

基因工程人 γ 干扰素 C 端的结构分析及功能作用

王海波 徐来根 吴高德 夏其昌*

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

应国光 王兴娟 童葵塘

(卫生部上海生物制品研究所, 上海 200052)

摘要 基因工程人 γ 干扰素经溴化氰裂解后进行 HPLC 分析, 发现 C 端肽缺失。毛细管电泳 (CE) 及氨基酸序列定量分析结果进一步指出, 其 C 端不仅缺失, 而且不均一, 分别以 Lys-125, Lys-128 和 Lys-130 为末端。用 WISH/VSV 系统测定其抗病毒效价, 比活性为 3×10^7 IU/mg, 说明其 C 端缺失 13—18 个氨基酸残基时并不影响活性。本文还讨论了 C 端断裂的可能原因。

关键词 基因工程 γ 干扰素, C 端分析, 肽谱, 蛋白质序列分析

γ 干扰素是细胞分泌的一类功能调节蛋白, 它的重要生物学作用以及临床用于免疫功能低下和肿瘤治疗的价值是引人瞩目的。用基因工程技术由大肠杆菌中克隆和表达人 γ 干扰素在国内已获得成功。理论上它应由 143 个氨基酸残基组成, 分子量为 16 775Da。几个实验室报道缺失 C 端 11—18 个氨基酸残基, 活性部分丧失或完全丧失^[1-3], 但 Kung 等人^[4]报道缺失 15 个氨基酸残基时, 对活性并无影响。Luk 等人^[5]报道缺失 21 个氨基酸残基时, 其抗病毒和抗细胞增殖活性仅分别下降 2 倍和 3 倍。因此 C 端缺失与活力的关系尚是一个有争议的问题^[6, 6']。

本文报道用溴化氰裂解 γ -干扰素, 用 HPLC 反相柱进行肽谱分析, 并用毛细管电泳 (CE) 及蛋白质/多肽序列仪对各色谱峰进行分析测定, 结果指出基因工程人 γ 干扰素的 C 端缺失是不均一的, 分别丢失 13, 15, 18 个氨基酸残基。用 WISH/VSV 系统测定其抗病毒效价, 比活性为 2.78×10^7 — 3.22×10^7 IU/mg, 说明其 C 端缺失不影响活性。

1 材料与方 法

1.1 基因工程人 γ 干扰素的制备与纯化

带有 γ 干扰素基因的杂交质粒 pBV220 转染大肠杆菌 DH5 α 株, 建成高效表达的工程菌株, 经发酵培养, 匀浆后收取包涵体, 提取干扰素并加以复性, 然后用柱层析法加以浓缩纯化, 用于本研究的是高度纯化的基因工程人 γ 干扰素 9202, 9203 和 9204 批。

本文系“863”计划资助研究项目。

* 通讯联系人。

本文于 1992 年 6 月 17 日收到。

1.2 生物学活性测定方法

测定 γ 干扰素的抗病毒活性, 用 WISH 细胞/VSV 系统, 用日本 NIH 供给的参考品的复制品校准为国际单位 (IU)。

1.3 SDS-PAGE 电泳

SDS 浓度为 0.1%, 分离胶浓度为 15% 丙烯酰胺, 浓缩胶为 4.5% 丙烯酰胺, 加样量 5 μ g, 在 40—120V 电泳 5 小时后用银染色。纯度测定将染色后的凝胶在岛津 CS-910 双波长薄层扫描仪上进行。

1.4 产品的溴化氰裂解

γ 干扰素 300 μ l (约 100 μ g) 用反相柱 RP-300 脱盐, 收集 γ 干扰素峰, 冷冻干燥, 溶解于 70% 甲酸中, 加 200 μ g 溴化氰 (2 μ mol) 充氮气, 避光反应 24—48 小时。加超纯水 1ml 搅匀, 冷冻抽干, 并重复一次。

1.5 色谱条件

色谱仪: Beckman System Gold; 柱: RP-300 (Aquapore 30mm \times 2.1mm); 流动相为 A: 0.1% TFA, B: 0.085% TFA/ACN; 梯度: 0—50% B, 50 分钟, 220nm 检出; 0.1AUFS。

