

重组人 $\alpha 8$ 型干扰素的纯化与鉴定

郭嘉 陆峰 金永明 瞿卉 吴丹 陆德如

(第二军医大学基础部分子遗传教研室 上海 200433)

摘要 采用酵母表达载体进行重组人 $\alpha 8$ 型干扰素(HuIFN- $\alpha 8$)的表达,该表达菌株可将重组 $\alpha 8$ 型干扰素分泌进入培养基中,回收培养基进行纯化,然后利用超滤浓缩,先过 S. Sepharose FF 柱,再进行 DEAE Sepharose FF 层析和 G-25 脱盐,最后用高效液相 HPLC, SDS-PAGE 丙烯酰胺凝胶电泳及肽图等方法对纯化产品进行鉴定。采用以上两步纯化方法纯化酵母分泌表达的重组人 $\alpha 8$ 型干扰素纯度可达 95% 以上,其比活性为 3.0×10^8 u/mg。

关键词 重组人 $\alpha 8$ 型干扰素,蛋白质纯化,肽图

人 $\alpha 8$ 型干扰素(IFN- $\alpha 8$)是干扰素中的一个亚型,它与 αD , $\alpha 2b$ 等相比其同源性相差甚远,而与 αB 干扰素仅差 5 个氨基酸,在体内含量也极少^[1,2]。但对于抗疱疹病毒而言活性与 αD 和 $\alpha 2b$ 亚型干扰素相当甚至高于它们。IFN- $\alpha 8$ 基因由复旦大学李育阳教授赠送,采用酵母表达载体进行建株,成功构建了人 $\alpha 8$ -干扰素基因载体,并转入酵母菌中进行分泌表达。

在抗病毒及抗肿瘤的研究中发现,天然干扰素是以多种亚型出现,尤其肿瘤初期,所以 $\alpha 8$ -干扰素作为干扰素家族的一员,是不可忽视的。

1 材料与方 法

1.1 质粒和菌株

IFN- $\alpha 8$ 基因及该基因的表达载体 PW172 均由武圣明教授在复旦大学遗传所李育阳教授实验室构建,酵母宿主菌株采用 BJ1991,由复旦大学遗传所李育阳教授赠送。

1.2 酵母菌的发酵培养

发酵罐为美国 NBS 公司制造的 30 立升发酵罐,接种量为 1%。在 2ml 选择性培养基 YNB 中进行选种,放大到 30ml YNB 培养基中,再进一步将该菌种放大至 500ml 的 YNB 中并加入酪蛋白水解物,该菌液作为 30 立升大罐的菌种来源。首先使发酵罐内溶氧浓度平衡至 100%,然后提高转速至 200r/min,提高溶氧浓度 50% 饱和,于 30℃ 培养 30h,整个发酵过程中葡萄糖浓度保持在 10g/L 以上,使 OD₆₀₀ 达到 6。

1.3 IFN- $\alpha 8$ 的纯化

S Sepharose Fast Flow, DEAE Sepharose Fast Flow 购自 Pharmacia 公司,中压层析装置为美国 Waters 公司的 650 系统,高效液相层析装置为 Waters 810 系统,泵为 510,柱为 Waters 公司 C₈(10mm×15cm),超滤器为美国 Milipore 公司的 Pillicon 超滤器。

本文于 1995 年 8 月 8 日收到。

发酵液在 7000r/min 4℃ 离心,收集发酵上清,再进行除菌过滤,滤液进行超滤浓缩,膜截留分子量为 10000,浓缩至 20 倍,约为 1500ml,将其通过 S Sepharose FF 柱,洗脱液 A 为 20mmol/L NH_4Ac pH4, B 为 25mmol/L PBS pH7 进行 pH 梯度洗脱,收集峰 2 命名为 S_{20} ,再将 S_{20} 峰上 DEAE Sepharose FF 柱,缓冲液 A 为 25mmol/L PBS, pH7, B 为 25mmol/L PBS 和 0.5mol/L NaCl, 然后进行线性梯度洗脱,收集的活性峰上 G_{25} 柱脱盐,收集活性成分得 IFN- α 8, 再进行 HPLC 分析,鉴定流动相为 0.08% TFA 的水,和 0.08% TFA 的色谱纯乙腈,流速为 1ml/min,洗脱时间为 60min, 20%~100% 的线性梯度。

