

杆状病毒重组蛋白金鱼生长激素 I 的纯化

林广云 龙繁新 陈锦荣¹ 王珣章 黄安林¹

Wendy Ko¹ 李继仁¹ 余奇理¹

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)

(香港大学动物系)¹

摘 要 利用放射免疫分析(RIA)证实了含金鱼生长激素 I cDNA 的重组病毒在感染细胞 96h 后所表达的生长激素达到最高水平,平均每 10^5 个细胞可分泌金鱼生长激素 I 最高达 288.07ng;平均每克干虫可产生金鱼生长激素 I 925.3 μ g。从感染重组病毒的无血清细胞培养基中纯化生长激素 I,平均每毫升培养基可纯化具免疫活性纯度 95% 以上的金鱼生长激素 I 达 664.224ng。纯化后蛋白的 N-末端首 20 个氨基酸序列测定的结果表明其信号肽得到了准确的切割。从而保障了表达蛋白的生物活性。

关键词 杆状病毒表达载体系统, 金鱼生长激素基因, 表达, 纯化

学科分类号 Q 781

昆虫杆状病毒表达载体系统为真核蛋白基因的表达提供了一个真核环境以保证其表达产物的生物活性所必需的三级结构的折叠,二硫键的形成,齐聚化及翻译后加工等能顺利进行^[1]。现在,杆状病毒表达载体系统已经商品化,仅 95、96 两年就有 862 种外源基因用这个系统进行表达。

目前已从金鱼脑垂体中克隆到金鱼的两种 GH cDNA^[2],且编码金鱼生长激素 I 的 cDNA 已在杆状病毒表达系统中得到成功的表达^[3]。因此我们对表达产物进行了纯化,纯化后的产物除可用作促进金鱼生长外还可作为标准品来研究金鱼体内的天然 GH。克隆及表达金鱼生长激素基因无论对基础理论研究或生产实践均有重要意义^[4,5]。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞及培养基

含金鱼生长激素 I cDNA 的重组病毒 TnNPV-SX⁺gfGHI21a(简称 VGHI21a)、草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*9, 简称 Sf9)昆虫细胞及细胞培养基为 Tc-100 培养基补加 10% 小牛血清。纯化蛋白时所用无血清培养基(SFM)为 Sf900 II,购自于 Gibco 公司(Life Technologies, cat. no. 10902-092)。

1.2 金鱼生长激素 I(gfGHI)的含量放射免疫分析(RIA)

1.2.1 细胞样品制备: 详见参考文献[3]。

香港 RGC 资助项目。

收稿日期:1997-07-03, 修回日期:1998-01-13。

1.2.2 虫体样品制备: 于人工饲料上涂加重组病毒多角体并喂食粉纹夜蛾核四龄幼虫, 4d后收集被感染的六龄幼虫, 剪腹足收集血淋巴, 离心, 过滤后收集上清, 供 RIA 用。

1.2.3 放射免疫分析(RIA): 按林浩然等 1988 的方法^[6]。RIA 试剂盒购自 Gibco 公司。其中正常兔血清(NRS)稀释度为 1:40; 兔抗金鱼 GH 血清(由香港大学动物系 Ader-son Wong 博士提供)稀释度为 1:38 000; 羊抗兔血清(GAR)稀释度为 1:17.5。

1.3 金鱼生长激素 I 的纯化

1.3.1 含金鱼生长激素 I(gfGHI)的培养基的制备: 在 10cm 的 TC 培养皿中接入 5×10^6 Sf9 细胞, 待细胞贴壁后, 换以 10ml 新鲜的 Sf900 II 无血清培养基于 27℃ 培养过夜至细胞数为 10×10^6 /皿。共接 20 皿细胞。弃培养基, 加入 100 μ l 含金鱼生长激素 I(gfGHI)基因的重组病毒吸附 1h; 弃病毒液, 加入新鲜培养基于 27℃ 培养 96h。收集培养基, 于 4℃ 2500g 离心 20min。小心吸出上清, 储存于 4℃。

