

# 人 $\gamma$ -干扰素生产工艺的研究

王晓沁 闫玉清 赵滨强 李会成

(哈尔滨市医药工业研究所 哈尔滨 150020)

石福欣

(中国医科大学 沈阳 110001)

**摘 要** 采用高密度发酵法发酵重组人  $\gamma$ -干扰素产生菌 SW-INF/DH5 $\alpha$  并成功地获得高表达、高产量的菌体,表达的  $\gamma$ -干扰素蛋白占菌体总蛋白的 60% 以上,20L 发酵液可收获 2kg (湿重)菌体。纯化过程中采用尿素抽提、稀释、复性、浓缩后通过 Sephacryl S-200 柱的纯化方法,简化了纯化步骤,缩短周期,提高了蛋白回收率。纯化中未采用单抗亲和层析技术,使产品更为安全可靠。最终产品经 SDS-PAGE 检测纯度达 100%,核酸含量和热原均合格,  $A_{280}/A_{260} > 1.5$ ,比活性达  $1 \times 10^7$  IU/mg,总回收率达 40%。这说明整个工艺适宜大规模生产的需要,具有实际应用价值。

**关键词** 重组人  $\gamma$ -干扰素,发酵工艺,纯化工艺

学科分类号 Q920.1

人  $\gamma$ -干扰素作为人体免疫调节剂对细胞癌、结肠癌及病毒感染类风湿关节炎、慢性肉芽肿瘤等均有良好的疗效,有着较为广阔的市场前景。由于天然  $\gamma$ -干扰素产量低、不易大量制备,限制了它的研究和临床应用。随着  $\gamma$ -干扰素基因的克隆和表达首先由美国 Genetech 公司的 Gray<sup>[1]</sup> 等于 1982 年完成。 $\gamma$ -干扰素的大批量生产并临床应用日益引起人们的重视,从国内外已发表的论文透露的工艺来看<sup>[2-9]</sup>,主要表现在基因工程菌的发酵水平低,大规模生产比较困难;纯化过程中多采用单克隆抗体亲和层析技术,不但使生产成本大大增加,且有异源蛋白污染的危险。有的工艺中还使用 SDS 作为保护剂保持蛋白结构和活性的稳定,这也就大大增加了产品对人身体的危害性。

本文研究了人  $\gamma$ -干扰素基因工程菌的发酵、包涵体抽提及恢复天然结构等纯化工序, $\gamma$ -干扰素的生产过程更为简便、高效。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

SW-INF $\gamma$ /DH5 $\alpha$ , 由本所生物技术室提供。质粒用 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 启动子,含氨基青霉素抗性基因。

### 1.2 试剂

蛋白胨、酵母抽提粉系英国 Oxoid 或日本大五荣养公司产品, Sephacryl S-200 系

收稿日期:1996-10-03,修回日期:1997-09-09。

Pharmacia 公司产品。葡萄糖、磷酸盐、尿素、硫酸镁、氯化钠、氯化钙、氯化铵皆系国内生产。

### 1.3 蛋白凝胶电泳

按文献[10]报道的方法进行。

### 1.4 蛋白浓度测定

以牛血清白蛋白为标准,按 Lowry<sup>[11]</sup>介绍的方法进行。

### 1.5 HPLC 实验条件

用 Shimadzu SPD-6AV, RP-C-8X 型柱, 0.46cm × 25cm。流动相为 30% CH<sub>3</sub>CN-0.1% Trifloro acetic acid。流速为 0.5ml/min。

### 1.6 人 $\gamma$ -干扰素效价测定

用连续稀释法以水泡性口膜炎病毒(VSV)抑制细胞感染病变测定,按文献[12]进行。

### 1.7 热原质测定

按“1986年11月全国生物制品热原质实验修订规程”进行。取体重 1.7~2.5kg 家兔 3 只,每只静脉注射剂量按人每 kg 体重临床最大使用量的 3 倍,要求无一只升温超过 0.8℃,3 只总和不超过 1.8℃。

### 1.8 残余核酸的检测

测定试样在 280nm 和 260nm 波长处吸收峰的吸收度比值,初步判断试样中是否含有核酸。纯蛋白的  $A_{280}/A_{260}$  约为 1.75,比值大于 1.5 的样品视为合格。

