

温敏型聚合物 PNIPAAm 辅助的溶菌酶体外复性*

卢滇楠 刘 铮**

(清华大学化工系 北京 100084)

摘 要 合成了 3 种具有不同分子量的温敏型聚合物聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAAm),测定了其分子量分布以及相应的低临界溶解温度(LCST).在溶菌酶复性溶液中加入 PNIPAAm 可促进溶菌酶复性,其中采用中等分子量 M₁-PNIPAAm(M_n 为 2.2×10^4 g/mol)时溶菌酶的复性效果最佳,并采用荧光发射光谱技术表征了 PMIPAAm 分子结构对于溶菌酶结构的影响.系统考察了采用 M₁-PNIPAAm 时,复性液中尿素浓度、蛋白质浓度和温度等条件对溶菌酶复性效果影响.结果显示尿素与 M₁-PNIPAAm 对于溶菌酶复性呈现协同效应,复性操作温度不仅同溶菌酶自身特性有关,而且还受到 M₁-PNIPAAm 自身性质变化的影响.研究结果表明温敏型高聚物在高浓度蛋白质的大规模体外复性中具有很好的应用前景.

关键词 温敏型聚合物,聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAAm),溶菌酶,复性

基因工程技术的发展使得蛋白质的异体表达成为现代生物医药产业的最常用的方法.大肠杆菌因其基因操作简便和易于大规模培养等优点而成为目前最常用的蛋白质表达体系^[1].但大肠杆菌表达体系中缺乏真核生物蛋白活性表达所需的翻译后修饰系统,过量表达的蛋白质往往以包涵体的形式存在.因此需要采用变性剂溶解包涵体,然后再以适宜的方式脱除变性剂或加入其它化学试剂使蛋白质重新折叠而获得预期的生物活性.这个过程称之为蛋白质体外折叠或者复性.

Afinsen 等提出蛋白质的空间结构是由其一级结构及蛋白质所处的溶液环境所决定^[2],从热力学的角度阐述了蛋白质体外折叠反应进行的方向.此后,大量的实验研究证明变性蛋白质在折叠过程中会形成中间态,中间态可同时转化为具有天然活性的蛋白质或者无活性的蛋白质聚集体^[3-5],因此抑制蛋白质聚集体的形成就成为蛋白质体外折叠技术的焦点.目前的研究主要从如下两个方面着手,一方面是降低蛋白质分子间相互接触的概率,典型的如稀释法,反相微团技术^[6]、双水相萃取技术^[7],各类色谱技术^[8-12],中空纤维素膜透析技术^[13]等.另一方面是仿照蛋白质体内折叠过程,采用折叠助剂来辅助蛋白质在体外的折叠,即在折叠反应体系中加入折叠助剂,变性蛋白质与助剂结合形成复合物并开始折叠,当折叠完成后,由于蛋白质表面疏水性质的变化

导致其与折叠助剂分离而进入溶液中.目前所采用的助剂有精氨酸^[14]、低分子量糖类^[15]、表面活性剂^[16]、PEG^[17,18],分子伴侣 GroEL^[19]等等.

环境刺激响应性高分子(或称智能聚合物)具有分子结构随溶剂环境而发生可逆变化的特性^[20],据此,我们设想将智能聚合物作为蛋白质折叠助剂,通过调控蛋白质折叠溶液的温度、pH 值等参数来调控智能聚合物与蛋白质分子间的相互作用,即首先使其与变性蛋白质形成复合物以阻止蛋白质聚集物的生成,当蛋白质折叠完成后,可通过改变上述参数使智能聚合物与复性蛋白质分离并可复用.与现有的其他类似过程相比,采用智能聚合物辅助蛋白质折叠具有操作简便,易于放大的特性,可望应用于大规模蛋白质体外折叠过程中.

本文合成了 3 种分子量的 PNIPAAm,并研究了其辅助溶菌酶体外复性的效果,探索了 PNIPAAm 辅助复性过程中,尿素浓度、蛋白质浓度和温度等条件对溶菌酶复性效果影响.研究结果表明 PNIPAAm 对溶菌酶折叠具有辅助作用,在高浓度蛋白质的体外复性上具有很好的应用前景.