凝胶色谱仪: LKB HPLC 系统; 柱: TSK G2000SW 300mm \times 7.5mm; 流动相: 20mmol/L 磷酸缓冲液; 0.3mol/L NaCl, pH7.5 280nm 检出; 0.04AUFS

1.6 毛细管电泳条件

毛细管电泳仪: ABI 公司 270 A 型; 电泳条件: 100mmol/L 磷酸-10mmol/L 氯化钠缓冲液, pH2.5; 20kV, 40 μ A, 30 分钟, 214nm 检出, 0.005AUFS。

1.7 蛋白质序列测定

Applied Biosystems Inc. 477A/120A 液相脉冲蛋白质序列仪, 按标准程序操作。

2 结 果

2.1 产品的纯度及分子量测定

反相 HPLC (图 1) 和凝胶过滤 HPLC (图 2) 的结果表明产品为均一的峰。SDS-PAGE 电泳表明 3 批中试半成品纯度在 99% 以上, 二聚体小于 0.88%, 其分子量约为 14.8kDa (表 1)。

表 1 SDS-PAGE 测定纯度的结果

Table 1 Determination of purity by SDS-PAGE

Batch	Non-reduced electrophoresis			Reduced electrophoresis			Molecular weight (kDa)
	Monomer	Dimers	Total	Monomer	Dimers	Total	
9202	99.12	0.88	99.99	99.84	0.15	99.99	14.8
9203	99.70	0.29	99.99	98.93	0.62	99.55	15.1
9204	99.40	0.59	99.99	99.44	0.16	99.60	14.6

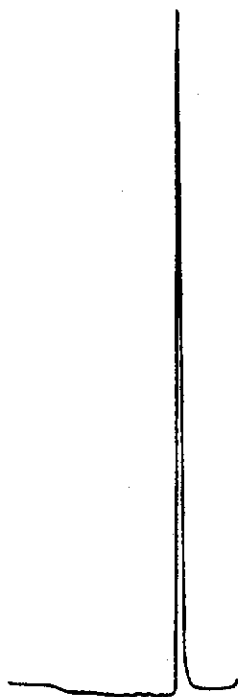


图 1 γ -IFN 的 HPLC 反相色谱图
Fig. 1 RP-HPLC pattern of γ -IFN

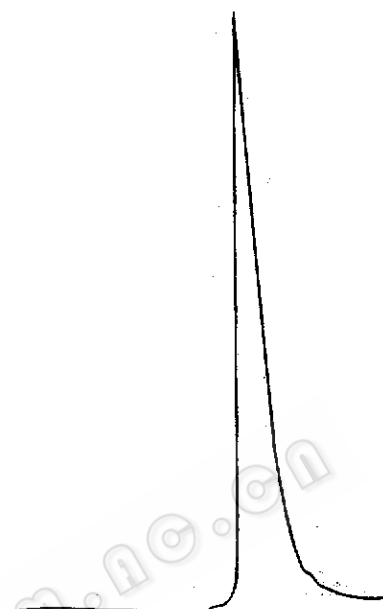


图 2 凝胶色谱图
Fig. 2 Gel permeation chromatography of γ -IFN

2.2 生物活性及比活性

此 3 批纯化基因工程人 γ 干扰素的蛋白含量和效价比较接近, 比活性在 2.78×10^7 — 3.22×10^7 IU/mg 之间, 说明比活性与国际上报道的一致 (表 2)。

表 2 3 批中试制品的蛋白含量、效价和比活性

Table 2 Protein amount, titer and specific activity in three samples

Batch	Protein amount ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Titer ($\times 10^7$ IU/ml)	Specific activity ($\times 10^7$ IU/mg)
9202	404	1.3	3.22
9203	464	1.3	2.78
9204	368	1.1	3.01

2.3 肽谱分析

经溴化氰裂解后的 γ 干扰素配成浓度约 $100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$, 进行 HPLC 分析, 结果如图 3 所示。收集各峰并根据洗脱顺序分别命名为 Cn I, Cn II, Cn III, Cn IV 和 Cn V。

2.4 N 端各肽段氨基酸序列的分析

从 HPLC 上收集的各峰, 经冷冻抽干在 ABI 477A/120A 蛋白质序列仪上进行序列分析, 结果如下:

