

重组人 GM-CSF/MCAF 融合蛋白的 变性、复性及纯化研究

叶棋浓 苏国富 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和单核细胞趋化激活因子(MCAF)融合蛋白在大肠杆菌中高效表达后,表达产物以包涵体形式存在。包涵体经分离和洗涤后,探索了rhGM-CSF/MCAF变性和复性的合适条件。复性后的样品经Sephadex G-75凝胶过滤和CM-Sepharose FF离子交换两步层析,得到了具有生物学活性的SDS-PAGE纯的rhGM-CSF/MCAF。Western blot检测表明,纯化的rhGM-CSF/MCAF能分别与GM-CSF和MCAF抗体发生特异反应。

关键词 融合蛋白, 变性, 复性, 纯化

巨噬细胞与粒细胞在引起免疫反应和调节免疫反应中起重要作用。GM-CSF能刺激中性粒细胞、巨噬细胞的生长与分化,增强中性粒细胞的细胞毒作用^[1];MCAF既能激活单核细胞,又能特异地把单核细胞趋化到损伤部位(组织)分化成巨噬细胞^[2],两者在抗感染、抗肿瘤及机体防御等方面均有重要作用^[3~8]。我们拟通过GM-CSF和MCAF融合,使两者在疾病恢复中起协同或增强作用;另一方面,使免疫细胞(单核细胞)定向趋化到特定部位,尽可能减少细胞因子所带来的全身毒副作用。我们已在大肠杆菌中高效表达了hGM-CSF/MCAF融合蛋白,为了对其性质作深入研究,需获得较纯的融合蛋白,本文对rhGM-CSF/MCAF的变性、复性及纯化进行了研究。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

表达rhGM-CSF/MCAF的重组质粒pGM01由本实验室构建,GM-CSF和MCAF融合基因受 $\lambda P_R P_L$ 启动子调控,pGM01的受体菌为大肠杆菌DH5 α 。

1.2 试剂

Sephadex G-75和CM-Sepharose FF购自Pharmacia公司,GM-CSF抗体由本院三所提供,MCAF抗体由美国Rollins BJ博士赠送。GM-CSF参考样品购自GIBCO/BRL公司,MCAF参考样品购自Promega公司。

1.3 大肠杆菌的培养及诱导表达

将含重组质粒的大肠杆菌DH5 α (pGM01)接种于LB培养液中,于30℃150r/min振荡培养过夜,次日将该活化的菌液以1%~2%的比例接种于新的LB培养液中,于30℃继续振荡培养,待其OD₆₀₀生长至0.4~0.5时,升温到42℃诱导4~5h,离心收集表达

菌体。

1.4 包涵体的分离及洗涤

经分析, rhGM-CSF/MCAF 在大肠杆菌中的表达产物以包涵体形式存在。将上述离心收集的菌体以 1:10 比例悬浮于 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、1mmol/L EDTA 中, 加入溶菌酶至终浓度 0.2mg/ml, 冰浴 30min 后, 超声破碎 5~10 次 (每次 30s, 间隔 30s), 8000~10 000r/min 离心 15min, 收集沉淀, 用 1~4 mol/L 尿素或(和)0.5% Triton X-100 的 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、1mmol/L EDTA 溶液洗涤 2~3 次, 10 000r/min 离心取沉淀。

1.5 包涵体的变性溶解

将沉淀溶于下述三种溶液的任何一种中, 此三种溶液分别为含 5~7mol/L 尿素、5~7mol/L 盐酸胍、0.5%~2%SDS 的 20mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、1~10mmol/L EDTA、0~10mmol/L DTT, 沉淀于 4℃或室温溶解, 1000r/min 收集上清。

1.6 rhGM-CSF/MCAF 的复性

将蛋白浓度调整为 0.1mg/ml 左右, 此溶液中的盐酸胍最终浓度不小于 1mol/L, 先用含 0.5mol/L 的盐酸胍的 20mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、1mmol/L EDTA 缓冲液 4℃透析, 再用下述两种溶液中的任何一种进行透析, 它们是: (1) 20mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、1mmol/L EDTA, (2)除(1)外再加入 GSH 和 GSSG, 使终浓度分别为 2mmol/L GSH 和 0.2mmol/L GSSG, 然后将透析后的溶液浓缩, 再透析后上样到 Sephadex G-75 层析柱上。

1.7 Sephadex G-75 凝胶过滤

用 20mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、1mmol/L EDTA 平衡 Sephadex G-75 层析柱 (2×60cm), 上样后用上述溶液洗脱, 流速 12ml/h, 收集各组分, 将含活性峰的样品用 20mmol/L NaAc (pH5.5)、1mmol/L EDTA 溶液充分透析, 离心取上清。