1.3.2 金鱼生长激素 I 的纯化: 1) DEAE 阴离子交换: 将收集的细胞培养基上清置于 25mmol/L Tris(pH7.5)缓冲液中透析至原离子浓度得到大于 10^7 的稀释。将透析过的样品于 4℃ $10\ 000 \times g$ 离心 20min, 将上清转移至一 500ml 血清瓶中用作下一步纯化, 留出 1ml 作比较分析用。用 25mmol/L Tris(pH7.5)缓冲液平衡 5ml 纤维素(DE32, Whatman, cat. no. 4055010)柱(1cm 直径), 流速为 2ml/min。加入样品, 以同样的流速通过交换柱。先用 25mmol/L Tris(pH7.5)缓冲液洗柱子直到出现一条平缓的基线, 然后用 25mmol/L Tris, 60mmol/L NaCl, pH7.5 的洗脱液洗脱蛋白样品共收集 8ml 的洗脱样品。2) 凝胶过滤: 用 Centriprep-3(Amicon, no. 4302)浓缩经 DEAE 柱层析的蛋白样品。具体作法为: 将蛋白样品加入 Centriprep-3 中, 于 4℃ $2000 \times g$ 离心 1.5h。滤膜上方的液体为浓缩的蛋白样品。利用 Superose 12HR10/30 凝胶在 FPLC(Pharmacia)系统中进行纯化。将 25mmol/L Tris, 0.15mol/L NaCl, pH7.5 缓冲液以 0.4ml/min 的流速平衡柱子 125min 后加入 200 μ l 蛋白样品。将最早流出的 11ml 样品收集在一起, 然后以每管 150 μ l 收集 11~15ml 的样品, 共收集 32 个部分。利用 RIA 确定金鱼生长激素 I(gfGHI)的含量, 而用 SDS-PAGE 及 Western 印迹检测蛋白在哪一个洗脱管中。

1.3.3 SDS-PAGE 及 Western 印迹: 方法详见参考文献[3], 其中 Western 印迹的第二抗体为羊抗兔 IgG, 连有碱性磷酸酶(购于 GIBCO BRL 公司), 工作浓度为 1:20 000, 底物为 NBT+BCIP(购自 Sigma 公司), 按其说明使用。

1.4 纯化后蛋白的纯度测定

用日本岛京公司 CS930 双波长薄层扫描仪。

1.5 蛋白质的序列测定

利用 Edman Degradation 的方法, 对纯化蛋白的 N 末端 20 个氨基酸进行自动序列测定。蛋白用量为 50pmol。自动蛋白测序系统为 HEWLETT PACKARD 公司生产的型号为: HP G1005A。包括: 蛋白测序仪(G1000A), HPLC(SERIES II 1090), HPLC 柱(PTH-AA, 250nm \times 2.1nm), 测定仪(FPD269nm)。

2 结 果

2.1 在昆虫离体培养细胞及粉纹夜蛾幼虫中 gfGHI 表达量的测定

将 100 μ l 重组病毒 VGHI21a 接种 2×10^6 离体培养的 Sf9 细胞,于感染后 24h、48h、72h、96h 收集细胞及培养基上清进行 RIA 定量表达的蛋白,结果如图 1 所示。表达的定量结果与定性结果相符合^[5]。在细胞感染后 96h,表达量最高,平均每 10^5 个细胞最高可分泌 gfGHI 达 288.07ng。在同一时间,胞内残留 gfGHI 103.5ng/ 10^5 细胞。

金鱼生长激素 I 基因在粉纹夜蛾幼虫中的表达含量如表 1 所示。平均每克干虫可表达 gfGHI 达 925.3mg。所表达的金鱼生长激素 I 含量稀释曲线与鲤鱼 GH 标准曲线是平行的,说明实验结果可靠(图未显示)。

表 1 虫体血淋巴中表达的 GHI 含量

Table 1 Quantity of GHI expressed in haemolymph of larvae

Dilution	Undiluted GHI/ng·ml ⁻¹	Total volume/nl	Total GHI/mg	Weight of dry larvae/g	GHI/mg·g ⁻¹ dry larvae
640	12901.12	35	0.4515	0.488	0.925

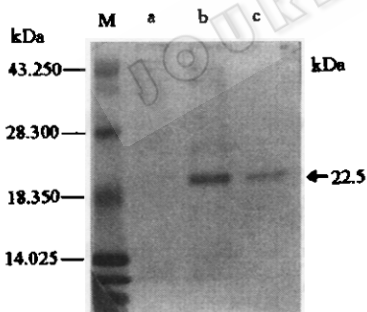


图 2 纯化后的 gfGHI 的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of gfGHI

- a. Serum free medium(SFM) before purified;
 b. gfGHI was purified using DEAE anion exchange;
 c. gfGHI was purified using DEAE anion exchange and gel filtration, M. Prestained protein markers

