肿瘤坏死因子的分离纯化*

王光虎[1]　冯小黎[2]　张晓靖[2]　苏志国[2]　吴淑华[3]

[1](大连理工大学化工学院　大连　116012)

[2](中国科学院化工冶金研究所　北京　100080)

[3](中国预防医学科学院病毒所　北京　100052)

关键词　肿瘤坏死因子,化学法破碎细胞,基因工程菌,组合层析,蛋白质纯化

分类号　R73　**文献标识码**　A　**文章编号**　1000-3061(1999)02-0270-73

肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor-α)具有抗肿瘤、抗病毒和免疫调节等功能。自从 1975 年 Carswell 等人[1]发现该因子以来,TNF 一直受到科学界的重视。TNF 是一种含有 157 个氨基酸的非糖基化蛋白,相对分子质量大约为 17 350[2]。其热稳定性较好[3],天然活性形式是三聚体[4]。表达在大肠杆菌中的 TNF 大都分泌在胞内,因此分离 TNF 必须先打破细胞。Ikehara、Sreekrishna 等人利用溶菌酶来进行破碎[5-7],Luksa 等人利用超声波破碎[7,8]。溶菌酶的价格比较昂贵,超声波法产生的自由基会使某些蛋白质变性失活[9]。相比之下,化学法释放产物具有操作简单、易于放大的优点。它能溶解微生物细胞壁和细胞膜,使胞内产物释放出来。因此本文使用盐酸胍为化学溶菌剂,悬浮大肠杆菌使细胞的基因工程 TNF-α 释放出来。在此基础上,设计并比较了 3 种组合层析纯化 TNF 的路线,利用 TNF-α 的热稳定性,与层析相结合,得到比活为 1.7×10^7 u/mg,单一电泳条带的 TNF-α。

1　实验材料与方法

1.1　菌种

pAT153 和 pTNF320 质粒均由中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室构建,表达的 TNF 不形成包涵体。宿主菌为 *E. coli* JM103。

1.2　材料

离子交换介质 DEAE-Sepharose F.F 及凝胶过滤介质 Sephacryl S-200 购自瑞典 Pharmacia 公司;盐酸胍购自上海试剂二厂;其它试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3　菌体的培养

含 pTNF320 的大肠杆菌在含氨苄青霉素的 LB 培养基中培养,含 pAT153 的大肠杆菌在含四环素的 LB 培养基中培养。温度 37℃,搅拌转速 200r/min,通气量 0.5～0.6L/(L·min),pH 控制在 7.5 左右。

1.4　TNF 的纯化方法

离心收集菌体,用蒸馏水冲洗 2～3 次;以液质比 1:3 把菌体悬浮在一定浓度的盐酸胍(pH8.0)溶液中,0℃ 低速搅拌;破碎液于 4℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清液稀释后透析(外液用 20mmol/L Tris.HCl,pH8.0);热变性后于 4℃、15 000 r/min 离心 15 min;取上清液经 DEAE-Sepharose F.F 柱,用梯度 NaCl 洗脱,收集活性峰;活性峰样品经 PEG6 000 浓缩,再经 Sephacryl S-200 分子筛层析,洗脱液为

* 国家杰出青年科学基金(No.29525609)和国家自然科学重点基金(No.29736180)资助项目。

收稿日期:1998-03-25,修回日期:1998-10-20。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

PBS(pH7.4);收集活性峰即为所获 TNF。

1.5　TNF 活性测定方法

参照 Aggarwal[10]的方法。L929 细胞由中国预防医科院病毒所病毒基因工程国家重点实验室惠赠。

1.6　蛋白质浓度测定

用 Bradford 法[11],以牛血清白蛋白为基准。

1.7　TNF 纯度测定

用 SDS-PAGE 测定[12]。15%分离胶,4.5%浓缩胶。考马斯亮蓝染色。标准蛋白为 BRL 公司产品。

2　结果与讨论

2.1　破菌时间对产物活性的影响

图 1 是盐酸胍浓度为 5 mol/L 时蛋白质释放量和 TNF 活性随时间的变化曲线(c_G 为盐酸胍的浓度, U_t 为胞内 TNF-α 活性)。其他破菌条件的选择见文献[3]。

