

重组人 $\alpha 2b$ 型干扰素的纯化与鉴定

周 圆 金冬雁 曾 庆* 李玉英 迟 捷 侯云德

(中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052)

摘 要 采用单克隆抗体亲和层析一步纯化法对大肠杆菌表达的重组人 $\alpha 2b$ 型干扰素 (IFN- $\alpha 2b$) 进行了纯化, 然后利用凝胶过滤高压液相层析、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 N 端 25 个氨基酸的序列测定等方法对纯化产品进行了鉴定, 表明一步纯化的 IFN- $\alpha 2b$ 达到 95% 以上的纯度, 其比活性为 2.54×10^8 u/mg。但重组 IFN- $\alpha 2b$ 产品 N 端不均一, 含有约 30% 的去 Met 分子和约 70% 的带 Met 分子。从蛋白质序列的水平上证实, 本实验室用定位诱变法构建的 IFN- $\alpha 2b$ 基因在大肠杆菌系统中得到了正确的表达。

关键词 $\alpha 2b$ 型干扰素, 蛋白质纯化, N 端序列分析

人 $\alpha 2a$ 型干扰素 (IFN- $\alpha 2a$) 和人 $\alpha 2b$ 型干扰素 (IFN- $\alpha 2b$) 都是国际上已经大量生产和广泛应用的抗病毒及抗肿瘤多肽药物, 两者仅有一个氨基酸之差 (IFN- $\alpha 2a$ 第 23 位氨基酸为 Lys, 而 IFN- $\alpha 2b$ 则为 Arg), 但人 $\alpha 2b$ 型干扰素基因来自正常细胞, 而且 IFN- $\alpha 2b$ 在人体中产生抗干扰素和抗体的概率也较低^[1]。本实验室从国内现有的 IFN- $\alpha 2a$ 基因出发进行基因改造, 通过寡核苷酸介导的定位诱变, 成功地构建了人 IFN- $\alpha 2b$ 基因, 并在大肠杆菌系统进行了高效表达^[2]。

为研制和生产我国的基因工程 IFN- $\alpha 2b$ 产品, 亟需在扩大规模上进行 IFN- $\alpha 2b$ 的实验室纯化及鉴定, 在蛋白质序列的水平上探明经定位诱变得到的 IFN- $\alpha 2b$ 基因在大肠杆菌系统的表达情况。本文采用单克隆抗体亲和层析一步纯化法对大肠杆菌表达的重组人 IFN- $\alpha 2b$ 进行了纯化, 并利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、凝胶过滤高压液相层析、N 端氨基酸序列分析等方法进行了相应鉴定。

1 材料与方 法

1.1 质粒和菌株

IFN- $\alpha 2b$ 基因及该基因的高效表达质粒 pBV221/IFN- $\alpha 2b$ 均由作者构建^[2]。大肠杆菌 DH5 α 株的基因型为: F⁻ $\phi 80$ lacZ Δ M15 Δ lacU169 deoR endA1 recA1 hsdR17 thi-1 sup44 λ ¹ gyrA96 relA1, 购自美国 BRL 公司。

1.2 大肠杆菌的分批发酵培养

以加入氨苄青霉素的 SD-8 作为发酵培养基^[3], 在德国 B. Braun 公司制造的 Biostat 发酵罐 (体积为 5L, 使用体积为 4L) 中进行分批培养。首先使发酵罐内的溶氧浓度平衡至 100%, 然后按 1:100 接入 OD₆₀₀ 约为 1.0 的种子液, 初始发酵条件: 30℃、空气流量 0.9L/min, 转速 300r/min。首先通过提高转速 (300—800r/min), 然后通过提高空气流

本工作为国家 863 高技术研究发展计划生物领域资助项目, 已于 1992 年 5 月通过专家鉴定。

* 现工作单位: 广东省微生物学研究所。

本文于 1992 年 4 月 18 日收到。

量(0.9—3.0L/min)最后通过加入分子氧使溶氧浓度保持60%饱和,于30℃培养12小时,至 OD_{600} 达到15.0,升温至42℃诱导6小时,整个发酵过程中葡萄糖浓度保持在10g/L以上。