1 材料和方法

1.1 实验试剂

鸡蛋清溶菌酶(Sigma, USA),二硫苏糖醇

* 2003-07-01 收稿,2003-10-08 修稿;国家自然科学基金资助项目(基金号 20176023);清华大学分析基金资助; ** 通讯联系人

(DTT) (Bebeo, USA), 还原型、氧化型谷胱甘肽 (GSH, GSSG) (Roche, Switzerland), 微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA), Tris (Amersham, Sweden), 巯基丙酸 (MPA) (Acros, Belgium), EDTA、尿素(北京益利精细化学品有限公司), *N*-异丙基丙烯酰胺 (NIPAM, Acros, Belgium), 偶氮二异丁腈 (AIBN) (北京益利精细化学品有限公司)。

1.2 PNIPAAm 的合成

PNIPAAm 的合成采用文献[21]所报道的自由基聚合方法. NIPAAm 与经过重结晶处理的偶氮二异丁腈(AIBN)溶解于无水乙醇中, 在 60℃下反应 24 h. 用旋转蒸发器蒸发大部分溶剂, 直至出现固体, 用少量丙酮溶解固体, 用一定体积的正己烷沉淀聚合物, 以上操作重复 3 次, 除掉未反应单体和引发剂, 将该聚合物置于真空干燥器中至恒重, 得到较纯的白色粉末状聚合物. 实验过程中通过调整 NIPAAm 和 AIBN 的比率以及后续过程中采用丙酮-正己烷体系分级沉淀来确定不同分子量范围的聚合物, 如表 1 所示.

1.3 溶菌酶的变、复性操作

变性液由 pH 8.6, 0.1 mol/L Tris-HCl 含 8 mol/L 尿素、1 mmol/L EDTA 和 30 mmol/L DTT 组成. 复性液由 pH 8.2, 0.1 mol/L Tris-HCl 含 1 mmol/L EDTA、4 mmol/L GSSG、4 mmol/L GSH, 及实验中制定浓度的尿素和 PNIPAAm 组成. 变性操作是首先将天然溶菌酶溶解于变性液中, 蛋白质浓度为 50 mg/mL, 室温下保温 24 h, 经酶活检测完全丧失活性后, 调节 pH 值至 3.0, 4℃保存.

复性操作是采用快速稀释法, 即在一定温度条件下, 将含有尿素和 PNIPAAm 的复性液同变性蛋白质溶液快速混合, 恒温培养 24 h 后测量活性.

1.4 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度测定采用分光光度法, 在 280 nm 处变性蛋白和天然蛋白的消光系数分别为 2.37

和 2.63.

1.5 蛋白质结构的荧光分析

荧光发射光谱分析采用 Hitachi 公司的 F-2500 荧光分光光度计. 激发波长为 280 nm, 测定 200 ~ 500 nm 范围内发射光谱.

1.6 溶菌酶活性测定

用微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 为底物, 实验时首先用 pH = 6.2, 0.2 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液配置微球菌溶液, 调节其在 450 nm 处的吸光度在 1.3, 然后取 2.5 mL 菌液, 加入 500 μL 溶菌酶溶液, 测定反应液在 450 nm 下的吸光度变化, 通过吸光度值的降低速率来计算溶菌酶的活性. 本文中采用活性收率 (Yield) 来描述溶菌酶的复性效果, 活性收率的定义为

$$\text{Yield} = \frac{\text{复性液中的溶菌酶总活力}}{\text{变性前的该样品液中的溶菌酶总活力}}$$

1.7 聚合物分子量测定

聚合物分级沉淀得到的组分分子量测定采用 Waters 150C 凝胶渗透色谱仪, 以窄分子量的聚苯乙烯试样为标准, 色谱柱采用 HT2-HT3-HT4 三柱联用, 四氢呋喃为流动相, 示差折光检测器检测, 此项实验委托北京大学化学学院中级仪器实验室完成.

1.8 聚合物的 LCST 测定

将样品配置成含有聚合物 2 mg/mL 的水溶液, 在给定温度条件下恒温 20 min 后, 测定其在 500 nm 处溶液的透光率.

