J, et al. Nucleic Acids Research, 2005, 33(Web Server Issue): w72.
- [10] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3381.
- [11] Guex N, Peitsch M C. Electrophoresis, 1997, 18(15): 2714.

- [12] LI Wen, LAI He, ZHAO Qi-hua, et al(李文, 赖 荷, 赵绮华, 等). Guangxi Medical Journal(广西医学), 2006, 28(5): 634.
- [13] SHEN Xing-can, LIANG Hong, HE Xi-wen, et al(沈星灿, 梁 宏, 何锡文, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2004, 32(3): 388.
- [14] Levitt M, Chothia C. Nature, 1976, 261: 552.
- [15] Manavalan P, Johnson W C Jr. Nature, 1983, 305: 831.
- [16] HU Hong-yu, XU Gen-jun(胡红雨, 许根俊). Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展), 1999, 26(1): 9.
- [17] MA Chun-qi, LI Ke-an, ZHAO Feng-lin, et al(马春琪, 李克安, 赵凤林, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 1999, 57(4): 389.

Spectroscopic Studies on Refolding Process in Vitro of Pan-Allergen Profilin in Coco Pollen

LUO Hai-mei¹, XIAO Jie¹, WU Yu-lan², LIU Zhi-gang², Jun Lu³, XU Hong^{1*}

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

2. Allergy and Immunology Institute, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

3. School of Biological Science, The University of Auckland, 92019, Auckland, New Zealand/NCIECP, Auckland University of Technology, Auckland, New Zealand

Abstract Recombinant proteins expressed by prokaryotic expression system are normally in the form of inclusion. In the present paper, refolding process of recombinant pan-allergen profilin protein induced by urea has been investigated by using circular dichroism spectra, fluorescence spectra, synchronous fluorescence spectra systematically. And the spectral characteristics of the renaturation were obtained. In addition, bioinformatics methods including predications of secondary and tertiary structures have also been used to explain the spectral characteristics and analyze the conformational changes of the protein during renaturation *in vitro*. Results from this study should be useful to the establishment of a spectral method examining the extent of protein renaturation, and be helpful to the understanding of the mechanism of renaturation of recombinant protein.

Keywords Cocos nucifera pollen; Allergen; Profilin; Refolding *in vitro*; Dialysis; Bioinformatics

(Received Oct. 23, 2009; accepted Jan. 26, 2010)

* Corresponding author