

## 毕赤酵母表达重组人白细胞介素 11 的纯化与鉴定

黄岩山<sup>1\*</sup> 董 勇<sup>2</sup> 李 辉<sup>2</sup> 王同映<sup>2</sup> 裘霁宛<sup>2</sup> 余应年<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(浙江大学医学院 杭州 310006)

<sup>2</sup>(杭州九源基因工程有限公司 杭州 310018)

**摘 要** 报道了毕赤酵母表达人白细胞介素 11 的下游工艺研究,并对其产物进行了分析鉴定。所用工艺流程为离心收集上清、超滤浓缩脱盐、离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤。所得产物经 SDS-PAGE 电泳、RP-HPLC 分析、N 端和 C 端序列分析、质谱、等电点分析和生物学活性分析。结果表明:产品纯度大于 97%,结构和性质与 *E. coli* 融合表达的 Neumega 完全一致。

**关键词** 毕赤酵母,重组人白细胞介素 11,纯化,鉴定

中图分类号 R968 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0250-04

人白细胞介素 11(hIL-11)是一种多功能的细胞因子,最基本的功能在于造血调控作用,它能刺激人的造血祖细胞和巨核细胞前体的分化并诱导巨核细胞的生成和成熟,最终导致血小板数量的增加。此外,它还具有促进消化道上皮损伤的恢复、调节脂肪细胞分化等多种生物活性<sup>[1,2]</sup>。FDA 于 1997 年批准该产品上市,用于防止化疗引起的再生性血小板减少症<sup>[3,4]</sup>。它是目前全世界唯一已用于临床的促进血小板生成药。其它适应症如肿瘤化疗引起的口腔粘膜炎症、节段性回肠炎的治疗也正处于临床阶段,具有较好的临床应用价值<sup>[5]</sup>。但是,由于该蛋白的性质相当特殊,结构上富含 Pro,等电点极高,常规的表达和复性都很困难,因此目前的生产都是采用融合表达方法,生产过程中需酶切处理,工艺复杂,成本居高不下。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)系统是近年来发展起来的一个外源蛋白表达系统<sup>[6]</sup>。它既具有 *E. coli* 系统操作简便、生产成本低等优点,又对重组蛋白有一定的折叠和加工能力,已用于表达 EGF、TNF、HSA 等多种蛋白<sup>[7]</sup>。这里,我们利用毕赤酵母分泌表达人白细胞介素 11 的工程菌,对其纯化工艺和表达产物进行了研究,并与 *E. coli* 融合表达的 rhIL-11 做了对比分析。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌种

工程菌由本公司自行构建。由于天然 IL-11 基

因在甲醇酵母中不能有效表达,因此我们根据甲醇酵母的偏爱密码子,人工合成了缺失第一位 Pro 的人 IL-11 全长基因,经克隆转化筛选得到 rhIL-11 的高表达工程菌 JY114。

#### 1.2 工程菌培养与上清收集

设定发酵温度 30℃,利用全自动发酵罐(Biostat C, B. Braun Biotech)进行发酵。根据需要进行培养基成分添加,待甘油耗尽后进入甲醇诱导阶段。诱导阶段进行 pH 及溶氧的控制。整个发酵时间视工程菌生长情况确定。培养结束后离心法收集发酵上清液。

#### 1.3 发酵液预处理

利用 Pellicon 超滤系统(美国 Millipore 公司),孔径为 5000 的超滤膜堆,以 5:1 的比例,用 20mmol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液对发酵上清进行超滤脱盐处理,使最终发酵上清的电导小于 5mS/cm。

#### 1.4 rhIL-11 的纯化

纯化采用的层析系统为 ÄKTA Explore(瑞典 Pharmacia 公司)。发酵上清先经 SP Sepharose FF 柱层析纯化。柱子先用 20mmol/L Tris-HCl(pH8.0)平衡,经预处理的发酵上清液直接上样后,用 NaCl 梯度洗脱。收集 rhIL-11 目标峰,再加入固体硫酸铵至 2.0mol/L,上 Phenyl Sepharose HP 柱,2.0~0mol/L 硫酸铵梯度洗脱。收集目标峰后,再上经 5mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)平衡的 Sephadex G25 柱脱盐获得纯化终产品。

