

# 大肠杆菌表达的重组人粒细胞-巨噬 细胞集落刺激因子的纯化

凌明圣 邹民吉, 徐明波 王嘉玺 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

**摘要** 对重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)高效表达克隆 pZW. GM 的表达产物进行了纯化,并对纯化的人 GM-CSF 进行了 N 端氨基酸序列分析。人 GM-CSF 基因表达产物在大肠杆菌中以不溶性包涵体形式存在,经过超声破菌、包涵体抽提、凝胶过滤层析、复性、离子交换一系列纯化步骤,终产物纯度达 99%,按蛋白总量计算回收率达 10%,比活性达  $1 \times 10^7$  u/mg 蛋白质。通过测定纯化人 GM-CSF 的 N 端 16 个氨基酸序列,与由其 DNA 序列推导的氨基酸序列完全一致,为大批量重组人 GM-CSF 的生产创造了条件。

**关键词** 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,复性,纯化,氨基酸序列分析

GM-CSF 是重要的造血调控因子,已用于临床试验,治疗各种原因引起的白细胞减少症患者<sup>[1]</sup>,包括: AIDS; 接受化疗的癌症患者; 接受骨髓移植的癌症患者; 周期性白细胞减少症; 先天性白细胞减少症; 再生障碍性贫血等。

由于天然人 GM-CSF 来源有限,产量甚微,不能满足科研和临床应用的需要,我们在成功构建人 GM-CSF 高效表达克隆的基础上,采用一简便有效、经济合理的纯化流程,最终获得了人 GM-CSF 蛋白纯品,为基因工程人 GM-CSF 产品的大规模生产做了有益的尝试。

## 1 材料和方法

### 1.1 发酵培养

含人 GM-CSF 表达质粒的大肠杆菌接种后在 30℃ 培养,再转 42℃ 诱导表达,收集菌体。

### 1.2 菌体裂解和包涵体溶解

收集的菌体,用 TE 缓冲液(50mmol/L Tris·HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.3)洗涤,再悬浮在 TE 中,超声破菌,离心沉淀,弃上清,再用 3mol/L 尿素洗涤包涵体,最后用含 8mol/L 尿素, 10mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)的 TE 溶解包涵体。

### 1.3 凝胶过滤

将包涵体溶解液上样至 Sephacryl S-200 柱(3.6×100cm),洗脱液为含 8mol/L 尿素, 1mmol/L DTT 的 TE 缓冲液,流速 0.5ml/min,收集目的峰。

### 1.4 复性

上述收集液用 TE 稀释至蛋白浓度为 100μg/ml 以下,尿素浓度保持在 1mol/L,加

入 0.1mmol/L 氧化型谷胱甘肽 (G-S-S-G), 1mmol/L 还原型谷胱甘肽 (GSH), 10°C 复性 12 h。

### 1.5 离子交换层析

用 TE 缓冲液平衡 Q Sepharose Fast Flow 层析柱 (1.5×20cm)。将复性液上样, 待穿过峰后, 分别用含 0.3mol/L、0.5mol/L、1.0mol/L NaCl 的 TE 洗脱, 流速 1ml/min, 收集目的峰, 并对 PBS 透析。

### 1.6 纯化产物的鉴定和分析

纯化各步均用 15%SDS-PAGE 鉴定重组人 GM-CSF 存在的组分, 方法参照文献 [2], 各纯化阶段的蛋白定量依 Bradford 法<sup>[3]</sup>, 以小牛血清白蛋白为标准参照物。

### 1.7 活性测定

用 TF-1 细胞, 根据 MTT 法测定活性, 方法参照文献 [4]。

### 1.8 N 端氨基酸序列分析

将人 GM-CSF 纯化样品进行 15%SDS-PAGE, 然后电转移至 PVDF 膜上, 将膜上出现的人 GM-CSF 蛋白染色条带剪下, 按厂商提供的标准反应和转化方案, 在 ABI 公司 470A 蛋白/多肽序列仪上进行测序, 方法参照文献 [5]。

## 2 结果

### 2.1 发酵培养和纯化

pZW. GM 工程菌经发酵和诱导培养后, rhGM-CSF 以包涵体形式存在, 约占菌体蛋白的 35%左右。经超声破碎和包涵体 3mol/L 尿素洗涤后再用含 8mol/L 尿素和 10mmol/L DTT 的 TE 溶解, 经 15%SDS-PAGE 鉴定, 相应区带 (14.7kDa) 占总量的 85% (图 1, C)。经 Sephacryl S-200 柱凝胶过滤 (洗脱曲线见图 2), 可把大部分大分子杂蛋白除去, 合并相应组分, 柱后纯度可以达 95% (图 1, D)。样品经谷胱甘肽氧化还原系统复性处理后作 Q Sepharose Fast Flow 离子交换层析 (洗脱曲线见图 3), 收集 0.3 mol/L NaCl 的 TE 洗脱峰对 PBS 透析后, 用 15% SDS-PAGE 鉴定呈单一区带, 纯度达 99% (图 1, E)。

