

人肿瘤坏死因子及其突变体的基因 工程下游工艺研究

徐 皓 高长寿 刘 惠 邓 芳 潘 华 陈常庆

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 研究了重组人肿瘤坏死因子(rhTNF α)及其突变体[Lys²]-人肿瘤坏死因子[Lys²]-rhTNF α)的基因工程下游工艺。rhTNF α 和[Lys²]-rhTNF α 的温控表达工程菌株在 B. Braun E 10 型 15L 自控罐中经发酵每升可得 50g 湿菌体。rhTNF α 和[Lys²]-rhTNF α 的表达水平仍能保持在 50% 以上,且表达产物为可溶性蛋白。所得菌体经超声破菌、硫酸铵沉淀,然后依次用 DEAE-Sephacryl FF、CM-Sephacryl FF 和 Sephacryl S-200 柱层析进行分离纯化,由每升发酵液菌体最终可得 1g 左右的纯品,纯度达到 98% 左右,rhTNF α 的比活为 $\sim 1.5 \times 10^8$ IU/mg, [Lys²]-rhTNF α 的比活为 $\sim 6 \times 10^8$ IU/mg。

关键词 人肿瘤坏死因子,突变型人肿瘤坏死因子,下游工艺,rhTNF α , [Lys²]-rhTNF α
学科分类号 Q789

人肿瘤坏死因子(简称 hTNF α)是 1975 年由 Carswell 等人发现的^[1],它的最显著特征是能选择性地杀伤或抑制肿瘤细胞。临床试验的结果也表明人肿瘤坏死因子确实有抗肿瘤效果,但毒副作用较大。为此,国内外多家实验室先后开展了对 hTNF α 的蛋白质改造工作,并获得了上百种在不同位点改造的 hTNF α 突变体^[2-6],有的突变体已在准备进行临床试验。但用基因工程方法生产人肿瘤坏死因子和其突变体的最终得率一般较低,而且较为详细的大量生产的下游工艺研究也很少见诸文献报道。我们在前文^[7]曾经报道了 rhTNF α 及其突变体[Lys²]-rhTNF α 在大肠杆菌中高效表达的结果,其表达水平平均可达菌体总蛋白的 60% 以上,为了能进一步开展对于[Lys²]-rhTNF α 的临床研究,在此基础上,我们又对 rhTNF α 和[Lys²]-rhTNF α 进行了基因工程下游工艺研究,使得两者的最后得率为每升发酵液可以获得 1g 左右的纯品,纯度达到 98% 左右。

1 材料和方法

1.1 化学试剂和材料

硫酸铵、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、SDS 和 Tris 等均为国产分析纯试剂。丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺为 BioRad 产品。乙腈为 Merk 产品。DEAE-Sephacryl FF、CM-Sephacryl FF 和 Sephacryl S-200 为 Pharmacia 公司产品。抗 hTNF α 单抗由第四军医大学免疫教研室金伯泉教授赠送;辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 二抗为 Amersham 公司产品。

收稿日期:1997-05-13,修回日期:1997-11-05。

1.2 工程菌株

质粒的转化操作按文献[8],将含有 rhTNF α 基因的表达载体 pSB-TR 和含有 [Lys²]-rhTNF α 基因的表达载体 pSB-TK 分别转化大肠杆菌 YK537,得到以 P_L 为启动子的温控表达工程菌株 YK537/pSB-TR 和 YK537/pSB-TK。

