

重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子的 实验室培养、复性和分离纯化

王易伦 郭瀛军* 张平武 陆德如

(第二军医大学分子遗传教研室 上海 200433)

摘要 建立了一个实验室制备重组 hGM-CSF 的培养、复性和分离纯化的技术工艺。通过对 PEGM 工程菌的生长和诱导表达等条件的初步调整,使 hGM-CSF 的表达量从 16.9% 提高到 32.3%,获得 0.749g/L 的包含体,纯度为 65%;包含体用 6mol/L 盐酸胍溶解和稀释复性后,经 CM Sepharose FF、DEAE Sepharose FF 和 Sephacryl S-200 HR 层析分离,制得纯度达 97% 以上、比活性为 3.0×10^7 u/mg 的 hGM-CSF,纯化总回收率约为 5%。

关键词 hGM-CSF, 包含体, 纯化, 复性, 培养

我们通过优化 mRNA 翻译起始区和采用表达质粒 pET-3a 使人粒-巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)在 *E. coli* JM109(DE3)中高效表达^[1]。本文对该重组 hGM-CSF 的培养、复性和分离纯化进行了实验室规模的研究,并获得纯度达 97% 以上、比活性为 3.0×10^7 u/mg 的纯品。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

含 pET-hGM-CSF 重组质粒的 *E. coli* JM109(DE3)工程菌(PEGM)为本室构建。

1.2 试剂

酵母抽提物(Oxid. B. R.), polypepton(日本制药株式会社), 酪蛋白水解物(Sigma), IPTG(北京中科院环境生态中心), 盐酸胍(Sigma), CM Sepharose FF, DEAE Sepharose FF, Sephacryl S-200 HR(均为 Pharmacia), hGM-CSF 标准品(Beite), 其他化学试剂均为市售分析纯。

1.3 工程菌表达

挑单菌落接种于 M9 表达培养基($50 \mu\text{g/ml}$ Amp), 37°C 振荡培养过夜,次日取适量培养物接种于新鲜培养基($100 \mu\text{g/ml}$ Amp)中,分别观察诱导培养、诱导时间、IPTG 剂量和不同培养基等条件对表达的影响。

1.4 包含体提取和复性

诱导培养后的菌体,用 STE(mmol/L : Tris-HCl 50, pH8.0, EDTA 1, NaCl 300)洗,离

上海市科学技术发展基金资助项目。

* 联系人。

本文于 1995 年 2 月 14 日收到。

心沉淀加超声缓冲液-1(mmol/L:PB 50, pH8.3, EDTA 1, β -巯基乙醇 1), 冰浴超声 15s, 间隔 15s, 共 15 次, 离心, 沉淀改用超声缓冲液-2(超声缓冲液-1 中加入 0.1% Triton), 冰浴超声 15s, 间隔 15s, 共 3~5 次, 离心, 重复以上步骤数次。抽提的包含物按 1g/10ml 变性液(mmol/L:盐酸胍 6000, PB 50, pH8.3, EDTA 1, DTT 10)溶解, 离心去不溶性沉淀物, 用 PBE(mmol/L:PB 50, pH8.3, EDTA 1)稀释至 200 μ g/ml, 4~8 $^{\circ}$ C, 对 PBE 透析。超滤浓缩透析物备用。

1.5 hGM-CSF 纯化

hGM-CSF 纯化工艺流程见图 1。

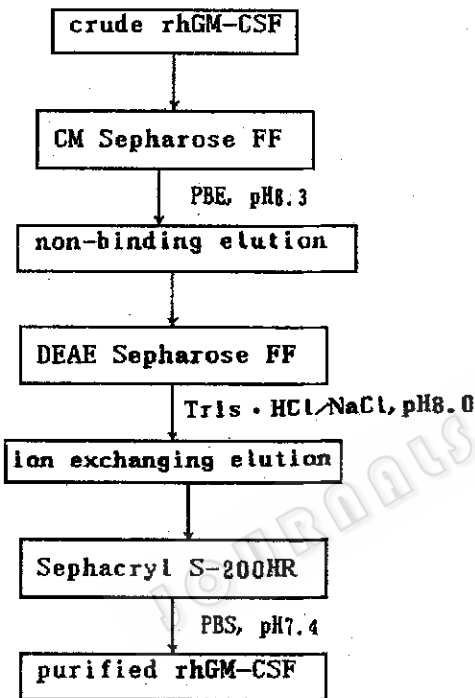


图 1 hGM-CSF 纯化工艺流程示意图

Fig.1 Schematic process of hGM-CSF purification

胞收集仪收集至 49 号玻璃纤维纸上, 晾干, 用液闪计数器测定 cpm。

2 结果与讨论

2.1 工程菌生长和诱导表达条件

JM109(DE3)的染色体中整合了 λ 噬菌体 DE3, 在 IPTG 诱导下, λ DE3 中由 LacUV5 控制的基因可产生活性极强的 T7RNA 聚合酶, 它特异地作用质粒中的 T7 启动子, 使质粒编码基因转录。这种强力的选择性转录和