### 1.9 尿素溶液的纯化

按文献[13]方法进行。

### 1.10 发酵

**1.10.1 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 三角瓶中, 120℃ 灭 20min, 冷却后每瓶加氨苄青霉素 50 $\mu$ g/ml, 接种低温保存的人  $\gamma$ -干扰素基因工程菌甘油管, 在 30℃ 摇床培养 10h, 作为发酵罐种子。

**1.10.2 发酵罐及发酵培养液组成:** 发酵罐 40L, NBS Mobile Pilot Plant 型。培养液 20L: 含(g) 蛋白胨 200, 酵母抽提粉 100, NH<sub>4</sub>Cl 2, NaCl 10, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120, CaCl<sub>2</sub> 0.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60, MgSO<sub>4</sub> 2 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 80g 溶液, 氨苄青霉素 1g, 接种种子培养液 1000ml 进行发酵。

**1.10.3 发酵条件:** pH7.0, 搅拌转速 600r/min; 温度 30℃/42℃; 通气量 40L/min; 溶氧控制高于 60%。

## 2 结果和讨论

### 2.1 发酵及细胞破碎

用 40L NBS 发酵罐盛 20L 发酵液, 按材料与方法所述条件于 30℃ 发酵 5h, 然后升温至 42℃ 再发酵 3h, 进行诱导表达。发酵结束后 1000r/min 离心除去上清液, 称菌体湿重(由于菌浓度高, 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。

发酵完毕后冷却至 10℃ 以下, 4000r/min 离心(Heraeus 离心机)20min 除去上清液,

共得菌体约 2kg。42℃ 诱导不同时间后人  $\gamma$ -干扰素的表达量经激光扫描检测,结果如表 1,表明诱导后 42℃ 培养了 3~4h 即可达到最高表达量。

### 2.2 菌体的破碎和包涵体的提取

取 50g 湿重细胞悬浮于 500ml PBS 缓冲液中,于冰浴条件下进行超声破碎,超声破碎仪为 Sonics&Materials 产品,反复进行 5 次,每次 30s。4000r/min 离心 30min。0.1% TritonX-100 的溶液充分搅拌混匀,10000r/min 离心 20min,共洗 3 次。最后沉淀(包涵体)悬浮于 500ml PBS 中,电泳可知包涵体的纯度均在 90% 以上。菌体破碎液和包涵体洗涤后 SDS - PAGE 情况如图 2 所示。

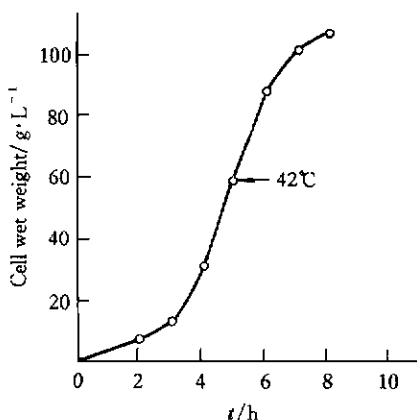


图 1 人  $\gamma$ -干扰素基因工程菌的发酵  
Fig.1 Fermentation process of *E. coli* harboring PRPL promoter- $\text{INF}\gamma$  plasmid

表 1 诱导时间对于干扰素表达水平的影响

Table 1 Effect of the thermo-induction time on expression level of  $\text{INF}\gamma$

Induction time/h	Expression level of $\text{INF}\gamma$ total cell protein/%
1	25
2	40
3	60
4	60

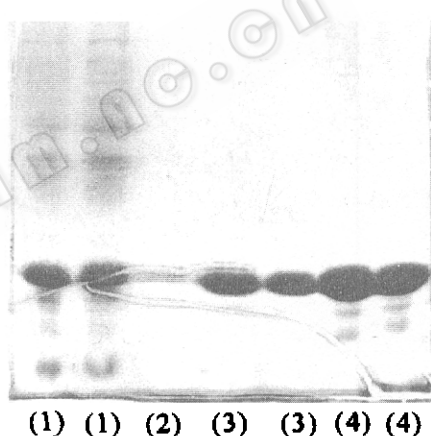


图 2 菌体破碎液及洗涤后包涵体的 SDS-10% PAGE

Fig.2 Electrophoretogram of cell component and inclusion body of  $\text{INF}\gamma$ (SDS - 10% PAGE)