1.4 抗病毒活性检测

采用细胞病变抑制法进行测定^[3]。在 96 孔细胞培养板上接种 WISH, 细胞在 37℃ CO_2 的培养箱中培养 24h 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,24h 后观察细胞病变情况。用保证半数细胞免于发生病变的稀释浓度所含的干扰素量作为 1 单位(u)并以国家卫生部生物制品鉴定所的标准干扰素核准成国际单位。蛋白含量采用 Lowry 法。

1.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按文献[7],分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 5%,标准分子量参照蛋白购自华美公司。采用卡马氏亮蓝作为蛋白染色剂。用 Beckman UV68 紫外分光光度仪进行扫描。

1.6 肽图分析

裂解方法^[8],美国 Waters 公司的 810 系统的 HPLC,用 C_8 反相柱,波长为 214nm, AUFS 0.05 进行分析,用 CNBr 进行裂解。约 100 μg IFN- α 8 冻干品,加入 70% 甲酸,再加 200 μg 溴化氰(2 μmol),总体积为 500 μl ,充氮气,避光反应 24~28h。加超纯水 1ml 搅匀,冷冻抽干,并重复 1 次。

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 8 和 IFN- α 2b(古巴生产)抗病毒活性结果(如表 1 所示),表中数据是 4 次重复测定的平均数。

可见同等蛋白量,抗病毒活性 IFN- α 8 比 IFN- α 2b 高。

2.2 IFN- α 8 的纯化

本实验采用多步纯化可获得较高回收率的 IFN- α 8,比活性达 3.0×10^8 IU/mg,总回收率为 55%(表 2),每步纯化的产物都进行了电泳分析(见图 1),我们已放大为每次处理 30L 发酵液的能力。

表 1 IFN- α 8 和 IFN- α 2b 的抗病毒活性比较
Table 1 Comparison of the antiviral activity of IFN- α 8 and IFN- α 2b

Type of IFN	Antiviral activity/IU $\cdot\text{mg}^{-1}$
IFN- α 8	3.0×10^8
IFN- α 2b	0.9×10^8

2.3 纯化产物的鉴定

2.3.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳:图 2 为经过纯化的 IFN- α 8 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图,图中呈现单一清晰的 IFN- α 8 条带,分子量约为 24kDa,与国外报道相似^[5],未见任何杂蛋白带。凝胶的密度扫

表2 IFN- α 8的纯化Table 2 Purification of IFN- α 8

Produce	Activity/ $\text{u}\cdot\text{L}^{-1}\cdot 10^8$	Specific activity/ $\text{u}\cdot\text{mg}^{-1}$	Purification factor	Recovery / %
Culture	0.25	2.1×10^4	1	100
Diafiltration	4.90	1.3×10^5	6.2	98
S Sepharose FF	3.62	7.1×10^6	54	74
DEAE Sepharose FF	2.74	2.8×10^8	39	56
G-25	2.68	3.0×10^8	1	55

描表明, IFN- α 8 产品纯度达到 98%。电泳呈现分子量与迁移率不同的情况, 原因在于在 IFN- α 8 一级结构中 98-101 位的氨基酸影响了 IFN- α 8 的迁移, 使电泳带未落在按氨基酸分子量推算的 17kDa 的分子量位置^[4,6]。

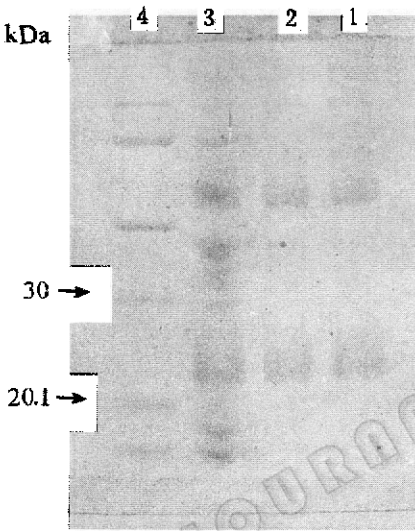


图1 IFN- α 8 纯化过程的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE Pattern of the purification procedure of IFN- α 8

1. The sample is purified by S Sepharose FF, 2. The sample is purified by DEAE sepharose FF, 3. The culture is concentrated, 4. Molecular weight marker.