1.8 CM-Sepharose FF 离子交换层析

CM-Sepharose FF 层析柱 (1.5×20cm) 用 20mmol/L NaAc (pH5.5)、1mmol/L EDTA 溶液平衡, 上样后用含 0~0.5 mol/L NaCl 的起始缓冲液梯度洗脱, 收集洗脱各组分。

1.9 纯化产物的鉴定

1.9.1 SDS-PAGE 及 Western blot 按参考文献 [9] 进行。

1.9.2 GM-CSF 生物学活性测定: 选用 GM-CSF 依赖的细胞株 TF1, 以 MTT 染料掺入法进行^[10]。

1.9.3 MCAF 生物学活性测定: 以琼脂糖平板法测定 MCAF 的单核细胞趋化活性^[11]。

1.9.4 蛋白含量测定: 考马斯亮蓝 G250 法^[12]。

2 结果

2.1 包涵体的分离与洗涤

诱导培养后的菌体经超声破碎, 离心所得沉淀即为包涵体。此时沉淀重悬后再进行一次超声破碎, SDS-PAGE 显示, 第二次超声破碎可使包涵体的纯度进一步提高, 而不

影响包涵体的本质,并且可减少以后的洗涤次数,用尿素溶液洗涤包涵体发现,随着尿素浓度的提高,杂蛋白大部分被洗去,但目的蛋白 rhGM-CSF/MCAF 的含量也随之下降,因一部分 rhGM-CSF/MCAF 可溶于 3mol/L 和 4mol/L 的尿素溶液中。对于 rhGM-CSF/MCAF 来说,用 2mol/L 尿素洗涤包涵体效果较好,纯度为 70% 左右。另外,用 0.5% Triton X-100 洗涤包涵体的效果略差于用 2mol/L 尿素洗涤。

2.2 包涵体的溶解

洗涤后的包涵体分别用尿素、盐酸胍和 SDS 溶解,我们发现不论时间长短(1h~1d)、温度高低(4℃到室温)、DTT 有无,用尿素溶解包涵体都存在着 rhGM-CSF/MCAF 降解现象,即大部分蛋白集中在比 rhGM-CSF/MCAF 分子量偏小的位置(图版 I-A)。为了证实降解现象是否发生在用尿素溶解包涵体这一步骤中,我们先把 2.1 中所获得的包涵体沉淀用 1×SDS 加样缓冲液煮沸,然后走 SDS-PAGE,结果未发现 rhGM-CSF/MCAF 降解成分子量偏小的蛋白质,而包涵体用尿素溶解后的样品显示的蛋白带大部分集中在比 rhGM-CSF/MCAF 分子量偏小的位置。为了进一步证实该分子量偏小的蛋白带确实是由 rhGM-CSF/MCAF 降解而来,我们用 GM-CSF 单克隆抗体进行了 Western blot 试验,结果表明,尿素溶解后的样品显示两条反应带,说明多余的一条反应带是由 rhGM-CSF/MCAF 降解而来(图版 I-B)。为了克服上述问题,我们又进行了如下研究。

2.2.1 不同浓度 PMSF 对蛋白降解的影响:在尿素溶液(含 20mmol/L Tris·HCl、1mmol/L EDTA、6mol/L urea),加入 PMSF 使终浓度分别为 1mmol/L、10mmol/L 和 50mmol/L, rhGM-CSF/MCAF 在上述三种溶液中仍存在着同样的降解现象。

2.2.2 EDTA 和 Tris 浓度对蛋白降解的影响:在尿素溶液中使 Tris 浓度为 20mmol/L,使 EDTA 浓度分别为 1mmol/L 和 10mmol/L,发现后者 rhGM-CSF/MCAF 降解少于前者,但仍存在少量的降解。若提高 Tris 浓度到 50mmol/L,保持 EDTA 浓度为 10mmol/L,则几乎不存在降解问题,说明提高离子强度可抑制蛋白降解。遗憾的是,随着包涵体溶解时间的延长(6h 后), rhGM-CSF/MCAF 仍被部分降解。

2.2.3 不同变性剂对蛋白降解的影响:鉴于用尿素溶解包涵体存在着降解现象,我们改用盐酸胍或 SDS 溶解包涵体,意外地发现用 6mol/L 盐酸胍、20mmol/L Tris·HCl、1mmol/L EDTA 或 1% SDS 溶解包涵体均不存在 rhGM-CSF/MCAF 降解问题。随着溶解时间的延长,也不存在降解现象。

