

## 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 包涵体提取、复性和纯化的研究

周永春 陆峰 金永明 贾林 林爱友 陆德如

(第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所 上海 200433)

**摘要** 由基因工程大肠杆菌表达的重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 以包涵体的形式存在于细胞中, 通过破菌、洗涤获得包涵体, 再经过溶解、凝胶过滤、复性、疏水和离子交换柱层析得到了均一的产品, 经高压液相和 SDS-PAGE 电泳测定纯度均大于 98%, rhGM-CSF 的比活为  $3.2 \times 10^7$  IU/mg, 纯化获得的 rhGM-CSF 为一酸性蛋白, 等电点约为 5.2, NH<sub>2</sub>-末端前 20 个氨基酸序列测定结果与文献报道一致。rhGM-CSF 的 NH<sub>2</sub>-末端不均一, 其中带 Met 的分子约占 59.5%, 第一个氨基酸为 Ala 的分子约占 24.6%, 为 Pro 的分子约占 14.6%。纯化过程中蛋白的纯化倍数为 3.9, 生物活性总得率为 69.1%, 工艺重复性好, 易放大。

**关键词** 人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子, 包涵体, 复性, 纯化

人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子是调节造血前体细胞生长和分化的主要细胞因子, 刺激粒细胞-巨噬细胞集落形成单位 (CFU-GM) 向粒细胞集落形成单位 (CFU-M) 的分化增殖, 进而促进中性粒细胞和巨噬细胞的增加, 增强造血功能。1984 年 N. M. Gough 等<sup>[1]</sup>完成了 GM-CSF 基因 cDNA 克隆工作, 是第一个造血因子的基因被分子克隆的。成熟的 GM-CSF 蛋白由 127 个氨基酸组成, 是一个糖基化的蛋白, 主要由抗原和丝裂原激活的 T 淋巴细胞产生。天然的 GM-CSF 和哺乳动物细胞、酵母细胞、大肠杆菌生产的重组 GM-CSF 在体内、体外实验中具有相同的生物学活性, 糖基化对于受体的结合、信号处理和药物代谢并不重要<sup>[2]</sup>。

目前, rhGM-CSF 主要用于治疗骨髓抑制疗法引起的白细胞减少和感染, 临床疗效明确, 国内外许多生物技术公司竞相开发, 但中试纯化工艺报道较少, 早期采用亲和层析<sup>[3]</sup>, 工艺不易放大, 成本较高, 本文报道一种经优化的纯化工艺, 工艺的重现性好, 易于放大。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 实验中所用的缓冲液

**溶液 (A):** 50mmol/L PB (磷酸盐缓冲液), pH8.0, 1mmol/L EDTA, 300mmol/L NaCl。**溶液 (B):** A + 0.2% Triton X-100。**溶液 (C):** 7mol/L Gu·HCl, 50mmol/L

上海市“八五”攻关课题。

本文于 1996 年 5 月 23 日收到。

PB, pH8.0。溶液 (D): 3 mol/L Gu·HCl, 50mmol/L PB, pH8.0, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT。溶液 (E): 50mmol/L PB, pH8.0, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.1mmol/L 氧化型谷胱甘肽。溶液 (F): 50mmol/L PB, 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0。溶液 (G): 20mmol/L PB, pH7.0。溶液 (H): (G) + 2.5% 异丙醇。溶液 (I): 溶液 (G) + 0.5 mol/L NaCl

### 1.2 重组大肠杆菌的培养和包涵体的制备

实验用菌株为大肠杆菌 K<sub>12</sub>JM109 (pET-GMCSF), 由表达质粒 pET-GMCSF 转化而得, 此菌株由本所王易伦课题组构建。300ml 摇瓶 LB 种子培养基接种后振荡培养 10h, 接入 30L 发酵罐中培养, 培养温度为 37℃, pH7.0, 3h 后加入 IPTG 进行诱导培养 5h, 离心收集菌体。180g 菌体加入 2400ml 溶液 (A), 充分搅拌混和, 冰浴超声 30 次, 每次 30s, 停 30s, 连续 30 次。离心获得沉淀, 加溶液 (B) 2400ml 洗涤沉淀, 反复 3 次, 离心后获得包涵体。加入 360ml (C) 溶解包涵体, 高速离心 45min, 获得 rhGM-CSF 粗提液。