2 结果与讨论

2.1 PNIPAAm 的合成和表征

采用凝胶渗透色谱 (GPC) 和分光光度法测定 L_ PNIPAAm、M_ PNIPAAm 和 H_ PNIPAAm 的数均分子量 (M_n), 重均分子量 (M_w), 分子量分布以及在纯水体系中较低临界溶解温度 (LCST), 结果如表 1 所示.

Table 1 Monomer ratio of NIPAAm to AIBN in the synthesis of PNIPAAm and corresponding molecular weight, dispersity and LCST of three kinds of PNIPAAm

	NIPAAm: AIBN (mol/mol)	M_n^*	M_w^*	Polydispersity [*]	LCST (°C)
L_ PNIPAAm	10:1 (mol %) MPA	4.0×10^3	5.7×10^3	1.30	32.5
M_ PNIPAAm	100:5	1.8×10^4	2.2×10^4	1.25	32.5
H_ PNIPAAm	100:1	4.7×10^4	5.3×10^4	1.13	30.5

^{*} Measured by GPC method using THF as solvent, only for reference

表 1 表明,选用不同比率的 NIPAAm 和 AIBN 来进行自由基聚合,经过后续丙酮-正己烷体系分级沉淀制备不同分子量范围的温敏型 PNIPAAm,所获得的 3 种聚合物具有较低的聚合物分散度,因此可以用于研究分子量对蛋白质体外折叠的影响.

2.2 PNIPAAm 辅助蛋白质复性可行性

首先考察了具有 3 种分子量的 PNIPAAm 对溶菌酶复性的辅助作用.在所有实验中,溶菌酶在复性液中的最终浓度皆取 1 mg/mL,尿素最终浓度皆取 2.23 mol/L.复性操作采用快速稀释方法,即直接向变性溶菌酶溶液中一次加入给定体积的复性液,在 30℃ 恒温下 2 h,然后在 20℃ 恒温复性 24 h 后测定其活性,结果如图 1 所示.

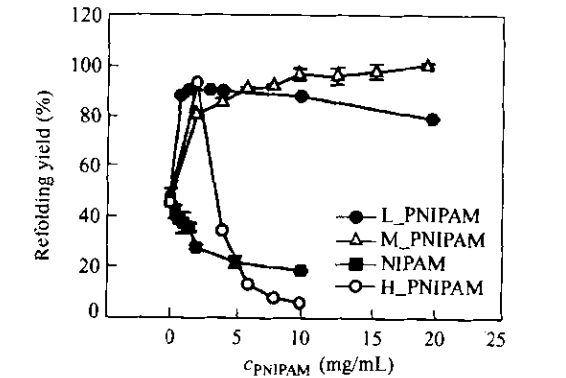


Fig. 1 Refolding yield of lysozyme as function of the input of PNIPAAm at different molecular weight

从图 1 可见,随着 L_PNIPAAm 浓度增高,溶菌酶的复性率先迅速升高后缓慢降低,但总体维持在 80% 以上.而采用 M_PNIPAAm 时,溶菌酶复性率随 M_PNIPAAm 浓度的增加而持续升高,在 M_PNIPAAm 浓度达到 10 mg/mL 时,溶菌酶复性率可达到 100%.而采用 H_PNIPAAm 时,溶菌酶复性率随 H_PNIPAAm 浓度的增大而先迅速升高再迅速降低到 10% 以下,这主要是由于 H_PNIPAAm 的排除体积效应导致蛋白质聚集加剧所致.而加入异丙基丙烯酰胺单体(NIPAAm)则使溶菌酶的复性率随单体浓度的增加而降低,表明它对溶菌酶复性没有辅助和促进作用.

2.3 PNIPAAm 溶液中的溶菌酶分子构象的荧光分析

为揭示 PNIPAAm 分子量对其辅助溶菌酶复性效果差异的原因,考察了天然及复性溶菌酶在 M_PNIPAAm 和 H_PNIPAAm 溶液中的荧光发射

光谱随高分子浓度的变化.实验时,首先将用含给定浓度高分子的天然或复性溶菌酶溶液稀释至 1 mg/mL,在 20℃ 下保温 24 h 后测定其荧光发射光谱,并将其在 340 nm 处的荧光发射强度、最大发射波长和活性对聚合物浓度作图,得到图 2、3 和 4.