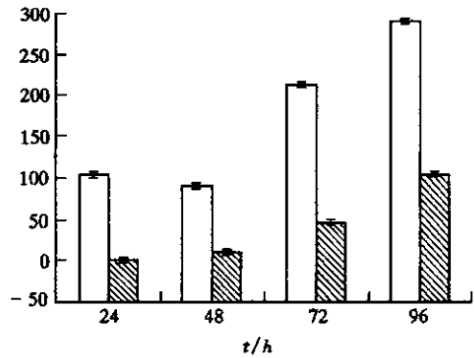


图 1 用 RIA 测定 gfGHI 在 Sf9 细胞内及细胞培养基上清中的含量

Fig. 1 Quantification of gfGHI in Sf9 cells and culture medium using RIA

- GHI in medium; ▨ GHI in Sf9 cells

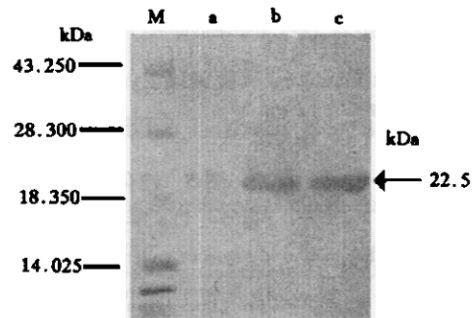


图 3 纯化后的 gfGHI 的 Western 印迹

Fig. 3 Western blotting of gfGHI which was purified

- a. SFM before purified; b. gfGHI after purified using DEAE exchange; c. gfGHI after purified using DEAE exchange and gel filtration; M. Prestained protein markers

2.2 gfGHI 的纯化

收集 60ml 感染了 VGHI21a 96h 的细胞培养基,经离心、透析处理后,过 DEAE-阴离

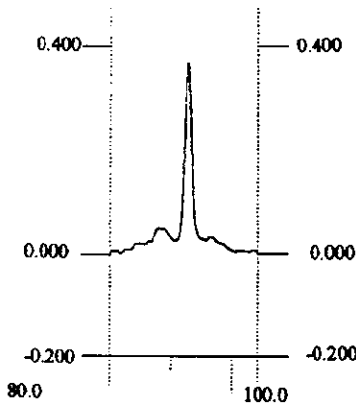


图 4 纯化的 gfGHI 的纯度扫描

Fig.4 The purity of gfGHI purified

子交换柱,根据 SDS-PAGE 及 Western 印迹的结果,可见目标蛋白已得到浓缩,但仍然有杂蛋白的存在。将此纯化得到的蛋白经超滤再次浓缩后,过凝胶柱,经 SDS-PAGE 及 Western 检测,表明在收集的 31 支管中以第 23、24、25 支管为最纯,其中以第 24 管的量最多。纯化后的 SDS-PAGE 及 Western 结果如图 2,3 所示,纯度达 95% 以上(图 4)。纯化后蛋白含量的 RIA 的结果如表 2 所示。平均每毫升培养基可纯化 gfGHI 664.224ng。所表达的金鱼生长激素 I 含量稀释曲线与鲤鱼 GH 标准曲线平行,说明实验结果可靠(图未显示)。

2.3 纯化后的 gfGHI 的 N-末端蛋白测序

将纯化的蛋白 50pmol 加样到蛋白自动测序仪中,测出 N-末端的头 20 个氨基酸与未切割即带有信号肽的 gfGHI 蛋白序列比较表明,用杆状病毒表达系统表达出的 gfGHI 不但可分泌到胞外且可准确地将信号肽切除(如图 5 所示),这就为保持表达出的 GH 的生物活性提供了保障。

-22
Met Ala Arg Ala Leu Val Leu Leu Ser Val Val Leu Val Ser Leu Leu Val Asn Gln
+1
Gly Arg Ala ***Ser Asp Asn Gln Arg Leu Phe Asn Asn Ala Val Ile Arg Val Gln His***
Ser Asp Asn Gln Arg Leu Phe Asn Asn Ala Val Ile Arg Val Gln His
+10
+20
Leu His Gln Leu Ala Ala Lys.....
Leu His Gln Leu

图 5 纯化后的 gfGHI 的 N-末端序列测定结果

Fig.5 The N-terminal protein sequencing results of gfGHI

The amino acid sequence underlined is signal peptide, Mature protein beginning at position + 1,

