

同柱串联凝胶过滤从重组人肿瘤坏死因子中脱除 PEG 和盐

谷振宇 冯晓黎 苏志国*

(中国科学院化冶所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

关键词 肿瘤坏死因子, 破碎和双水相萃取联合操作, 串联凝胶过滤

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0471-03

rhTNF- α 是一种具有较强抗癌活性的蛋白质, 因此近年来人们对它的提取和分离纯化做了大量工作^[1,2]。破碎萃取联合操作是对双水相萃取和珠磨法破碎的发展和集成。它的出现给 rhTNF- α 粗提开了一个好头。经双水相萃取后, 上相大量的 PEG 及盐保护了同样处于上相的 rhTNF- α 的活性^[3]。但大量 PEG 及盐的存在使样品很难用层析来进一步纯化。目前双水相萃取后面常跟一两步反萃取, 但该方法影响因素多、收率低且会造成产物的稀释^[4]。由于破碎萃取联合操作所用的 PEG1540、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与目标蛋白的分子量 (rhTNF- α 分子量为 51kD 左右) 相差较大^[2], 因此可以考虑用超滤、凝胶过滤等利用分子量的差别来进行物质分离的方法将 PEG 及盐从目标蛋白中除去。由于 PEG 是线型分子, 易把超滤膜膜孔堵塞, 且蛋白质在膜上的吸附, 也易使蛋白质失活。由于浓差极化形成凝胶层也不利于 PEG 分子进一步透过^[5]。如果要进行缓冲液的更换, 就必须进行透滤, 既费时又费力。而凝胶过滤则只根据蛋白质分子大小不同来分离, 故在层析过程中不易使蛋白质变性失活, 可以达到很高的回收率, 并能同时实现去除 PEG、脱盐和更换缓冲液, 而且还可以除去一些与目标蛋白质分子量相差较大的一些蛋白质及核酸等杂质, 可以起到初步纯化的作用。因此用凝胶过滤来进行联合操作与后续步骤的衔接有可能达到一举数得的效果。我们通过对不同凝胶介质分辨率及含水量的综合考虑发展了一种同柱串联凝胶过滤, 在实验中较好地实现了 PEG、盐与目标蛋白质 rhTNF- α 的分离。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用各种试剂均为进口或国产分析纯。所用层析实验在 Amersham Pharmacia Biotech 公司生产的低压层析装置及 AKTA purifier 上进行。

1.2 实验方法

1.2.1 重组菌的培养 基因工程菌由中国预防医科院病毒所基因工程国家重点实验室赠送。宿主菌为大肠杆菌

JM103 表达质粒为 pAT153。用 LB 培养基在 7L 发酵罐 (美国 New Brunswick Scientific 公司) 上培养, 采用葡萄糖恒 pH 流加法操作^[6]。

1.2.2 细胞破碎萃取联合操作 离心收集发酵后的重组大肠杆菌菌体 (Beckman J6-MC 4000r/min, 30min)。用蒸馏水洗 2~3 次。菌体用含 25% PEG1540 和 10% 硫酸铵的 20mmol/L PBS pH7.0 用磁力搅拌悬浮成匀浆, 在 4℃ 冰箱中保存 8~10 min。将 220 g 直径为 0.25~0.5 mm 的无铅玻璃珠加到破碎室中, 然后缓慢加入 80 mL 菌体匀浆, 边加边用手缓慢转动搅拌轴以使玻璃珠与菌体匀浆充分混合。于 2500 r/min, 3 min, 3℃ 破碎离心后分相, 取上相溶液进行活性和蛋白质浓度的测定^[1]。

1.2.3 蛋白质浓度的测定 参照 Bradford 法^[7] (考马斯亮蓝染色法)。

1.2.4 rhTNF- α 活性测定法 参照 Aggarwal 的方法^[8]。

1.2.5 PEG 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的鉴定 将 1 mL 浓盐酸, 1.5 克 NaCl, 0.5 mL 0.25 mol/L 的亚铁氰化钾溶液溶于 5 mL 蒸馏水中, 充分混匀配成 PEG 的鉴定溶液。该混合液鉴定溶液中是否含有 PEG 非常灵敏^[9], 且与 PEG 的分子量无关。用该方法鉴定含有 TNF 活性的洗脱组份中是否含有 PEG。用 0.5 mol/L 的 BaCl_2 溶液鉴定有 TNF 活性的洗脱组份中是否含有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