1.3 IFN- α 2b 的纯化

抗IFN- α 2a的单克隆抗体由美国S. Pestka教授赠送,抗IFN- α 2a单克隆抗体亲和层析柱由作者按常规的CNBr活化法与Sephacrose 4B偶联而成^[4]。高压液相层析装置(黄金系列)和Sphero-gel-TSK 3000SW凝胶过滤高压液相层析柱(粒度10 μ m,7.5 \times 300mm,由日本Toyo Soda制造公司生产)均购自美国Beckman仪器公司。

从分批发酵的培养物中收集菌体,加入1%体积的7mol/L盐酸胍裂解液在冰浴中搅拌1—2小时(或于4℃放置过夜)。于4℃以15000r/min的转速离心15min,除去沉淀。用25mmol/L Tris-HCl(pH7.6)将上清液稀释5—10倍后,再对此缓冲液透析过夜。离心并去除沉淀。取上清液用饱和度为80%的硫酸铵于4℃盐析过夜。离心并收集蛋白质沉淀,用去离子水溶解后,再分别对去离子水、0.01mol/L HCl(pH2.5)及25mmol/L Tris-HCl(pH7.6)各透析12小时。取透析物用PBS(pH7.5)平衡后,通过抗IFN- α 2a单克隆抗体亲和层析柱进行纯化,用0.1mol/L甘氨酸-HCl(pH2.5)洗脱IFN- α 2b。通过凝胶过滤高压液相层析(Sphero-gel-TSK 3000SW柱)对洗脱物进行分析鉴定,流动相为100mmol/L Tris-HCl(pH7.5),流速为0.2ml/min。

1.4 抗病毒活性检测

采用细胞病变抑制法进行测定^[5]。在96孔细胞培养板上接种WISH细胞,在37℃、5%CO₂的培养箱中培养24小时后加入4倍连续稀释的待测干扰素样品,继续培养过夜,用水泡性口炎病毒(VSV)攻击,24小时后观察细胞病变情况。以保护半数细胞免于发生病变的稀释度所含的干扰素量作为1单位(u),并以美国国立卫生研究院(NIH)提供的标准干扰素校准成国际单位(IU)。

计算比活性时用紫外吸收法测定蛋白质含量,但以N端序列分析的定量结果进行校正。

1.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按文献[6]进行。分离胶浓度为15%,浓缩胶浓度为4.5%,标准分子量参照蛋白购自瑞典Pharmacia公司。采用银氨溶液作为蛋白质染色剂,用BioRad 620型光密度扫描仪对染色湿凝胶进行扫描。

1.6 N端序列分析

在美国Applied Biosystems公司477A脉冲液相蛋白/多肽测序仪-120A PTH氨基酸分析仪(C₁₈反相微内径高压液相层析柱)上进行,方法参见文献[7]。测定时IFN- α 2b的上样量为500 pmol,上样前未对Cys作衍生化处理。

2 结 果

2.1 抗病毒活性

在相同条件下平行比较重组人IFN- α 2a和IFN- α 2b抗病毒活性的结果如表1所示,表中数据是3次重复测定的平均数。

表 1 IFN- $\alpha 2b$ 和 IFN- $\alpha 2a$ 的抗病毒活性比较Table 1 Comparison of the antiviral activity of IFN- $\alpha 2b$ and IFN- $\alpha 2a$

Type of IFN	Antiviral activity (IU/ (L · OD ₅₀₀))
IFN- $\alpha 2b$	4.09×10^8
IFN- $\alpha 2a$	1.52×10^8

从表 1 可以看出，同等量的细菌所表达的 IFN- $\alpha 2b$ 与 IFN- $\alpha 2a$ 其抗病毒活性无显著性差异 ($p > 0.05$)。