1.6 hGM-CSF 生物活性测定

1.6.1 包含体溶解样品的相对活性: 取 OD₆₀₀ 相同的诱导培养物, 离心取菌体溶于 6mol/L 盐酸胍, 离心后, 上清用 PBS 稀释, 在 96 孔板上以 MTT 法测定其刺激 TF-1 细胞株的增殖活性^[2]。

1.6.2 体外集落形成法: 取 C₅₇ 小鼠股骨髓, 用 DMEM 培养基制成 5 × 10⁵/ml 单细胞悬液。分别加入标准 hGM-CSF 和待测样品, 于 40 孔板中, 0.1ml/孔, 每份样品一式 3 孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵育 48h。按 > 8 个/集落为有效集落形成单位 (CFU) 计数, 用标准 GM-CSF 的 CFU-活性单位的曲线求得待测样品活性。

1.6.3 ³H-TdR 掺入法: TF1 细胞按 2 × 10⁴/孔接种在 96 孔板中, 加标准 hGM-CSF 和待测样品, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵育 48~72h, 加 0.5 μ Ci³H-TdR/孔, 继续培养 18h, 用多头细

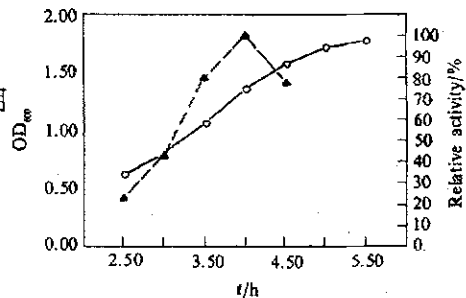


图 2 PEGM 的生长和诱导表达

Fig.2 Growth and inducing expression of PEGM

○ Growth ▲ Inducing

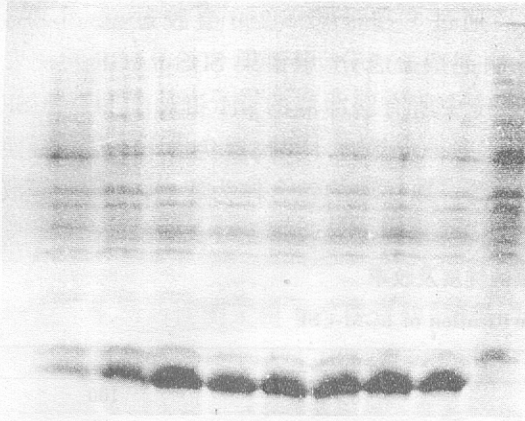


图3 IPTG 诱导时间

Fig.3 IPTG inducing times

Left to right lane: inducing 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8h and pET-3a control

UV5-T7RNA 聚合酶-T7 启动子的级联放大作用,在诱导表达时有可能出现质粒的不稳定和诱导渗漏表达^[3]。实验先用过夜 PEGM 培养物按 1:30 接种至含 1mmol/L IPTG 的表达 M9 培养基中,观察诱导培养过程中质粒的稳定性。从图 2 可见,在 OD₆₀₀达到 1.3 之前,质粒扩增稳定,hGM-CSF 相对活性随细菌生长而递增,以后,活性与生长相分离;当改用先培养至 OD₆₀₀约 0.6,再加 IPTG 诱导 2~8h,在该条件下,hGM-CSF 表达稳定,见图 3。并且,采用常规剂量的 1/25(0.04mmol/L IPTG)和不同培养基,hGM-CSF 均能得到有效表达,见图 4,目前,hGM-CSF 的表达量已由原来的 16.9% 提高至 32.3%,见图 5 第 2 泳道(薄层扫描资料未列)。