1.2.6 同柱串联凝胶过滤 先将一定量的 Sephadex G-100 装入 LKB 26/60 层析柱中, 待 G-100 充分沉降胶面水平后, 在其表面加上一层滤纸, 再倾入一定量的 G-25。倾入过程中注意保持两种胶界面的水平。柱装好后用蓝色葡聚糖验证柱床的均一性。为了消除凝胶介质的非特异性吸附, 将装好的柱子用 1 倍柱体积的 0.1 mol/L NaOH 与 0.1 mol/L HCl 各洗 1 次, 再用蒸馏水洗到中性。最后用 2 倍柱体积的缓冲液充分平衡, 加入样品后以 1 mL/min 流速用 1.5 倍柱体积缓冲液洗脱, 用自动部分收集器收集流出液 3 mL/管。测定 TNF 的活性, 并用配好的试剂检测管中是否含有 PEG1540 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

1.3 分辨率计算

因为 PEG 在 200 ~ 800 nm 下没有明显的吸收,我们就通过前面提到的试剂来检测洗脱液中是否存在 PEG,因此无法用相邻两峰的分辨率公式来表征 TNF 与 PEG 分离的好坏。实验中我们采用了自动部分收集器,按每管 3 mL 的量来收集,因此我们用如下公式来定义 TNF 与 PEG 的分辨率 R :

$$R = 1 - \frac{N_s}{N_T}$$

式中 N_s 为 TNF 与 PEG 重叠的管数; N_T 为有 TNF 活性的总管数。由公式知 $0 \leq R \leq 1$ 。 R 越大说明两者分离得越好,当 $R = 1$ 时说明 PEG 与 TNF 完全分开。

2 实验结果与讨论

2.1 G100 与 G25 对比对分辨率的影响

在凝胶过滤中 PEG6000 的行为类似于分子量 25 ~ 35 kD 的球状蛋白质^[10],则 PEG1540 的行为应远小于 25 ~ 35 kD 的球状蛋白质,而我们的目标蛋白 rhTNF- α 是分子量为 51 kD 的类球状蛋白,与 PEG1540 有很大的差距。因此从理论上讲通过选用适当的凝胶过滤介质可以达到将两者分离的目的。实验中根据 Pharmacia 凝胶选择手册先选用分级范围合适的 G-100 进行分离。但由于 G-100 含水量较大(每克干胶含水量大约为 10 mL),而经过破碎萃取联合操作的上相溶液中含有大量的 PEG(30%左右)^[3],因此,将样品加入胶后,就引起胶大量脱水造成床层的剧烈收缩。在实验中观察到收缩率为 7%/1%,即当加样量为床体积 1% 时,床层体积收缩 7%。由于胶的收缩破坏了胶面的水平,进而破坏了整个床层的均一性,造成内部返混,严重影响了分离效果。而 G-25 (每克干胶含水量大约为 2.5 mL)含水量少,同样条件下 G-25 的收缩率仅为 0.5%/1%。且床层的均一性不被破坏,但是由于 G-25 胶主要用于脱盐,对 PEG 1540 与 TNF 的选择区分性能不是很好,实验中发现用 G-25 两者只能达到部分分离。G-100 的选择性比 G-25 好,只是由于含水量大而在高浓度的 PEG 存在下会造成很大的变形。而 G-25 抗变形能力较强,但选择性稍差。如果能将两者的优点结合到一起,可能会达到既增大上样量又提高分辨率的效果。这促使我们考虑先用 G-25 进行粗分离,再用 G-100 进行细分离。样品经 G-25 后 PEG 与 TNF 可以达到初步分离且 PEG 会被稀释。因此只要选择适当的 G-25 胶的高度,就可以使 PEG 进入 G-100 胶时不再破坏床层的均一性,从而使 G-100 胶选择性好的优点充分发挥出来。基于以上几点考虑,我们在一根层析柱中装 2 种胶即:G-25 在上,G-100 在下进行分离。并考察了在总高度(床层高度保持 50 cm)不变的情况下,两种胶不同的对比对分离的影响。从图 1 中可以看出 G-25 与 G-100 的混合使用比单独用 G-25 效果要好。而二者的最佳组合是 15/35。10/40 效果不好的原因是上层 G-25 太短,PEG 在进入 G-100 时还保持相当的浓度,而使两者的交界面发生轻微扭曲。因此破坏了 G-100 的均一性,影响了分离效果。而 20/30 由于下层 G-100 高度过低,G-100 的细分离作用发挥得不