### 1.3 凝胶过滤

用 7.5cm×140cm 玻璃柱装 Pharmacia 公司生产的 Sephacryl S-200 (HR) 6000ml, 用溶液 (D) 进行平衡, 将 rhGM-CSF 粗提液上样, 然后以溶液 (D) 进行洗脱, 流速为 6ml/min。

### 1.4 复性方法

将凝胶过滤的样品峰, 用溶液 (E) 进行稀释复性, 方法为: 先稀释 1 倍, 室温放置 15min, 再稀释 1 倍, 混匀, 室温 15min, 最终稀释至 20 倍, 4℃ 过夜。体积约为 10L。

### 1.5 疏水柱层析 (HIC)

用 5.0cm×25cm 玻璃柱装 Phenyl sepharose 6FF (High Sub) 凝胶 520ml, 首先用 3 倍柱体积的去离子水冲洗, 再用 3 倍柱体积的溶液 (F) 平衡, 流速为 18ml/min, 将复性好的样品液加入 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 混匀, 过滤后上样, 结束后先用平衡液 (F) 洗去未吸附的杂质, 然后用溶液 (G) 1800ml 洗脱, 再用 1600ml (H) 洗脱。

### 1.6 离子交换层析 (IEC)

DEAE Sepharose (FF) 柱为 Pharmacia 公司的产品, 柱型 12cm×15cm。将疏水柱活性峰样品以 25ml/min 上样, 上样结束后用 1800ml 溶液 (G) 洗脱, 再用溶液 (I) 2000ml 洗脱, 并收集活性峰。

### 1.7 分析测试方法

1.7.1 rhGM-CSF 生物学活性测定: 用 TF1 依赖细胞株, 根据 MTT 法测定活性, 方法参照文献[4]。

1.7.2 蛋白浓度测定: 用 Lowry 法测定<sup>[5]</sup>, 标准蛋白由卫生部药品生物制品检定所提供。

1.7.3 纯度分析: SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶 4.5%, pH6.8, 分离胶为 14.5%, pH8.8, 电泳结束后用钨银染色或考马斯亮蓝染色。HPLC 纯度分析: 用 C<sub>8</sub> 反相柱和 TSK 3000 凝胶柱分析。

1.7.4 等电聚焦电泳: 标准等电点蛋白为 IEF3-10, 电泳胶为 Phast Gel IEF3~9, 仪器为 Phast System 电泳仪。

1.7.5  $\text{NH}_2$ -末端氨基酸序列分析: Edman 降解法, 用 Beckman LF 3200 蛋白/多肽氨基酸序列测定仪测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 包涵体的提取和溶解

由于 rhGM-CSF 在大肠杆菌中过量表达, 重组蛋白以包涵体形式存在于菌体细胞中, 先用超声破碎细胞, 经过用溶液(B)多次洗涤, 分级离心后, 获得了包涵体, 由 SDS-PAGE 电泳分析, 分离得到的包涵体主要含有 rhGM-CSF, 分子量约在 15 000Da, 洗涤上清中含有许多杂蛋白。

rhGM-CSF 溶解性较差, 用低浓度的胍和尿素溶解效果不好, 我们采用 7mol/L Gu·HCl 溶解, 经充分搅拌离心后, 发现 95% 重组蛋白在胍液中。

### 2.2 凝胶过滤

由于粗提液中仍有许多杂蛋白, 直接进行复性, 杂蛋白干扰重组蛋白的折叠, 形成聚集体从溶液中析出。复性前先进行凝胶过滤层析, 平衡液中含有 DTT 和 EDTA, 防止重组蛋白二硫键氧化形成错配的分子, 凝胶过滤典型的色谱图如图 1 所示, 其中第(2)峰为重组蛋白峰。