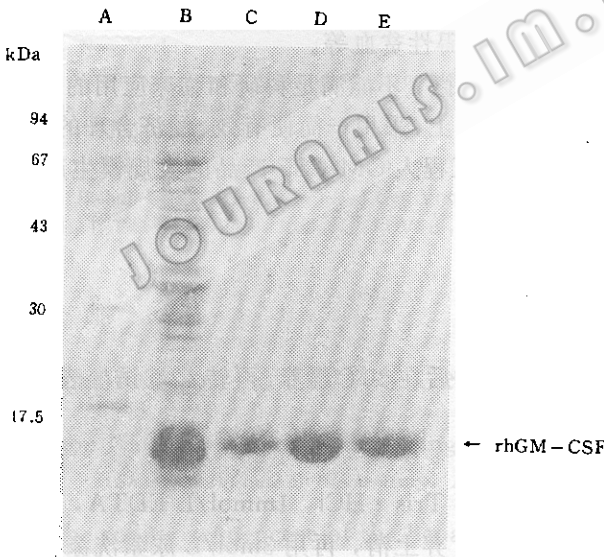


图 1 纯化后 rhGM-CSF 的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified rhGM-CSF

A. MW marker, B. Total cell pellet, C. Inclusion bodies,  
D. S-200 eluted, E. Q FF eluted

大肠杆菌表达的重组人 GM-CSF 经包涵体处理, 凝胶过滤, 离子交换层析纯化后得

到纯度 99% 的纯品。列表 1 如下:

表 1 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 的纯化  
Table 1 Purification of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF)

Stage	Total protein (mg)	rhGM-CSF (%)	rhGM-CSF (mg)	Activity (u/mg)	Protein recovery (%)
Bacteria paste	420	35	147		100
Inclusion bodies	120	85	102		24.3
S-200	53	95	50.4	$5 \times 10^6$	12
Q FF	42	99	41.6	$1 \times 10^7$	9.9

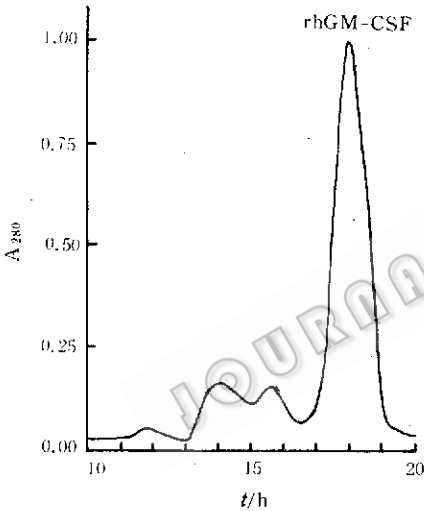


图 2 rhGM-CSF 的 S-200 凝胶过滤层析  
Fig. 2 Sphacryl S-200 gel filtration of rhGM-CSF

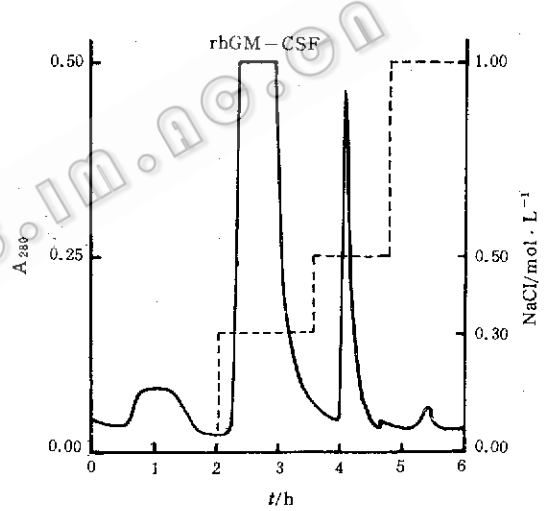


图 3 rhGM-CSF 的 Q FF 离子交换层析  
Fig. 3 Q FF chromatography of rhGM-CSF

## 2.2 生物活性鉴定

Sphacryl S-200 柱后样品直接作生物活性测定, 比活性约为  $5 \times 10^6$  u/mg 蛋白质。经用谷胱甘肽氧化还原系统复性处理再经 Q Sepharose Fast Flow 离子交换层析, 比活性上升到  $1 \times 10^7$  u/mg 蛋白质。

