

huGM-CSF(9-127)-IL-6(29-184)融合蛋白的复性及纯化研究

孙强明 刘红岩 戴长柏 马雁冰 孙茂盛 徐维明*

(中国协和医科大学中国医学科学院医学生物学研究所分子生物室,昆明 650118)

摘 要 利用 Q Sepharose H.P. 离子交换柱层析在 8mol/L 尿素变性条件下对 huGM-CSF(9-127)-IL-6(29-184) 融合蛋白进行初步纯化,然后再利用 Sephacryl S-200 分子筛柱层析复性及纯化后获得目的蛋白,其纯度达到 95% 以上。该纯化方案成功地解决了稀释复性或透析复性产物在进行 Q Sepharose H.P. 离子交换柱层析时目的蛋白不稳定而沉积于柱上的问题,获得了较好的复性效果,复性率达到 80% 以上。使用该纯化方案,1 天内便可基本完成重组蛋白的复性及纯化过程,而且也便于扩大。

关键词 huGM-CSF/IL-6 融合蛋白,复性,纯化

中图分类号 Q816 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)03-0291-04

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)是一种已广泛应用于临床的造血细胞因子,它对各种原因引起的骨髓抑制和白细胞减少症均有一定疗效^[1]。白细胞介素-6(huIL-6)也具有多重的生物活性,huIL-6 在骨髓干细胞的增殖分化中起重要作用,且与 huIL-3、huGM-CSF 等合用时表现出协同刺激效应^[2]。临床研究表明,IL-6 能促使化疗病人血小板恢复^[3]。然而一些研究表明使用 GM-CSF 和 PIXY321(huGM-CSF/IL-3)均可能导致血小板减少症^[4,5]。huGM-CSF 和 huIL-6 这两种细胞因子既具有协同作用又具有互补作用,因而设想它们的融合可能构成一种新的具有多重生物学功能的高效造血因子。我们于 1999 年率先构建了该融合蛋白的基因并获得高效表达,表达量达 25%,该融合蛋白具有 huGM-CSF 和 huIL-6 的双重生物学效应,能同时刺激 huGM-CSF 的依赖细胞株 TF-1 和 huIL-6 的依赖细胞株 B9 细胞的生长增殖。

原核基因工程产品具有生产成本低,表达量高和包涵体蛋白易于纯化等优点。但是作者在进行多种蛋白的纯化时,发现包括 rhGM-CSF(9-127)-IL-6(29-184)融合蛋白,戊肝表面抗原在内的多种分子量较大的蛋白包涵体在逐步稀释复性或透析复性的过程中往往难以避免沉淀的发生,本文通过在变性条件下进行 Q Sepharose H.P. 离子交换层析,然后再

通过 Sephacryl S-200 凝胶过滤分子筛柱层析复性和进一步纯化成功地解决了该问题。

1 材料与方法

1.1 试剂

分析纯尿素购自重庆东方试剂厂,Tris 购自上海生工生物工程有限公司,Q Sepharose H.P. 和 Sephacryl S-200 层析介质均购自 Pharmacia 公司,细胞培养基购自 GIBCO/BRL 公司。

1.2 仪器

中压层析柱(3cm × 20cm 及 3cm × 100cm)购自华美生物工程有限公司,AKTA purifier 蛋白纯化系统和 Amersham Pharmacia Image Master[®] VDS 图像分析系统扫描仪均购自 Pharmacia 公司,Biologic LP 蛋白纯化系统购自 BIO-RAD 公司。

1.3 包涵体的提取与洗涤

将 huGM-CSF(9-127)-IL-6(29-184)融合蛋白(简称 rhGM-IL-6)工程菌在 LB + AMP 培养基中培养并诱导表达,离心收集菌体,超声破菌提包涵体,然后分别用 4mol/L 尿素,2mol/L 尿素,漂洗液(2% Triton X-100 0.5% β-ME 0.5% NaCl)漂洗,最后离心收集包涵体。

1.4 包涵体的溶解与 rhGM-IL-6 的稀释复性(或透析复性)及复性后产物的离子交换层析纯化

1.4.1 稀释复性:包涵体溶于 50mmol/L Tris · HCl,

收稿日期 2001-10-22,修回日期 2002-02-26。

基金项目 云南省自然科学基金资助(No.2001C0031Q)。

* 通讯作者。Tel 86-871-8334173;E-mail xuwmyn@public.km.yn

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

0.5%β-ME 8.5 mol/L(pH 8.0)尿素中 ,将蛋白浓度调整至 6mg/mL ,用复性液(50mmol/L Tris · HCl ,0.05%β-ME 20mmol/L GSSG 2mmol/L GSH ,pH 8.0)一步将尿素浓度稀释 80 倍至 0.1mol/L 4℃静置过夜。

