

基因工程猪生长激素的分离提纯及变复性技术的研究

李震* 于瑞嵩 张平 王英 刘惠莉

(上海市农业科学院畜牧兽医研究所,上海市农业遗传育种重点实验室—动物遗传工程研究所,上海 201106)

关键词 rPGH, 分离提纯, 变复性

中图分类号 Q575.11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0703-03

生长激素(Growth hormone; Somatotropin)调节动物的生长及其体内多种代谢过程。文献报道使用猪生长激素(PGH)可显著加快猪生长速度,提高胴体瘦肉率和饲料报酬^[1]。因为 PGH 潜在的巨大经济价值,国内外一些科研机构都研究采用基因工程的方法实现产业化生产。这些研究几乎都是采用原核表达系统,产物都是形成包含体^[2,3]。但在包含体的分离提取及变复性的方法上差别极大。1987 年 Keith E. Langley 在做蛋白复性时创新性地采用了包含体蛋白在高浓度的变性剂溶液中直接氧化复性的方法,此方法较适宜于基因工程产品的大量制备^[4]。本研究参考了 Langley 的方法进行重组猪生长激素(rPGH)的提纯和变复性,并在程序上进一步简化,在不影响产品活性的前提下提高了回收效率降低了成本,为 rPGH 的大量制备探索了基础工艺条件。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 rPGH 基因工程菌:由本研究室构建。

1.1.2 仪器:细胞高密度培养使用 B. Braun 30L 发酵罐。细胞破碎使用 B. Braun Labsonic 超声波破碎仪。SDS-PAGE 使用 Bio-Rad Mini-Protein II 电泳仪。超滤采用 Masterflex Millipore 及 Sartorius 截留分子量为 10000 的超滤仪。电泳结果处理使用天能 GIS 凝胶图象处理系统。溶液蛋白浓度测定利用 Beckman DU640 分光光度计。蛋白纯化利用 Pharmacia LKB 公司快速层析系统(FPLC System)。

1.2 方 法

1.2.1 发酵培养:rPGH 工程菌 30℃ 摇床培养 5~6h,以 1:15 稀释转入 30L 发酵罐中,发酵培养基为 LB,30℃ 培养至对数生长期后,迅速转 42℃ 温度诱导 pGH 基因表达,4h 后收集菌体。

1.2.2 菌体破碎与包含体提取:将 280g 离心收集的菌体,用 800mL 裂解缓冲液 Tna(Tris HCl 20mmol/L, NaCl 50mmol/L pH 7.5)悬浮,超声破碎,在相差显微镜下检查达 98% 破碎率。

17000g 4℃ 离心 30min。再用 1L 水重新悬浮,离心 30min,沉淀用 Tel 溶液(20mmol/L Tris·HCl, 5mmol/L EDTA, 0.02% 溶菌酶, pH8.0)悬浮,室温搅拌 1h。加入 0.25 倍体积 10% (W/V) 去氧胆酸钠至终浓度 2%。室温搅拌 1h,离心 30min 收集沉淀。沉淀用 1L 水重新悬浮,洗涤沉淀,离心 30min 收集包含体沉淀。

1.2.3 包含体的变性与复性:方法一:6mol/L 盐酸胍(pH8.0)溶解包含体,室温放置 80h,17000g 4℃ 离心 30min,去沉淀,用复性缓冲液 I (BLM 溶液:0.25% NaHCO₃, 0.2% α-乳糖, 0.2% 甘露醇, pH8.5),将盐酸胍浓度稀释至 2mol/L。用 BLM 溶液将盐酸胍复性液透析 5~6 次。收集透析液,去沉淀,上清超滤浓缩蛋白浓度至 2mg/mL。-20℃ 储存备用。方法二:提取包含体用 6mol/L 盐酸胍(pH8)溶解,室温搅拌 2h,12000g 离心去沉淀,上清用复性缓冲液 II (BLM 溶液 + 0.05% 吐温-80)将盐酸胍稀释至 2mol/L,4℃ 搅拌 20h,4℃ 12000g 离心 20min,上清用 BLM 溶液透析 5~6 次,收集,去沉淀,超滤浓缩至蛋白浓度 2mg/mL。-20℃ 储存备用。

1.3 目的蛋白产物的 FPLC 分析

用 6mol/L 盐酸胍(pH8.0)平衡 S200 快速液相色谱层析柱,将 6mol/L 盐酸胍中氧化并浓缩的溶液上层析柱,洗脱液流速为 360mL/h。收集 19min 后出现的 280nm 光吸收第 1 峰。

1.4 纯化产物的鉴定和分析

1.4.1 蛋白质纯度及分子量用 SDS-PAGE 分析。

1.4.2 用非还原 SDS-PAGE 测复性液中单体含量:上样缓冲液中除了不含 DTT 或巯基乙醇外,其他成分与还原 SDS-PAGE 电泳相同^[5]。

1.4.3 目标蛋白的氨基酸组成分析由中国科学院上海生物化学研究所完成。

1.4.4 蛋白质含量测定:采用 Lowry 法,以 BSA 为标准品。

1.5 去垂体大鼠制备

参考 K. W. Thompson 咽旁手术制备去垂体大鼠方法,并在一些方面根据实验室具体条件进行了简化及改进^[6]。

收稿日期:2001-04-13,修回日期:2001-08-07。

基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目(农科攻字 97 第 5-01 号)和上海市现代生物与新药产业发展基金(984319002)。

