

巴斯德毕赤酵母表达的突变型人白细胞介素-2 的发酵条件与纯化研究 Studies on Fermentation Conditions and Purification of Mutant Human Interleukin-2 Expressed in *Pichia pastoris*

刘 堰^{1,3*}, 苏 畅¹, 胡应和², 欧阳克清², 蔡绍哲²

LIU Yan^{1,3*}, SU Chang¹, HU Ying-He², OUYANG Ke-Qing² and CAI Shao-Xi²

1. 西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715

2. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044

3. 南京大学生物医药国家重点实验室, 南京 210093

1. College of Life Science, the South-west Normal University, Chongqing 400715, China

2. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

3. National Key Laboratory of Medical Bio-technology, Nanjing University, Nanjing 210093, China

摘 要 在以前的研究中,通过蛋白质工程技术获得了三突变体白细胞介素-2 基因(编码 125 位半胱氨酸→丙氨酸;18 位亮氨酸→蛋氨酸;19 位亮氨酸→丝氨酸),并在毕赤酵母中加以表达。进一步优化表达条件,其最适诱导条件:80%以上的通气,诱导 2 d,初始 pH6.0,甲醇终浓度为 1.0%。在上述条件下表达量占菌体总蛋白的 30%以上,大约 200mg/L。建立了一套从毕赤酵母表达上清中分离纯化分泌型表达蛋白 IL-2 的方法,经离心,超滤浓缩,强阳离子交换 S 柱和分子筛层析得到纯化的突变型和野生型 IL-2;其得率为 27%,纯度达电泳纯并且 HPLC 检测只有一个峰。纯化的突变蛋白对 CTTLL-2 细胞具有刺激性;与野生型 IL-2 相比,在各种温度条件下储存的突变蛋白保留有更高的活性;突变型 IL-2 的活力是野生型的 4~5 倍,具有更高的利用价值。

关键词 纯化,高效分泌表达,突变型人白细胞介素-2,毕赤酵母

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0430-05

Abstract Interleukin-2 (IL-2) was initially isolated as a T cell growth factor and had been shown to direct the expansion and differentiation of several hematopoietic cell types. Clinical studies using IL-2 in the treatment of AIDS have been encouraging, due to its critical role as a proliferative signal for activated T-lymphocytes. IL-2 has also undergone trials in the treatment of several types of cancer, based on its stimulation of cytotoxic, antitumor cells. Today, human IL-2 is produced completely by genetically engineered method, and it has been proved that genetically engineered recombinant human IL-2 has almost the same function and clinical effect as wild IL-2. In the former study, recombinant human IL-2 usually comes from *E. coli*, in this paper the mutant IL-2 was successfully expressed and purified in *Pichia pastoris* for the first time. As a eukaryote, *Pichia pastoris* has many of the advantages of higher eukaryotic expression systems such as protein processing, protein folding, and posttranslational modification, while being as easy to manipulate as *E. coli* or *Saccharomyces cerevisiae*. It is faster, easier, and less expensive to use than other eukaryotic expression systems such as baculovirus or mammalian tissue culture, and generally gives higher expression level. Expression conditions of human mutant interleukin-2(the codon for cysteine-125 of human IL-2 with alanine;

Received: October 29, 2004; Accepted: December 28, 2004.

This work was supported by a grant from Scientific Research Fund in Southwest China Normal University.

* Corresponding author. Tel: 86-25-83593692; E-mail: liuyan922@263.net; liuyan922@hotmail.com

西南师范大学科学基金项目。

the codon for leucine-18 with methionine; the codon for leucine-19 with serine) in the recombinant *Pichia pastoris* strain were optimized via test of some factors such as the rate of aeration, the inductive duration, the initial pH and the concentration of methanol. The results from tests showed that the most important parameter for efficient expression of interleukin-2 in recombinant *Pichia pastoris* strain is adequate aeration during methanol induction, and the optimum inductive condition for interleukin-2 expression was: more than 80% aeration, 2 days for induction, the initial pH of 6.0, the final methanol concentration of 1.0%. With this condition, the expressed IL-2 was secreted into fermentation broth and reached a yield of 30%, approximately 200 mg/L. Expressed interleukin-2 (MvIL-2) was isolated and purified by centrifugation, millipore filtration to concentration, Econo-PacS strongly acidic cation exchanger cartridge and molecular sieve chromatography and the yield of MvIL-2 was 27%. MvIL-2 was purified to electrophoretic purity by SDS-PAGE and only one peak being loaded on HPLC. Purified MvIL-2 protein had stimulating activity similar to the wild type of IL-2 as assayed by IL-2-dependent CTLL-2 cells. However, the stability of MvIL-2 was superior than that of IL-2 at different temperatures. The activity of obtained MvIL-2 was 4~5 times of the wild type of IL-2, So MvIL-2 had an advantage over wild type of rhIL-2 in storage stability and activity.