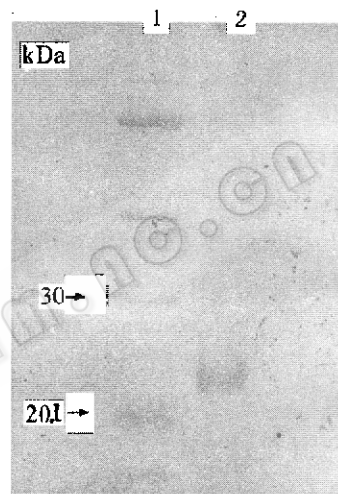


图2 IFN- α 8 纯品的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis pattern of pure IFN- α 8

1. Marker of lower molecular weight, 2 Pure IFN- α 8

2.3.2 反相高效液相层析: 对纯化的 IFN- α 8 进行鉴定, 也表明样品中含有单一分子量的蛋白质, 保留时间为 19.8min, 用归一化法计算为 98.4%, 层析谱图见图 3。

2.3.3 IFN- α 8 含 6 个甲硫氨酸, 我们采用 CNBr 裂解, 应裂解为 6 个片段, 分别为 43, 41, 39, 37, 19 和 11。通过用反相 C_8 柱进行分离可见有 2 组裂解峰, 见图 4, HPLC 分析一致, 从此也可推算 IFN- α 8 的纯度 >95%。

3 讨论

本文结果表明利用酵母表达的 IFN- α 8 的抗病毒活性高于古巴生产的 IFN- α 2b, 比

活也高,宜于纯化,可看出利用酵母表达的 IFN- α 8 比利用大肠杆菌表达的 IFN 要高^[5]。酵母表达的重组产品在纯化上可采用直接上离子交换柱的方法,即载量大,收率高,避免昂贵的单抗柱,有利于工业生产。

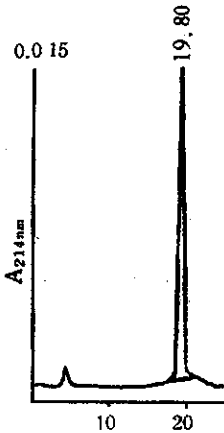


图 3 IFN- α 8 高效液相层析洗脱曲线

Fig. 3 HPLC profile of purified IFN- α 8



图 4 IFN- α 8 的 CNBr 裂解产物肽谱图

Fig. 4 Peptide mapping of IFN- α 8 after CNBr cleavage

参 考 文 献

[1] J David gangemi, Janis Lanis, Lanislazdins *et al.* Journal of Interferon Research, 1989, 9:227~237.

[2] Elizaveth Y, David L, Phillip W *et al.* Nucleic Acids Research, 1981, 9(3): 731.

[3] 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.

[4] 王海波, 等. 生物工程学报, 1994, 10(1): 50~55.

[5] Andreas M, Gilles V *et al.* J Gene Virol 1986, 67:1633~1643.

[6] OsheRoff P L, Tahqra S M *et al.* Monoclonal Antibodies to a Recombinant Human Leukocyte Interferon (rIFN- α B) Clinical immunology and immunopathology 1984, 30:188~196.

[7] Sambrook, Fritish, Maniatis. Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

[8] Allen G. Sequencing of Proteins and Preptides, Elsevier Science Publishers B V 1989.

Purification and Characterization of Recombinant Human Interferon- α 8

Guo Jia Lu Feng Jin Yongming Qu Hui Wu Dan Lu Deru

(Department of Molecular Genetics of Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract The recombinant human interferon- α 8 (IFN- α 8) is expressed by yeast expression system. The expression strain can secreted recombinant interferon- α 8 into culture. The culture containing interferon- α 8 is ultrafiltrated, concentrated and chromatographed with S Sepphrose FF, DEAE Sepharose FF. The treated sample is desalted by G-25. Then the pure sample is identified by HPLC, SDS-PAGE electrophoresis and peptide map. Two steps purification can obtain high pure interferon- α 8. The pure is higher than 95%. The specific antiviral activity of interferon- α 8 is 3.1×10^8 IU/mg protein.

Key words Recombinant human interferon- α 8 (rHuIFN- α 8), protein purification, peptide map