考虑到蛋白纯化中选择层析方法的多样性,本实验最后选用盐酸胍溶解包涵体,因 SDS 溶解包涵体后,蛋白纯化只能选用凝胶过滤层析。

2.3 rhGM-CSF/MCAF 的复性

包涵体溶解后,用材料与方法中所述的两种不同溶液进行复性,发现复性后的 rhGM-CSF/MCAF 生物活性相似,但用溶液(1)复性后的蛋白产量低于用溶液(2)复性后的产量,前者为每升菌液 8mg,后者为 19mg。另外,如果复性缓冲液的 pH 值降低(偏酸),则复性过程中,沉淀物的形成量会增加,使活性蛋白含量减少,所以在偏碱性条件下复性 rhGM-CSF/MCAF 变性蛋白效果较好。

2.4 rhGM-CSF/MCAF 的纯化

2.4.1 Sephadex G-75 凝胶过滤:结果如图 1 所示, rhGM-CSF/MCAF 集中在图中斜线

所表示的峰。

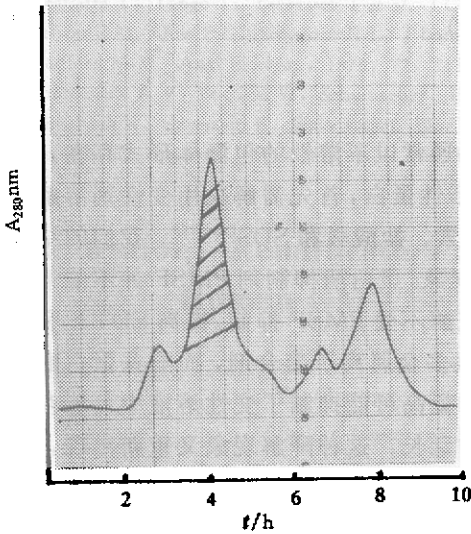


图1 rhGM-CSF/MCAF 的
Sephadex G-75 凝胶过滤

Fig. 1 Sephadex G-75 gel filtration of rhGM-CSF/MCAF

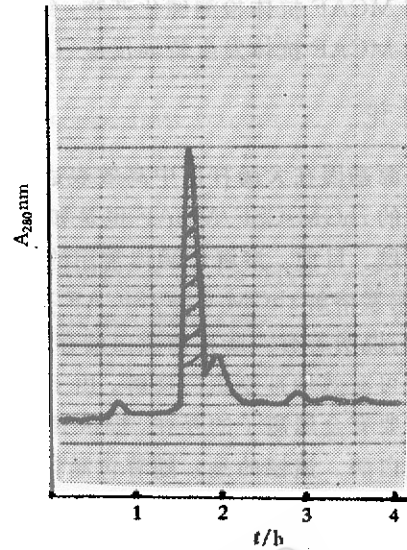


图2 rhGM-CSF/MCAF 的
CM-Sepharose FF 离子交换层析

Fig. 2 CM-Sepharose FF ion-exchange chromatography of rhGM-CSF/MCAF

2.4.2 GM-Sepharose FF 阳离子交换层析: 结果如图 2 所示, rhGM-CSF/MCAF 集中在图中斜线所表示的峰, 约 0.18mol/L NaCl 时被洗脱。表达产物经上述两步纯化后, rhGM-CSF/MCAF 达到了电泳纯。用 hGM-CSF 依赖的 TF1 细胞株测得 GM-CSF/MCAF 的 GM-CSF 活性达 1.8×10^7 u/mg, 参考 GM-CSF 的活性为 8×10^6 u/mg。用琼脂糖平板法测得 hGM-CSF/MCAF 和参考 MCAF 表现出趋化活性的最小浓度均为 40ng/ml (表 1)。可以看出, GM-CSF/MCAF 具有较高的生物学活性。

表 1 rhGM-CSF/MCAF 的纯化

Table 1 Purification of rhGM-CSF/MCAF

Step	Total protein /mg	Purity of rhGM-CSF/MCAF /%	Amount of rhGM-CSF/MCAF /mg	Recovery /%	Specific activity (u/mg) ^a	(ng/ml) ^b
Total cellular lysate	320	27.2	87.0	100	ND ^c	ND
Solubilized inclusion bodies	104	69.5	72.3	83.1	ND	ND
Supernatant after renaturation	19	72.2	13.7	15.7	7.0×10^6	ND
Sephadex G-75	8.0	84.6	6.77	7.8	ND	ND
CM-Sepharose FF	4.8	93.4	4.48	5.1	1.8×10^7	40

^aSpecific activity was expressed as that of GM-CSF. ^bSpecific activity was expressed as that of MCAF.