Key words purification, secreted overexpression, human IL-2 mutant, *Pichia pastoris*

白细胞介素-2(IL-2)是免疫调节中起核心作用的一种疏水蛋白质,分子量为 15 kD;其各种生物学活性包括促进 T 淋巴细胞增殖以及增强自然杀伤细胞的活性^[1]。它有一对二硫键(Cys58/Cys105)和一个自由的 125 位半胱氨酸。

白细胞介素-2(IL-2)通常用大肠杆菌 *E. coli* 作为宿主进行表达纯化^[2]。在以往的文献^[3]报道中,重组 IL-2 经变性剂 6mol/L 盐酸胍(GuHCl)抽提变性;重新折叠/氧化复性后才能从 *E. coli* 中纯化并达到分析规模。在这些研究中重组 IL-2 的纯化最大不超过 5mg/L 的水平,因此大肠杆菌 *E. coli* 制备 IL-2 有一定的局限性。

另外大肠杆菌 *E. coli* 是一种原核表达系统,而巴斯德毕赤酵母表达系统作为真核表达系统,具有许多其它蛋白表达系统所不具备的优点^[4]。本文在构建突变型人白细胞介素-2 基因并在巴斯德毕赤酵母中初步表达^[5]的基础上,进一步优化发酵条件,首次从毕赤酵母表达分泌上清液中纯化出分泌的突变型人白细胞介素-2。纯化步骤简单可行,适合工业化生产,每升大约可得白细胞介素 50mg 左右。所获得的突变型 IL-2 纯品比活性为 4.0×10^7 IU/mg 蛋白,比天然型 IL-2 高 5 倍左右,可望作为一类新药作进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:宿主菌为毕赤酵母菌株 KM71,表达质粒为携带有人突变型或野生型白细胞介素-2(IL-2)的 pPIC9K,由本室构建完成,保存于 -70°C , 15% 甘油中。

1.1.2 试剂:蛋白胍(bacto-tryptone)和酵母粉(bacto-yeast extract)均为 OXOID 公司产品,丙烯酰胺

(Acrylamide)、N,N-甲叉双丙烯酰胺(N,N-Methylene-Bis-Acrylamide)及考马斯亮蓝 R250 为 Sigma 公司产品,蛋白标准品(middle range)为 BIO-RAD 公司产品,苯甲基磺酰氟(PMSF)为 NORTH-BIO 公司产品,强酸性阳离子交换剂($-\text{SO}_3^-$)及强碱性阴离子交换剂($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$)为 BIO-RAD 公司产品,葡聚糖凝胶(SephadexG-100)为 Pharmacia 公司产品,其余为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基:LB;LA;RDB(%):山梨醇 1mol/L,葡萄糖 1,YNB 1.34,生物素 4×10^{-5} ,氨基酸 0.005(L-谷氨酸, L-蛋氨酸, L-赖氨酸, L-异亮氨酸);YPD(%):蛋白胍 2,酵母提取物 1,葡萄糖 2;BMGY(%):YNB 1.34,蛋白胍 2,酵母提取物 1,生物素 4×10^{-5} ,甘油 1100mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.0)配制;BMMY(%):YNB 1.34,蛋白胍 2,酵母提取物 1,生物素 4×10^{-5} ,甲醇 0.5~3,100mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.0)配制。

1.1.4 主要仪器设备:超速冷冻离心机(Sorvall RC28S)为 DUPONT 公司产品,紫外-可见分光光度计(6010)为上海惠普分析仪器厂产品,电泳仪(Mini PROTEAN 3cell)为 Bio-Rad 公司产品,超滤浓缩系统(Labscale)为美国 Millipore 公司产品,真空冷冻干燥仪为美国 FTS SYSTEMS 公司产品,蛋白纯化系统(Biological LP)为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 工程菌的发酵^[6]及条件的优化:将保存的突变型和野生型 IL-2 工程菌^[5]分别接种于 2 mL YPD 培养基中,过夜培养,以 1% 接种入含 100 mL BMGY 的 500mL 三角瓶。30 $^\circ\text{C}$ 300r/min 培养至 $OD_{600} = 3 \sim 6$ (大约 16~18 h)。弃上清液并将菌体细胞沉淀悬浮在 1/5 或 1/10 倍原初始培养液体积的 BMMY 培养

