

# 人干扰素 $\alpha$ -2b 生产工艺的研究

阎玉清 王晓沁

(哈尔滨医药工业研究所 哈尔滨 150020)

巫爱珍 孙玉昆

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘要** 人干扰素  $\alpha$ -2b 的简易、高效生产工艺研究,包括高效率、小型化的发酵技术,不用单克隆抗体亲和层析的纯化工序,以及大肠杆菌表达的人干扰素  $\alpha$ -2b 包涵体蛋白的天然构型复性等问题,从 10L 基因工程大肠杆菌发酵液所得 1000g 菌体中得人干扰素  $\alpha$ -2b 约 500mg,效价为  $1 \times 10^6$  u/mg,设备投资少,生产成本低,产品表现了高纯度、高效价。适宜大量生产,为广大人民群众提供廉价高质量药品创造了条件。

**关键词** 人干扰素  $\alpha$ -2b

人干扰素  $\alpha$  是目前抗病毒药物中临床疗效显著者之一,对肝炎、带状疱疹、子宫颈糜烂等病毒感染表现良好的治疗效果。早期,干扰素的生产系将人白血球或 B 细胞用病毒诱导产生的方法进行,产量低、价格昂贵,不能满足需要。现在可以方便的利用基因工程技术在大肠杆菌中表达、发酵进行生产。人干扰素  $\alpha$ -2a 或人干扰素  $\alpha$ -2b 是由 165 个氨基酸残基组成的蛋白质,在大肠杆菌中表达的人干扰素  $\alpha$ -2b 除 N-末端多一个甲硫氨酸残基外其它与天然品相同。人干扰素  $\alpha$  有十多种亚型,其区别表现在个别氨基酸的差异上,如人干扰素  $\alpha$ -2a 的第 23 位氨基酸为赖氨酸残基,而  $\alpha$ -2b 的第 23 位为精氨酸残基。临床应用的结果,干扰素  $\alpha$ -2a 来自恶性化细胞系,临床使用过程中产生中和抗体的频率为 17%,大于来自正常细胞系人干扰素  $\alpha$ -2b 的产生中和抗体的频率为 6%<sup>[1]</sup>。基于上述原因应更多考虑生产使用人干扰素  $\alpha$ -2b。从已发表的论文<sup>[2~10]</sup>透露的工艺看来,表现在基因工程菌的发酵水平低,需要采用大型发酵罐设备投资高,工艺中使用单克隆抗体亲和层析,制备量的单克隆抗体亲和层析柱不仅价格昂贵,而且使用次数有限(20~30次),这些来自鼠的单克隆抗体蛋白的片段难避免从亲和层析柱中脱落、混入产品造成异源蛋白污染,十分危险。所以随着工艺的改进、生物工程产品使用单克隆抗体亲和层析工艺已被淘汰。

我们研究了人干扰素  $\alpha$ -2b 的基因工程大肠杆菌的发酵,包涵体的恢复天然结构以及不用单抗亲和层析的纯化等方面的工作,建立了简易高效的生产工艺。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌种

SW-IFN $\alpha$ -2b/DH5 $\alpha$ , 质粒用 P<sub>i</sub> 启动子,含氨苄青霉素抗性基因。

本文于 1995 年 5 月 10 日收到。

## 1.2 试剂

蛋白胨, 酵母抽提粉系英国 Oxoid 或日本大五营养公司产品, DE-52 为 Whatman 产品。Sephadex G-50 为 Pharmacia 产品。葡萄糖、磷酸盐、尿素、硫酸镁、氯化钠、氯化钙、氯化铵皆系国产品。