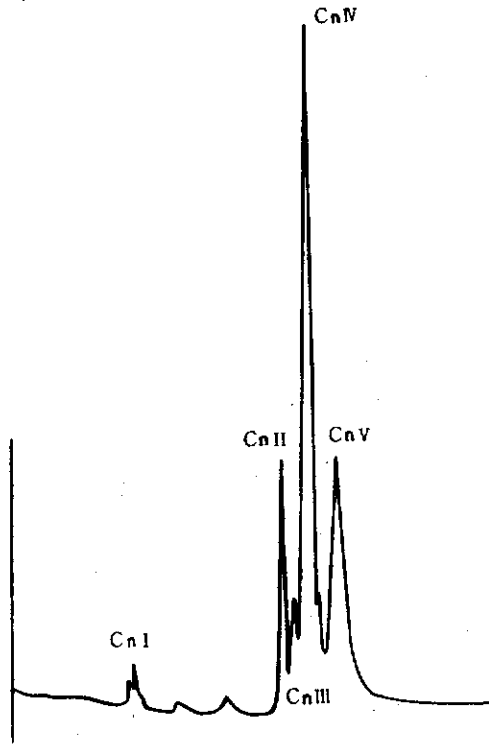


图 3 γ -IFN 的 CNBr 裂解产物肽谱图

Fig. 3 Peptide mapping of γ -IFN after CNBr cleavage

Cn-I	Ala-Glu-Leu...	(No. 118—134)
Cn-I	Asn-Val-Lys...	(No. 78—117)
Cn-III	Asn-Val-Lys...	(No. 78—117)
Cn-IV	Met-Glu-Asp...	(No. -1—45)
	Glu-Ser-Glu...	(No. 46—77)
Cn-V	Met-Glu-Asp-Pro...	(No. -1—45)

Cn-I 与 Cn-III 的 N 端是相同的, Cn IV 中的一个肽和 Cn-V 也是相同的, 可能它们为同一段肽, 由于 Met 在溴化氰裂解时, 部分转变成高丝氨酸, 部分转变成高丝氨酸内酯, 从而造成疏水性的不同而在反相柱上区分开来, 未发现 No. 135—143 九肽, 说明 C 端肽缺失。

2.5 毛细管电泳 (CE) 分析

从 HPLC 上收集的各峰, 经冷冻抽干后用毛细管电泳分析。结果如图 4 所示。Cn IV 在 CE 上为两个峰, 这与 477A/120A 上 N 端的测定结果一致。说明毛细管电泳与液相色谱技术由于分离原理的不同, 在分析检定方面有其互补性。

Cn I 在 HPLC 上呈现不均一, 而在 CE 图上明显的表现为几个峰 (图 5), Cn I 在 477A/120A 液相脉冲蛋白质序列仪上的 N 端测定结果显示它们为一个 N 端, 推测 Cn I 的不均一性可能是 C 端参差不齐而导致的。



图 5 Cn I 的 CE 分析

Fig. 5 CE pattern of Cn I

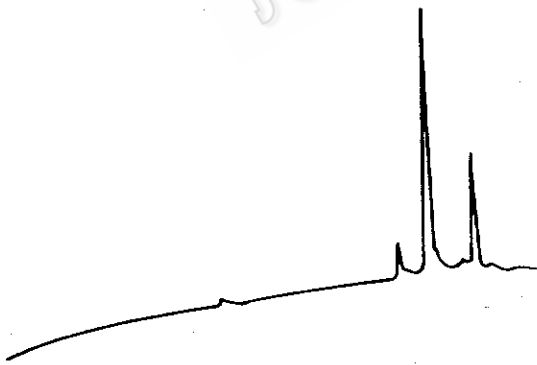
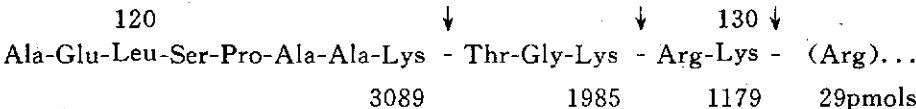