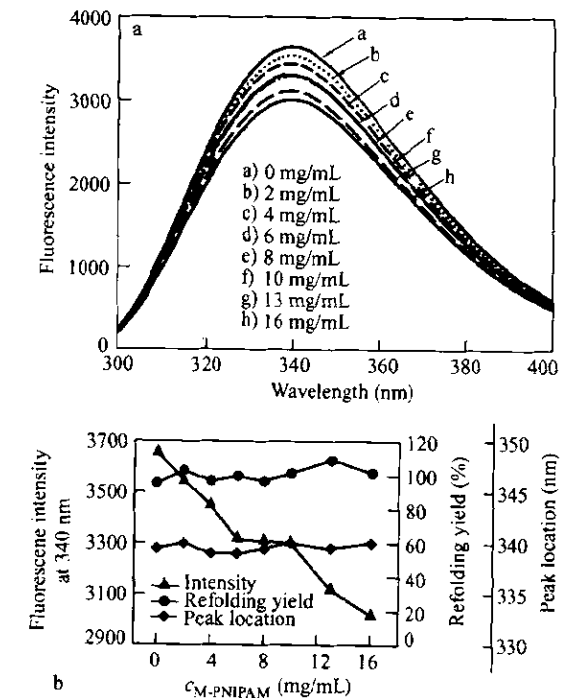


Fig. 2 Fluorescence analysis of native lysozyme by M_PNIPAAm a) Fluorescence spectra of native lysozyme in M_PNIPAAm solution at different concentration; b) Comparison of refolding yield, fluorescence intensity and peak location of native lysozyme as function of M_PNIPAAm concentration

从图 2 中可知,在本实验范围内,天然溶菌酶的荧光发射光谱(3a)和最大发射波长(3b)不随 M_PNIPAAm 的浓度而变,表明 M_PNIPAAm 不会影响天然溶菌酶的结构.但是天然溶菌酶荧光强度会随着 M_PNIPAAm 浓度增加而降低.这可能是由于(1)聚合物溶液本身具有散射一定波长光的能力,实验中发现不含溶菌酶的 20 mg/mL 的 M_PNIPAAm 可以完全将 280 nm 激发光散射;(2)随着 M_PNIPAAm 浓度的增加,溶菌酶分子与其碰撞几率增加,从而造成荧光淬灭,引起荧光发射光谱能量的降低.

将图 3 与图 2 中的结果一对比可知,复性溶菌酶在 M_PNIPAAm 中的荧光发射光谱与图 2 类似.从图 3(b)中可知,当 M_PNIPAAm 浓度为零时,溶菌酶的复性率为 82%,未折叠部分蛋白质

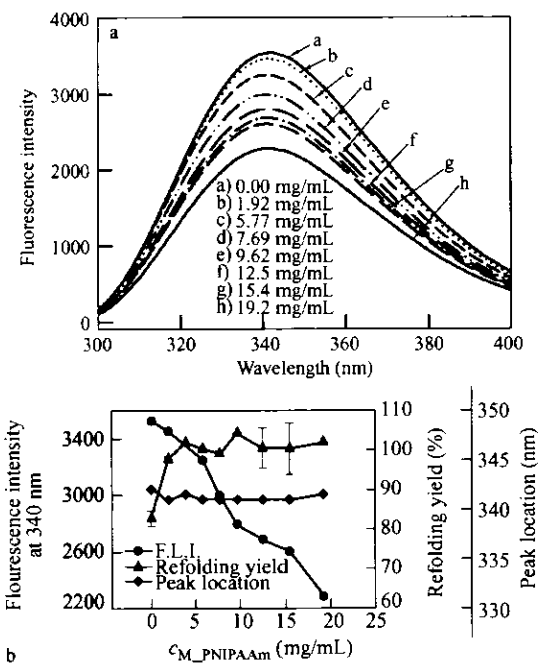


Fig. 3 Fluorescence analysis of refolded lysozyme by M-PNIPAAm
a) Fluorescence spectra of refolded lysozyme in M-PNIPAAm solution at different concentration; b) Comparison of refolding yield, fluorescence intensity and peak location of refolded lysozyme at various concentration of M-PNIPAAm