## 1.3 蛋白凝胶电泳

按 Laemmli. *et al* 文献 [11] 报道的方法进行。

## 1.4 SDS-PAGE 凝胶扫描

用 Pharmacia LKB ULTRO SCAN X. L. 型扫描仪进行。

## 1.5 蛋白浓度测定

以牛血清白蛋白为标准, 按 Lowry<sup>[12]</sup>方法进行。

## 1.6 人干扰素 $\alpha$ -2b 效价测定

用连续稀释法以水泡性口膜炎病毒 (VSV); 抑制细胞感染病变方法<sup>[13]</sup>进行。

## 1.7 尿素溶液的纯化

按文献 [14] 方法进行。

## 1.8 发酵

1.8.1 种子培养液: 蛋白胨 10g, 酵母抽提粉 5g, NaCl 5g, 加水至 1000ml, 分装于 4 个 1000ml 三角烧瓶中, 120℃ 灭菌 20min, 冷却后取 2 瓶加氨苄青霉素达 50 $\mu$ g/ml, 接种人干扰素  $\alpha$ -2b 基因工程菌, 30℃ 摇床培养 10h, 作为发酵罐种子使用。

1.8.2 发酵罐及培养液组成: 发酵罐 15L, B. Braun Biostat E 型。培养液 9L: 含 (g) 蛋白胨 100, 酵母抽提粉 50, NH<sub>4</sub>Cl 1, NaCl 5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60, CaCl<sub>2</sub> 0.1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30, MgSO<sub>4</sub> 1 和少量防泡剂在 120℃ 灭菌 20min 后, 冷却至 30℃, 外加单独灭菌的含葡萄糖溶液 40g, 氨苄青霉素 0.5g, 接种种子培养液 500ml 进行发酵。

1.8.3 发酵参数: pH6.8; 搅拌转速 500r/min; 温度 30℃/42℃; 通气量 10L/min; 溶氧 50%。

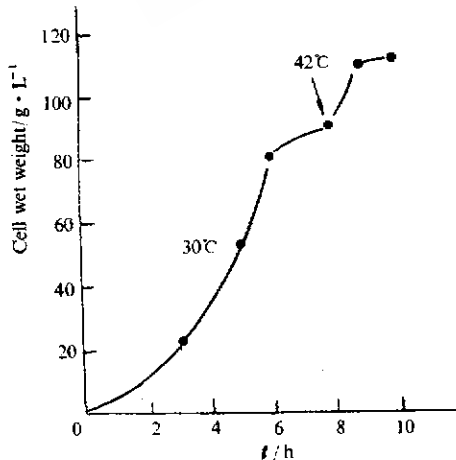


图1 人干扰素  $\alpha$ -2b 基因工程菌的发酵

Fig. 1 Fermentation process of *E. coli* harboring P<sub>t</sub> promoter-interferon  $\alpha$ -2b plasmid

## 2 结果和讨论

### 2.1 发酵及细胞破碎

用 15L B. Braun 发酵罐盛 10L 发酵液进行发酵, 按材料与与方法所述参数进行, 于 30℃ 发酵 8h, 然后 42℃ 诱导 2h 完成发酵。每隔不同时间取 2ml 发酵液, 10 000r/min 离心除去上清液, 称量菌体湿重 (称量菌体重量比测定发酵液浊度更为准确), 结果如图 1 所示。

发酵完毕冷却后用 4000r/min 离心 (BeckmanJ6B 离心机), 30min, 除去上清液, 得湿菌体 1kg 左右, 破碎细胞。42℃ 诱导不同时间后人干扰素  $\alpha$ -2b 的表达量如表 1, 结

果表明诱导 2~3h 即可。

表 1 诱导时间对干扰素表达水平的影响

Table 1 Effect of the induction time on the expression level of interferon  $\alpha$ -2b

Induction time/h	Expression level of interferon $\alpha$ -2b/%
0.5	5
1.0	10
2.0	20
3.0	20