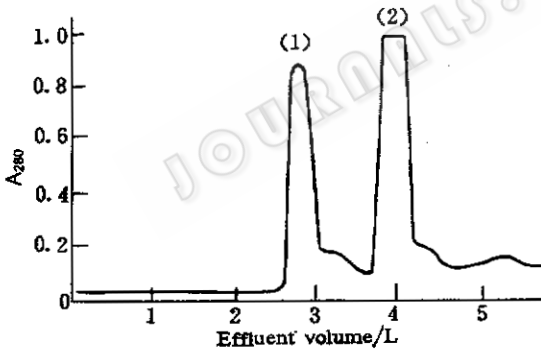


图 1 凝胶过滤典型图谱

Fig.1 Gel filtration chromatography

凝胶过滤后, 样品纯度进一步提高, 从图 3 电泳结果看, 重组蛋白的纯度达到 90% 左右, 有利于下一步的复性。

### 2.3 复性

自从重组 DNA 技术用于表达真核蛋白, 许多研究者对大肠杆菌表达的重组蛋白从包涵体的变性状态折叠成天然构型的条件进行了多方面的研究<sup>[6]</sup>, 其关键技术是二硫键如何正确配对, 进而获得有活性的蛋白质。常用空气氧化法或各种氧化还原系统来获得 Cys-Cys 的键合。

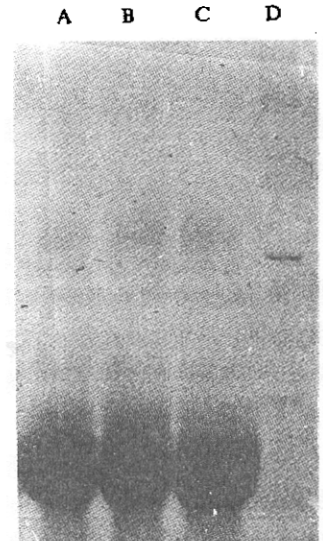


图 2 三批凝胶过滤后样品的 SDS-PAGE 电泳

Fig.2 SDS-PAGE pattern of samples after gel filtration

A: 950601 B: 950602  
C: 950603 D: Protein molecular marker

rhGM-CSF 分子中有 2 对二硫键, 其生物活性依赖于 2 对二硫键的正确配对, 我们对 rhGM-CSF 复性方式与条件进行了系统研究, 结果列于表 1。从表中可看出逐步稀释复性, 采用氧化型和还原型谷胱甘肽系统能获得较佳的复性得率。

表 1 复性条件对 rhGM-CSF 复性效果的影响

Table 1 Effects of various conditions on the renaturation of rhGM-CSF

Renaturation	Protein concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	GSH/GSSG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	PEG(4000)/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Triton X-100/%	* Yield of activity/%
Dialysis	160	-	-	0.2	26
	160	1/0.1	-	0.2	38
Direct dilution	160	-	-	0.2	18
	80	-	-	-	24
	80	1/0.1	80	0.2	62
Step dilution	160	2/0.2	-	0.2	43
	120	2/0.2	-	0.2	51
	80	-	80	0.2	54
	80	1/0.1	80	0.2	89

\* Based upon ELISA activity.

#### 2.4 疏水柱层析

约 10L 复性好的样品经过 Phenyl sepharose 疏水柱层析, 其典型的色谱图如图 4 所示。其中峰(A)为非活性峰, 主要是核酸、胍和表面活性剂等杂质, 峰(B)和(C)均为 rhGM-CSF 样品峰, 体积约为 1800ml。

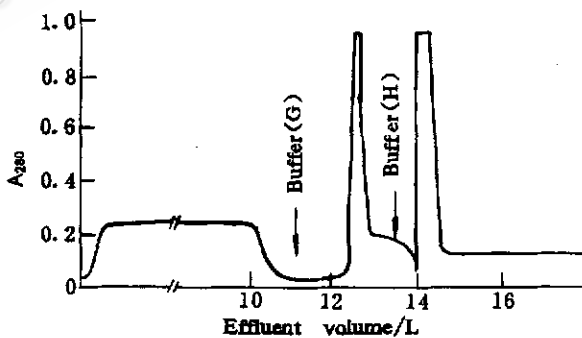


图 3 疏水层析典型图谱

Fig. 3 Hydrophobic interaction chromatography(HIC)