1.4.2 透析复性 :包涵体溶于 50mmol/L Tris · HCl , 0.5%β-ME , 8.5 mol/L 尿素(pH 8.0)中 ,将蛋白浓度调整至 0.1mg/mL 随后装入透析袋中 ,分别用 1 mol/L 尿素复性液(1 mol/L 尿素 ,50mmol/L Tris · HCl , 20mmol/L GSSG , 2mmol/L GSH ,pH 8.0) 0.5 mol/L 尿素复性液(0.5 mol/L 尿素 ,50mmol/L Tris · HCl , 20mmol/L GSSG , 2mmol/L GSH ,pH 8.0) , 0.1 mol/L 尿素复性液(0.1 mol/L 尿素 ,50mmol/L Tris · HCl , 20mmol/L GSSG , 2mmol/L GSH ,pH 8.0)于 4℃分 3 次经 36h 逐步稀释透析复性。

1.4.3 复性产物的离子交换层析纯化 :平衡液为 50mmol/L Tris · HCl , 0.1mol/L 尿素 ,pH 8.0 ,洗脱液为平衡液加 0.6mol/L NaCl。复性产物以 2.5mL/min 流速上 Q Sepharose H.P. 离子交换柱 ,洗脱流速为 2.5mL/min ,从平衡液到 100% 洗脱液的梯度洗脱时间为 75min。

1.5 包涵体溶解物在变性条件下的离子交换层析纯化

包涵体溶于 50mmol/L Tris · HCl 0.5%β-ME 8.0 mol/L 的尿素(pH8.0)中 ,将溶解液以 2.5mL/min 流速上 Q Sepharose H.P. 离子交换柱 ,平衡液为 50mmol/L Tris · HCl , 0.5%β-ME , 8.0mol/L 尿素 ,pH 8.0。洗脱液为平衡液加 0.6mol/L NaCl。洗脱流速为 2.5mL/min ,从平衡液到 100% 洗脱液的梯度洗脱时间为 75min。

1.6 Sephacryl S-200 分子筛柱复性和纯化

将过 Q Sepharose H.P. 离子交换柱收集到的目的蛋白组分上 Sephacryl S-200 分子筛柱 ,平衡液为 PBS 0.2% Tween80 ,1.5mmol/L EDTA , pH7.4 ,流速为 0.8mL/min。

1.7 非还原 SDS-PAGE 电泳测复性产物中的单体含量

聚丙烯酰胺胶的浓度为 15% ,2 × 上样缓冲液中不含巯基乙醇 ,其它成分均与还原 SDS-PAGE 电泳相同。

1.8 生物学活性测定

以 MTT 掺入法测定其刺激 huGM-CSF 依赖细胞株 TF-1 和 huIL-6 依赖细胞株 B9 的增殖活性。用 Bradford 法测其蛋白含量。根据其促增殖曲线和蛋白含量 ,计算出融合蛋白的比活性。

2 结 果

2.1 经超声破菌和 4mol/L 尿素 ,2mol/L 尿素 ,2% Triton X-100 + 0.5% β-ME + 0.5% NaCl 分别漂洗 ,离心收集得到包涵体 ,其纯度达到 70% 左右(图 1)。

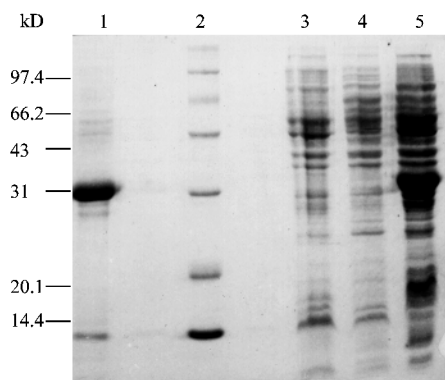


图 1 pBV220- GM-CSF(9-127)-IL-6(29-184)表达产物及其包涵体的 15% SDS-PAGE 分析

Fig.1 15% SDS-PAGE analysis of pBV220- GM-CSF(9-127)-IL-6(29-184) expression products and its inclusion bodies