## 2.2 产物的抽提复性与纯化回收

取 100g 湿重细胞悬浮于 500ml pH7.0, 20mmol/L 磷酸缓冲液中, 于冰浴条件下进行超声破碎, 超声发生仪为 Labsonic, 170W/200V, 反复进行 3 次, 用 Beckman J6B 离心机 4 000r/min 离心 30min。取沉淀部分用 100ml 8mol/L 尿素溶液, pH7.0, 20mmol/L 磷酸缓冲液, 0.5mmol/L 二巯基苏糖醇室温搅拌抽提 2h, 用 Beckman J2-21M 离心机 (15 000r/min) 离心 30min。取上清液用同样缓冲液稀释至尿素浓度为 0.5mol/L, 加二巯基苏糖醇至 0.1mmol/L, 4℃ 搅拌 15h, 15 000r/min 离心 30min 除去不溶物。经截留量 10 000 分子量的中空纤维超滤器浓缩, 将浓缩的 INF  $\alpha$ -2b 溶液经过 Sephadex G-50 分离, 层析柱 2cm $\times$ 100cm, 先用 20mmol/L, pH7.0 磷酸缓冲液平衡, 上柱后用同一缓冲液洗脱分离, 收集 INF $\alpha$ -2b 部分, 经 SDS-PAGE 检查。将 Sephadex G-50 柱层分离的 INF $\alpha$ -2b 组份, 再经 DE-52 柱 (2cm $\times$ 50cm) 纯化 INF $\alpha$ -2b, 上柱后用含 0.05、0.1 和 0.15mol/L NaCl 的 20mmol/L pH7.0 磷酸缓冲液洗涤, 收集含 INF  $\alpha$ -2b 的洗脱液。全过程蛋白质回收率为 20%~25%, 产品不含杂蛋白, DNA 及热源物质含量合格。

产品的 HPLC 分析, 效价及扩大生产结果列于图 2 及表 2、表 3, 说明本文报道的生产工艺是简而易而高效的。

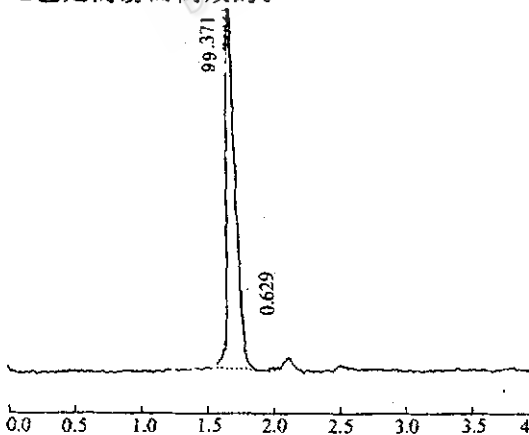


图 2 人干扰素  $\alpha$ -2b 产品的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analysis of Interferon  $\alpha$ -2b

Shimadzu SPD-6AV, RP-C-8 0.46cm $\times$ 25cm, 30% CH<sub>3</sub>CN-0.1% Trifluoro acetic acid, 0.5ml/min.

表 2 INF  $\alpha$ -2b 的生物活性

Table 2 Biological activity of INF  $\alpha$ -2b

Batch	Biological activity /IU $\times 10^4 \cdot \text{mg}^{-1}$
1	2.05
2	0.708
3	1.7
4	1.15
5	1.67

目前, 外源基因用大肠杆菌表达时常用 P<sub>L</sub> 启动子, 因为诱导表达比较方便, 在 30℃ 条件下发酵生长, 然后在 42℃ 进行诱导表达, 诱导表达时细胞应在存活状态, 所

以 30℃ 生长过程时间不宜过长, 由于生长温度低、时间短, 所以一般情况下发酵的菌体收量不高, 我们使用 15L 发酵罐盛 10L 发酵液, 在 10h 操作过程中可得湿菌体 1kg 左右, 不仅能满足下游批量生产需要, 而且不需要另外设置锅炉和泵房, 使发酵车间小型化、节约投资, 具有重要经济意义。表达产物形成包涵体, 优点在于表达产物稳定、量多, 缺点是恢复蛋白质的天然结构才能充分地显示生物活力。

表 3 3 批扩大实验结果

Table 3 Scale-up to production

Batch	Biological activity/ $\times 10^7$ IU $\cdot$ ml $^{-1}$	Protein conc. /mg $\cdot$ ml $^{-1}$	Relative activity/IU $\cdot$ ml $^{-1}$
Standard	1.7	0.1~0.2	$1.7 \times 10^8$
1	1.28	0.15	$8.7 \times 10^7$
2	2.5	0.15	$1.7 \times 10^8$
3	3.1	0.12	$2.6 \times 10^8$