图 4 Cn IV 的 CE 分析

Fig. 4 CE pattern of Cn IV

2.6 C 端不均一性的检出

鉴于 Cn I 在 CE 图上不均一, 而 N 端整齐, 我们用大量样品 (>3nmols) 进一步分析了 Cn I 肽段的全部氨基酸残基序列, 定量结果为:



可以认为 C 端至 Lys-130 为止, 而在 No-125, No-128 也有部分断裂, 各自约占 1/3, 这

与 CE 结果 (图 5) 相符。

3 讨 论

目前国际上对 γ 干扰素 C 端缺失与生物活性的关系有不同的报道^[1-5]。我们初步的结果显示 C 端缺失 13—18 个氨基酸残基, 对生物活性并无明显影响, 目前我们尚未能把干扰素 1—125, 1—128, 1—130 的产品分开并和完整的基因工程人 γ 干扰素 (1—143) 作进一步的比较。但根据比活性已达到一个很高的水平, 如果其中一部分活性丧失, 将会明显导致产品的比活性下降, 由此推测缺失的部分不是功能所必需的部分。Luk 等人^[6]认为导致几个实验室错误地认为 C 端为功能所必需的原因, 是复性失败所造成的。Luk 认为尽管 C 端不为功能所必需, 但它对复性是重要的。

γ 干扰素有 4 个 Met, 因此 CNBr 裂解肽谱应有 5 个峰, 我们的 HPLC 肽谱也确有 5 个峰, 但进一步的肽峰序列分析说明, 仅仅证实 5 个肽峰的肽谱是不够的, 还需要有进一步的数据来阐明。同时由于发现产品 C 端不均一, 我们最近再次验证所用样品在 cDNA 上是完整的, 即 C 端不均一性是表达后所造成的。这些都说明了在蛋白质水平上分析鉴定基因工程产品的重要性。

Rose 等^[6]认为基因工程人 γ 干扰素 C 端的缺失, 可能是由于大肠杆菌中的膜蛋白酶造成的, 但对其性质知之甚少。我们的结果显示此种蛋白酶的专一性可能是在 Lys-X 肽键上。若在生产过程中加入一些蛋白酶抑制剂, 例如 Tosyl Lysyl Chloro-methyl Keteone (TLCK) 和 Phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF) 将会有利于抑制这种蛋白酶的作用。对这种蛋白酶进行研究, 比较它与 Endoproteinase Lys-C^[8,9]是否具有相同的专一性, 也是有实际意义的课题。

参 考 文 献

- [1] Arakawa T *et al.* J Biol Chem, 1986, 261: 8534.
- [2] Garotta G *et al.* J Interferon Res, 1987, 7: 685.
- [3] Seelig G F *et al.* Biochemistry, 1988, 27: 1981.
- [4] Kung H F *et al.* Methods Enzymol, 1986, 119: 204.
- [5] Luk S Ka-Shing *et al.* J Biol Chem, 1990, 265: 13314.
- [6] Rose K *et al.* Biochem J 1983, 215: 273.
- [7] Allen G Sequencing of Poteins and Reptides. Elsevier Science Press 1989, pp. 95—99.
- [8] Tarr G E *et al.* Proc Natl Acad Sci, U S A, 1983, 180: 6552.
- [9] Jekel P A *et al.* Anal Biochem 1983, 134: 347.

Analysis on Function and Structure of C Terminus of the Recombinant Human γ -Interferon

Wang Haibo Xu Laigen Wu Gaode Xia Qichang

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Ying Guoguang Wang Xingjuan Tong Kuitang

(Ministry of Public Health, Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai 200052)

Abstract The recombinant human γ -interferon has high biological activity and its N terminus is intact. The C terminal residues predicted from the DNA sequence were determined by analyzing and sequencing the peptides after CNBr cleavage. All fragments separated from the RP-HPLC were analyzed by capillary electrophoresis and sequenced by Edman degradation. It is found that the C terminus of the recombinant human γ -interferon was lost and heterogeneous. The clips occur at Lys-125, Lys-128 and Lys-130. The possible reason of C terminal heterogeneity of γ -interferon was also discussed.

Key words γ -Interferon, C terminal analysis, peptide mapping, protein sequencing