

人干扰素- γ 基因工程大肠杆菌的培养 及其产物的纯化与复性*

张耀东¹ 张丽华² 耿信笃²

¹(陕西师范大学化学系 西安 710062)

²(西北大学现代分离科学研究所 西安 710069)

关键词 γ -干扰素, 大肠杆菌, 高效表达, 纯化, 复性

分类号 Q51 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0240-43

γ -干扰素具有较强的免疫调节、细胞抑制功能和抗病毒活性功能, 在临床上有一定的应用价值。由于天然 γ -干扰素来源有限, 产量甚微, 因此有关 γ -干扰素的基因工程技术研究^[1,2]十分活跃, 并带动了重组人干扰素- γ (rIFN- γ)下游技术的研究^[3]。优化发酵工艺以获得稳定的高质量发酵产物, 可以降低下游技术中分离纯化的成本和难度。但是, 不能得到稳定的高效表达产物是基因工程中普遍存在的问题^[4], 除表达系统本身因素外, 还涉及诸多其它因素。通过对 pBV220IFN- γ DH5 α 工程菌高效表达 rIFN- γ 因素的研究, 并选择合适条件分离包含体, 获得了 rIFN- γ 含量和活性都很高的粗提液。采用高效疏水色谱法(HPHIC)对 rIFN- γ 进行一步同时纯化与复性, 方法不仅简单、快速, 而且避免了采用大量溶剂稀释复性和通过透析除去变性剂的麻烦。

1 材料和方法

1.1 菌种

pBV220IFN- γ DH5 α 基因工程大肠杆菌由中国预防医科院病毒所张智清教授、侯云德院士提供。

1.2 培养基

蛋白胨 20 g, 酵母提取物 10g, 氯化钠 8g, 用蒸馏水溶解成 2000mL 溶液, pH 为 7.4, 湿热灭菌 15min, 即得 LB 培养液(发酵时加入一定量的氨苄青霉素)。若用固体培养基, 则再加入 2% 琼脂。

1.3 rIFN- γ 的提取及质量鉴定

将收集的菌体清洗后进行冷冻和超声破碎, 再用 2.0 mol/L 脲溶液清洗包含体以除去部分杂质蛋白, 然后用 7.0 mol/L 盐酸胍提取^[5]。提取液中蛋白质的含量测定按照 Lowry^[6]法进行, rIFN- γ 的含量按照 Laemmli^[7]-SDS-PAGE 电泳法测定, rIFN- γ 的活性效价按照细胞病变抑制法^[8]进行测定。

1.4 rIFN- γ 的纯化

用自己合成的以硅胶为基质的疏水色谱填料, 匀浆法填充半制备色谱柱(150mm \times 7.9mm *i.d.*)。流动相: A 液为(2.5mol/L)(NH₄)₂SO₄ + (20mmol/L)KH₂PO₄, pH=7.0, B 液为 20 mmol/L KH₂PO₄, pH=7.0。流速 1 mL/min, 室温, 非线性梯度洗脱, A 液和 B 液的比例由系统控制器控制, 检测波长为 280nm。

2 结果

2.1 大肠杆菌的生长状态

* 国家高技术研究发展计划项目(No. 863-102-13-05)。

收稿日期:1997-12-15, 修回日期:1998-12-31。

用下述方法考察大肠杆菌 (*E. coli*) 生长状态的稳定性: 将在平皿上培养的菌种接种于装有 5 mL LB 培养液的 25 mL 试管中, 在 30°C 条件下培养 9h。然后按照 1:40 的稀释比转入到装有 120 mL LB 培养液的 250 mL 锥形瓶中, 在 30°C 条件下培养 14 h。接着按 1:40 的稀释比扩大培养(30°C), 每隔一定时间测 OD_{600} 值, 以 OD_{600} 值为纵坐标, 时间 t 为横坐标作 *E. coli* 生长曲线(Fig. 1a)。在完全相同的发酵条件下, *E. coli* 生长曲线不完全相同, 说明 *E. coli* 生长状态是不稳定的, *E. coli* 在不同的培养时间进入对数生长期, 但是都在 OD_{600} 约为 0.35 时进入对数生长期。为了考察 *E. coli* 在诱导温度时的生长状态, 可以按 1:40 的稀释比扩大培养(30°C)至 OD_{600} 约为 0.35 时升温至 42°C 培养。每隔一定时间测 OD_{600} 值, 作图(Fig. 1b)。在 42°C 条件下, OD_{600} 约为 1.35 时大肠杆菌对数生长期结束, 进入静止期。