基中,每隔 24 小时加入甲醇使其终浓度分别为 0.5% 到 5% 进行诱导。优化发酵条件:通气状况、诱导时间、初始 pH 值等。一旦最佳条件确定,则可以按比例放大,从摇瓶培养转至大规模发酵。

1.2.2 人重组白介素-2(rhIL-2)粗提液的获得及超滤浓缩:甲醇诱导 2 d 后,4℃,15000 r/min 离心 10 min,上清液立即加入 PMSF(丝氨酸蛋白酶的抑制剂)至 1 mmol/L 或者 5~10 mmol/L EDTANa₂,防止蛋白酶的作用。上清液用 0.45 μm 膜过滤得到 rhIL-2 粗提液 200 mL,用 MW = 30000 的膜截流,加双蒸水(相当于 5 个体积的发酵液),循环滤过,最后弃去杯中浓缩液(很少),除去 MW 大于 30000 的杂质。收集过滤液(含有 IL-2)。

再用 MW = 10000 的膜截流,加 50 mmol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH3.5)约 5~10 个体积(将杯内的滤过液替换成缓冲液),浓缩成约 200 mL(或更少),除去 MW 小于 10000 的杂质并浓缩。

1.2.3 强阳离子交换 S 柱离子交换色谱:强酸性阳离子交换树脂(Bio-Rad 公司 Macro-PrepS Support,作用基团:-SO₃⁻),柱体大小:2.5cm × 30cm,以 pH3.5,含 50mmol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(工作液)充分平衡,rhIL-2 粗提液上柱,用工作液淋洗至无蛋白流出,再用含 0~1mol/L NaCl 的工作液进行洗脱,流速 10mL/h,收集各峰,测定蛋白质含量,电泳以确定目标蛋白的洗脱组分,收集 rhIL-2 纯度较高的组分。

1.2.4 SephadexG-100 凝胶过滤色谱:SephadexG-100 凝胶柱(1.5cm × 80cm)以 pH7.0,含 5mmol/L EDTANa₂,2mmol/L 巯基乙醇的 0.1mol/L NH₄Ac 缓冲液充分平衡,将 1.2.3 收集到的含 rhIL-2 的组分经脱盐,冷冻干燥后溶于少量 pH7.0(0.1mol/L)乙酸铵缓冲液后上样,用上述平衡液进行洗脱,流速 20mL/h,收集各峰,测定蛋白质含量并作电泳分析。

1.2.5 纯度鉴定及分子量测定:样品进行 SDS-不连续缓冲系统聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[7]。

1.2.6 菌体浓度和干重:菌体浓度使用分光光度计测 600nm 的光吸收值 OD₆₀₀,样品稀释至 OD 值在 0.1~0.7 之间。取不同 OD 值的发酵菌悬液经 5000r/min 离心 30min,用 PBS 清洗 2 次,离心,称菌体湿重。将湿菌体在 90℃ 烘干至恒定值,用微量分析天平称细胞干重,吸光度与细胞干重在一定范围内呈线性。

1.2.7 重组蛋白表达量的测定和蛋白质浓度测定:用常规 SDS-PAGE 凝胶电泳检测^[7],由 FR-980 凝胶电泳分析仪测定 rhIL-2 占菌体总蛋白的百分含量。菌体总蛋白浓度测定采用 Bradford 法^[8],以 BSA 为标准品。

1.2.8 活性测定:IL-2 生物活性测定,是检测 IL-2 激活的 IL-2 依赖性细胞 CTLL 的增殖程度,用 MTT 检测法来测定^[9,10]。

2 结果与讨论

2.1 工程菌表达条件优化

2.1.1 诱导时间的影响:考察诱导时间可以了解外源蛋白分泌表达和菌体生长的情况,并可据此判断发酵结束的时间。以含 0.5% 甲醇的 BMMY 培养基进行诱导,每 12 小时取样,平行实验 3 次,检测结果见图 1。从 12 h 开始,随时间延长表达量逐渐增加,培养 48h 达到高峰值,占总蛋白 38%,然后缓慢下降,而菌体浓度变化不大。