## 2.3 N 端氨基酸序列分析

对最终纯化的人 GM-CSF 进行氨基酸序列分析得到 N 末端 16 个氨基酸序列为:

Met Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His

与天然人 GM-CSF 相比较, 除 N 端多出一个蛋氨酸 (Met, 即起始密码子) 外, 二者完全一致, 证明所表达纯化的目的蛋白确系人 GM-CSF。

### 3 讨论

我们的实验表明大肠杆菌表达的重组人 GM-CSF 同许多大肠杆菌表达的外源蛋白一样,都以不溶性包涵体形式存在于胞浆中,暗视野显微镜下可见细胞浆内有折光性很强的颗粒。在进行重组人 GM-CSF 纯化过程中,首先遇到的问题是包涵体的处理。包涵体除含有重组蛋白外,还含有细菌杂蛋白、遗传物质及内毒素成分等<sup>[6]</sup>。利用包涵体密度大、水不溶性的特点,通过离心技术和低浓度变性剂(3mol/L 尿素)反复洗涤,抽提出大部分可溶性杂质,使包涵体纯度达到 85%。

包涵体的洗涤处理使 rhGM-CSF 的进一步纯化相对容易,但包涵体的变性溶解及复性才是获得有效纯化的关键。人 GM-CSF 分子中有 4 个半胱氨酸残基,可以形成两对链内二硫键,这是生物功能所必需的。这样在纯化过程中必须要使用变性剂和还原剂,使 rh GM-CSF 包涵体变性并打开二硫键。这样纯化后的 GM-CSF 的二硫键位置和立体构象都受到破坏,这对生物活性会有影响。从我们的实验结果看, Sephacryl S-200 柱后样品比活性为  $5 \times 10^6$  u/mg 蛋白质,因为在活性检测时已经对样品做了很大倍数的稀释,在这样的过程中已经有部分分子回复到天然构象。我们采用谷胱甘肽氧化还原系统在较高 pH 下复性,在这样的条件下,巯基和二硫键之间较易相互转换,处于可逆的反应状态。基于天然蛋白质分子构象总是处于自由能最低状态,使其逐步趋于二硫键正确配对,复性后经离子交换层析比活性提高到  $1 \times 10^7$  u/mg 蛋白质。我们曾采用单纯的稀释复性或蛋白质浓度为 0.5mg/ml 的情况下,用  $50 \mu\text{mol/L}$   $\text{CuCl}_2$  复性,但效果均不及谷胱甘肽氧化还原系统复性。

此纯化方案合理地解决了变性、复性问题,得到高活性、高纯度的 rhGM-CSF,为大规模生产和临床应用提供了条件。

**致 谢:** 本所的张明伟同志在活性检测中提供了帮助,本院仪器中心的钱小红同志对 N 端氨基酸序列分析提供了帮助,在此一并感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Susan M G, Rennie C. *Drugs*, 1992, **43**: 516.
- [2] Laemmli U K. *Nature*, 1979, **227**: 680.
- [3] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248.
- [4] Sadik O, Christoph B, Jens A *et al.* *Exp Hematol*, 1990, **18**: 1108.
- [5] Simpson R J, Moritz R L, Begg G S *et al.* *Anal Biochem*, 1989, **177**: 211.
- [6] Frankel S, Sohn R, Leinwand L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 1192.

## Purification of Recombinant Human Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor Expressed in *Escherichia coli*

Ling Mingsheng Zou Minji Xu Mingbo Wang Jiayi Ma Xiankai

(*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*)

**Abstract** Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) was expressed as inclusion bodies (IB) in *E. coli*. A simple and effective protocol has been worked out for the purification. IB collected after the breakage of bacteria through sonication were subjected to repeated washing, and then solubilized in TE buffer (50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.3) contained 8mol/L urea and 10mmol/L DL-dithiothreitol. By means of Sephacryl-200 HR, refolding and Q Sepharose Fast Flow, rhGM-CSF was obtained with a purity of 99%. The total protein recovery was 10% and specific activity of rhGM-CSF was  $1 \times 10^7$  u/mg. The sequence of N-terminal 16 amino acid residues of purified rhGM-CSF was determined and found to be identical to the native protein. This study provided useful parameters for mass production of rhGM-CSF.

**Key words** Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, protein purification, refolding, amino acid sequencing