- (1) Supernatant of the broken cell,
- (2) Control of  $\text{INF}\gamma$ ,
- (3) Sample of  $\text{INF}\gamma$ , (4) Washed inclusion body

### 2.3 包涵体的抽提复性和纯化回收

取部分洗好的包涵体用 50ml 8mol/L 尿素溶液, 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH8.0, 2mmol/L EDTA, 10 mmol/L DTT 室温搅拌抽提 2h, 用 Heraeus 离心机 15000r/min 离心 30min。取上清液用同样的缓冲液(不含 DTT)稀释 100 倍,使尿素浓度 < 0.1mol/L, 4℃ 搅拌 24h。稀释液用截留分子量 10000 的中空纤维超滤器浓缩约 100 倍,浓缩液经

透析后离心 15 000r/min 除去不溶物。上清经过 Sephacryl s-200 柱层析分离,层析柱 2cm  $\times$  100cm,平衡及洗脱均用 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0),收集的主峰即为  $\gamma$ -干扰素活性峰,SDS-PAGE 检测表明其纯度可达 100%,DNA 及热原质含量均合格。纯化过程的蛋白质回收率约为 40%。生产流程可大概分为如下几步:发酵 $\rightarrow$ 离心、收集菌体 $\rightarrow$ 细胞破碎 $\rightarrow$ 包涵体的洗涤和抽提 $\rightarrow$ 复性 $\rightarrow$ 超滤 $\rightarrow$ 层析 $\rightarrow$ 产品。其中每步的收率,纯度,比

活性等列于表 2。

表 2 来自重组菌株 SW-INF $\gamma$ /DH5 $\alpha$  的 INF $\gamma$  的纯化

Table 2 Purification of INF $\gamma$  from SW-INF $\gamma$ /DH5 $\alpha$

Purification	Total activity/ $\times 10^6$ IU	Specific activity/ $\times 10^7$ IU $\cdot$ mg $^{-1}$	SDS-PAGE/ %	Recovery/ %	A <sub>280</sub> /A <sub>260</sub>
Washing IBs	—	—	87	>90	—
Refolding	9.25	0.95	91.5	61	1.46
Ultrafiltration	7.37	0.92	92	54.2	1.44
Sephacryl s-200	5.64	1.02	100	41.3	1.63

表 2 是 3 批产品平均检测结果。产品的 HPLC 分析见图 3, 每批产品的蛋白浓度、比活性、核酸含量、热原等质量检测结果列于表 3。图 3 及表 3 的结果说明此工艺所得 INF $\gamma$  基本符合标准。第 1 批产品的 A<sub>280</sub>/A<sub>260</sub> 为 1.57, 低于其它两批的结果, 可能是由于产品中核酸含量较高, 对 260nm 处的紫外吸收值有较大影响之故。