2.2 包含体提取和变复性

从图 5 可见,工程菌 PEGM 表达产物主要以包含体形式存在,经分离纯化,每升发酵液可得约 0.75g、纯度为 65% 的湿重包含体(见图 5 第 4 泳道,薄层扫描资料未列)。hGM-CSF 含有 4 个半胱氨酸残基,形成两个二硫键(Cys54 和 Cys96、Cys88 与 Cys121)。目前,对目的蛋白包含体的溶解和复性尚无成熟的可遵循的技术方案^[4]。有文献认为,hGM-CSF 包含体在很低的尿素浓度下即被溶解^[5],但我们的工作表明,即使用 8mmol/L 尿素其溶解性仍不如 6mol/L 盐酸胍。我们先用盐酸胍溶解包含体,通过稀释、透析使 hGM-CSF 得到较好复性。

2.3 hGM-CSF 的分离纯化

hGM-CSF 纯化工艺流程和各部分纯化结果见图 1 和图 6。hGM-CSF 的等电点为 3.4~4.5^[5],我们首先采用 CM Sepharose FF,在 PBE, pH8.3 的条件下,通过目的蛋白的非离子交换洗脱而去除部分结合在柱上的杂蛋白;再用 DEAE Sepharose FF 和 20mmol/L Tris·HCl + 0.5mol/L NaCl

1 2 3 4 5 6 7

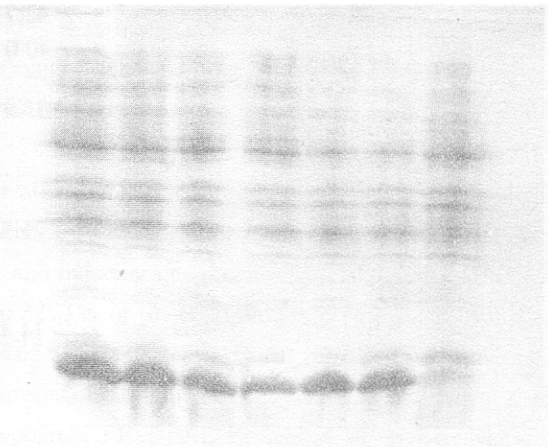


图4 不同培养基和不同 IPTG 剂量的比较

Fig.4 Comparison of different media plus different IPTG dosage
1, 2: Expressive M9 medium plus 0.04mmol/L and 1mmol/L IPTG, 3, 4: 2YT medium plus 0.04mmol/L and 1mmol/L IPTG respectively, 5, 6: SB medium plus 0.04mmol/L and 1mmol/L IPTG respectively, 7: pET-3a control with expressive M9 medium plus 1mmol/L IPTG

(pH8.0)线性洗脱,纯化并浓缩目的蛋白;最后通过 Sephacryl S-200 凝胶过滤,用 PBS (pH7.4)洗脱 hGM-CSF,并去除样品中其他非制剂型盐成分,用银染 SDS-PAGE 检测表明,hGM-CSF 呈单一区带,见图 6。整个纯化系统中所有缓冲液的 pH 相对于 hGM-CSF 的 pI 均为碱性,这有利于目的蛋白在碱性条件下进一步复性,同时,避免因 pH 剧烈变换需要反复透析或引起目的蛋白变性、溶解性降低等。以提取的包含体为起点,每升发酵液可获约 37mg 纯化终产品,纯化总回收率约为 5%,各步纯度及收率见 Table 1。

表 1 各纯化步骤的纯度及收率

Table 1 Summary of purification of hGM-CSF

Step	Protein/mg	Purity/ %	Recovery/ %
Crude inclusion body	749	65	100
Ultrafiltration	350	no data	47
CM Sepharose FF	200	73	57
DEAE Sepharose FF	104	88	52
Sephacryl S-200	37	>97	36