The N-terminal protein sequencing results are shown in bold and italic

3 讨 论

RIA 结果充分证实了金鱼生长激素 I 基因在杆状病毒表达系统中得到了高效的表达,最高时可分泌到细胞培养基中达 288.07ng/10⁵ 细胞。由于所表达的蛋白是分泌型,因此,利用无血清培养基可简化重组蛋白的纯化步骤。结果证明金鱼生长激素得到了成功的纯化,纯度达 95% 以上,纯化产物具有免疫活性。N-末端蛋白序列分析结果表明信号肽得到了识别并被准确地切割,由于 gfGH N-末端第 6~22 的氨基酸是 GH 的功能区^[7],因此 N-末端信号肽的准确切割就充分保障了表达产物的生物活性,同时也体现了杆状病毒表达载体系统与原核表达系统相比在翻译后加工上突出的优势^[8]。

表 2 纯化后的 GHI 含量
Table 2 Quantity of GHI after purified

Dilution	Undiluted GHI/ng·ml ⁻¹ (fraction 23)	Undiluted GHI/ng·ml ⁻¹ (fraction 24)	Undiluted GHI/ng·ml ⁻¹ (fraction 25)	Average of GHI/ ng·ml ⁻¹	Total volume/ml	Total GHI purified/ng	Total medium/ml	GHI purified/ ng·ml ⁻¹ medium
320	78629.44	107761.28	79298.88	88563.2	450	39853.44	60	664.224

编码金鱼生长激素 I 的 cDNA 虽然已从金鱼的脑垂体中得到克隆^[2],但金鱼生长激素 I 在金鱼体内的转录及翻译水平的研究还未见报道。本研究所表达的重组金鱼生长激素 I 作为一个标准品来研究天然的金鱼生长激素 I;重组金鱼生长激素 I 的纯化方法也为将来从金鱼脑垂体中提纯金鱼生长激素 I 提供了一个参考。目前,人们正在着手研究用基因工程生产的重组生长激素制品投喂养殖鱼类以直接刺激它们快速生长,并已取得一定成效^[5],因此可用于生长激素制品投喂养殖金鱼以直接刺激它们快速生长。由此可见,本研究首次成功地表达的金鱼生长激素 I 无论在理论研究还是生产实践上都有重要的意义。

参 考 文 献

- O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual, New York, WH Freeman, 1992
- Law M S, Cheng K W, Fung T K *et al.* Archives of Biochemistry and Biophysics. 1996, 330:19-23
- 林广云,王陶章,Aderson Wong 等. 生物工程学报, 1997, 13(2):149-153
- Skarphedinnsson O, Power D M, Ingleton P M. General and Comparative Endocrinology. 1990, 80:393-398
- Lin H R, Zhang Q, Peter R E. Aquaculture. 1995, 129:342
- 林浩然,彭 纯,梁坚勇等.《鱼类生理学实验技术和方法》,广州:中山大学出版社.1988, pp.62-66
- 林浩然. 动物学报, 1996, 42:69-79
- Keiko K O, Masanori Y, Yoshiaki H. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, 213(2):389-396

Purification of Baculovirus Recombinant Goldfish Growth Hormone I

Lin Guangyun Long Qingxin Chan Kamwing¹ Wang Xunzhang Wong Anlam¹
Wendy Ko¹ Eric Lee¹ Yu Keili¹

(State Key Laboratory for Biologic Control of Zhongshan University, Guangzhou 510275)

(Department of Zoology, The University of Hong Kong, Hong Kong)¹

Abstract The expression level *in vivo* and *in vitro* were quantified using RIA. Average of 10⁵ Sf9 cells may secrete gfGHI into medium reaching level of 288.07ng in 96 h pi(post infection); The expression level of gfGHI in larvae may reach to 925.3mg per gram of dry larvae. The gfGHI was purified from the serum free medium(SFM) of cultured Sf9 cells which infected with recombinant viruses containing gfGHI gene. 666.224ng of gfGHI whose purity higher than 95% was purified from per minilitre SFM medium. The results of protein sequencing of N-terminal of purified gfGHI proved that the signal peptide were cleaved accurately. These results, taken together, suggest that gfGHI were highly expressed successfully using baculovirus expression system and the expressed gfGHI was modified by this system.

Key words Baculovirus expression vector system, goldfish growth hormone gene, RIA, purification