2.1.2 甲醇诱导浓度的影响:按摇瓶培养法每隔 24h 分别补加甲醇使其终浓度为 0.5%、1%、1.5%、2%、3%、4%、5%,诱导培养 48h。平行实验 3 次以上,结果如下:当甲醇诱导浓度为 0.5% 时,其残留浓度较低,同时细胞光密度也较低,说明此时甲醇成为限制性底物;当甲醇浓度为 1% 时,其残留浓度较低但 OD₆₀₀ 最大,说明在其他条件不变的情况下此浓度最适于菌体生长;当甲醇浓度大于 1.5% 后,其残留浓度较高,OD₆₀₀ 下降,说明在此浓度范围细胞生长受到抑制。从毕赤酵母表达目的蛋白量来看,在甲醇浓度为 1% 时达到最高。

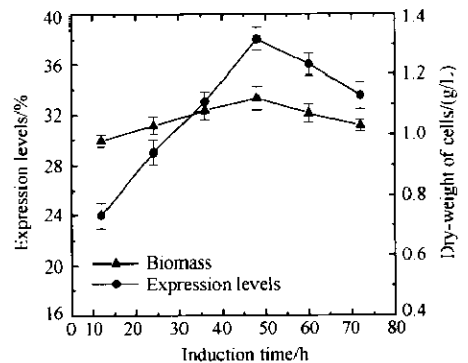


图 1 诱导时间对菌体生长和 rhIL-2 表达的影响

Fig. 1 Effect of different time for induction on cell growth and rhIL-2 production

本研究表明,白细胞介素-2 的毕赤酵母摇瓶发酵的最佳条件如下:以 BMGY 作为种子培养基,菌体密度 OD₆₀₀ 达到 9 时,重悬于 1/5 体积的 BMMY 中开始诱导表达,此时菌体密度相当于 OD₆₀₀ 达到 45,甲醇诱导剂量为 1%,pH 值 6.0,诱导 2d,产量达高峰期,最大表达量为 0.204g/L。

2.2 rhIL-2 纯化

rhIL-2 粗提液经强阳离子交换 S 柱色谱,得到四个峰(图 2),电泳鉴定其中 0.55mol/L NaCl 洗脱组分为 rhIL-2,位于第 4 峰,纯度达 85%。

离子交换分离得到的较纯的 rhIL-2 经 Sephadex G-100 凝胶过滤色谱分离,得到 3 个组分(图 3),电泳鉴定 rhIL-2 位于第 2、3 峰间,靠近 3 峰,合并样品 46~48 管,电泳鉴定为单一条带(上样量 20 μ g),纯

度为 98%。纯化样品的电泳结果如图 4。纯化过程总的回收率 27%,见 Table 1。将最后纯化得到的 rhIL-2 上高压液相色谱(HPLC),只有一条带(图 5)。

表 1 重组 IL-2 的纯化

Table 1 Summary of rhIL-2 purification protocol

Step	Total protein /mg	Total volume/mL	IL-2 ^② /mg	Purity /%	Purification multiple	Recovery /%
Ferment supernatant ^①	134.0	200	41.5	31	1.0	100
Superfiltration Concentrate	103.9	50	37.4	36	1.2	90
Cation-exchange resin(S)	19.1	80	16.2	85	2.7	39
Sephedex G-100	11.4	7	11.2	98	3.2	27

① Ferment supernatant was obtained from 1000ml BMGY culture medium about 10g *P. pastoris* strains as the method 1.2.1.

② Content of IL-2 was determined by optical density after SDS-PAGE, and corrected by purified standard IL-2.

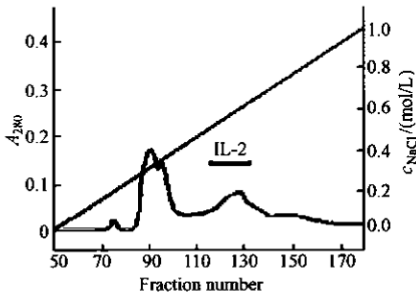


图 2 离子交换柱层析纯化重组人白介素-2

Fig.2 Strong cation-exchange resin S exchange Chromatography of rhIL-2 crude extract

Column size: 1.5cm \times 30cm; Flow rate: 20ml/h; Gradient elution: BufferA (pH3.5, 50mmol/L HAC-NaAc), BufferB (1mol/LNaCl, pH3.5, 50mmol/L HAC-NaAc).