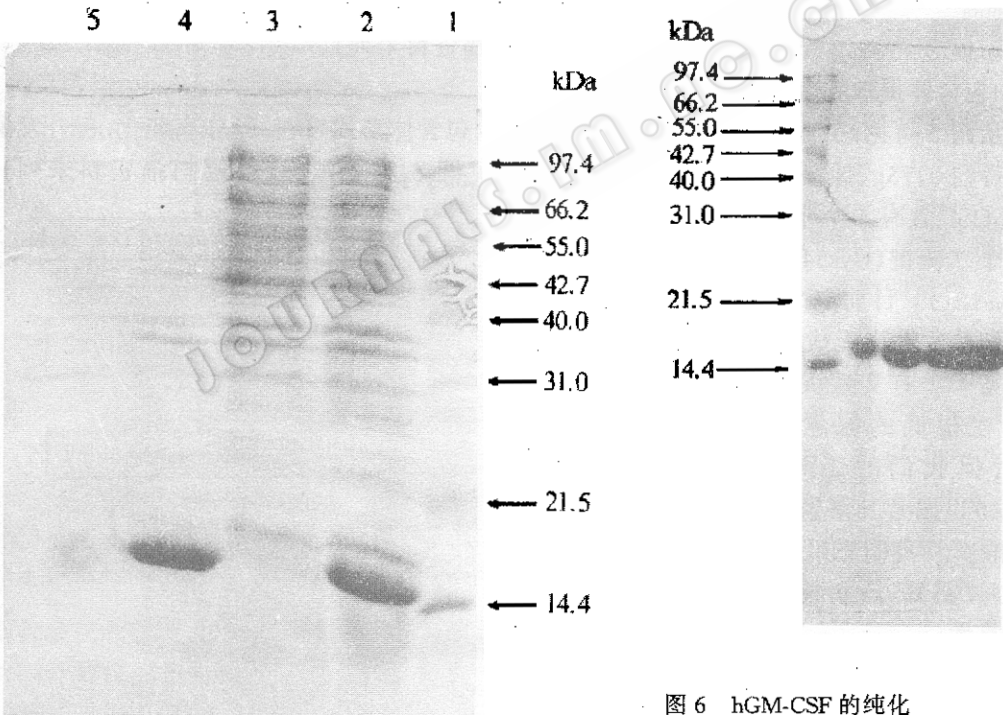


图 5 hGM-CSF 表达产物的细胞定位

Fig.5 Distribution of hGM-CSF in JM109(DE5) cell

- 1: Protein molecular weight standard, Mid range (Promega),
- 2: Bacterial lysis, 3: Soluble proteins,
- 4: Insoluble proteins, 5: Periplasmic proteins

图 6 hGM-CSF 的纯化

Fig.6 Purification of hGM-CSF

SDS-PAGE pattern, from left to right lane: protein molecular weight standard (Mid range), and samples from CM Sepharose FF, DEAE sepharose FF and sephacryl S-200 HR elution respectively

2.4 hGM-CSF 的纯度和活性鉴定

纯化样品经考马斯亮蓝 R250 染色的 SDS-PAGE 和薄层扫描测定纯度达到 97.6%, 用 HPLC C18 柱分析纯度达到 97.72%, 两者相近。体外集落形成法测定, hGM-CSF 的生物活性 $\geq 10^7$ u/mg, 用 ^3H -TdR 掺入法进一步证实比活性超过 10^7 u/mg。

综上所述, 通过实验室规模的培养, 复性和分离纯化的研究, 我们已获得高纯度和高比活性的重组 hGM-CSF 纯品, 为进一步中试和生产规模制备 hGM-CSF 奠定了基础。

致谢 生物活性测定由本室曹之舫、贾琳同志和本校长海医院沈茜同志、放射医学研究所李雨等同志完成; HPLC C18 纯度分析由本室郭嘉完成, 谨致诚挚谢意。

参 考 文 献

- [1] 王易伦, 张平武, 戴建新等. 生物化学杂志, 1996, 12(3): 262~265.
- [2] Greenberg, R, Curr Microbiol. 1988, 178: 321~332.
- [3] Studier F W, Moffatt B A. J Mol Biol. 1986, 189: 113~130.
- [4] Fischer B, Sumner I, Goodenough P. Biotech Bioeng. 1993, 41: 3~13.
- [5] 徐明波, 董晓杰, 孟文华等. 高技术通讯, 1993, 9: 11~15.
- [6] Aggarwal B B, Gutterman J U. In: Human Cytokines, Hand book for Basic and Clinical Research, Blackwell Scientific Publications, Boston, USA, 1992, pp. 238~253.

Laboratorial Cultivation, Renaturation and Purification of Human Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor

Wang Yilun Guo Yingjun Zhang Pinwu Lu Deru

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

Abstract A laboratory process for the cultivation, renaturation and purification of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) is presented in this report. After primary optimizing the conditions of culture and inducing growth of engineered strain (PEGM), the yield of hGM-CSF increased from 16.9% to 32.3% of the total cellular proteins and inclusion body (IB) amounted to 0.75g/L with a purity of 65%. The isolated IB was dissolved in 6mol/L guanidinium chloride and subsequently refolded by means of dilution. The protein of hGM-CSF was purified by the stepwise chromatographies of CM Sepharose FF, DEAE Sepharose FF and sephacryl S-200 HR. The finally purified hGM-CSF reached a purity of 97%, with a specific activity of 3.0×10^7 u/mg. The total recovery amounted to approximately 5%.

Key words GM-CSF, inclusion body, purification, renaturation, culture