2.2 IFN- $\alpha 2b$ 的一步纯化

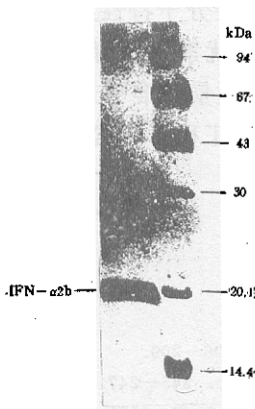
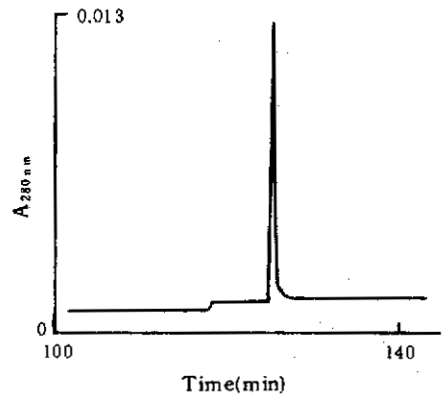
本实验所采用的一步纯化法，可将重组人 IFN- $\alpha 2b$ 纯化 500 倍，比活性达 2.58×10^8 IU/mg，总回收率达到 62% (见表 2)。推算 IFN- $\alpha 2b$ 在所采用的表达系统中的表达量及纯化回收率与已获准投产的 IFN- $\alpha 2a$ 相近⁽⁷⁾。

表 2 IFN- $\alpha 2b$ 的纯化Table 2 Purification of IFN- $\alpha 2b$

Procedure	Activity (IU/L, $\times 10^8$)	Specific activity (IU/mg)	Purification factor	Recovery (%)
Cell lysis	2.08	1.17×10^5	1.0	100
Acidification	1.52	5.08×10^5	4.3	73
Affinity Chromatography	1.28	2.54×10^8	500.0	62

2.3 纯化产物的鉴定

2.3.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳：图 1 是经过纯化的 IFN- $\alpha 2b$ 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图，图中呈现单一而清晰的 IFN- $\alpha 2b$ 条带，未见出现任何杂蛋白。对染色的湿凝胶进行光密度扫描，表明 IFN- $\alpha 2b$ 产品的纯度达到 97.8%。根据电泳迁移率推算，IFN- $\alpha 2b$ 的分子量约为 19kDa。

图 1 IFN- $\alpha 2b$ 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图Fig. 1 SDS-PAGE pattern of IFN- $\alpha 2b$ 图 2 IFN- $\alpha 2b$ 的高压液相层析洗脱曲线Fig. 2 HPLC profile of purified IFN- $\alpha 2b$

2.3.2 凝胶过滤高压液相层析:对纯化的 IFN- α 2b 进行凝胶过滤高压液相层析鉴定,表明样品中含有单一分子量的蛋白质,保留时间为 122—125min 的洗脱物占总洗脱物的 98.5%。层析谱见图 2。

2.3.3 N 端氨基酸序列分析:N 端氨基酸序列测定的结果表明。经定位诱变得到的 IFN- α 2b 基因的表达产物含有正确的 N 端氨基酸序列,但其 N 端不均一,其中约 30% 的分子去除了 Met,其余约 70% 的分子则保留了 Met。由于后 1 种分子占多数,测序仪读出的序列为:Met-Cys-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser-Leu-Gly-Ser-Arg-Arg-Thr-Ley-Met-Leu-Leu-Ala-Gln-Met-Arg-Arg-Ile (共 25 个残基)。其 N 端第 24 个残基(去除 Met 后为第 23 个残基)是 Arg 而不是 Lys (见图 3)。在样品中未发现杂质蛋白的序列,鉴于所采用的测序系统对 PTH 氨基酸的检出下限小于 5pmol,推断 IFN- α 2b 的纯度 >95%。