## 1.5 分析与鉴定

**1.5.1** 菌体浓度用分光光度计在 600nm 波长处测定光密度值 ( $OD_{600}$ ) ;12.5% 的 SDS-PAGE 采用 Laemmli 法<sup>[8]</sup> ;蛋白质定量采用 Bradford 法。表达量采用光密度扫描法 (Pharmacia VDS system )

**1.5.2** rhIL-11 纯度采用 HPLC-C4 反相柱 (Vydac , USA.20% ~ 90% 含 0.1% TFA 乙腈梯度 ,流速为 0.8mL/min 检测波长为 214nm )测定。

**1.5.3** 等电点测定采用 Beckman 公司的毛细管等电聚焦电泳系统测定 ,方法见说明书。两性电解质的 pH 范围为 3 ~ 10。质谱委托中科院化学所测定 ,N 端和 C 端测序委托中科院上海生物化学研究所测定。

**1.5.4** 生物学活性分析 :用 IL-6 依赖细胞株 7TD1 和 MTT 色素还原法测定酵母表达的 rhIL-11 的生物学活性<sup>[9]</sup> ,以 Genetics Institute 大肠杆菌重组表达的 rhIL-11 (商品名 :Neumega) 为对照 (比活为  $8.0 \times 10^6$  u/mg )。用酶标仪测定  $OD_{570nm}$  ,参考波长为 630nm。以  $OD$  值为 Y 轴 ,板上稀释梯度的对数为 X 轴 ,作对照品和待检样品的量效关系散点图。利用 Excel 软件对实验结果进行回归分析 ,得到各样品的回归方程和相关系数。根据回归方程求出各样品的  $ED_{50}$  值。样品比活按下式计算 :

$$\text{待检样品比活性 (u/mg)} = \text{对照品比活性 (u/mg)} \times \text{对照品 } ED_{50} / \text{待检样品 } ED_{50}$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组工程菌的高密度高表达发酵

对于罐上发酵 ,为缩短培养时间 ,减小因为表达外源蛋白导致的对重组菌株的选择压力 ,rhIL-11 发酵分两阶段进行。首先 ,在以甘油为唯一碳源的合成培养基中增殖菌体 ,等甘油耗尽后再加甲醇诱导 IL-11 基因表达。另外实验证明在中性 pH 下 rhIL-11 表达水平不高 (蛋白酶降解) ,因此将甲醇诱导阶段的 pH 降低以抑制蛋白酶对分泌表达产物的降解。诱导至 72h 以上表达达到最高峰 ,放罐 ,此时菌浓度  $OD_{600} \geq 200$  ,上清液中 rhIL-11 表达量经 SDS-PAGE 分析大于 0.4g/L。图 1 为 JY1L4 菌种罐上培养菌密度与 rhIL-11 表达量的关系图。

### 2.2 rhIL-11 的分离与纯化

酵母分泌表达的最大特点就是表达产物直接分泌在培养基中 ,不需要复杂的破菌手段 ,而且表达上清中杂蛋白含量很低。但是 ,由于发酵培养基含有

大量的无机盐和酵母代谢产物 ,因此我们利用切向流超滤技术 ,去除发酵上清中的小分子杂质 ,使其有利于下一步的离子交换层析。

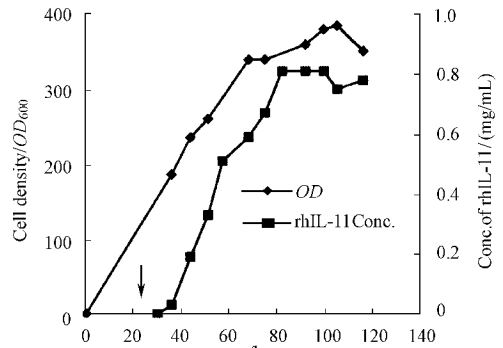


图 1 高密度发酵中 JY1L4 生长曲线与 rhIL-11 的表达量

Fig.1 JY1L4 growth curve and the expression of rhIL-11

→ Inducing

由于 rhIL-11 的等电点偏碱性 ,因此我们选用了 SP 阳离子交换层析进行初步纯化 (见图 2) ,一步即可去除绝大部分杂蛋白 ,使其蛋白纯度达 90% 以上。