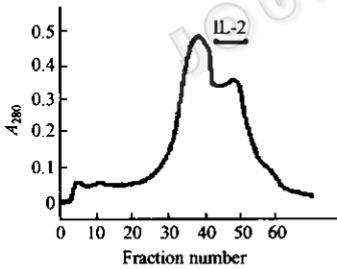


图 3 分子筛层析纯化重组人白介素-2

Fig.3 SephadexG-100 gel filtration chromatography of rhIL-2

Column size: 1.5cm \times 80cm; Flow rate: 20ml/h; Elution: pH7.0, 5mmol/L EDTANa₂-2mmol/L mercaptoethanol-0.1mol/L NH₄Ac.

2.3 分子量的测定

6 种标准蛋白分子量分别为 94kD、67kD、43kD、30kD、20kD、14.4kD(图 4),将其迁移率对分子量的对数作图,所得标准曲线为 $\lg M_r = 4.962 - 1.168R_f$,相关系数 $r = -0.986$ ($P < 0.001, n = 5$)。将 rhIL-2 迁移率代入计算得分子量为 14.5kD,与理论值 15kD 相差小于 5%,基本符合。

2.4 生物活性测定

上述纯化所得的 rhIL-2 纯品用 MTT 法测活,每

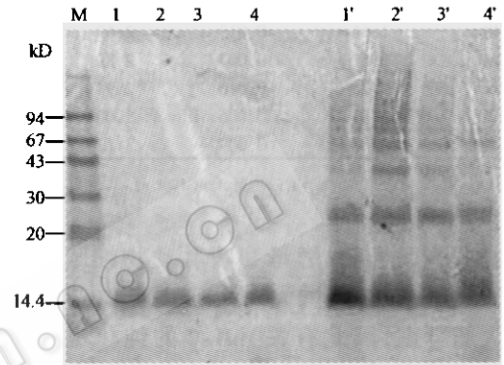


图 4 纯品考马斯亮蓝 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of coomassie blue staining purified rhIL-2

1,2: wild-type sample (pure);3,4: mutant sample (pure);1',2': wild-type sample (before purification); 3',4': mutant sample (before purification).

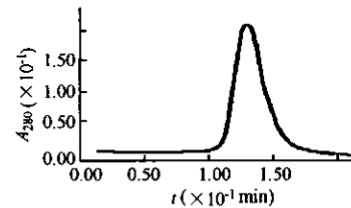


图 5 人重组 IL-2(C125A/L18M/L19S)纯品在 HPLC 纯化分析图

Fig.5 Patterns of purified hIL-2(C125A/L18M/L19S)

loaded on HPLC

Sample: IL-2-x, Channel, UV484/280NM, Filename: IL-2-x; Technique: C:/MAX/DATA₁/IL-2-x.

微克 IL-2 加入 50 μ g 牛血清白蛋白(BSA)定容于 50mmol/L 乙酸铵 pH4.0 中,冷冻干燥成干粉。用 MTT 法测活前,溶解于 4mmol/L HCl 中并达到含 0.1% BSA,制成 IL-2 终浓度为 1 μ g/mL 的缓冲液,并用 0.2 μ m 微孔滤膜过滤。表 2 显示该样本两次测活的结果。每一次测活代表同一样本重复 3 次。结果显示样本两次测定虽有差异,但突变型 IL-2 引起

CTL-2 细胞的增殖明显高于野生型 IL-2,并可从中计算出突变型 IL-2 的活力是野生型 IL-2 的 4.4 倍。

表 2 MTT 法对重组天然 IL-2 和突变 IL-2 的活性测定
Table 2 MTT assay for recombinant IL-2 and IL-2 mutant protein

IL-2 (pg/mL)	$A_{570-A690}$			
	WT		MT	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
0	0.01	0	0.01	0
10	0.13	0.005	0.24	0.006
20	0.19	0.007	0.43	0.013
40	0.34	0.010	0.62	0.013
80	0.45	0.011	0.91	0.012
160	0.62	0.011	1.73	0.037
320	0.92	0.009	2.45	0.012
640	1.66	0.013	2.69	0.031
1280	2.52	0.007	2.89	0.027
2560	2.73	0.016	2.94	0.018
5120	2.83	0.006	3.08	0.012
10240	2.88	0.009	3.12	0.015

① Wild type IL-2 $P < 0.05$ $n = 6$; ② Mutant type IL-2.

