

反相高压液相色谱折叠重组人白细胞介素-2

凌明圣 许祥裕 施凤霞 朱有华 龙娜

(南京军区军事医学研究所 南京 210002)

摘要 重组人白细胞介素-2 (rhIL-2) 基因表达产物在大肠杆菌中以不溶性包涵体形式存在, 经过菌体发酵和收集、超声破菌、包涵体抽提、稀释透析初步复性、反相高压液相色谱纯化, 终产物纯度大于 99%。反相高压液相色谱不仅可以纯化 rhIL-2, 且使产物的总活性提高 7.9~9 倍, 比活性提高 14~18 倍, 达到 1.5×10^7 u/mg 蛋白质, 蛋白得率为 50%~56%。结果表明, 反相高压液相色谱具有纯化和显著提高 rhIL-2 折叠效率的双重功效, 为非 SDS 变复性法生产 rhIL-2 提供了简便有效的方法。

关键词 重组人白细胞介素-2, 折叠, 纯化, 反相高压液相色谱

国内折叠 rhIL-2 比较通用的方法是在高浓度 SDS 条件下变性, 在低浓度 SDS 下复性, 这样在纯化后的终产物中不可避免的有 SDS 残留, 最终影响产品的质量。已有许多关于分离介质介导重组蛋白折叠的报道^[1~3], 但有些方法适用于实验室规模, 难于应用于中试规模以上的生产。

我们在收集菌体, 超声破菌和包涵体洗涤处理后, 用 6mol/L 盐酸胍溶液溶解包涵体, 然后用 8mol/L 尿素溶液迅速将包涵体抽提液稀释并做透析处理, 经反相高压液相色谱一步纯化, 得到了高纯度、高比活和无热原质的 rhIL-2 产品, 经放大试验, 实验的稳定性可靠。同时发现 rhIL-2 在 pH2.5 的三氟乙酸溶液中活性迅速下降。这种将复性和纯化融为一体的新方法为 rhIL-2 的产业化带来新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

人白细胞介素-2 重组质粒由本所构建, 宿主细胞为 *E. coli* HB101。CTLL 细胞株购自中科院细胞所。反相高压液相色谱柱 Spherisorb C18 300A 45 μ ID20 由中科院大连化物所装填。高压液相色谱仪为美国 Waters 600E 型, 紫外检测器为 Waters 486 型。rhIL-2 标准品 (1.0×10^7 u/mg) 购自 Cetus 公司。超分析纯盐酸胍和色谱纯三氟乙酸 (TFA) 为 Sigma 公司产品。乙腈为国产色谱纯, 其余药品为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌体发酵: 含人 IL-2 重组质粒的大肠杆菌接种后在 30℃ 培养, 再转 42℃ 诱导表达, 离心收集菌体。

1.2.2 菌体裂解和包涵体抽提: 菌体用 TE 缓冲液 (50mmol/L Tris·HCl, 1mmol/L

EDTA, pH8.0) 洗涤, 再悬浮在 TE 中超声破菌, 离心后弃上清, 再用含 4mol/L 尿素的 TE 洗涤包涵体沉淀, 离心弃上清, 最后用含 6mol/L 盐酸胍的 TE 溶解包涵体, 离心后的上清即为包涵体抽提液。

1.2.3 初步复性: 包涵体抽提液迅速稀释至含 8mol/L 尿素的 10mmol/L Tris·HCl, pH8.0 的溶液中, 使蛋白浓度为 0.1mg/ml, 装透析袋于 4℃ 按 1: 3 体积对 10mmol/L Tris·HCl, pH8.0 溶液透析 10h, 换透析液 3 次, 经高速离心去除絮状沉淀。

1.2.4 反相高压液相色谱折叠、纯化及其放大: 用 C 通道以 15ml/min 的流速上样至 C18 反相柱, 上样结束后, A 通道接 0.1% TFA 水溶液, B 通道接 0.1% TFA 乙腈溶液。在 0~90min, A 通道由 100%~10%, B 通道由 0%~90% 进行线性梯度洗脱, 流速为 10ml/min。初试上样初步复性液 1800ml, 放大的上样量为 5000ml。收集目的峰后, 37℃ 旋转减压蒸发除去乙腈后, 小部分不调 pH 除菌后 4℃ 存放, 另一部分用 10mmol/L, pH7.0 的 PB 缓冲液透析, 除菌后 4℃ 存放。