精纯化采用了 Phenyl Sepharose HP 柱。由于它是通过疏水性质进行分离 ,与离子交换具有不同的分离机理。因此 ,除了去除杂蛋白外 ,还能去除大部分的色素、热原质和核酸片段等非蛋白类杂质。经过此柱 ,蛋白纯度即可大于 98% (见图 2)。

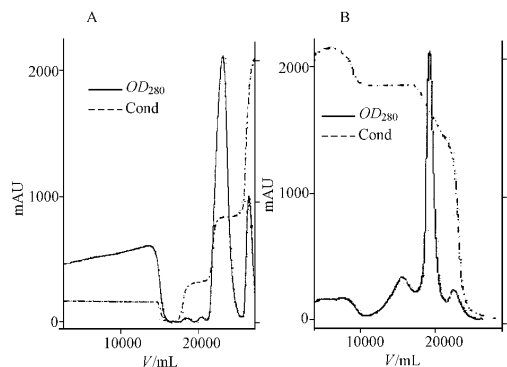


图 2 SP Sepharose FK (A) 和 Phenyl Sepharose HR (B) 分离纯化 rhIL-11 的层析图

Fig.2 Chromatograph of rhIL-11 on SP Sepharose FK (A) and Phenyl Sepharose HR (B)

最后通过 Sephadex G25 柱脱盐 ,不仅能去除发酵和纯化过程中的小分子物质 ,还可将蛋白转入适合于制备制剂的缓冲液体系中。

整个纯化过程中 ,超滤处理后的样品电导较低 ,刚好能满足离子交换的要求 ,而经离子交换的样品 ,含有一定的盐浓度 ,适合于进行疏水层析。而且这

两步都是吸附性层析,具有较好的浓缩蛋白的能力,样品体积变小,刚好适合于脱盐层析。因此,整个纯化组合相对比较合理,不需要其他的处理步骤,易于工业放大。纯化的总回收率在 28% 左右,蛋白生物学活性与对照品相当,产品最终纯度在 98% 以上。纯化各步骤的 SDS-PAGE 电泳图谱见图 3。

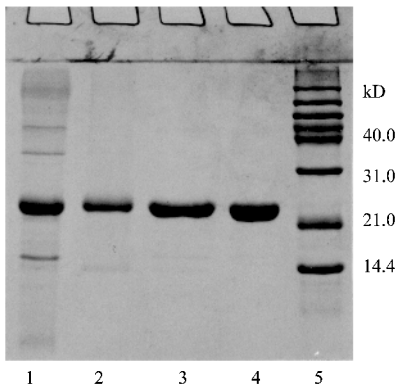


图 3 rhIL-11 纯化过程中的 SDS-PAGE 图

Fig.3 SDS-PAGE analysis of rhIL-11

1. Supernatant 2~4. Purification after CM Sepharose FF, Phenyl Sepharose FF, Sephadex G25, respectively 5. Marker

表 1 毕赤酵母 JY114 表达的 rhIL-11 的纯化

Table 1 Purification of rhIL-11 from *Pichia pastoris* JY114

Procedure	Total rhIL-11	Purity	rhIL-11 recovery
	/g	/%	/%
Supernatant	31	-	100
Ultrafiltration	25.1	-	81
CM Sepharose FF	14.1	90.8	45.5
Phenyl Sepharose HP	9.43	97.5	30.4
G25 desalting	8.87	98.6	28.6