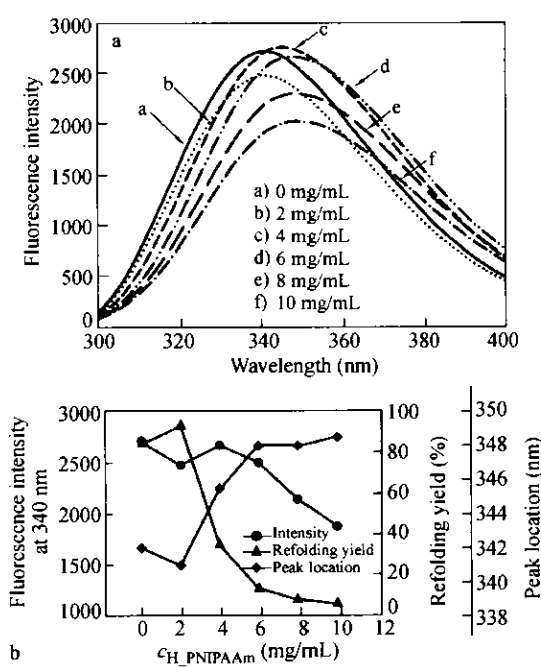


Fig. 4 Fluorescence analysis of refolded lysozyme by H-PNIPAAm
a) Fluorescence spectra of refolded lysozyme in H-PNIPAAm solution at different concentration ; b) Comparison of refolding yield, fluorescence intensity and peak location of refolded lysozyme in H-PNIPAAm solution of different concentration

以多聚体形式存在,体系的最大发射波长发生微小红移,即从 340 nm 红移到 342 nm.而随着 M-PNIPAAm 浓度的增加,溶菌酶复性率逐渐接近 100%,溶菌酶的最大发射波长也恢复到天然状态溶菌酶附近(340.5 nm),并且溶菌酶荧光强度发生类似天然溶菌酶的变化.因此,M-PNIPAAm 可辅助变性溶菌酶折叠为与天然溶菌酶的三级结构.

图 4 所显示的是复性溶菌酶在 H-PNIPAAm 中的荧光发射光谱及活性.与图 2 和 3 中的结果相对比可知,复性溶菌酶在 H-PNIPAAm 作用下的荧光发射强度和最大发射波长均发生了变化.复性溶菌酶活力随 H-PNIPAAm 浓度的增加而先上升后下降,相应地,体系的荧光强度先下降后上升,最大发射波长从 342 nm 先下降到 340 nm 再红移到 348 nm,与完全变性状态的溶菌酶的荧光发射波长基本一致.据此可知,高浓度的 H-PNIPAAm 因其体积排除效应和较强的疏水性,不具备溶菌酶复性的功能.故在后续实验中均采用 M-PNIPAAm.

2.4 尿素对共聚物 LCST 的影响

尿素是常用的蛋白质变性剂,对蛋白质折叠过程有重要影响^[12].为此首先考察尿素浓度对 PNIPAAm 的温敏特性的影响,结果如图 5 所示.

图 5 表明,M-PNIPAAm 的 LCST 随着尿素浓度的增加而降低.这主要是因为 PNIPAAm 的羰基以及亚胺基能和相邻水分子所形成的氢键会因加入尿素而被破坏.换言之,加入尿素可以增强溶液中 PNIPAAm 的疏水性,强化 PNIPAAm 与变性蛋白质或者具有疏水表面的蛋白质结合,从而有望减少蛋白质复性过程中蛋白质聚集体的生成.

2.5 尿素对 M-PNIPAAm 辅助复性效果的影响

变性溶菌酶样品初始浓度为 50 mg/mL,采用含不同尿素的复性液快速将其稀释到 1 mg/mL, M-PNIPAAm 的浓度为 2 mg/mL,于 20℃复性 24 h 后测定样品中溶菌酶的活力,结果如图 6 所示.