1. Inclusion bodies ;2. Low molecular weight standards ;3, 4. Total cell lysate of controlled *E. coli* strain ;5. Total cell lysate of *E. coli* expressing GM-CSF/IL-6 fusion protein

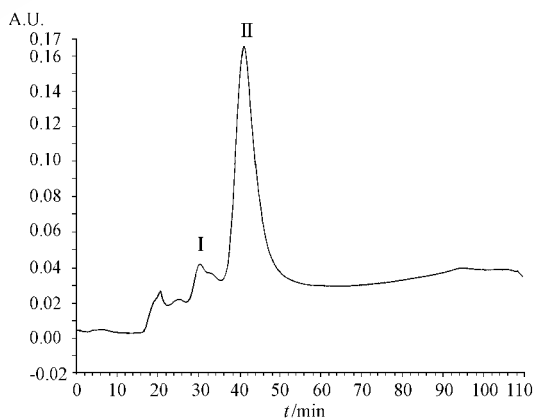


图 2 rhGM-IL-6 在 8.0mol/L 尿素条件下经 Q Sepharose H.P. 柱纯化时的紫外检测图

Fig.2 Purification of rhGM-IL-6 in 8.0mol/L urea by Q Sepharose H.P.

2.2 稀释复性和透析复性后的产物分别以 2.5mL/min 流速上 Q Sepharose H.P. 离子交换柱 ,将洗脱液的盐浓度从 0.6mol/L NaCl 增加到 1mol/L ,结果均不能将目的融合蛋白洗脱下来。

2.3 包涵体溶解后在变性条件下经 Q Sepharose H.P. 柱层析后得到 2 个主蛋白峰(见图 2) ,SDS-PAGE 电泳分析及活性检测证实峰 II 为目的蛋白峰(见图 4)。

2.4 将目的蛋白峰样品(样品量为 20mL) ,Bradford

法测其蛋白浓度为 2.88mg/mL,凝胶激光扫描分析表明样品中融合蛋白的含量达到 83.1% 以上,计算得到其中含有 47.87mg 的融合蛋白)进行 Sephacryl S-200 分子筛柱层析分离,收集到 3 个峰。SDS-PAGE 电泳分析及活性检测证实峰 I 为高纯度的目的蛋白主峰,峰 II 为杂蛋白小峰,峰 III 为尿素峰(见图 3 A)。非还原 SDS-PAGE 电泳测复性目的蛋白主峰产物中的单体含量。峰 I 收集液体积为 41.6mL,Bradford 法测蛋白浓度为 0.97mg/mL,凝胶激光扫描分析表明收集液中融合蛋白单体的含量达到 95% 以上,经分析计算单体目的蛋白的含量为 38.33mg,与上柱样品中目的蛋白的含量对比计算得到样品的复性率达 80% 左右。

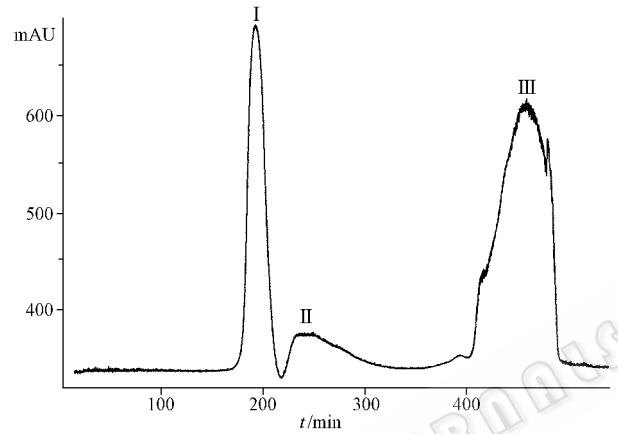


图 3 Q Sepharose H.P. 柱分离获得的峰 II 通过 Sephacryl S-200 柱进行复性时的紫外检测图
Fig.3 *In situ* refolding of rhGM-IL-6 after Q Sepharose H.P. on Sephacryl S-200