## 2.3 rhIL-11 的鉴定

**2.3.1 SDS-PAGE 电泳和免疫印迹分析** SDS-PAGE 电泳分析表明它的分子量比理论值(19kD)大,为 22kD 左右,可能与它的特殊结构有关。但不同方法表达的蛋白其电泳行为和免疫性质是一致的(参见图 4)。

**2.3.2 RP-HPLC 分析** 经 Sephadex G25 脱盐的半成品用 RP-HPLC 进行纯度鉴定,纯度超过 97%(图 5)。

**2.3.3 等电点分析** 由于 rhIL-11 富含碱性氨基酸,因此它的理论等电点高达 11.4,目前没有哪一种两性电解质能用于它的测定。因此,我们采用毛细管等电聚焦电泳方法,对毕赤酵母分泌表达的 rhIL-11 进行了分析,与对照品( Neumega )相比,它们的出峰位置基本一致,两者等电点均大于 10。

**2.3.4 N 端和 C 端序列分析** 对甲醇酵母分泌表达的 rhIL-11 的 N 端 15 个氨基酸和 C 端 5 个氨基酸进

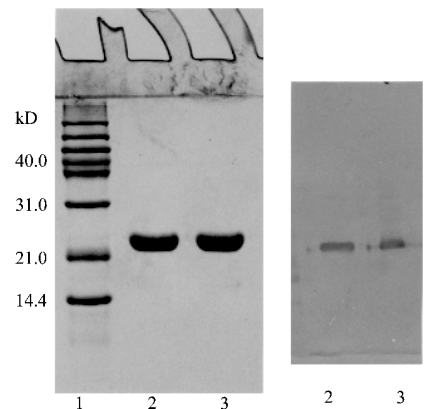


图 4 纯化后 rhIL-11 电泳和免疫印迹分析图

Fig.4 SDS-PAGE and Western-blotting analysis of purified rhIL-11

1. Marker; 2. Purified rhIL-11; 3. Neumega

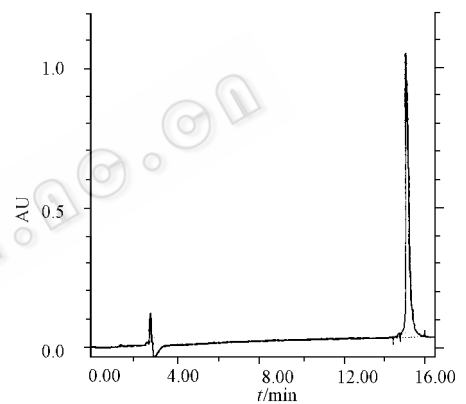


图 5 rhIL-11 纯度鉴定

Fig.5 Purity analysis of rhIL-11 by RP-HPLC

行测定的结果为  $\text{NH}_2\text{-GPPPGPPRVSPDPRAE}$  和  $\text{LK-TRL-COOH}$ ,与理论一致。

**2.3.5 质谱分析** 毕赤酵母分泌表达系统与大肠杆菌不一样的是它有一定的修饰加工能力,特别是糖基化修饰。质谱分析表明,酵母表达来源的 rhIL-11 分子量为 19060, Neumega 为 19056,而理论分子量为 19051,两者非常吻合,说明不同来源的 rhIL-11 均无任何修饰。

**2.3.6 生物学活性分析** 结果见图 6,两者活性基本相当,酵母表达的 rhIL-11 比活为  $8.2 \times 10^6$  u/mg。

以上分析结果证明,不同表达系统所生产的 rhIL-11,其结构和性质是相同的。此外,还进行了动物体内药效、药代、急性毒性和长期毒性等研究,表明不管是药效还是毒性,两者结果也是基本一致。

rhIL-11 由于其结构的特殊,用常规的表达方法很难获得有活性蛋白。但临床对 rhIL-11 的用量很大,目前国外临床每次为 5mg,需连续使用 1 周以上。现有的融合表达的方案成本高,工艺复杂,难以