1.2.5 纯化产物的鉴定: 用 15% 非还原 SDS-PAGE 鉴定反相高压液相色谱纯化的 rhIL-2, 方法参照文献 [4], 蛋白定量依 Bradford 法^[5], 以小牛血清蛋白为标准参照物。

1.2.6 活性测定: 用 CTLL 细胞, 根据 MTT 法测定初步复性和纯化后的样品活性, 并测定 pH2.5 条件下 4℃ 存放不同时间的 rhIL-2 样品的活性, 方法参照文献 [6]。

2 结 果

2.1 反相高压液相色谱折叠、纯化及其放大

初试时初步复性液上样量为 1800ml, 蛋白浓度为 80μg/ml, 活性为 8 × 10⁴u/ml, 比活为 1.0 × 10⁶u/mg, 反相色谱分离收集 66~87min 的洗脱液 210ml (色谱图见图 1A), 旋转蒸发除去乙腈后体积为 30ml, 蛋白浓度为 2.7mg/ml, 活性为 3.8 × 10⁷u/ml, 比活为 1.4 × 10⁷u/mg, 比活提高 14 倍, 总活性提高 7.9 倍, 蛋白得率为 56%; 放大时初步复性液上样量为 5000ml, 蛋白浓度为 83μg/ml, 活性为 7 × 10⁴u/ml, 比活为 0.84 × 10⁶u/mg, 反相色谱分离收集 65~90min 的洗脱液 250ml (色谱图见图 1B), 旋转蒸发除去乙腈后体积为 40ml, 蛋白浓度为 5.23mg/ml, 活性为 7.9 × 10⁷u/ml, 比活为 1.5 × 10⁷u/mg, 比活提高 18 倍, 总活性提高 9 倍, 蛋白得率为 50%。

纯化的样品经非还原型 SDS-PAGE 电泳鉴定在 15kDa 附近有单一的电泳条带, 经紫外薄层扫描纯度均大于 99% (见图 2)。

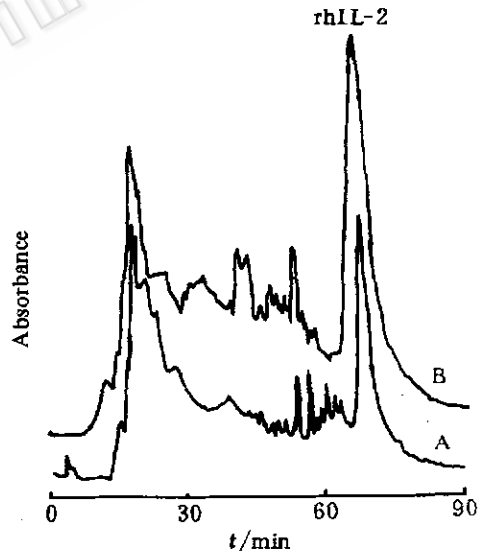


图 1 rhIL-2 的反相高压液相色谱
Fig. 1 Reverse phase high performance liquid chromatography of rhIL-2
A, B. represented initial and amplifying test respectively

反相高压液相色谱同时具备折叠和纯化 rhIL-2 的功能, 得到了高纯度、高比活无热原质的产品, 且初试与放大后的色谱性质稳定, 实验结果列表 1 如下:

表 1 反相高压液相色谱折叠、纯化 rhIL-2 及其放大

Table 1 Refolding and purification of rhIL-2 by reverse phase high performance liquid chromatography and its processing amplification

Stage	Total protein /mg	Specific activity / $10^6 \text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$	Purified rhIL-2 /mg	Specific activity of purified rhIL-2 / $10^7 \cdot \text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$	Total activity recovery/times	Specific activity recovery/times	Protein recovery /%
Initial test	144	1.0	81	1.4	7.9	14	56
Amplifying test	415	0.84	209.2	1.5	9.0	18	50

2.2 三氟乙酸对 rhIL-2 活性的影响

初试时反相色谱纯化后旋转蒸发除去乙腈后, 由于洗脱液含 0.1% TFA, 致使样品的 pH 为 2.5, 即刻测活比活性为 $1.4 \times 10^7 \text{u/mg}$, 部分样品不调 pH 除菌后置 4℃ 存放 48h 后测得比活性为 $2.4 \times 10^6 \text{u/mg}$, 下降 6 倍, 存放 1 周后测得比活性为 $1.0 \times 10^6 \text{u/mg}$, 继续下降 2.4 倍; 另一部分样品用 10mmol/L PB, pH7.0 的缓冲液透析处理除菌后置 4℃ 存放 48h 和 1 周后测得的比活保持不变。结果表明在酸性的 TFA 溶液中, rhIL-2 活性极不稳定, 迅速调整 pH 是保持其活性的有效办法。