不同蛋白质从包涵体恢复其天然结构的方法不尽相同, 与该蛋白的分子量大小, 二硫键多少, 有否亚基存在等都有密切的关系。有很多蛋白只能部分恢复其生物活力, 我们研究了人干扰素  $\alpha$ -2b 的从包涵体恢复天然结构与活力的关系, 很多因素影响这一过程, 但从理论上还有许多待研究之处。

纯化干扰素  $\alpha$  所使用的单克隆抗体层析柱一般常用 CNBr 活化 Sepharose 联结抗体蛋白, 在解离抗原-抗体结合时所使用的 pH 很低, 不仅容易引起产物失活 (人干扰素  $\alpha$ -2b 对酸性 pH 还比较稳定) 还会引起抗体片段的脱落, 引起异源蛋白的污染, 所以目前生物工程产品工序中不得使用, 本文符合不使用抗体亲和层析要求。

全过程中人干扰素  $\alpha$ -2b 蛋白回收率为 20%~25% 左右, 未列出每步的活力回收, 因为人干扰素  $\alpha$ -2b 复性前后生物活力相差百倍之多, 这种计算无意义。

## 参 考 文 献

- [1] Dianzany F, Antonelle G, Currenti M *et al.* J INF Res, 1990, 10 (Supp) S6.
- [2] 曾 庆, 金冬雁, 金 奇等. 病毒学报, 1992, 8 (3): 205~209.
- [3] 陈晓燕, 黎孟枫, 周 园等. 病毒学报, 1992, 8 (4): 327~331.
- [4] 康凤先, 叶 勤, 俞俊棠等. 生物工程学报, 1993, 9 (4): 332~336.
- [5] 智 刚, 周 园, 李玉英等. 病毒学报, 1991, 7 (2): 142~147.
- [6] 周 园, 金冬雁, 张智清等. 病毒学报, 1993, 9 (1): 37~39.
- [7] 张 彤, 吴淑华, 张鹤龄. 病毒学报, 1995, 11 (2): 131~137.
- [8] 张平武, 王易伦, 陆德如. 见: 上海市生化学会编, 上海生物化学学术会议论文摘要, 1994, p. 60.
- [9] Tarnowski S T, Roy S K, Liptak R A. Methods in Enzymology, 1986, 119: 153~165.
- [10] Thatcher D R, Panayotavs N. Methods in Enzymology, 1986, 119: 166~177.
- [11] Lammler U K. Nature, 1970, 227: 680~685.
- [12] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* J Biol Chem, 1951, 193: 265.
- [13] Rubistein P, Familletti C, Sidney P K. J Virology, 1981, 37: 755~758.
- [14] Prakash V, Loucheux C, Stephen. Arch Biophys Biochem. 1981, 210: 455~464.

## Study on the Production of Interferon $\alpha$ -2b Expressed in *Escherichia coli*

Yan Yuqin Wang Xiaoqin

(Harbin Pharmaceutical Institute of China, Harbin 150020)

Wu Aizhen Sun Yukun

(Shanghai Reseach Center of Biotechnology, Academina sinica, Shanghai 200233)

**Abstract** The production process of interferon  $\alpha$ -2b was established in our institute. The human interferon  $\alpha$ -2b was expressed in *E. coli* by using  $P_L$  promoter, The production process consists of high cell density fermentation, refolding of the inclusion body, chromatography with Sephadex G-50 and DEAE, without using monocloning antibody affinity chromatography. After purification, about 500mg of interferon  $\alpha$ -2b was obtained from 1kg wet cell produced by 10L fermentation broth. The biological activity shows  $1 \sim 2 \times 10^8$  IU/mg protein. This production process is very simple and convenient. It will save a lot of facility investment, space and labour, so that the cost of the product is rather low.

**Key words** Human interferon  $\alpha$ -2b