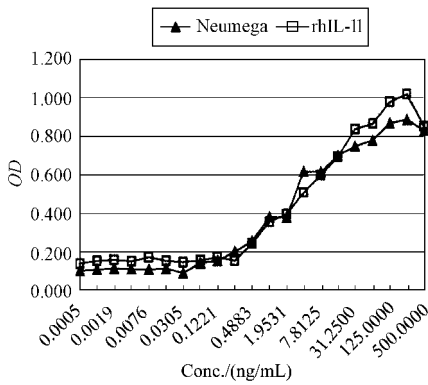


图 6 毕赤酵母表达 rhIL-11 生物学活性测定

Fig.6 Bioactivity of rhIL-11 expressed by *Pichia pastoris*

满足临床需求。因此,发展低成本的生产方案的要求极为迫切。我们在这里报道的酵母生产系统,具有表达量高、生产成本低、易于规模生产,获得的产品与已经在临床使用的 Neumega 性质一致,与传统生产技术相比,具有重大突破,至今尚未见有该方面的报道。因此,该技术具有极大的实用前景,目前正在临床申报之中。

## REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Du X X, Williams D A. Review of molecular, cell biology and clinic

use. *Blood*, 1997, **89**( 11 ) : 3897 ~ 3908

- [ 2 ] Reynolds CH. Clinical efficacy of rhIL-11, *Oncology*( *Huntingt* ). 2000, **14**( 9 Suppl 8 ) : 32 ~ 40.
- [ 3 ] Kaye JA *et al*. FDA licensure of NEUMEGA to prevent severe chemotherapy-induced thrombocytopenia, *Stem Cells*, 1998, **16**( Suppl 2 ) : 207 ~ 223.
- [ 4 ] Rust DM, Wood IS, Battiato LA *et al*. Oprelvekin: an alternative treatment for thrombocytopenia, *Clin J Oncol Nurs*, 1999, **3**( 2 ) : 57 ~ 62
- [ 5 ] Dickinson EC, Tincer R, Nadler EP, Koltuksuz U *et al*. Recombinant human interleukin-11 prevents mucosal atrophy and bowel shortening in the defunctionalized intestine. *J Pediatr Surg*. 2000, **35**( 7 ) : 1079 ~ 83.
- [ 6 ] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**( 1 ) : 45 ~ 66
- [ 7 ] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W G. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, *Bio/Technology*, 1993, **11** : 905 ~ 910
- [ 8 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 9 ] Miao J H (苗继红), Wang J X (王嘉玺) *et al*. Cloning and expression in *E. coli* of hIL-11 gene. *Sci China( series B )* ( *中国科学 B 辑* ), 1995, **25**( 6 ) : 616 ~ 622

## Purification and Characterization of Recombinant Human Interleukin 11 Which Expressed by *Pichia pastoris*

HUANG Yan-Shan<sup>1\*</sup> DONG Yong<sup>2</sup> LI Hui<sup>2</sup> WANG Tong-Ying<sup>2</sup> QIU Ji-Wan<sup>2</sup> YU Ying-Nian<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310005, China )

<sup>2</sup>( Hangzhou Jiuyuan Gene Engineering Co. Ltd. Hangzhou 310018, China )

**Abstract** This study first time report a method to purify the rhIL-11 which expressed by *Pichia pastoris*. rhIL-11 was secreted into the supernatant and collected by centrifugation. The purity of rhIL-11 reached 97% through the steps of ultrafiltration, SP Sepharose FF, Phenyl Sepharose HP and Sephadex G25. Analysis of SDS-PAGE, Western-blotting, IEF, RP-HPLC, Mass spectrometer, N and C terminus amino acid sequence and bioactivity was conducted. All the analysis results proved that the rhIL-11 expressed by *Pichia pastoris* was the same as Neumega which was expressed in *E. coli* with fusion expression system. So it is possibly a cheaper and easilier method to produce rhIL-11 for clinical use.

**Key words** *Pichia pastoris*, recombinant human interleukin 11, purification, characterization

Received : November 10, 2000

\* Corresponding author. Tel: 86-571-69110099; Fax: 86-571-6911688; E-mail: niuwa2000@sina.com