3 讨 论

以包涵体形式表达的重组蛋白需进行复性才能获取其生物学功能, 而复性一直是困扰生物工程下游工作者的一个难题, 比较传统的方法是稀释透析处理, 这样样品的浓度一般低于 $10 \mu\text{mol/L}$ ^[1], 我们在 rhIL-2 制备过程中的初步复性即是如此, 但复性后比活性很低。

分离介质用于折叠重组蛋白既简便同时又可对样品进行纯化, 是一个值得探讨的课题。还未见反相高压液相色谱如此显著提高重组蛋白活性的报道。有作者^[7]用 SDS 作变性剂处理 rhIL-2 包涵体, 经过分子筛和反相色谱纯化, 反相色谱的总活性回收率在 118.2%~167.8% 之间, 终产物中 SDS 残留量在 $25 \mu\text{mol/L}$ 左右, 而 SDS 残留会影响热原质的鲎试验结果。我们采用非 SDS 变性法, 经反相色谱一步纯化, 总活性回收提高 7.9~9 倍, 比活性提高 14~18 倍, 得到了高纯度、高比活、无热原质的 rhIL-2。另外通过反相色谱还可以去除部分折叠、不完全和错误折叠的部分, 在非还原型 SDS-PAGE

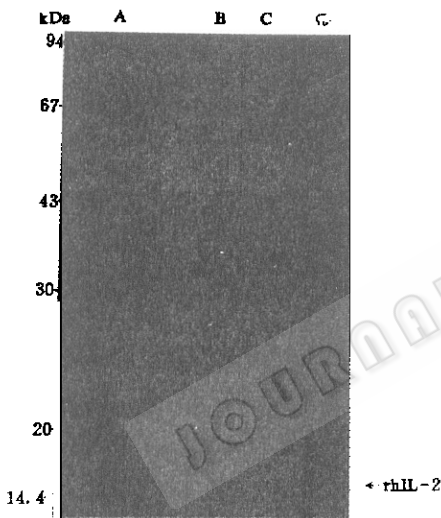


图 2 纯化的 rhIL-2 非还原型 SDS-PAGE
Fig. 2 Non-reduced SDS-PAGE analysis of purified rhIL-2

A. MW marker, B, C stand for purified rhIL-2 of initial and amplifying test respectively

电泳结果未见 rhIL-2 二聚体组份存在, 可见产品已达到结构纯, 这也是蛋白得率在 50% 左右的原因。

参 考 文 献

- [1] Werner M H, Clore G M, Gronenborn A M *et al.* FEBS Letters, 1994, 345: 125.
- [2] Hoess A, Arthur A K, Wanner G *et al.* Bio/Technology, 1988, 6: 1214.
- [3] Kelley R F, Winkler M E. Genetic Engineering, 1990, 12: 1.
- [4] Laemmli U K. Nature, 1979, 227: 680.
- [5] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 248.
- [6] Mosmann T J. Immunol Meth, 1983, 65: 55.
- [7] 徐明波, 董晓杰, 孟文华等. 高技术通讯, 1993, 3 (9): 11.

Refolding Recombinant Human Interleukin-2 by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography

Ling Mingsheng Xu Xiangyu Shi Fengxia
Zhu Youhua Long Na

(Nanjing Military Medical Institute, Nanjing 210002)

Abstract Recombinant human interleukin-2 (rhIL-2) was expressed as inclusion bodies (IB) in *E. coli*. By means of fermentation, bacteria collection and breakage through sonication, IB solubilization, initial dilution dialysis renaturation, purification by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), the purity of purified rhIL-2 was more than 99%. RP-HPLC could not only purify rhIL-2 but also raise its total activity and specific activity to 7.9~9.0 and 14~18 times respectively. The specific activity of purified product reached to 1.5×10^7 u/mg, and the protein recovery was 50%~56%. The results proved that RP-HPLC has twofold function for purification and notably raising refolding efficiency of rhIL-2, which provided simple and useful parameters for production of rhIL-2 by non-SDS denaturation and renaturation method.

Key words Recombinant human interleukin-2, refolding, purification, reverse phase high performance liquid chromatography