1.3 工程菌的发酵

工程菌的发酵是在 B. Braun E10 型 15L 自控罐中进行。首先将冻存于 -70℃ 的甘油菌种接种入装有 LB 培养基(蛋白胨 10g/L, 酵母粉 5g, NaCl 5g)的试管中 30℃ 培养活化,然后再转入 LB 试管中 30℃ 培养至对数生长期,这时转入装有种子培养基(蛋白胨 27g/L, 酵母粉 13g, 甘油 7g, 微量元素 1ml)的摇瓶中,30℃ 培养为二级种子以备上罐。发酵培养基中包括(g/L): Na₂HPO₄·12H₂O 10.5, KH₂PO₄ 6, K₂HPO₄ 6, (NH₄)₂SO₄ 1.8, NH₄Cl 0.3, 酵母粉 2.25, 蛋白胨 4.5, MgSO₄·7H₂O 5, 以及甘油 1.2ml/L, 微量元素 1ml/L。种子上罐后在 30℃ 培养 5h。培养过程中,通过补加氨水控制 pH 在 7.0,并通过控制搅拌速度和增加补料(每升含酵母粉 100g, 蛋白胨 200g, 甘油 500g)维持溶氧量不低于 50%。然后提高温度至 42℃ 以诱导工程菌 YK537/pSB-TR 和 YK537/pSB-TK 分别表达产生 rhTNF α 和 [Lys²]-rhTNF α , 诱导表达时间 4h。离心收集菌体。

1.4 菌体的破碎

我们用 PBS 将由 1L 发酵液所得的菌体制成 10% 浓度的悬浊液,并用 Sonics & Materials 超声仪(1500W)间断超声 20 次(每次 90s)以破碎菌体。然后 15 000r/min 离心,在上清液中加入硫酸铵到 40% 饱和度,离心后留取上清并继续加入硫酸铵至 65% 饱和度。再次离心后,以 20mmol/L Tris 缓冲液(pH>8.0)溶解沉淀并透析一次,离心收集上清液进行柱层析分离。

1.5 rhTNF α 和 [Lys²]-rhTNF α 的柱层析分离

将透析后的表达产物上清液稀释后上 DEAE-Sepharose FF 柱(ϕ 2×25cm),用 0~0.5mol/L NaCl 线性梯度洗脱,分别从 242mmol/L 和 195mmol/L NaCl 浓度开始收集 rhTNF α 和 [Lys²]-rhTNF α 的主峰。用 60% 饱和度硫酸铵沉淀,离心的沉淀用 20mmol/L 磷酸缓冲液(pH<6.0)溶解,透析一次后,稀释上 CM-Sepharose FF(ϕ 2×25cm)柱。用 0~0.5mol/L NaCl 线性梯度洗脱,分别从 332mmol/L 和 285mmol/L NaCl 浓度开始收集 rhTNF α 和 [Lys²]-rhTNF α 的主峰。再次用 60% 饱和度硫酸铵浓缩,离心沉淀用 PBS (pH7.2)溶解,透析除盐后,上 Sephacryl S-200(ϕ 10×100cm)柱。收集主峰,即可得到最后的产物纯品。

1.6 鉴定方法

蛋白定量采用 Lowry 法^[9],标准蛋白由北京药检所提供。SDS-PAGE 采用 Laemmli 方法^[8],分离胶浓度为 15%,考马斯亮蓝染色。等电点分析采用 Bio-Rad 公司的微型聚丙烯酰胺等电聚焦(mini IEF)分析系统,测定范围在 pI4.6~9.6。Western blot 按照《分子克隆实验室指南》中的方法,采用辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠二抗,以二氨基联苯胺为底物显色^[8]。HPLC 分析采用 Waters 公司 Waters 510 分析型 HPLC 系统,采用 C-8 反相柱,乙腈-1% TFA 水溶液梯度洗脱,280nm 检测,N 端氨基酸序列分析由中科院上海生化所夏其昌教授实验室代为测定。质谱分析则委托中科院上海有机化学研究所生命有机

家实验室质谱组代为测定。活性测定采用 L_{929} 细胞测活法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 YK537/pSB-TR 和 YK537/pSB-TK 工程菌的发酵

在发酵工艺中,我们用产酸量较少的甘油代替葡萄糖,并采用控制添加补料的步骤,使菌体生长达 25 OD 左右的中密度,每升发酵液可得湿菌体 50g 左右,两者的表达量仍能保持在 50% 以上(图 2),经蛋白定量和 SDS-PAGE 后的灰度扫描分析结果计算,每升发酵液中含有 2.5g 左右的 rhTNF α 或 [Lys²]-rhTNF α ,结果见表 1。