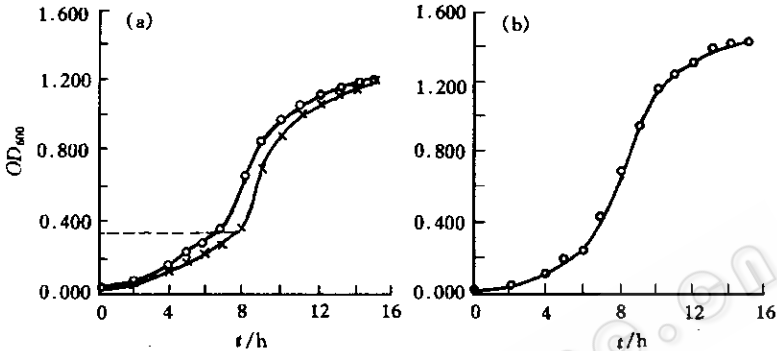


图 1 大肠杆菌的生长曲线

The culturing temperature: a. 30°C b. $OD_{600} \leq 0.35$, 30°C $OD_{600} > 0.35$, 42°C

× Cell density of batch cultivation at 30°C; o Cell density of batch cultivation at 42°C

E. coli 的良好生长状态对 rIFN- γ 的表达是有利的。在细菌的对数生长期内, *E. coli* 生长活跃, 生长状态稳定, 对表达有利。如前所述, *E. coli* 在不同培养时间处于对数生长期, 因此, 在一定培养时间诱导表达是导致表达 rIFN- γ 不稳定的因素之一。可以采用 $OD_{600} \approx 0.35$ 时升温诱导表达, $OD_{600} \approx 1.35$ 时收集菌体。

2.2 rIFN- γ 的分离纯化与复性

用 7.0 mol/L 盐酸胍提取的含有 rIFN- γ 的粗提液直接输入到半制备疏水色谱柱, 分离的色谱图见图 2, 收集过柱后的干扰素峰, 进行 SDS-PAGE 电泳纯度的测定(Fig. 3)。其它结果指标见表 1。

表 1 HPHIC 对在 7.0 mol/L 盐酸胍中 rIFN- γ 的分离、纯化与复性结果

Total protein /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Purity /%	Bioactivity /(IU/mL)	Specific bioactivity /(IU/mg)	Recovery of bioactivity /%
164	>86	4.1×10^5	2.5×10^6	≥ 208

一般分离 rIFN- γ 的方法都需要经过复性步骤, 采用稀释法复性虽然简单, 但是液量的增加使蛋白浓度降低, 给后面的分离纯化带来操作上的麻烦。采用透析、超滤或电渗析除去变性剂, 费时且复性效果不佳。将原样直接输入到疏水色谱柱, 不仅避免了上述复性操作的缺点, 而且避免了使用亲和柱而样品处理样小的弊端, 起到了复性、分离、纯化作用^[9]。

2.3 rIFN- γ 提取液的质量

从原样的 SDS-PAGE 电泳(Fig. 4), 疏水色谱分离效果(Fig. 2), 以及表 2 所列出的几个方面同以时间为参数的发酵结果进行比较, 各项指标均优于改进前的发酵结果。

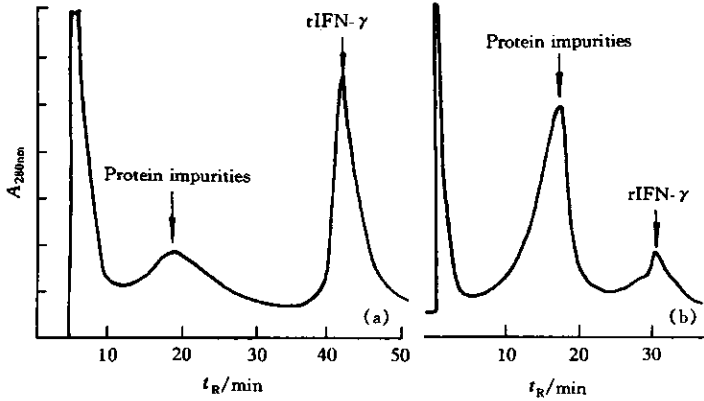


图 2 rIFN- γ 7.0mol/L 盐酸胍提取液的 HPHIC 分离
a. 改进后; b. 改进前

The conditions were different on the crude extracted solutions of rIFN- γ and the non-linear gradient elution time from 100% A to 100% B