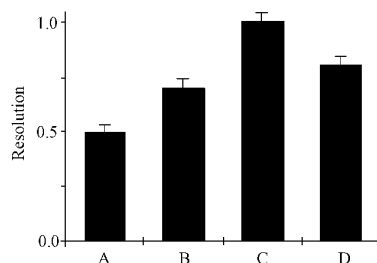


图 1 G-25 与 G-100 不同对比对分辨率的影响

Fig.1 Effect of ratio of G-25 to G-100 on the resolution

A : G-25/G-100 = 50/0 ; B : G-25/G-100 = 10/40 ;

C : G-25/G-100 = 15/35 ; D : G-25/G-100 = 20/30

够充分,所以分离效果也不是很好。15/35 的配比在整个分离过程中交界面看不到任何变化。整个床层的均一性保持完好,且 G-100 也保持了足够的高度,因此,达到较好的分离效果。从层析谱图(图 2)上也可看出峰形比较有规律,TNF 都集中在 * 峰内,而 PEG 在 * 峰后面的大峰中部出现。两者达到了较好的分离。

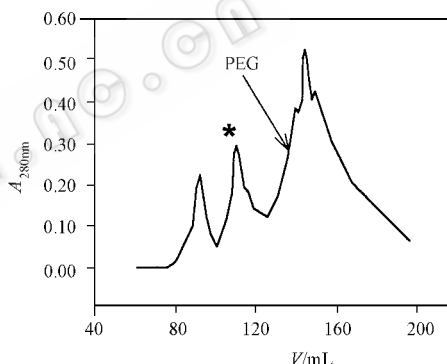


图 2 串联凝胶过滤色谱图

Fig.2 Profile of serial operation

G-25/G100 = 15/35 ; Sample volume : 12 mL ; flowrate : 1 mL/min

Buffer : 0.01 mol/L Tris-HCl pH8.0 ; * 为 rhTNF- α 的活性峰

2.2 加样量对分辨率、纯化倍数及活性回收率的影响

从图 3 中可以看出,当加样量超过 14 mL 时,TNF 与 PEG 的分辨率下降,但即使加样为 16 mL 时两者的分辨率仍能达到 0.93。根据图 4 加样量对活性回收率基本没有什么影响。但由于上样量的增大,会造成分辨率的下降,因此使纯化倍数下降。为了达到 TNF 与 PEG 的最佳分离效果,并考虑到后续的分层纯化,我们选择了如下最佳操作条件:缓冲液:0.01mol/L Tris-HCl pH = 8.0 ;上样量:14 mL ;洗脱流速:1 mL/min。这样可以达到彻底去除 PEG 的目的。而在以上的每次实验中均可以达到完全除去 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的目的。因此不再单独考虑 TNF 与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的分离效果。整个过程的纯化倍数 4.4,活性回收率 97%。经过此步串联凝胶过滤后的 rhTNF- α 样品可以直接用离子交换层析或其它后续步骤进一步纯化。