表 1 YK537/pSB-TR 和 YK537/pSB-TK 工程菌发酵数据

Table 1 Fermentation of the recombinant strain YK537/pSB-TR and YK537/pSB-TK

Strains	pH	Fermentation /h	Induction /h	OD _{600nm}	Wet weight /g	Expression level	Recombinant protein/g
YK537/pSB-TR	7.0	9	4	23.57	452.7	>50%	~21.5
YK537/pSB-TK	7.0	9	4	25.55	512.3	>50%	~25.0

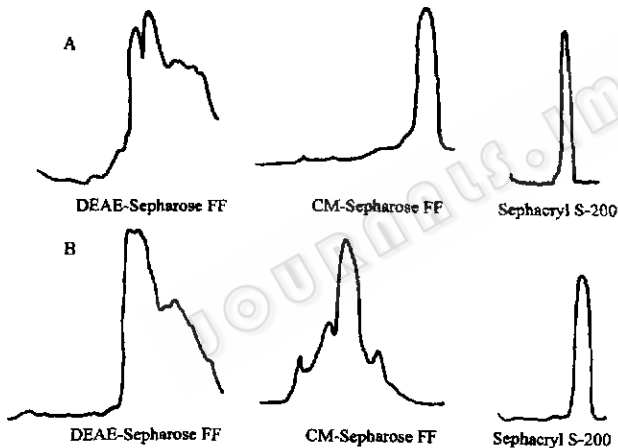


图 1 rhTNF α 和 [Lys²]-rhTNF α 纯化过程中的三次柱层析图谱

Fig.1 Chromatography maps during the purification process of rhTNF α and [Lys²]-rhTNF α

A. Purification of rhTNF α , B. Purification of [Lys²]-rhTNF α

2.2 表达产物的分离纯化

由于 YK537/pSB-TR 和 YK537/pSB-TK 工程菌表达的产物均为可溶性蛋白,不仅表达水平很高,而且其等电点在 6.5 左右,由于在中试规模中的破菌量仅在克级范围,因而我们选用了大功率间断超声破菌,然后对超声破菌后离心所得含有表达产物的上清液采用了硫酸铵分级沉淀和柱层析相结合的方法,即将上清液先用 40%~65% 饱和度的硫酸铵进行分级沉淀,再依次上 DEAE-Sepharose FF 和 CM-Sepharose FF 阴、阳离子柱分离,最后通过 Sephacryl S-200 柱层析纯化。两种产物的 3 次柱层析的图谱分别见图 1A 和 B。

在此过程中采用了 3 次硫酸铵沉淀的步骤。第一次的分级沉淀虽然对产物带来一定的溶解损失,但它能除去部分酸性杂蛋白和大量核酸类物质以及其它的非蛋白类杂质,从而减少了在 DEAE-Sepharose FF 柱层析分离时的负荷量,缩小了柱体积。DEAE-Sepharose FF 柱后的硫酸铵沉淀则不仅可以起到体积浓缩和除去大量氯化钠的作用,而且还可以避免当分离 pH 由碱性转向

酸性时因为通过产物等电点而产生的沉淀。同时,由于硫酸铵盐析的沉淀可经稀释降低其内部的盐浓度后直接上样于离子交换柱,或经 1 次透析后再适当稀释而上样,因而硫酸铵沉淀的步骤耗时并不长。在 CM-Sephacryl FF 柱层析后的硫酸铵沉淀和透析主要起对产品洗脱液的浓缩去盐作用,保证了最后上 Sephacryl S-200 分子筛柱必需的小体积要求。此外,由于我们选用的树脂为 FF 型的,因此可以采用较高的洗脱流速而不至影响柱效。这样就大大加快了纯化速度。