^cNot detected.

2.5 rhGM-CSF/MCAF 的鉴定

2.5.1 SDS-PAGE 鉴定: 结果如图版 I-C 所示, 纯化后的 rhGM-CSF/MCAF 在 26kDa 处显示单一的着色较深的蛋白条带, 与我们的预期结果相同。

2.5.2 Western blot 鉴定: SDS-PAGE 后的蛋白带转移到硝酸纤维素膜上, 分别用 GM-

CSF 和 MCAF 抗体检测纯化产物, 结果表明, 纯化的 rhGM-CSF/MCAF 能分别与 GM-CSF 和 MCAF 抗体发生特异反应 (图版 I-D, E)。

3 讨论

外源基因在大肠杆菌中高效表达的目的蛋白通常以不溶性的包涵体形式存在。我们所表达的 rhGM-CSF/MCAF 也是如此, 为获得活性蛋白, 首先需解决用变性剂溶解包涵体的问题。目前, 溶解包涵体常用的变性剂有尿素、盐酸胍和 SDS^[13-15]。我们的结果表明, 用尿素溶解 rhGM-CSF/MCAF 存在着降解现象, 蛋白酶抑制剂 PMSF 并不能消除这种现象, 说明若有大肠杆菌蛋白酶存在, 则可能该酶不受 PMSF 抑制。提高 EDTA 和 Tris 浓度却可有效地抑制蛋白降解。由于 EDTA 是很多金属离子螯合剂, 而有些蛋白酶发挥作用需要有金属离子的存在, 提示 EDTA 浓度的提高可能抑制了变性溶液中可能存在的一些蛋白酶。遗憾的是, 随着包涵体溶解时间的延长, 这种降解现象又重新出现, 其原因尚不清楚。所幸的是, 用盐酸胍或 SDS 溶解包涵体均不存在 hGM-CSF/MCAF 降解问题。邵魁等在大肠杆菌 DH5 α 中表达了 rhGM-CSF (内部资料), 表达产物也在胞浆中形成包涵体, 但用尿素溶解包涵体并未发现 rhGM-CSF 存在降解现象, 说明 rhGM-CSF/MCAF 的降解可能与其中 MCAF 结构有关。用合适的变性剂可以克服蛋白降解这一事实提示变性剂与蛋白质结构之间可能存在着某种关系, 还有待我们去发现其它一些变性剂。

变性蛋白的复性是获得生物活性蛋白质过程中的至关重要的环节。rhGM-CSF/MCAF 共有四个二硫键, 在变性过程中, 二硫键被还原, 这就要求复性过程中重新氧化形成正确的二硫键, 任何二硫键的错配均可能降低 rhGM-CSF/MCAF 的生物活性。我们采用了空气氧化和谷胱甘肽氧化两种方法进行复性, 结果表明两者所获得的 rhGM-CSF/MCAF 生物活性相似, 但后者产量高于前者, 其原因可能是采用空气氧化不能精确控制复性过程的速度, 使复性过程中产生的沉淀增多, 复性产物再经 Sephadex G-75 和 CM-Sephadex FF 两步层析纯化, 获得了具有较高生物学活性的电泳纯的 rhGM-CSF/MCAF, 为进一步研究其生物学功能奠定了基础。

致 谢 本所张兆山、朱厚础教授和孙澎同志, 本院三所沈倍奋、王会信、蒋慈徽教授及王润华、刘农乐同志等在蛋白纯化方面给予大力帮助, 表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Dipersio J F, Billing P, Williams R *et al.* *J Immunol*, 1988, **140**: 4315.
- [2] Leonard E J, Yoshimura T. *Immunol Today*, 1990, **11**: 97.
- [3] Donahue R E, Wang E A, Stone D K *et al.* *Nature*, 1986, **321**: 872.
- [4] Mayer P, Lam C, Obenaus H *et al.* *Blood*, 1987, **70**: 206.
- [5] Grabstein K H, Urdal D L, Tushiuski R J *et al.* *Science*, 1986, **232**: 506.
- [6] Nakano K, Kasahara T, Mukaida N *et al.* *Infect Immunity*, 1994, **62**: 377.
- [7] Matsushima K, Larsen C G, Dubois G C *et al.* *J Exp Med*, 1989, **169**: 1435.
- [8] Rollins B J, Sunday M E. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**: 3125.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1989

- (10) Kitamura T, Tange T, Terasawa T *et al.* J Cell Physiol, 1989, **140**: 323
(11) Nelson R D, Quie P G, Simmons R L. J Immunol, 1975, **115**: 1650
(12) Bradford M M. Anal Biochem, 1976, **72**: 248
(13) Kimmenade A V, Bond M W, Schumacher J H *et al.* Eur J Biochem, 1988, **173**: 109
(14) Haienbeck R, Kawasaki E, Wrin J *et al.* Bio/Technol, 1989, **7**: 710
(15) Yasueda H, Nagase K, Hosoda A *et al.* Bio/Technol, 1990, **8**: 1036

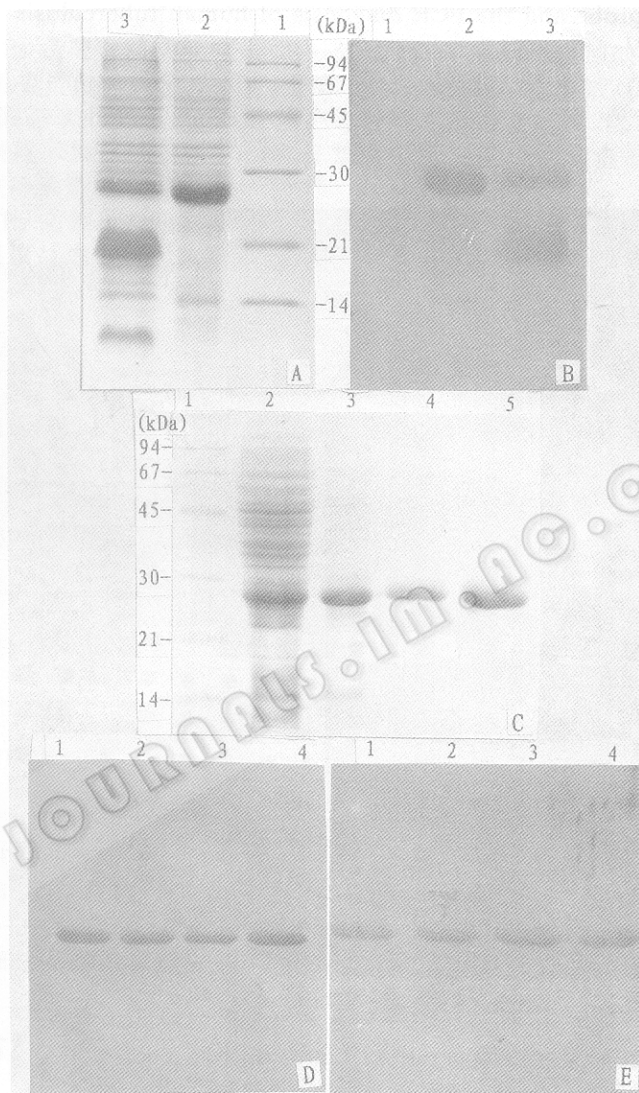
Denaturation, Renaturation and Purification of A Recombinant Human GM-CSF/MCAF Fusion Protein

Ye Qinong Su Guofu Huang Cuifen

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071)

Abstract A fusion Protein of human granulocyte-macrophage stimulating factor (GM-CSF) and monocyte chemoattractant activating factor (MCAF) was efficiently expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. After the isolation of the inclusion bodies, the optimum conditions of denaturation and renaturation were studied. The resulting renatured rh GM-CSF/MCAF was purified to homogeneity by Sephadex G-75 gel-filtration and CM-Sepharose FF ion-exchange chromatography. The purified product remains biological activities and can react specifically with GM-CSF and MCAF antibodies respectively by western blot analysis.

Key words Fusion protein, denaturation, renaturation, purification



A, B. Denaturation of rhGM-CSF/MCAF inclusion bodies by SDS-PAGE and Western blot analysis respectively.

1. Protein molecular weight markers
2. rhGM-CSF/MCAF inclusion bodies + $1 \times$ SDS loading buffer
3. rhGM-CSF/MCAF inclusion bodies + $5 \sim 7$ mol/L urea

C. Purification of rhGM-CSF/MCAF.

1. Protein molecular weight markers
2. Total cellular lysate of *E. coli* harboring pGM01
3. Inclusion bodies of rhGM-CSF/MCAF
4. Purified rhGM-CSF/MCAF by Sephadex G-75
5. Purified rhGM-CSF/MCAF by CM-Sepharose FF

D, E. Western blot analysis of rhGM-CSF/MCAF with GM-CSF and MCAF antibodies respectively.

1. Total cellular lysate of *E. coli* harboring pGM01
2. Inclusion bodies of rhGM-CSF/MCAF
3. Purified rhGM-CSF/MCAF by Sephadex G-75
4. Purified rhGM-CSF/MCAF by CM-Sepharose FF