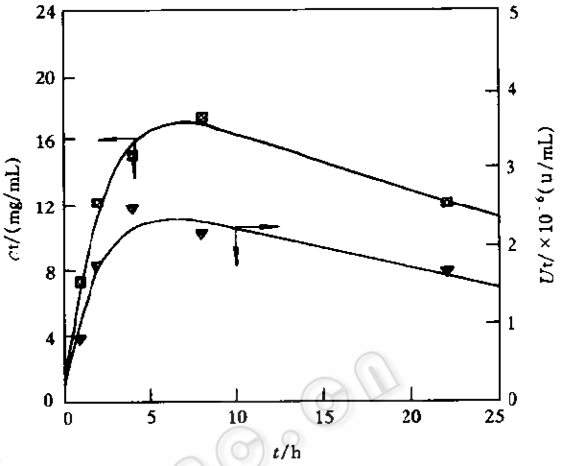

图 1　破碎时间对蛋白释放和 TNF 活性的影响

(T 0℃;Ratio of liquid and cell:1∶3;pH8.0, c_G(= 5 mol/L)

2.2　几种层析组合方式的影响

2.2.1　盐酸胍裂解细胞后的离心上清液经 DEAE-Sepharose F.F 及 Sephacryl S-200 纯化:收集各峰样品,进行 TNF 活性检测,可知在离子交换层析 100 mmol/L NaCl 洗脱峰为活性峰。检测结果如表 1 所示,层析谱图略。蛋白质粗品先经离子交换再经凝胶过滤层析纯化,回收率为 12.5%,提纯倍数为 7.3。

表 1　DEAE-Sepharose F.F 及 Sephacryl S-200 的层析结果

Purification steps	Total activity /×10⁻⁶(u/mL)	Specific activity /×10⁻⁶(u/mg)	Yield /%	Purification factor
After cell lysis	38.0	1.3	—	—
After DEAE-sepharose	13.0	3.7	34.7	2.85
After sephacryl S-200	4.8	9.5	12.5	7.31

2.2.2　盐酸胍裂解细胞后的离心上清液先经 Sephacryl S-200 分子筛,再经 DEAE-Sepharose F.F 纯化:离子交换层析中 100 mmol/L NaCl 洗脱峰为 TNF 活性峰。检测结果如表 2 所示:先经凝胶过滤再离子交换层析纯化,回收率为 5.7%,提纯倍数为 19.1。

表 2　经 Sephacryl S-200、再经 DEAE-Sepharose F.F 纯化结果

Purification steps	Total activity /(×10⁶ u/mL)	Specific activity /(×10⁶ u/mg)	Yield /%	Purification factor
After cell lysis	26	1.1	—	—
After sephacryl S-200	3.3	11	12.7	10
After DEAE-sepharose	1.5	21	5.7	19.1

2.2.3　细胞经盐酸胍裂解,热变性,经 DEAE-Sepharse F.F 和 Sephacryls-200 层析:蛋白质粗品先放入一定温度水浴中保持一定时间进行热变性,然后离心,取上清上样。图 2 是热变性对蛋白质浓度和 TNF 活性的影响。由图可见,经 42℃ 热处理后,TNF 的活性几乎没有下降,比活性有提高。而 68℃ 变性后,TNF 的活性几乎丧失殆尽。本文证明了 TNF 的热稳定性。42℃ 热处理后,由于 TNF 较稳定,而其它蛋

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

白质部分失落,使 TNF 比活增大,达到了去除杂蛋白的目的。本文选择 42℃ 30min 较合适。取热变性后样品上层析柱,检测结果如表 3 所示。

表 3 热变性后经 DEAE-Sepharose F.F 及 Sephacryl S-200 纯化

Purification steps	Total activity /(10^6u/mL)	Specific activity /(10^6u/mg)	Yield /%	Purification factor
After cell lysis	26.0	0.85	—	—
Dialysis	23.5	0.86	90.4	1
Heat denaturation	23.0	1.01	88.5	1.19
After DEAE-sepharose	12.0	4.9	46.2	5.76
After sephacryl S-200	4.0	17.0	15.4	19.7

2.2.4 电泳检测纯度: 分别取破碎后、离子交换和凝胶过滤后的样品做 SDS-PAGE, 用考马斯亮蓝染色。可见纯化后在 17 000 处有单一蛋白条带。见图 3。