在柱层析纯化方面,我们曾经尝试过将破菌上清液经 40%~65% 饱和度分级沉淀后直接上 CM-Sephacryl FF 柱的方案。同 DEAE-Sephacryl FF 柱相比,前者的分离峰形较好,但有大量产物不被吸附而导致产品的流穿损失,而且洗脱下来的产物电泳仍含有相当多的杂质,因而最后确立了上述先经过阴离子柱再经过阳离子柱的纯化步骤。Sephacryl S-200 柱层析不仅可以进一步提高产品的纯度,而且有助于去除热源并把产品完全转换到临床针剂需要的 PBS 溶液系统。图 2 给出了 $[Lys^2]$ -rhTNF α 在各步纯化过程中的纯度鉴定结果。

通过这一制备方法,从 1L 发酵液起始,一次分离纯化即可获得 1g 左右具有抗肿瘤活性的纯 rhTNF α 或 $[Lys^2]$ -rhTNF α 。蛋白回收率为 20% 左右,活性回收率在 35% 左右。结果见表 2。

2.3 纯品的鉴定

纯化的 rhTNF α 或 $[Lys^2]$ -rhTNF α 经 SDS-PAGE 和 HPLC 鉴定,其纯度达到 98% 左右(见图 2, 3), rhTNF α 的比活 $\sim 1.5 \times 10^8$ IU/mg, $[Lys^2]$ -rhTNF α 的比活 $\sim 6 \times 10^8$ IU/mg。两者的等电点均在 6.5 左右,其为单一条带。质谱分析所得的分子量: rhTNF α 为 17331 ± 2 Da(理论计算值为 17353 Da), $[Lys^2]$ -rhTNF α 为 17325 ± 5 Da(理论计算值为 17325 Da)。同时 $[Lys^2]$ -rhTNF α 的 N 端 15 肽氨基酸序列还经过化学测序得到证明。

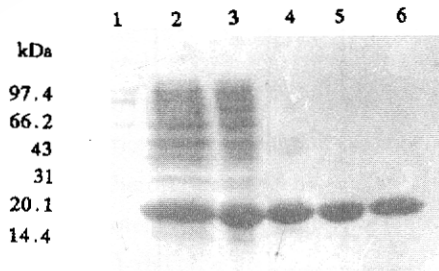


图 2 $[Lys^2]$ -rhTNF α 在各步纯化过程中的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of $[Lys^2]$ -rhTNF α during the purification process

1. Molecular weight marker of protein, 2. Supernatant after sonication
3. Supernatant of the dialysed solution after salting-out,
4. Active peak of $[Lys^2]$ -rhTNF α purified by DEAE-Sephacryl FF ion-exchange chromatography,
5. Active peak of $[Lys^2]$ -rhTNF α purified by CM-Sephacryl FF cation-exchange chromatography,
6. Active peak of $[Lys^2]$ -rhTNF α purified by Sephacryl S-200 seive

表 2 rhTNF α 和 [Lys²]-rhTNF α 的纯化结果
Table 2 Purification results of rhTNF α and [Lys²]-rhTNF α

	rhTNF α		[Lys ²]-rhTNF α	
	After purification*	Before purification*	After purification*	Before purification*
Total protein/g	4593.0	895.6	4911.0	1010.5
Protein yield/%		19.5		20.57
Specific activity/IU·mg ⁻¹	9.116×10 ⁷	1.515×10 ⁸	3.46×10 ⁸	5.98×10 ⁸
Degree of purification		1.66		1.73
Activity yield/%		32.4		35.56

* Before purification means the supernatant of the sonication mixture, after purification means the final product after Sephacryl S200.

** All the data in this table are based on 1L broth.

2.4 结论

本文提出的由 1L 基因工程菌发酵液制备克级量 rhTNF α 或 [Lys²]-rhTNF α 的方法, 具有每升发酵液产物收率高, 只需较小的设备容量和操作空间, 试剂耗资少, 而且操作简单等优点, 完成一次制备过程仅需 6 d, 因而是一个成本低而易于推广的简单高效的好方法。它也完全适用于某些其它突变型 rhTNF α 的大量制备或作为参考。