图 6 表明,加入 M-PNIPAAm 的情况下,溶菌酶体外复性所需尿素的最优浓度为 2.3 mol/L,与文献^[9,15]接近.而当尿素浓度为 0 时时,溶菌酶复性率低于 10%.表明尿素作为溶剂的功能是 M-

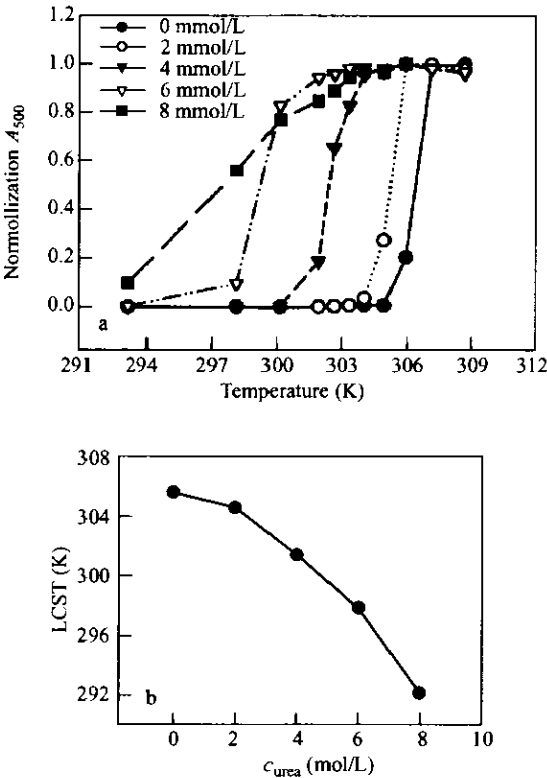


Fig. 5 M_PNIPAAm LCSTs decrease with increasing of urea concentration
a) Temperature dependence of optical transmittance at 500 nm in different concentration urea solution; b) LCST dependence of M_PNIPAAm on urea concentration

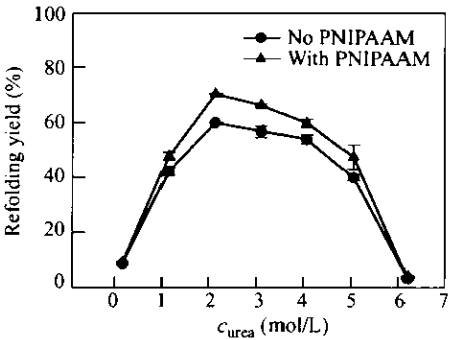


Fig. 6 Lysozyme refolding yield at different final urea concentration

PNIPAAm 不能替代的.而随着尿素浓度的进一步提高,溶菌酶复性率降低至 10% 以下,表明尿素对水分子的氢键的破坏作用导致 M_PNIPAAm 与溶菌酶的疏水作用更为强化,溶菌酶无法折叠而导致复性率降低.但 M_PNIPAAm 与尿素同时存在时的折叠效果优于单独使用尿素或者 M_PNIPAAm 时的复性效果,表明二者对于溶菌酶的

体外复性具有协同效应.

2.6 M_PNIPAAm 辅助折叠过程中的蛋白质浓度效应

提高蛋白质体外折叠时的最终蛋白质浓度,可以显著降低复性剂的用量和操作费用,因此考察了采用 M_PNIPAAm 时的溶菌酶在复性液中的最终浓度对复性效果的影响.变性溶菌酶初始浓度为 50 mg/mL,稀释液中尿素最终浓度为 2.3 mol/L,30℃ 保温 2 h,20℃ 复性 24 h 后测定溶菌酶活力,结果如图 7 所示.

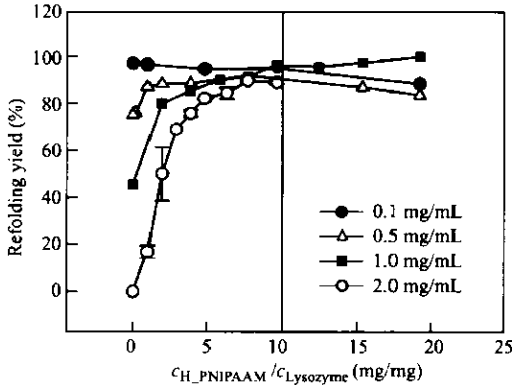


Fig. 7 Lysozyme refolding yield at different final lysozyme concentration

从图 7 可看出,复性液中不含 M_PNIPAAm 时,溶菌酶复性率随终蛋白质浓度的增加而降低.加入 M_PNIPAAm 后,溶菌酶的复性率在其终浓度为 2 mg/mL 时仍维持在 80% 以上.而在 M_PNIPAAm 与溶菌酶的质量比为 10:1 以上时,1 mg/mL 终溶菌酶浓度可得到接近 100% 的复性收率.这表明 M_PNIPAAm 在高浓度蛋白质体外折叠过程终所具有的独特优势和应用前景.