3 结 论

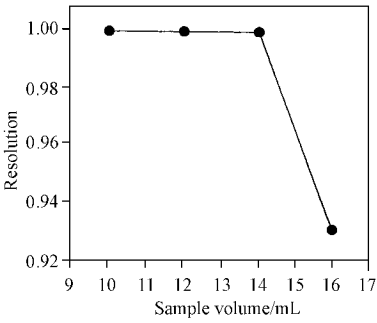


图 3 加样量对分辨率的影响

Fig.3 Effect of sample volume on the resolution

Flow rate 1 mL/min ; Buffer 0.01 mol/L Tris-HCl ; pH = 8.0

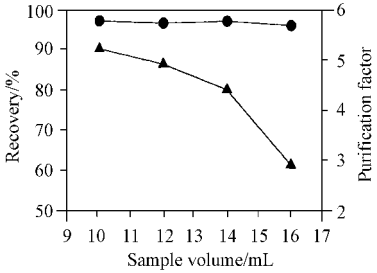


图 4 加样量对活性回收率及纯化倍数的影响

Fig.4 Effect of sample volume on the recovery and purification factor

Flow rate 1mL/min ; Buffer 0.01 mmol/L Tris-HCl ; pH = 8.0

● Recovery ; ▲ Purification factor

起到了取长补短的效果。实现了从破碎萃取联合操作富含 rhTNF- α 的上层液中除去 PEG 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的任务,并初步纯化了目标蛋白 rhTNF- α ,同时完成了缓冲液的更换。两种胶在一根柱子中的结合使用与在两根柱子串联使用相似,但它根本消除了两柱串联时连接管路中的死体积,避免了不必要的返混,提高了分辨率。G-25 和 G-100 属于较为廉价的凝胶介质,且可以重复多次使用,整个操作过程用普通的中低压层析设备即可完成。故此方法耗费较低,对设备的要求不

高,为破碎萃取联合操作和后续层析衔接提供了新的思路和有效的方法。

REFERENCES(参考文献)

[1] Xiaoli Feng ,Zhengyu Gu ,Yetao Jin *et al.* Polyethylene glycol improves the purification of recombinant human tumor necrosis factor during ion exchange chromatography. *Biotechnology Techniques* , 1998 ,**12** (4) 293 ~ 298

[2] Luksa J ,Menart V ,Milicic S *et al.* Purification of human tumor necrosis factor by membrane chromatography. *J Chromatogr* ,1994 , **661** :161 ~ 168

[3] WANG G H , FENG X L , SU Z G , Simultaneous cell Disruption and Aqueous Two-Phase Extraction for Isolation of Intracellular Recombinant Proteins , *Chinese J of Chem. Eng.* ,1999 ,**7** (2) :139 ~ 144.

[4] ZHOU C I(周长林). Study on extracting interferon- α_1 from *Escherichia coli* cell disruption crude by two-aqueous phase system. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) ,1993 ,**9** (3) 271 ~ 276

[5] YU J T(俞俊棠)《Biotechnique》(《生物工艺学》),Shanghai :Press of East China University of Science and Technology ,1997

[6] CONG C S(丛春水) ,DENG J X(邓继先) ,SU Z Q(苏志国). Study on Fed-batch culture of Recombinant *Escherichia coli* for Human Tumor Necrosis Factor- α Using pH Electrode. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) ,1999 ,**15** (1) 87 ~ 93

[7] Bradford M M . A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* , 1976 ,**72** 248 ~ 254

[8] Aggarwal B B ,Kohr W J ,Hass P E *et al.* Human tumor necrosis factor. *J Biol Chem* ,1985 ,**260** 2345 ~ 2354

[9] TAN T W(谭天伟) ,SHEN Z Y(沈忠耀). Quantity analysis of Polyethylene glycol in food and biological product. *Food and Fermentation Industry*(食品与发酵工业) ,1990 ,**4** :44 ~ 48

[10] Jackson C C ,Charlton J L ,Kuzminski K *et al.* Synthesis ,isolation , and characterization of conjugates of ovalbumin with monomethoxy-polyethylene glycol using cyanuric chloride as the coupling agent , *Anal Biochem* ,1987 ,**165** :114 ~ 127

Removal of PEG and Salt from Recombinant Human Tumor Necrosis Factor- α (rhTNF- α) with Serial Operation of Gel Filtration Chromatography

GU Zhen-Yu FENG Xiao-Li SU Zhi-Guo*

(State key laboratory of biochemical engineering , Institute of chemical metallurgy CAS 100080 ,China)

Abstract A serial gel filtration operation with the combination of G25 and G100 in one column was developed to remove salt and PEG from upper phase rich in recombinant human tumor necrosis factor α after simultaneous cell disruption and two-phase aqueous extraction. Buffer exchanging and primary purification were also achieved at same time. The purification factor of 4.4 was obtained with an activity recovery of 97% by one single step of serial operation.

Key words recombinant human tumor necrosis factor α , simultaneous cell disruption and two-phase aqueous extraction , serial operation

Received :December 26 ,2000

This work was supported by Grant from National Youth foundation(29736180)

* Corresponding author. Tel 86-10-82627062 ; Fax 86-10-62561822