* 通讯作者。 Tel:86-21-62200389; Fax:86-21-62207858; E-mail:zhenli60@public3.sta.net.cn

其他作者有:周智爱、张德福。

2 实验结果

2.1 包含体的纯化

通过选择合适的细菌破碎强度、时间、裂解液以及离心沉淀速率,可使包含体的纯度达 80%~90%。图 1 显示包含体分离纯化情况。

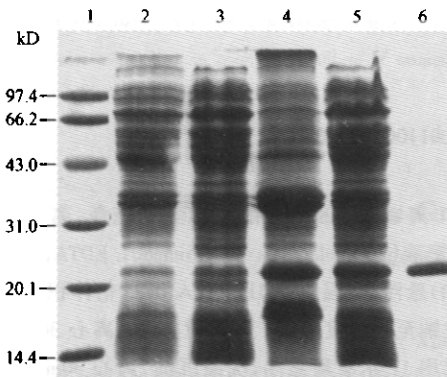


图 1 包含体分离纯化各步的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of inclusion body isolation

1. Marker; 2. Supernatant of washing liquid of inclusion bodies; 3. Suspension after centrifugation of broken cells with 17 000g; 4. Sticky material above the pellet of inclusion bodies; 5. Broken cells; 6. Inclusion bodies

2.2 rPGH 的纯化及复性

收集 S200 的快速液相色谱第 1 峰(图 2),进行分子量及氨基酸组成分析。分析结果表明得到的产物分子量与垂体 pGH 完全一致(SDS-PAGE 实验结果略),产物的氨基酸组成与垂体 pGH 的氨基酸组成基本符合(表 1)。从图 3 可以看出复性后存在于上清中的蛋白 95% 以上为 rPGH 蛋白分子单体(图 3)。复性沉淀中含一部分单体蛋白,但同时含大量多聚体。

表 1 目标蛋白产物的氨基酸组成分析(数据未进行校正)

Table 1 Amino acid composition analysis of protein product

Amino acid	Amount Detected	Theoretical number	Calculated number
	/mmol	of residues	of residues
Asp	6.43	16	16
Thr	2.41	8	6
Ser	3.04	15	8
Glu	9.96	25	25
Ala	6.32	17	16
Cys	0.34	4	1
Val	3.02	8	7.5
Ile	2.24	6	5.6
Leu	9.02	25	22.3
Tyr	2.31	7	5.7
Phe	4.97	13	12.3
Lys	3.83	11	9.5
His	1.05	3	2.6
Arg	4.92	13	13
Met	1.88	3	4.5
Pro	1.32	7	3
Gly	3.23	8	8

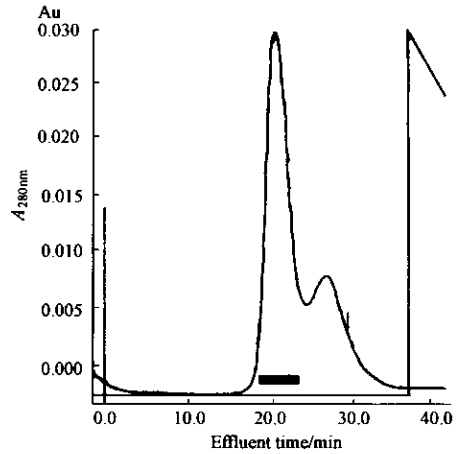


图 2 S200 快速液相色谱在高浓度盐酸胍

中分离纯化目标产物(280nm 紫外吸收第 1 峰)

Fig.2 Sephacryl-S200 gel filtration, in guanidine/HCl, of oxidized product The oxidized, concentrated sample was applied to a Sephacryl S-200(1.5 × 53.5cm) column equilibrated with 50mmol/L Tris/HCl, 6mol/L guanidine/HCl, pH8.0. The first peak of 280nm absorbance were collected.

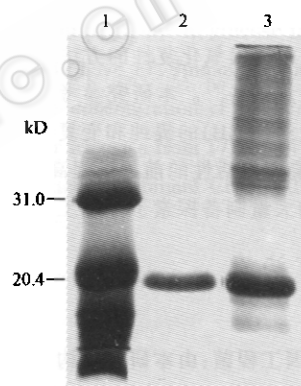


图 3 复性产物的非还原 SDS 电泳

Fig.3 Nonreductive SDS-PAGE analysis of rPGH after renaturation

1. Marker; 2. Renaturation supernatant; 3. Renaturation pellet.

为检测得到的复性产物的生物学活性,取复性后浓缩产物进行去垂体大鼠的注射实验。实验证明复性后得到具有较高生物活性的重组 rPGH。表 2 显示去垂体大鼠注射实验的结果。