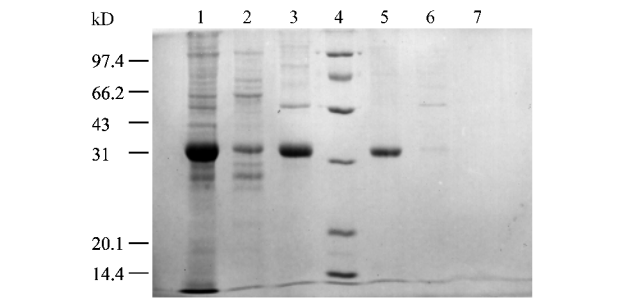


图 4 rhGM-IL-6 融合蛋白纯化产物的 15% SDS-PAGE 分析
Fig.4 15% SDS-PAGE analysis of purified rhGM-IL-6 fusion protein
1. Inclusion bodies ;2. Peak I of Q Sepharose H.P. ;3. Peak II of Q Sepharose H.P. ;4. Low molecular weight standards ;5. Peak I of Sephacryl S-200 after Q Sepharose H.P. ;6. Peak II of Sephacryl S-200 after Q Sepharose H.P. ;7. Peak III of Sephacryl S-200 after Q Sepharose H.P.

2.5 融合蛋白的生物学活性的测定

通过 MTT 掺入法测定 rhGM-IL-6、rhGM-CSF 刺激 huGM-CSF 依赖细胞株 TF-1 及 rhGM-IL-6、rhIL-6

刺激 huIL-6 依赖细胞株 B9 的增殖活性,用 Bradford 法测蛋白含量,结果表明 rhGM-IL-6 具有 huGM-CSF 和 huIL-6 的双重生物学活性,其 huGM-CSF 和 huIL-6 比活性分别为 1.08×10^8 u/mg 和 1.95×10^7 u/mg,而阳性对照 rhGM-CSF 的比活性为 1.98×10^7 u/mg, rhIL-6 的比活性为 1.84×10^7 u/mg(图 5)。

3 讨论

包涵体的提取方法已较为成熟,但是它却引入了一个变性-复性过程。影响复性的因素很多,首先是蛋白分子自身的理化特性,其次是目的蛋白质的浓度及复性体系的离子强度、pH 值、温度,另外从变性体系到复性体系的转换速度也是重要的影响因素。很多蛋白质的复性过程很难控制,往往会形成蛋白沉淀,一些蛋白质甚至通过稀释或透析方法完全转换为复性体系后,由于环境的改变,而再次出现沉淀。本实验室在对 rhGM-IL-6 融合蛋白和戊型肝炎表面抗原进行稀释或透析复性后的纯化过程中就遇到这种情况。实验中对 rhGM-IL-6 融合蛋白进行稀释或透析复性后,再将其上 Q Sepharose H.P. 强阴离子交换柱进行纯化,结果发现融合蛋白沉积到层析柱上而不能得到洗脱。为了解决这个问题曾尝试使用添加聚乙二醇、乙醇,降低上样浓度和速度,改变缓冲体系 pH 值及离子强度等多种方法均不能解决。

Q Sepharose H.P. 是一种比较稳定的层析介质,在 8mol/L 尿素条件下较为稳定^[6],利用这个性质我们尝试在 8mol/L 尿素变性条件下利用 Q Sepharose H.P. 离子交换柱首先对 rhGM-IL-6 融合蛋白进行初步纯化,再通过 Sephacryl S-200 分子筛柱进行复性和进一步纯化的实验方案,获得了较好的效果。Q Sepharose H.P. 离子交换柱在 8mol/L 尿素变性条件下仍然具有较好的分辨率,目的蛋白能得到较好的分离。利用 Sephacryl S-200 分子筛柱进行复性,由于凝胶颗粒的存在,蛋白分子之间有一定的距离和自由空间进行自由折叠而不受其它分子的影响,周围的平衡液提供了合适的离子强度和 pH 条件,蛋白分子从柱上端到末端,逐步并缓慢地脱离变性条件,为蛋白的复性过程提供了一个极为有利的条件,复性时间也得到缩短,复性的过程也相对容易控制^[7]。另外,在上 Sephacryl S-200 分子筛柱进行复性前融合蛋白的纯度得到大大提高,有利于提高的复性率。从实验结果可见 rhGM-IL-6 融合蛋白的复性率可达 80%。通过 Q Sepharose H.P. 离子交换柱和