2.7 复性过程中的温度效应

温度的变化对于调节 PNIPAAm 的结构及其表面的亲疏水性及其与蛋白质的相互作用具有重要影响.为此考察了复性操作温度对于蛋白质复性的影响.变性溶菌酶样品的浓度为 10 mg/mL,用复性稀释至 1 mg/mL,PNIPAAm 浓度为 2 mg/mL,尿素浓度为 1.6 mol/L,在具有搅拌装置的恒温反应器中进行复性.在不同的温度下保温 2 h 进行复性,然后在 20℃ 保温 24 h 测定溶菌酶活性.结果如图 8 所示.

图 8 表明,在复性操作的温度条件范围内,含 M_PNIPAAm 复性液所获得的复性率均显著地高不含于 M_PNIPAAm 的复性收率,而从图 1 可知,

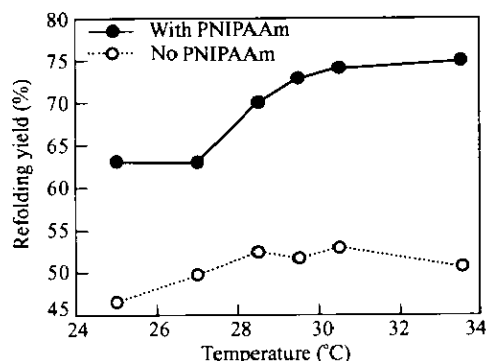


Fig. 8 Lysozyme refolding yield at different cultivation temperature

在 1.6 mol/L 尿素存在的情况下, M-PNIPAAm 的 LCST 为 32℃. 这表明无论 PNIPAAm 处于线团还是处于球体状态, 其均能发挥折叠助剂的作用. 此外, 在 M-PNIPAAm 存在的情形下, 当复性操作温度高于 30℃ 或者低于 27℃ 后, 溶菌酶复性率不再发生变化. 这是因为此时 M-PNIPAAm 是以稳定的溶胀 (低于 LCST) 或者是收缩 (高于 LCST) 结构出现, 与溶菌酶的结合不再发生变化所致. 而在对照组中, 溶菌酶的活性收率则随温度有所变化, 这主要反映出温度对于蛋白质折叠中间体结构的影響^[3].

综上所述, 采用自由基聚合的方法合成了 3

种分子量的温敏型高聚物 PNIPAAm; 研究了温敏型高分子 PNIPAAm 辅助溶菌酶复性的可行性; 结果表明分子量为 2.2×10^4 g/mol 的 M-PNIPAAm 具有辅助蛋白质复性的能力; 而分子量为 5.3×10^4 g/mol 的 L-PNIPAAm 在低浓度条件下可辅助溶菌酶复性, 而在高浓度时会阻碍溶菌酶复性. 中等分子量的 PNIPAAm 具有较宽的辅助复性作用浓度范围.

通过实验研究了 M-PNIPAAm 辅助蛋白质折叠过程中尿素浓度、蛋白质浓度及复性反应温度等对溶菌酶复性率的影响. 结果证实 PNIPAAm 的辅助折叠作用具体表现在与溶菌酶相互作用形成复合物而抑制变性溶菌酶聚集体的形成, 尿素因可以竞争性地与溶液中的水分子结合形成氢键具有更强的溶剂性能. PNIPAAm 与尿素共同作用时对于溶菌酶的复性具有协同效应. 复性操作温度对 M-PNIPAAm 辅助溶菌酶折叠具有一定的影响, 在本文所采用的实验条件下, 溶菌酶复性率随温度的升高而升高.