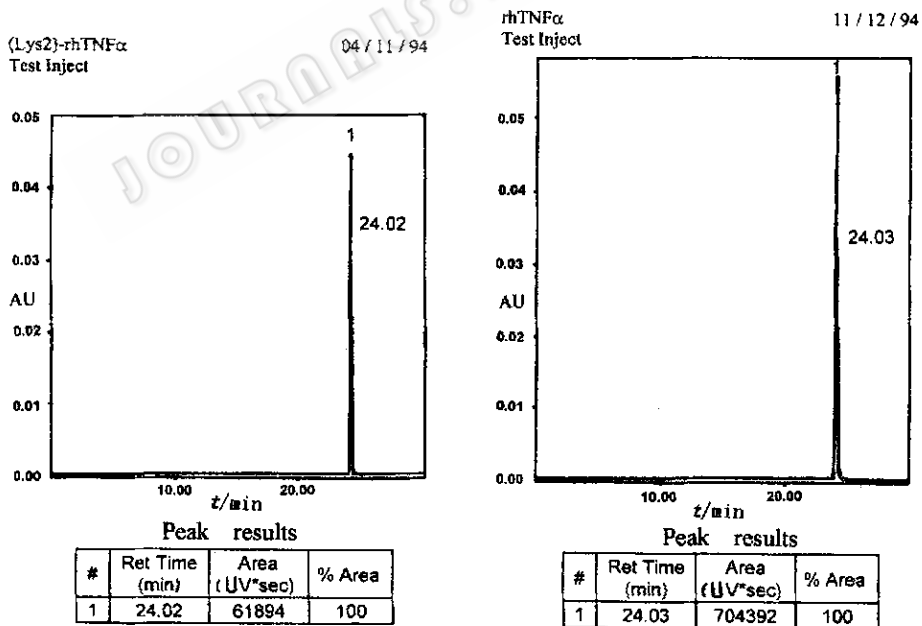


图 3 rhTNF α 及 [Lys²]-rhTNF α 纯品的 HPLC 鉴定图谱

Fig. 3 HPLC map of the pure rhTNF α and [Lys²]-rhTNF α product

致 谢 上海第一生化药业公司的汪兰英工程师参加了本研究的生物活性测定工作,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Carswell E A, Old L J, Kassel R L, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72: 3666~3670
- 2 Lin L S. Tumor necrosis factors: The molecules and their emerging role in medicine, edited by Bruce Beutler, Raven Press, Ltd, New York, 1992
- 3 Van O X, Tavernier J, Fiers W. Protein Engineering, 1994, 7: 5~22
- 4 Yamagishi J, Kawashima H, Maisuo N, *et al.* Protein Engineering, 1990, 3: 713~719
- 5 何晓龙, 常金丽, 蔡武成等. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27: 67~73
- 6 张德震, 智 刚, 陈南春等. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24: 289~295
- 7 高长寿, 毛申蓝, 俞 婴等. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28: 49~55
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 9 Holme D J, Peck H. Analytical Biochemistry, Longman Group Limited, London, UK, 1983. 394~395

Down-stream Technique Study of Human Tumor Necrosis Factor Alpha and its Mutant

Xu Hao Gao Changshou Liu Hui Deng Fang Pan Hua Chen Changqing
(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract The study of down stream techniques for recombinant human necrosis factor alpha (rhTNF α) and its mutant(Lys²)-rhTNF α led to the results of approximately 50g wet recombinant *E. coli* per liter with high expression level(> 50%) harvested from auto-controlled fed-batch culture in 15L fermentor (B. Braun). The rhTNF α and (Lys²)-rhTNF α expressed are totally soluble. Followed by the process of ultrasonication, ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography(DEAE-Sepharose FF, CM-Sepharose FF) and molecular sieve(Sephacryl S-200), a yield of approximately 1g pure recombinant protein from 1L broth is obtained. The purity is up to 98%. The specific activity of rhTNF α and (Lys²)-rhTNF α are $\sim 1.5 \times 10^8$ IU/mg and $\sim 6 \times 10^8$ IU/mg respectively.

Key words Human necrosis factor alpha, human necrosis factor alpha mutant, down-stream technique, rhTNF α , (Lys²)-rhTNF α