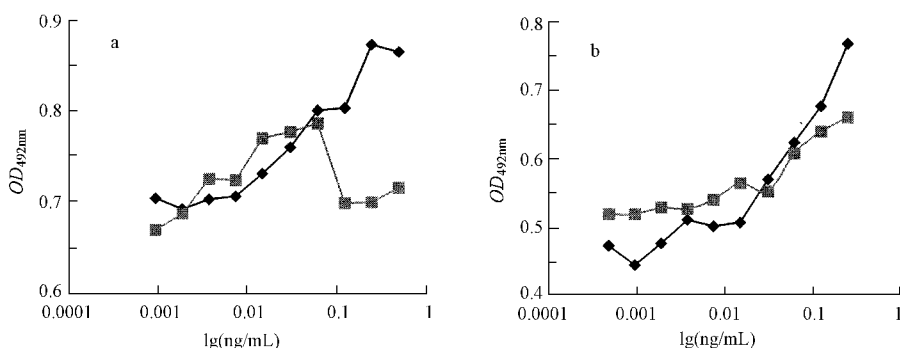


图5 rhGM-CSF、rhIL-6 及 rhGM-CSF 融合蛋白纯化产物刺激 TF-1 细胞及 B9 细胞的增殖曲线

Fig.5 Bioactivity of rhGM-CSF, rhIL-6 and purified rhGM-CSF on TF-1 and B9 cell line

a. Bioactivity of rhGM-CSF and purified rhGM-CSF on TF-1 ;

—◆— huGM-CSF ; —■— huGM-CSF(9-127)-IL-6(29-184)

b. Bioactivity of rhIL-6 and purified rhGM-CSF on B9 cell line

—◆— huIL-6 ; —■— huGM-CSF(9-127)-IL-6(29-184)

Sephacryl S-200 分子筛柱两步进行纯化和复性的纯化方案可以获得高纯度的复性融合蛋白,说明该方案是可行的。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Baxevas C, Tsavaris N, Papadimitriou S *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor improves immunological parameters in patients with refractory solid tumours receiving second-line chemotherapy: correlation with clinical responses. *Eur J Cancer*, 1997, **33** (8): 1202 ~ 1208
- [2] Mumcuoglu M, Slavin S. Enhancement of hematopoietic reconstitution with recombinant cytokines: effect of rhIL-6 in combination with rhGM-CSF and rhIL-3 on unmodified or T cell-depleted bone marrow. *J Hematother*, 1999, **8** (3): 247 ~ 253

- [3] Imrie K, Sheridan B, Colwill R *et al.* A phase I study of interleukin-6 after autologous bone marrow transplantation for patients with poor prognosis Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*, 1997, **25** (5-6): 555 ~ 563
- [4] Jones S E, Khandelwal P, McIntyre K *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the hematopoietic growth factor PIXY321 after moderate-dose fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in stage II and III breast cancer. *J Clin Oncol*, 1999, **17** (10): 3025 ~ 3032
- [5] Nash R A, Burstein S, Storb R. Thrombocytopenia in dogs induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: increased destruction of circulating platelets. *Blood*, 1995, **86** (5): 1765 ~ 1775
- [6] Ion exchange chromatography principles and method. 3rd edition. Printed in Sweden by Rahmsi Lund, 1991. pp. 37 ~ 39
- [7] Werner M H, Clore G M, Gronenborn A M *et al.* Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS letters*, 1994, **345** (2): 125 ~ 130

Refolding and Purification of the huGM-CSF(9-127)-IL-6(29-184) Fusion Protein

SUN Qiang-Ming LIU Hong-Yan DAI Chang-Bai MA Yan-Bing SUN Mao-Sheng XU Wei-Ming*

(Department of Molecular Biology, Institute of Medical Biology, CAMS and PUMC, Kunming 650118, China)

Abstract The huGM-CSF(9-127)-IL-6(29-184) fusion protein was precipitated on column when being purified by Q Sepharose H.P. ion exchange chromatography after renaturation by dilution. To solve this problem, a novel purification and refolding strategy was adopted. Inclusion bodies was first purified by Q Sepharose H.P. ion exchange in 8mol/L urea followed by in situ refolding on column by Sephacryl S-200. Renatured fusion protein was obtained in a purity of more than 95%. It was showed that the method of refolding on gel filtration column is efficient, with relative refolding rate at 80%. By the whole procedure, refolding and purification of recombinant protein can be performed within one day. This strategy is also promising to be applied in large scale purification and refolding of recombinant protein from inclusion bodies in *E. coli*.

Key words huGM-CSF/IL-6, refolding, purification

Received: 10-22-2001

This work was supported by Grant from Natural Sciences Foundation of Yunnan (No. 2001C0031Q).

* Corresponding author. Tel 86-871-8334173; E-mail: xuwmyn@public.km.yn

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