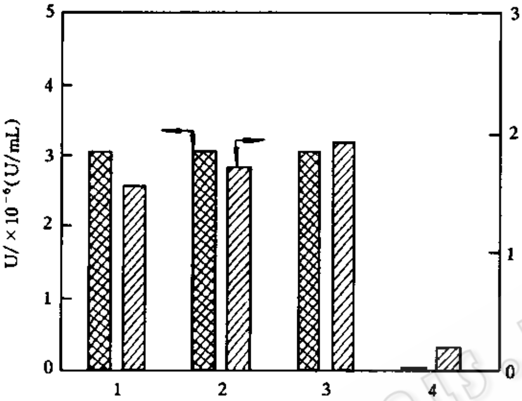

图 2 热变性的影响

Methods: ■ TFN activity ▨ TNF specific activity

1. Untreated; 2. Heat treated at 42℃ for 20min; 3. Treated at 42℃ for 30min; 4. Treated at 68℃ for 20 min

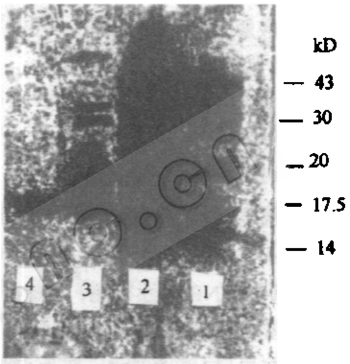

图 3 SDS-聚丙烯酰铵凝胶电泳

1. Protein marker, 2. Crude sample, 3. Sample after ion exchange chromatography, 4. Active peak of rhTNF purified by sephacryl S200

2.3 讨 论

通过上述 3 种不同纯化方式组合的比较可以看出,样品经过热变性处理再经层析,比未经热处理直接上样的纯化倍数和回收率均高。热处理的另一优点是可以除掉部分核酸和杂蛋白,有利于延长层析柱的寿命。因此经过热变性的方法较优。

样品经化学法裂解,直接取离心上层清液上凝胶过滤层析柱的优点在于,纯化步骤减少,省去透析和浓缩,最后结果是纯化倍数较高,缺点是回收率低。主要原因是两步上柱的收率偏低,这与洗脱液的选择和操作时间过长有关。若能进一步摸索层析条件,回收率可望提高。

参 考 文 献

[1] E. A. Carswell, L J. Old, R. L. Kassel *et al*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 1975, **72**: 3666~3670.

[2] E. J. Jones. *Nature*, 1989, **338**: 225~228.

[3] T. Shirai, H. Yamagucht, H. Ito *et al*. *Nature*, 1985, **313**: 803~806.

[4] R. A. Smith C. Baglioni. *J. Biological Chemistry*, 1987, **262**: 6951~6954.

[5] M. Ikehara, K. Fujimoto, N. Matsuo *et al*. *Acta Med Scand*, 1986, **220**: 387~94.

[6] K. Sreekrishna, L. Nelles, R. Potenz *et al*. *Biochemistry*, 1989, **28**: 4117~4125.

[7] J. Luksa, V. Menart, S. Milicic *et al*. *J. Chromatogr. A*, 1994, **661**: 161~168.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[8] Cetus Corporation, EU, 0263526 A1, 09.1987.
[9] Y. Chisti, M. Moo-Young. *Enzyme Microb. Technol.*, 1986, **8**(4):194~204.
[10] B. B. Aggarwal, W. J. Kohn, P. E. Hass *et al*. *J Biol Chem*, 1985, **260**(4):2345~2354.
[11] M. M. Bradford *Anal Biochem*, 1976, **72**:248~254.
[12] U. K. Laemmli. *Nature*, 1970, **227**:680~685.
[13] 王光虎,冯小黎,苏志国等,高校化学工程学报,1996, **10**(3):297~303.

Separation and Purification of Recombinant Tumor Necrosis Factor from *Escherichia coli* *

Wang Guanghu[1] Feng Xiaoli[1] Zhang Xiaojing[1] Su Zhiguo[2] Wu Shuhua[3]
[1](*Institute of Biochemical Engineering Dalian University of Technology, Dalian* 116012)
[2](*Institute of Chemical Meallurgy, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080)
[3](*Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing* 100052)

Abstract Tumor necrosis factor alpha(TNF-α) was released from recombinant *Escherichia coli* by chemical permeation method. Further purification was done by three types of integrated chromatography utilizing TNF's heat stability. The final product was found pure by gel electrophoresis with coomassie brilliant blue staining. The final specific activity of TNF-α was 1.7×10^7 u/mg.

Key words Tumor necrosis factor, chemical permeabilization, recombinant *E. coli*, integrated chromatography, protein purification

* National Execellent Youth Scholar Award and Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 29736180).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn