

两种新型白细胞介素-2的热稳定优越性

唐建伟* 刘爱萍 虞建良 范佩芳 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘要 研制成两种新型白细胞介素-2(新型 IL-2),其一为 125Ser-IL-2,另一为 125Ala-IL-2(即原型 IL-2 中 125 位 Cys 分别被 Ser 或 Ala 取代)。两种新型 IL-2 均已被高度纯化,并已完成了中试,获准临床应用。发现新型 IL-2 的热稳定优越性。在 65℃ 加热,新型 IL-2 的稳定性高于原型,失活比原型慢,被保留的活性也较原型多。在 0.1% SDS 中能使失活的 IL-2 逐渐恢复一定的活性,也是新型 IL-2 恢复活性高。同时,比较了其它条件下这三种重组 rIL-2 的稳定性及 SDS 对其复性的影响,发现三者之间差异很大。上述结果均证明:125Ala-IL-2 的热稳定性最好,125Ser-IL-2 次之,原型较新型差。

关键词 新型白细胞介素-2(IL-2),定点突变,IL-2热稳定性

人白细胞介素-2(IL-2)是由 Morgan 等^[1]在 1976 年首先发现的,它能使 T 细胞在培养条件下长期生长,促进细胞毒 T 淋巴细胞的产生,提高自然杀伤细胞(NK)的活性,促进淋巴因子活化的杀伤细胞(LAK)及肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的活性,促进干扰素等多种因子的分化,有多种生物学功能,在免疫调节中起关键作用。近年来,IL-2 在临床治疗肿瘤方面取得可喜进展,对不少感染性疾病也有一定疗效。故日益受到重视^[2,3]。

1983 年 Taniguchi 等^[4]首先克隆了 IL-2 的 cDNA,由 cDNA DNA 顺序推测 IL-2 成熟分子由 133 个氨基酸组成,分子量为 15kDa。IL-2 有三个 Cys,其中 58 与 105 位 Cys 形成二硫键,为活性所必需;C 端 125 位 Cys 上的-SH 基呈游离状态,跟活力关系不大^[5,6],但会引起二硫键错配,影响生物活性。为了克服此缺点我们通过基因突变的方法,将此 Cys 改换掉,获得了两种突变体,125Ser-rIL-2 及 125Ala-rIL-2,实验结果表明:125Ser/Ala-rIL-2 活性有所提高。同时,我们还发现,125Ala-IL-2 及 125Ser-rIL-2 的稳定性比原型有很大提高;SDS 对加热失活的 IL-2 有复性作用,且这种复性作用对三种 IL-2 有差异,这些未见文献报道过。两种新型 IL-2,现在都已通过中试,获得中国卫生部颁发的临床试用批文。

1 材料与方 法

1.1 材 料

质粒 pLY-4, M13mp18 双链 DNA, *E. coli* JM105, JF1125, K802 由本所 203 组提供。*E. coli* CJ236 由美国 Jordern Tang 惠赠, *E. coli* SG1117 由第二军医大学陆德如教授惠赠, T4 多核苷酸激酶、T4DNA 连接酶 Klenow 片段、EcoR I、BamH I 均为

* 唐建伟为二军大代培研究生。

其他作者为:孙兰英、王子轩、常远、郑宏大、陈寅。

本文于 1994 年 11 月 7 日收到。

Boehringer 公司、华美公司产品, α - 32 P-dATP、 γ - 32 P-ATP 为英国 Amersham 公司产品, 3 H-TdR 为上海原子核研究所产品。

1.2 方法

1.2.1 突变引物的合成: 引物用亚磷酸三酯法在 DNA 合成仪自动合成, 经 20% 丙烯酰胺 7mol/L 尿毒变性胶纯化。用于 125 位 Ala 突变的引物为 5'GATGCTTTGAGCAAAGGTAATC3', 共 22 个碱基, 用于 125 位 Ser 突变的引物为 5'TGCTTTGAGAAAAGGTGATCCATCT3' 共 25 个碱基, 该引物在 122 位氨基酸处增加了 1 个 Sau3A 酶切位点 (但未改变氨基酸编码)。

1.2.2 突变方法: 1987 年我们按 Kramer⁽⁷⁾ 的缺口双链法研制了 125Ser-IL-2。1988 年 U-DNA 正链法研究成功⁽⁸⁾, 后者突变速度快, 效率高达 70% 以上, 可以免除杂交筛选这一步, 直接用序列分析 (一般先用单轨扫描) 即可找出已突变的克隆株, 故立即用 U-DNA 正链法制备了 125Ala-IL-2, 我们是国内最早使用 U-DNA 正链法的实验室之一

1.2.3 其他方法: 工程菌的获得 (由表达质粒转化受体菌), 发酵培养, 产品分离纯化; 纯品 SDS-PAGE 鉴定, 两种新型 IL-2 的生物活性及蛋白质含量测定等, 均按虞建良等文中方法⁽⁹⁾。

2 结 果

2.1 125Ser-IL-2 及 125Ala-IL-2 基因的获得及其表面质粒构建

2.1.1 基因的制备: 125Ser-IL-2 及 125Ala-IL-2 基因由原型 IL-2 基因定点突变而得到。构建 125 Ser-IL-2 是用缺口双链法, 因该法在当时是先进的方法, 但突变效率还不高, 故需用点杂交方法进行初筛挑取阳性克隆, 再利用突变株上新增加的 1 个 Sau 3A 酶切位点进行酶切鉴定 (图略)。最后进行 DNA 的序列分析 (图 1, 图中, 中间图为正常 IL-2, 其 125



图 1 DNA 顺序分析鉴定新型 IL-2 基因
Fig. 1 DNA sequence of new type IL-2

位为 Cys 密码子 TGT (反向读为 ACA), 左边为 125Ser-IL-2, 其 125 位为 Ser 密码子 ACA (反向读为 TGT), 右边为 125Ala-IL-2, 其 125 位为 Ala 密码子 GCA), 证实该突变株中 125 位 Ser 的密码子为 TCT (Ser), 取代了原来的 TGT (Cys)。125Ala-IL-2 的制备, 则用 U-DNA 正链法, 任意挑取几个转化子抽提单链 DNA 后直接进行测序, 即可筛出突变好的菌株, 不必进行杂交筛选。从图 1 可知, 其中一个转化子 125 位密码子 TGT (Cys) 已突变成 GCT (Ala)。

2.1.2 表达质粒的构成及表达效率: 高效表达质粒的构建, 乃利用本组的 pLY-4, 构建过程见图 2, 得到两个表达质粒 pLY4-S (125Ser-IL-2) 及 LY4-A (125Ala-IL-2)。表达质粒的调控元件包括 P_L 启动子, t_1, t_2 终止信号及 CITS857 基因等, 将表达质粒 pLY4-S 和 pLY4-A 和 pLY4-C (C 代表原型 IL-2) 分别转化大肠杆菌 JF1125, K802, SG1117, 得到相应的工程菌。这些工程菌用摇瓶发酵, 所得菌体用 SDS-PAGE 分析, 黑度扫描计算

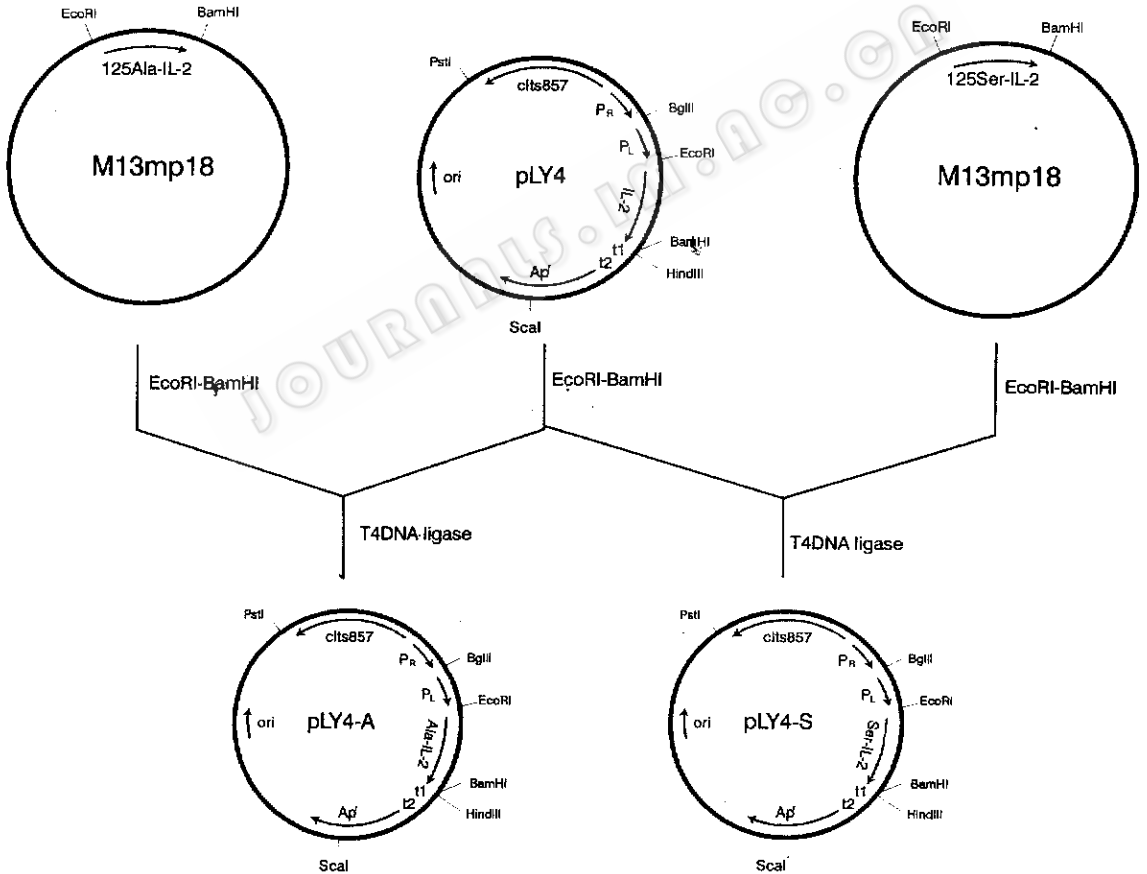


图 2 新型 IL-2 基因表达质粒的构建

Fig. 2 Construction of expression plasmids for new type IL-2

所表达新型 IL-2 在细菌总蛋白中所占比例。5 批发酵的结果显示, pLY4-S, pLY4-A 及 pLY-C 三种质粒在 *E. coli* JF1125 中表达平均水平为 45.3%, 42.7%, 39.6%, 在 *E. coli* K802 中平均表达水平分别为 35.0%, 38.6%, 35.6% 在 *E. coli* SG1117 中平均水平为 38.0%, 35.2%, 32.2%, 从总体看来, 新型比原型表达量略高。就宿主菌来说, *E. coli* JF1125 这一受体菌对 IL-2 的表达更为有利, *E. coli* SG1117 是一个蛋白酶缺陷性菌株, 其表达量并不比其它菌株高。

2.2 两种新型 IL-2 的纯化鉴定

2.2.1 新型 rIL-2 纯化及其

鉴定: 大肠杆菌在表达重组新型 IL-2 时形成包涵体, 分离包涵体可除去大部分大肠杆菌细胞杂质, 故采取分离包涵体路线。由于我们分离包涵体的方法较好, 将其溶解后, 只需用一次分子筛柱层析 (Sephacryl S-200) 分离即可使样品达到 96% 以上纯度。125Ala-IL-2 的发酵液、包涵体及柱层析峰分管收集, 样品经 SDS-PAGE 鉴定 (用考马斯亮蓝染色), 结果见图 3。黑度扫描显示纯度在 97.4%。同样的方法纯化了 125Ser-IL-2, 结果与 125Ala-IL-2 相似 (图略)。两种新型 IL-2 的 SDS-PAGE 银染为一条带, 还原型样品用 HPLC

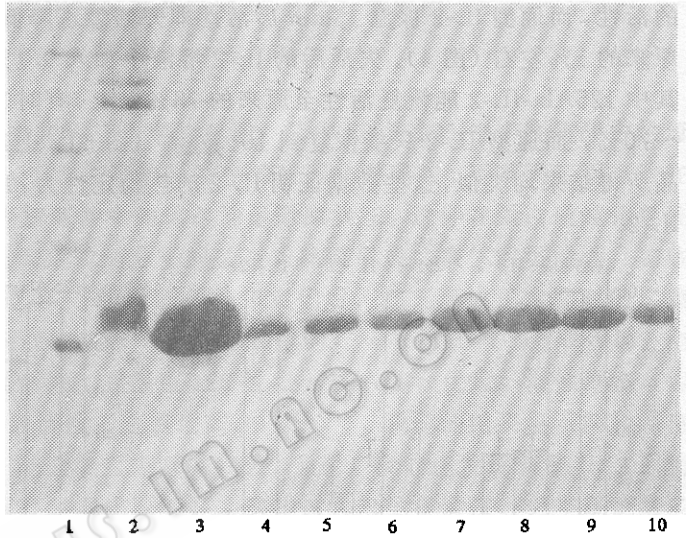


图 3 125Ala-IL-2 发酵液、包涵体及 S-200 柱层析各部分的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 3 SDS-PAGE of bacteria extract, inclusion body and chromatography fractions of 125Ala-IL-2.

1. Standard marker. 2. Bacteria extract, 3. Inclusion body, 4~10. Fractions from Sephacryl S-200 chromatography.

(TSK 柱) 分析, 两种新型 IL-2 的纯度均在 96% 以上, 全波 (230~300nm) 扫描两种新型 IL-2 最大吸收光谱均为 278nm, 与原型 IL-2 相同。用 Edman 降解法分析了二种新型 IL-2 的 N 端 15 个氨基酸, 其结果亦与理论值一致 (以上数据均略)。还用胰蛋白酶消化 125Ser-IL-2, 分析了 125Ser-IL-2C 端的 13 个氨基酸 (由我所夏其昌教授完成), 结果证明 125Ser-IL-2 的 125 位氨基酸确为 Ser。

2.2.2 三种 IL-2 的生物活性: 在相同条件下分离原型 IL-2, 125Ala-IL-2 及 125Ser-IL-2 的包涵体共 3 批, 纯度均在 96% 以上, 用 CTIL-2 细胞测定其活性, 原型 IL-2 的比活为 $(1.5 \pm 0.33) \times 10^7 \text{u/mg}$, 125Ser (或 125Ala) -IL-2 的比活为 $(1.8 \pm 1.76) \times 10^7 \text{u/mg}$, 结果显示新型 IL-2 的比活比原型 IL-2 略高。(表略)

另外, 测定了三种 IL-2 在促进 NK 样细胞增殖及 NK 细胞活性、生物功能专一性及抗肿瘤方面等生物学功能, 结果显示在相同活性条件下, 三种 IL-2 之间的生物学作用无显著性差异^[10]。表示突变未影响其抗癌等生物学功能。

2.3 两种新型 IL-2 与原型 IL-2 的稳定性比较

本工作首次详细研究了两种新型 IL-2 与原型 IL-2 间的稳定性及 SDS 对稳定性的影响,取新型 IL-2 及原型 IL-2 的样品,稀释后(此时样品中有很少量的 SDS,可以忽略不计,样品浓度相同,缓冲液为 50mmol/L PB, pH7.0),置 65°C 水浴保温不同时间(60min 及 90min),分别取样测活,然后加入 0.1%SDS,继续于 65°C 保温 10min,取样测活,上述这些实验的结果显示 125Ala-IL-2 失活较慢,65°C 保温 60min 及 90min 后,仍有 30% 的活性,而原型 IL-2 保温 15min 后活性即开始急剧降低,至 60min 及 90min 后活性仅为原来的 1% 左右(图 4)。失活后的 IL-2 溶液中加入 0.1%SDS,可使 IL-2 逐渐恢复活性,其中 125Ala-IL-2 能恢复活性至原来的 78% 以上,有时达 90%,125Ser-IL-2 能恢复 50%~70%,而原型 IL-2 只能恢复到 10% 左右(图 5)。上述实验用 IL-2 纯品或部分纯化产品所得结果均类似,这些数据证明 IL-2 的热稳定性为:125Ala-IL-2>125Ser-IL-2>原型 IL-2。

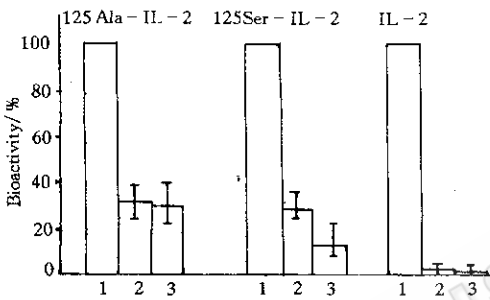


图 4 加热对不同 IL-2 活性的影响

Fig. 4 Thermostability of different rIL-2 by 65°C treatment

1. Without heat treatment, 2. 65°C, 60min, 3. 65°C, 90min

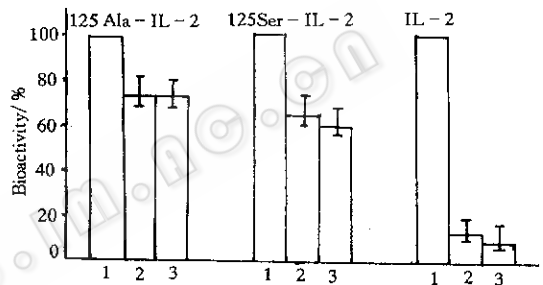


图 5 比较 0.1%SDS 对热失活 IL-2 的复性作用

Fig. 5 Recovery bioactivity of IL-2 in 0.1% SDS after heating

1. Native rIL-2, 2. 65°C, 60min → 0.1%SDS, 10min, 3. 65°C, 90min → 0.1%SDS, 10min

图 5 从另一个角度分析了两种新型 IL-2 的稳定性,样品在 65°C 处理 60min 及 90min 后的活性,比较加 0.1%SDS 前后活性的变化,125Ala-IL-2 及 125Ser-IL-2 加 0.1%SDS 后恢复活性又快又好,而野生型 IL-2 则否(图 5)。

2.3.1 不同 IL-2 稳定性的进一步研究:为了进一步了解两种新型 IL-2 的热稳定优越性及 SDS 对 IL-2 复性的影响,我们作了如下实验。

在三种 IL-2 纯化样品中加入 0.1%SDS,置 65°C 1h 后测活,并与不加 SDS 且未经 65°C 保温的样品(原液)之间的活性变化作比较,结果表明,加入 0.1%SDS 且 65°C 保温后,125Ala-IL-2 活性是原来的 2.22 倍,125Ser-IL-2 活性是原来的 10.5 倍,原型 IL-2 活性是原来的 16.8 倍。

待测定样品中加 0.1%SDS 后,置 4°C 1h 后测活,则加入 0.1%SDS 样品与原液(即不加 SDS 样品)之间活性的变化为,加入 0.1%SDS 后,125-Ala-IL-2 活性是原来的 1.67 倍,125-Ser-IL-2 活性是原来的 7.93 倍,原型 IL-2 活性是原来的 13.2 倍。

由此可见加入 0.1%SDS 后,无论是置 4°C 还是 65°C 的处理与原液相比,原型 IL-2 有极大提高,125Ser-IL-2 次之,125Ala-IL-2 的增高不明显。

在不加任何保护剂且将 SDS 尽可能去除干净条件下, 纯化的样品 (样品浓度为 0.8mg/ml, 缓冲液为 50mmol/L PB pH7.0), 置 4℃ 冰箱于不同时间取样测活, 当放置一个月时, 125Ala-IL-2 仍保留 50% 活性, 125Ser-IL-2 则为 10%, 原型 IL-2 只有 5%, 其稳定性也是 125Ala-IL-2 > 125Ser-IL-2 > 原型 IL-2。

上述比较, 表明三种 IL-2 的差异很大, 充分证明了三种 rIL-2 热稳定的显著差别。两种新型 IL-2 均较原型 IL-2 稳定, 但 125Ala-IL-2 的热稳定性能最好。SDS 对 IL-2 是复性作用或称保护作用, 这种复性作用对新型及原型 IL-2 是有差别的。

3 讨 论

白细胞介素-2 (IL-2) 分子中共有三个半胱氨酸, 其中 58 与 105 位半胱氨酸中的巯基形成二硫键, 且为活性所必需, 125 位半胱氨酸中的巯基是游离的。用基因工程方法在大肠杆菌中表达 IL-2 时, 三个半胱氨酸中的巯基均呈游离状态, 这样在蛋白质纯化复性过程中就会存在分子内部二硫键错配或两分子间通过二硫键形成二聚体的可能性, 这些均会影响 IL-2 的活性。曾有报道 IL-2 经重新折叠和氧化后, 85% 形成正常配对的二硫键, 而另外 15% 形成分子内错配或二聚体^[11]。当 125 位的 Cys 被 Ala 或 Ser 取代后, 消除了产生错配的因素, 故可提高活性。有报道 125 位 Cys 被 Ala 取代后, 活性增高, 但未说明增高多少^[12]。Ser 取代后的活性不变或增高 30%^[5, 6, 13]。我们的结果显示两种新型 IL-2 的活性比较原型有所提高, 与文献报道基本一致。另外, 我们还发现新型 IL-2 的稳定性无论是在 65℃ 加热或 4℃ 保存时均比原型好。这些过去未见报道过。但半胱氨酸的变化引起其它蛋白稳定性变化则有报道, 如人 IFNβ 17 位 Cys 被 Ser 取代后, 其抗病毒活性及在 -70℃ 保存的稳定性大大提高^[14]; 将小鼠 IFNβ 的第 17 位 Cys 用 Ser 取代后, 这种新型 IFNβ 在 65℃ 40min 后, 加入 0.1% SDS 继续保温 5min, 活性可恢复, 原型小鼠 IFNβ 则无此特性^[15]。将 T4 溶菌酶的第 3 位 Ile 改为 Cys, 这个新的 Cys 与 97 位 Cys 形成二硫键, 使 T4 溶菌酶 67℃ 半生存期由 11min 提高到 6h^[16]。所以, 本工作所发现的新型 IL-2 比原型稳定, 我们分析原因可能有二, 一是除去了游离的 Cys, 可以排除分子内及分子间二硫键错配因素; 二是 125Cys 位于 α-螺旋分子内部的疏水面, 将 Cys 换成 Ala, 增强了疏水面的 Vander Waals 力, 故可增强 IL-2 分子的稳定性。

参 考 文 献

- [1] Morgan D A, Rusocetti F F, Gallo R, *et al.* Science, 1976, **193**: 1007~1008.
- [2] Rosenberg S A, Ann Surgery, 1987, **210**: 474.
- [3] Taniguchi T, Matsui H, Fujita T *et al.* Nature, 1988, **302**: 305~310.
- [4] 唐建伟, 杜平, 刘新垣. 中国免疫学杂志, 1990, **9** (1): 1~3.
- [5] Wang A, Lu S D, Mark D F *et al.* Science, 1984, **224**: 1431~1432.
- [6] Kramer W, Drutsa V, Jansen H W *et al.* Nucleic Acids Res., 1984, **12**: 9441.
- [7] Kunkel T A. Proc Natl Acad Sci, 1985, **82**: 488.
- [8] 虞建良, 范佩芳, 郑宏大等, 中国科学, 1995, **25** (10): 1064~1070.
- [9] Feng X S, Zheng X J, Liu X Y *et al.*, Acta Pharmacologia Sinica, 1992, **13** (5): 435~438.
- [10] Mark D F, Doyle M, Koths K *et al.* Recombinant Lymphokines and Their receptor, 1987, 1~31.
- [11] Cohen F E, Kosen P A, Kuntz I D *et al.* Science, 1986, **234**: 349~352.
- [12] Liang S M, Thatcher D R, Liang C M *et al.* J Biol chem, 1986, **261** (1): 334~337.

- [13] Mark D F, Lu S D, Creasey A A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984, **81**: 5662~5666.
[14] Li B L, Schwartz B, Pestka S *et al.* J Interferon Res, 1987, **7**: 756.
[15] Jeanne L, Perry, L J, Wetzed R *et al.* Science, 1984, **226**: 555~557.

Thermostability of Two New Type rIL-2

Tang Jianwei Liu Aiping Yu Jianliang Fan Peifang Liu Xinyuan

(Shanghai institute of biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract Two new types of rIL-2, 125Ser/Ala-IL-2, were made and purified. Both have been scaled up for production. We discovered that heating at 65 °C, the new types of rIL-2 were more stable than native forms, the speed of the activity decrease of the new type IL-2 is slower and the retained activity of them is greater as compared with the wide type one. 0.1% SDS can recover the activity of the denatured rIL-2 with the new type IL-2 getting more activity in shorter time. The stability of the three type rIL-2 were varied differently with heating at 65 °C in 0.1% SDS. The above results showed that the thermostability orders is 125Ala-IL-2 > 125Ser-IL-2 > the native one.

Key words IL-2, point mutation, thermostability of new IL-2