#### 2.5 离子交换层析

由疏水层析获得的样品上样于 DEAE Sepharose 阴离子柱中, 其色谱图如图 5 所示。峰(1)为杂质峰, 峰(2)为样品峰。IE 样品经 G25 柱脱盐后得到 rhGM-CSF 的半成品。

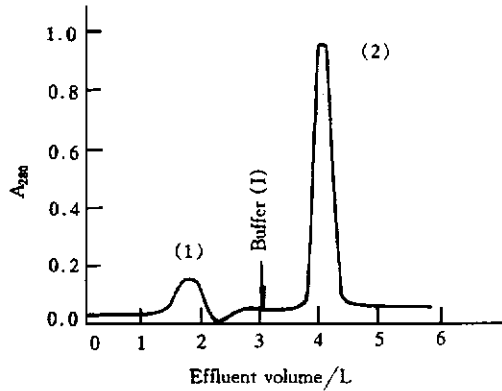


图 4 离子交换层析典型图谱

Fig.4 Ion-exchange chromatography

表 2 rhGM-CSF 纯化过程中每一步骤的结果

Table 2 Result of each step used for rhGM - CSF purification from the inclusion bodies

	Step				
	Solubilization of IBs*	Sephacryl S-200	Dilution renaturation	Phenyl-sepharose	DEAE-sepharose
Total protein/mg	1593.4	865.7	742.6	482.5	357.3
Total biological activity/IU		$1.65 \times 10^{10}$	$1.56 \times 10^{10}$	$1.35 \times 10^{10}$	$1.14 \times 10^{10}$
Specific activity /IU·mg <sup>-1</sup>		$1.90 \times 10^7$	$2.1 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$
Purification factor(-fold)		2.29	2.50	3.4	3.9
Recovery/%		100	94.5	81.8	69.1

\* IBs: Inclusion bodies.

## 2.6 样品的纯度与理化性质的分析

用 SDS-PAGE 电泳银染色方法, 分别对三批连续中试纯化的样品进行了分析, 在还原样品图谱上, rhGM-CSF 呈现单一带, 分子量为 14.8kDa, 在非还原电泳上, 在 14.8kDa 出现主带, 在 29kDa 处出现很浅的二聚体带, 由黑度扫描所占比例 < 2%。

纯化的样品经分析型 HPLC 测试, 柱型为 C<sub>8</sub> 反相柱和 TSK3000 凝胶柱, 三批样品的纯度均大于 98% (中国药品生物制品检定所测定)。

等电聚焦电泳结果 (图 6) 表明, 三批连续中试的样品均显示一条带, 等电点约为 pH5.2, 表明纯化的 rhGM-CSF 表面电荷是均一的, 为一酸性蛋白。

rhGM-CSF 半成品用 Edman 降解法测定 NH<sub>2</sub>-末端前 20 个氨基酸, 结果如下所示。三批中试样品结果相似, NH<sub>2</sub> 末端与理论值一致<sup>[7]</sup>, 大肠杆菌作为宿主菌表达真核蛋白, NH<sub>2</sub>-末端会产生三种形式: (1) 带甲酰基甲酰氨基酸残基; (2) 甲酰氨基酸残基; (3) 成熟的蛋白分子。终产物中 3 种分子的比例取决于细胞体内去甲酰基酸和甲硫氨酶多肽酶的活

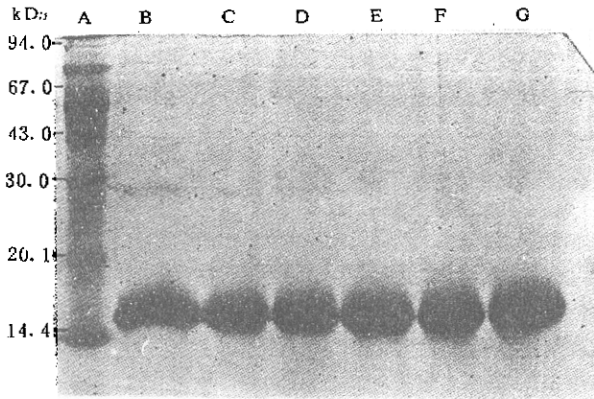


图 5 三批纯化样品的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDSA-PAGE analyses of three-batch purified samples  
 A. Protein molecular marker, B. C. D are native samples  
 E. F. G are non-native samples, B, E. 950601, C,  
 F. 950602, D, G. 950701