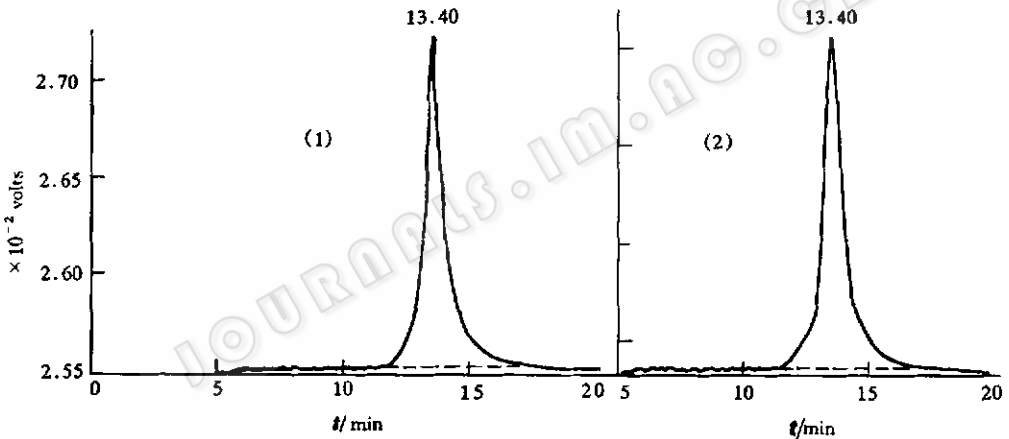


图 3 HPLC 分析 INF $\gamma$  的结果

Fig. 3 Result of INF $\gamma$  by HPLC

(1) Control of INF $\gamma$ , (2) Sample of INF $\gamma$

表 3 3 批  $\gamma$ -干扰素产品的质量检测结果

Table 3 The tested result of INF $\gamma$

Batch	Titer/ $\times 10^6$ IU $\cdot$ ml $^{-1}$	[Pr]/mg $\cdot$ ml $^{-1}$	Specific activity/ $\times 10^7$ IU $\cdot$ mg $^{-1}$	A <sub>280</sub> /A <sub>260</sub>
1	1.3	1.36	0.96	1.57
2	1.6	1.58	1.01	1.70
3	1.8	1.66	1.08	1.63

SDS-PAGE 100%, pyrogen, qualified

我们研究的人  $\gamma$ -干扰素生产工艺虽然尚未进行大规模生产检验, 但目前中等规模制备所表现出的优势已经为今后的工业化奠定了基础。

由于采用高密度发酵,发酵时间只需 8h;菌体生长迅速,30℃ 培养 5h 后即可升温至 42℃ 诱导表达。20L 发酵液可得约 2kg 湿菌体,这就大大节约了时间、资金、设备,一个 40L 的发酵罐完全可以满足大规模生产的需要。纯化工艺中由于包涵体的纯度较高(> 90%),而且核酸去除的比较彻底,因此纯化工艺步骤少,不用单克隆抗体亲和层析柱,不需添加 SDS 保护,使得产品更为安全,适合于大规模生产的要求。

**致 谢** 上海生物工程中心孙玉昆、巫爱珍教授对本文工作给予了指导和帮助,特致谢意。

### 参 考 文 献

- 1 Gray P W, Leung D W, Pennica D *et al.* Nature, 1982, 295: 503~505
- 2 Perez L, Seow H F, Rothel J S *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 33(4): 429~434
- 3 Zhang I, Radfold A J. J Chromotogr, 1992, 604(1): 143~155
- 4 Vintakhov A A. Antibiot Khimitoter(俄), 1988, 33(2): 99~102
- 5 Novick D, Fisher D G, Mory Y *et al.* Protides Biol Fluids, 1984 (Pub. 1985), 32: 1049~1052
- 6 周永春, 刘登奇. 微生物学报, 1993, 33(4): 248~254
- 7 张德震, 金冬雁. 生物化学杂志, 1991, 7(1): 105~109
- 8 张德震, 吴淑华. 病毒学报, 1989, 5(1): 37~39
- 9 张智清. 病毒学报, 1988, 4(2): 97~101
- 10 Lamli U K. Nature, 1970, 227: 680~685
- 11 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* J Biol Chem, 1951, 193: 265
- 12 Rubistein P, Familletti C, Sidney P K. J Virology, 1981, 37: 755~759
- 13 Prakash V, Loucheux C S. Arch Biophy Biochem, 1981, 210: 455~464

## Study on the Production Technology of Recombinant Human INF $\gamma$

Wang Xiaoqin Yan Yuqing Zhao Binqiang Li Huicheng

(Harbin Pharmaceutical Institute of China, Harbin 150020)

Shi Fuxin

(China Medical University, Shenyang 110001)

**Abstract** Recombinant human INF $\gamma$  was expressed in *E. coli* with 60% of the total cell protein. With high cell density fermentation, 2kg of wet cell could be obtained from 20L fermentation broth. After disruption of the cell, inclusion body isolated in nearly 90% purity was renatured. And after the purification of Sephacryl S-200, the product showed high purity (100% with SDS-PAGE and HPLC analysis), high specific activity ( $1 \sim 2 \times 10^7$  IU/mg) and low content of DNA and pyrogen. The total protein recovery was nearly 40%. The production process reported here is so simple and convenient that it can be applied in the large scale production of INF $\gamma$ .

**Key words** Recombinant human INF $\gamma$ , fermentation, purification