利用大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞已成功表达了重组人 IL-2,不过大量生产重组 IL-2 主要还是使用大肠杆菌,因此有关 rhIL-2 的纯化也多限于从大肠杆菌中提取。从大肠杆菌中生产重组 IL-2 的方法已成熟^[3,11]。虞建良^[12](1995 年)构建了 IL-2 的高效表达质粒,获得了高产工程菌株,并建立了目前国内外最为简单迅速而高效的 IL-2 纯化方法。

本文首次在巴斯德毕赤酵母中表达与纯化分泌型天然及突变型 rhIL-2,从该表达系统中纯化 rhIL-2 是一个全新的探索过程,用大肠杆菌生产 rhIL-2 首先遇到的就是包含体的处理问题。无论采用促溶剂盐酸胍或尿素还是表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)两种方法,促使 rhIL-2 从包含体中溶出,但都存在一定的缺点,如 SDS 可与 IL-2 结合,盐酸胍和尿素会使大量杂蛋白与 IL-2 一起进入沉淀,造成进一步纯化困难。用巴斯德毕赤酵母表达的 rhIL-2 是分泌型的,即 rhIL-2 在诱导表达过程中直接分泌到发酵液中,突破了大肠杆菌对包含体的处理问题及 rhIL-2 的变性、复性问题。

将发酵液离心除去菌体,经 SDS-PAGE 检测上清, rhIL-2 占有被分泌蛋白的 30% 以上,背景蛋白相对较少。离心获得的含有 rhIL-2 的上清液进一步纯化脱盐,考虑到分泌型表达产物的发酵液的体积很大,但浓度较低,因此第一步处理选用超滤浓缩,使浓缩、脱盐且更换缓冲液一步完成,并且在一定程度上去除杂蛋白,这样得到的含 rhIL-2 浓缩液可以直接上离子交换柱。离子交换柱选用强阳离子交换柱, pH3.5,在这个 pH 下 IL-2 是可溶的,并且经 NaCl

梯度洗脱可达到 39% 的回收率。而且大多数毕赤酵母蛋白不会吸附到这种树脂上,可以获得很好的纯化效果,洗脱后可以得到 85% 纯度的 IL-2。凝胶过滤色谱放在最后一步不仅起到进一步纯化的结果,而且可以直接过渡到适当的缓冲体系中,以利于产品成型保存。纯化过程简单迅速,费用低廉,只是得率有待进一步提高。

为了在相同条件下比较白细胞介素-2 突变型蛋白与野生型蛋白的特性,我们同时对两种蛋白进行了表达与纯化。虽然突变型蛋白在三个氨基酸位点上发生了改变,但在毕赤酵母中由于属于分泌表达,不存在变性、复性、二硫键错配的问题,并且产生的突变蛋白只是引起胞内小体中 pH 值的微小变化,对纯化没有影响。两种蛋白的表达纯化过程完全相同。纯化得到的变异 IL-2,其活性比野生型 IL-2 高 4~5 倍,这与作者的初衷相符,即期望得到一高活性,低毒性的新型 IL-2。正是由于其高活性,因而对其作进一步的毒理实验,动物实验等便显得很有意义,将其开发成一类新药便有了一定的基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Guo BY (郭葆玉). Genetically Engineered Pharmacology. Shanghai: Second Military Medical University Press, 2000
- [2] Wang Y, Li L, Liu JF et al. The analytic domain of IL-2. *Biochem Biophys Res*, 1997, **230**(3):542-545
- [3] Weir MP, Sparks J, Chaplin AM. Micropreparative purification of recombinant human interleukin-2. *Journal of Chromatography*, 1987, **396**:209-215
- [4] Higgins DR, Cregg JM. *Pichia* protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2001, pp.134-136
- [5] Liu Y(刘堰), Hu YH(胡应和), Ouyang KQ(欧阳克清) et al. Expression of a new type human interleukin-2 gene in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2003, **19**(5):618-624
- [6] Multi-Copy *Pichia* Expression Kit Instruction Manual. Invitrogen.com, 1996, pp.37-40;44-46
- [7] Guo YJ(郭尧君). Protein Electrophoretic Technique. Beijing: Science Press, 1998
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248-254
- [9] Dariusz S, Sarah J, Steer RH. An improved MTT assay. *J Immunol Methods*, 1993, **157**:203-207
- [10] Sun WM(孙卫民), Wang HQ(王惠琴). Methodology Studies on Cell Factors. Beijing: People Press, 1998
- [11] Weir MP, Sparks J. Purification and renaturation of recombinant human interleukin-2. *J Biochem*, 1987, **245**:85-91
- [12] Yu JL(虞建良), Fan PF(范佩芳), Zheng HD(郑宏大) et al. High expression and purification of human interleukin-2 in *E. coli*. *Science in China, Ser B*(中国科学 B 辑), 1995, **25**(10):1063-1069