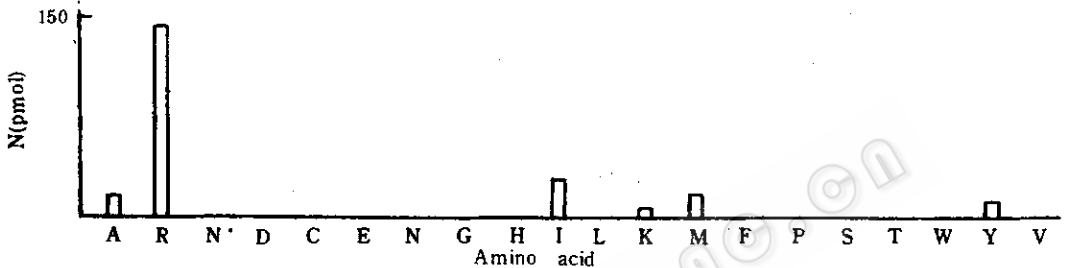


图 3 第 24 个测序周期的氨基酸分析条图

Fig. 3 Amino acid bar plot of the 24th cycle

3 讨 论

本文结果表明同等量的细菌所表达的 IFN- α 2b 与 IFN- α 2a, 其抗病毒活性无显著性差异,而 IFN- α 2b 的比活性亦与 IFN- α 2a 基本一致。据此推断,IFN- α 2a 基因和 IFN- α 2b 基因在本文所采用的大肠杆菌表达系统中的表达水平相同。

大肠杆菌系统表达的 IFN- α 2 分子普遍存在因宿主细胞内 Met 特异性氨肽酶作用不完全而引起的 N 端不均一的情况,而且其不均一程度因宿主菌、表达载体、表达条件而各有差异^(8,9)。关于带 Met 的基因工程产品与天然蛋白质在分子特性及免疫原性方面的差异以及采用各种体内和体外的加工方案去除基因工程干扰素中残留的 Met 的必要性,目前尚无定论。国内外关于基因工程干扰素人用注射剂的质量标准中未对去除 Met 作出明确要求。故一般可以认为, N 端带有 Met 并不影响基因工程干扰素的实际应用。

参 考 文 献

- [1] Dianzani F *et al.* J IFN Res, 1990, 10 (Suppl) : S6.
- [2] 曾 庆等. 病毒学报, 1992, 8 (3) : 205—209.
- [3] Luli G W *et al.* Appl Environ Microbiol, 1990, 56 : 1004—1011.
- [4] 张龙翔等. 生化实验方法和技术, 北京: 高等教育出版社, 1981, pp. 206—209.
- [5] 侯云德. 病毒基因工程的原理和方法, 北京: 人民卫生出版社, 1985, pp. 245—247.
- [6] Sambrook J *et al.* Molecular Cloning, 2nd ed, CSHL Press, 1989, pp. 1847—1859.
- [7] 智 刚等. 病毒学报, 1991, 7 (2) : 142—147.
- [8] 金冬雁等. 生物工程学报, 1991, 7 (2) : 108—113.
- [9] Sharma S K. Advanced Drug Delivery Reviews, 1990, 4 : 87—111.

Purification and Characterization of Recombinant Human Interferon- $\alpha 2b$

Zhou Yuan Jin Dongyan Zeng Qing Li Yuying Chi Jie Hou Yunde

(National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering,
Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052)

Abstract Recombinant human $\alpha 2b$ -type interferon (IFN- $\alpha 2b$) expressed in *E. coli* was purified to $>95\%$ homogeneity through affinity chromatography on Sepharose 4B coupled with anti-IFN- $\alpha 2a$ monoclonal antibody. The purified protein, with a specific antiviral activity of 2.54×10^8 IU/mg protein, appeared as a single band on the SDS-PAGE electrophoretogram and a single peak on the HPLC chromatogram. The N-terminal 25 amino-acid sequence of recombinant IFN- $\alpha 2b$ was determined on Applied Biosystems 477A protein/peptide sequencer and was shown to be correct. The purified protein was found to be heterogenous, comprising two sequences which differ merely by the initiating Met 70% of Met-plus species and 30% of Met-minus species.

Key words IFN- $\alpha 2b$, protein purification, N-terminal sequence analysis