3 讨论

本研究在变复性工艺上,主要参考了 Langley K E 等的方法,但在大量制备时省略了 S-200 柱层析的进一步纯化。一般情况下,高浓度蛋白复性容易产生沉淀。本实验方法一中,由于有 6mol/L 盐酸胍存在,蛋白不易发生快速的聚合而沉淀。从本研究的实验结果可以看出在较高蛋白浓度并有高浓度盐酸胍(6mol/L)存在的情况下,产物氧化复性取得了较好效果,产物的生物活性高,同时方法也较为简便。为了更清楚地验证方法一的有效性,特此设立了方法二。方法二采用了 2mol/L 盐酸胍溶液中复性,但从实验结果可以看出方法二所得产物的复性效果不如方法一。其中原因可能是

表2 去垂体大鼠注射实验结果^{*}
Table 2 Growth promotion efficiency of rPST
on hypophysectomized rats^{*}

Items Sample	Number of animals	Mean of increased BW (g)	Standard error	Significance of difference (with control)
1	9	11.0	1.49	0.000
2	9	8.89	0.98	0.000
3	9	4.22	0.78	0.005
Control	9	-0.17	0.66	

^{*} 30~50 μ g per day of rPGH were injected with each hypophysectomized rat by abdomen. The control groups were given BLM solution. Sample 1 and 2 were prepared with the method 1. But some of renaturation aggregates still remains in sample 1. Sample 3 was prepared with method 2.

方法二变性蛋白的氧化复性时间不充分,另一可能是在2mol/L盐酸胍溶液中复性,蛋白复性速度较快,容易形成二硫键的错配,影响了复性效果。从样品1,2的比较可以看出复性产物中残留少量沉淀不影响样品的活性,是否有促进作用尚不能确定。本实验目标蛋白的回收率近20%。实验中损失比较大的步骤一是菌体破碎后收集包含体,该步损失包含体的量较大,一般要损失目标蛋白的30%,从电泳图1可以看出,粘性悬浮液中的目标产物含量较大,是该步损失的主要原因。但由于粘性物质中包含大量的杂蛋白,致使该部分蛋白不得不完全弃去,造成目标产物的大量损失。另一步损失多的是透析复性,该步进入沉淀目标蛋白量为参与复性蛋白的50%(见图2)。该步沉淀的几乎完全是复性好的

目标蛋白及其多聚体。今后实验中将进一步完善实验条件,提高蛋白的回收及复性效率。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Hagen D R, Mills E W, Bryan K A *et al.* Effects of Exogenous porcine growth hormone (pGH) on growth, carcass traits, reproductive characteristics, and meat sensory attributes of young boars. *J Anim Sci*, 1991, **69**:2472~2479
- [2] YU X P(余旭平), QI S Z(齐顺章). Temperature-inducing high level expression of porcine growth hormone in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1991, **7**(4):307~311
- [3] Puri N K. Refolding of recombinant porcine growth hormone in a reducing environment limits *in vitro* aggregate formation. *FEBS Lett*, 1991, **292**:187~190
- [4] Keith E Langley, Thor F Berg, Thomas W Strickland *et al.* Recombinant-DNA-derived bovine growth hormone from *Escherichia coli*. 1. Demonstration that the hormone is expressed in reduced form, and isolation of the hormone in oxidized, native form *Eur J Biochem*, 1987, **163**:313~321.
- [5] XIAN H Q(威海青), FAN M(范明), WU Y(吴燕), QIU Z Y(邱宗荫). Research on Renaturation of recombinant human CNTF. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1999, **26**(5):454~457
- [6] LI Z(李震), WANG Y(王英), YU R S(于瑞嵩) *et al.* Modified parapharynx method for making hypophysectomized rats. *Shanghai Laboratory Animal Science* (上海实验动物科学), 2000, **20**(4):243

Isolation, Purification and Renaturation of Recombinant-DNA-Derived Porcine Somatotropin

Li Zhen^{*} YU Rui-Song LIU Hui-Li WANG Ying ZHANG Ping ZHOU Zhi-Ai ZHANG De-Fu

(Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences,

Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China)

Abstract Large scale abstraction and isolation of bacterially synthesized, recombinant-DNA-derived, porcine growth hormone (r-pST) is described. The r-pGH is found in genetic engineering *E. coli* as the form of inclusion bodies. Pellet fraction which were mainly inclusion bodies, after cell breakage and centrifugation, were collected. Cell envelope components, such as protein, lipid, endotoxin and nucleic acids are selectively removed from the pellet fraction by an EDTA/lysozyme/deoxycholate extraction. Inclusion bodies were dissolved using 6mol/L guanidine/HCl and air oxidation is then carried out in the presence of the guanidine/HCl. The Guanidine/HCl protein mixture were diluted by renaturation solution. Guanidine/HCl were removed by dialysis and then correctly refolded, oxidized r-pGH were obtained. Injection experiment of hypophysectomized rats proved r-pST with high native bioactivity was obtained.

Key words rPGH, isolation, renaturation

Received: April 13, 2001

This work was supported by grants from Shanghai Science and Technology Committee (97-5-01) and Shanghai Agricultural Committee (984319002).

^{*} Corresponding author. Tel: 86-21-62200389; Fax: 86-21-62207858; E-mail: zhenli60@public3.sta.net.cn