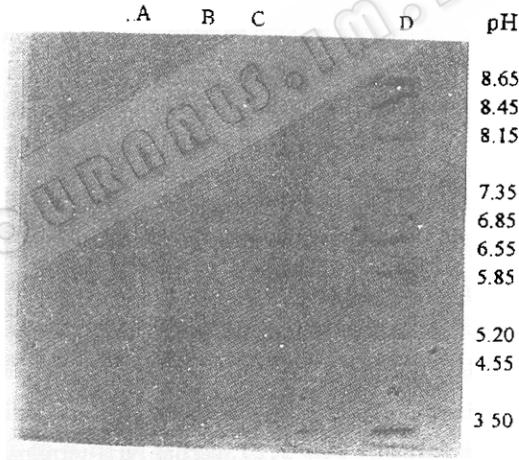


图 6 三批纯化样品的等电聚焦电泳分析

Fig. 6 Isoelectric focusing analyses of three-batch purified samples  
 A. 950601, B. 950602, C. 950701,  
 D. marker

性<sup>[8]</sup>。由于 rhGM-CSF 在水溶液中不稳定,出现了 Pro 为末端的肽分子。我们发现 rhGM-CSF 水溶液贮存时间越长, NH<sub>2</sub>-末端降解得越多。

N 端氨基酸序列分析结果为:

Met Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp  
Glu His Val Asn Ala Ile 样品 N 端不均一, 其中 Met 占  
59.5%, Ala 占 24.6%, Pro 占 14.6%

### 参 考 文 献

- [1] Gough N M, Gough J, Metcalf D *et al.* Nature, 1984, **309**(28): 763.  
[2] Buvges A W, Begley C G, Johnson G R *et al.* Blood, 1987, **69**: 43.  
[3] Moonen P, Mennod J J, Ernst J F *et al.* Proc Natl Acad Sci. USA; 1987, **84**: 4428~4437.  
[4] 凌明圣、邹民吉、徐明歧等. 生物技术通讯, 1994, **5**(4): 163.  
[5] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* J Biol chem, 1951, **193**: 265.  
[6] Fischer B, Sumner I, Goodenough P. Biotechnol Bioeng, 1993, **41**: 3.  
[7] Belew M, Zhou Y, Wang S *et al.* J of Chromatography A, 1994, **679**: 67~83.  
[8] Sandman K, Grayling R A, Reeve J N. Bio/Technology, 1995, **13**: 504.

## Extraction of Inclusion Bodies, Renaturation and Purification of Recombinant Human Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor(rhGM-CSF)

Zhou Yongchun Lu Feng Jin Yongming Jia Lin Lin Aiyou Lu Deru

(Institute of Medical Biotechnology and molecular Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**Abstract** Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF), produced as inclusion bodies in genetically engineered *E. coli* cells was purified to homogeneity by extraction and solubilization of inclusion bodies, gel filtration, renaturation, hydrophobic interaction and ion-exchange chromatographic procedure. The purified rhGM-CSF has been obtained the criteria of purity level above 98% examined by SDS-PAGE and HPLC, has a specific activity of about  $3.2 \times 10^7$  u/mg. rhGM-CSF is an acidic protein (PI = 5.2), partial NH<sub>2</sub>-terminal sequence (up to twenty residues) are identical with those reported for this protein. The results also showed that it is apparently heterogeneous from its NH<sub>2</sub>-terminal side as it is composed of three polypeptides in which the intact Met analogue accounts for 59.5%, Ala analogue accounts for 25%, Pro analogue accounts for 14.6%. The overall purification factor obtained was about 3.9, the recovery of purified rhGM-CSF was 69.1% by a biological assay method. The adopted purification procedure is reproducible and well suited for process scale operations.

**Key words** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, inclusion body, renaturation, purification