本文结果表明温敏型聚合物 PNIPAAm 可以有效地提高蛋白质体外复性率, 由于该过程具有操作简便可控, 易于放大、PNIPAAm 易于回收使用的优点而在大规模蛋白质体外折叠中具有很好的应用发展前景.

REFERENCES

- Georgiou G. AICHE J, 1988, 34(34): 1233 ~ 1248
- Anfinsen C B, Haber E, Sela M, White W H. National Academy of Sciences, 1961, 47(9): 1309 ~ 1314
- Matagne A, Jamin M, Chung E W, Robinson C V, Radford S E, Dobson C M. J Mol Biol, 2000, 297: 193 ~ 210
- Matagne A, Dobson C M. Cellular and Molecular Life Sciences, 1998, 54: 363 ~ 371
- Bachmann A, Segel D, Kiefhaber T. Biophysical Chemistry, 2002, 96: 141 ~ 151
- Hashimoto Y, Ono T, Goto M, Hatton T A. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 57(5): 620 ~ 623
- Forciniti D. Journal of Chromatography A, 1994, 668: 95 ~ 100
- Bai Q, Wei Y M, Geng M H, Geng X D. Chinese Chemical Letters, 1997, 8(1): 67 ~ 70
- Batas B, Chaudhuri J B. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 50: 16 ~ 23
- Li M, Zhang G F, Su Z G. Journal of Chromatography A, 2002, 159(1-2): 113 ~ 120
- Sathyamangalam S, Navin K. Protein Expression Purification, 1999, 15(2): 236 ~ 242
- Lu D N (卢滇楠), Liu Z (刘铮). Journal of Chemical Industry and Engineering (化工学报), 2002, 53(10): 1028 ~ 1033
- West S M, Chaudhuri J B, Howell J A. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 57(5): 590 ~ 599
- Arakawa T, Tsumoto K. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304(1): 148 ~ 152
- Li J, Zhang S, Wang C C. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(37): 34396 ~ 34401
- Clark D B, Schwarz E, Rudolph R. Methods Enzymology, 1999, 309: 48 ~ 58
- Cleland J L, Hedgepeth C, Wang D I C. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267: 13327 ~ 13334
- Cleland J L, Wang D I C. Biotechnology Progress, 1992, 8: 97 ~ 103
- Wang Q H, Buckle A M, Fersht A R. Journal of Molecular Biology, 2000, 304(5): 873 ~ 881
- Schild H G. Progress in Polymer Science, 1992, 17: 163 ~ 249

- 21 Chen Y(陈瑜), Chen M Q(陈明清), Liu X Y(刘晓亚), Yang C(杨成). Chinese Journal of Colloid & Polymer(胶体与聚合物), 2001, 19(3): 5-7

TEMPERATURE SENSITIVE PNIPAAm ASSISTED PROTEIN REFOLDING *in vitro*

LU Diannan, LIU Zheng

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract Temperature sensitive polymers, poly-*N*-isopropyl acrylamides (PNIPAAm) with different molecular weights, were prepared by radical polymerization. The molecular weight distribution and lower critical solution temperature of these polymers were determined by GPC and spectrophotometry. The feasibility of the polymer in assisting the refolding of denatured lysozyme was examined, by directly diluting the denatured lysozyme into refolding buffer containing PNIPAAm of different molecular weight. PNIPAAm with the mean molecular weight of 22,000 (M_w PNIPAAm) showed the best function of assisting lysozyme refolding, as indicated by the recovery of lysozyme activity from the denatured lysozyme sample. The molecular interaction of PNIPAAm with lysozyme and its implication on the structure change of lysozyme were investigated by fluorescence emission spectroscopy. The effects of lysozyme concentration and temperature on the lysozyme refolding were examined and the synergy of urea and M_w PNIPAAm on lysozyme refolding was identified. The suitable temperature for lysozyme refolding was chosen according to the temperature responsive behavior of PNIPAAm. The results shown by present study showed the high potential of temperature sensitive polymers in high concentration protein refolding *in vitro* in large scale.

Key words Protein refolding *in vitro*, Temperature sensitive polymer, Lysozyme, Poly-*N*-isopropyl acrylamide