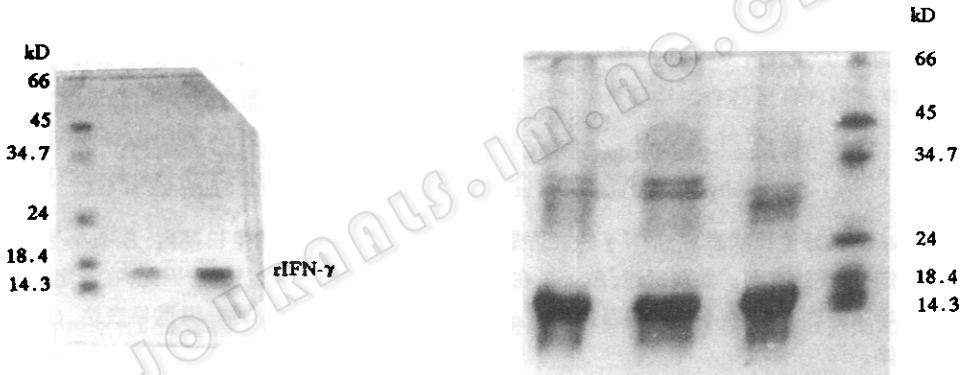


图 3 HPHIC 纯化后的 rIFN- γ SDS-PAGE 电泳图

图 4 7.0mol/L 盐酸胍提取液中 rIFN- γ 含量的 SDS-PAGE 电泳图

表 2 rIFN- γ 提取液与改进前的比较

	Total protein /(mg/mL)	Bioactivity /($\times 10^5$ IU/mL)	Specific bioactivity /($\times 10^4$ IU/mg)	The percentage of rIFN- γ /%
Before improvement	26.7	5.1	1.91	20~30
After improvement	15.9	16	10.0	60~80

3 讨 论

rIFN- γ 基因表达系统对 rIFN- γ 的表达有影响, rIFN- γ 的表达量与 *E. coli* 的生长状态也有关系, *E. coli* 良好的生长状态对 rIFN- γ 的表达有利, 在 *E. coli* 的对数生长期, *E. coli* 生长活跃, 生长状态最佳。因此, 在对数生长期内诱导表达可以提高 rIFN- γ 的产量与质量, 除此之外, 仍有下列一些影响 rIFN- γ 表达量的因素值得探讨。

非均一性表达;合成的人 γ -干扰素基因在 *E. coli* 中的稳定高效表达是相对的,不能得到稳定高效表达是绝对的。这是基因工程中普遍存在的问题,即基因工程产物不能得到均一性表达^[10]。

寡聚体的存在:通常是因为干扰素分子间次级键的作用,或因干扰素分子疏水缔合作用形成了寡聚体^[11],而寡聚体通常是没有生物活性或活性很低,提取液中加入适量的 SDS 活性提高,就是因为 SDS 可以促进缔合的寡聚体解聚。

内部降解:它使外源基因产物 rIFN- γ 不完整,因为内部降解是随机的,所以引起活性不稳定,*E. coli* 表达的 rIFN- γ 除正常的 143 个氨基酸残基外,其 C 端常有氨基酸残基缺失^[12]。

参 考 文 献

- [1] 王晓鸣,张智清,侯云德等.中国科学(B),1991,21(3):289.
- [2] 王子轩,刘新垣等.中国科学(B),1994,24(10):1076.
- [3] Z. Zhan, K. T. Tong *et al.* *J. Chromatogr.*, 1992, 604(1):143.
- [4] 王洪海,李育阳等.中国科学(B),1994,24(2):1270.
- [5] 张耀东,洪深求,张丽华等.陕西师范大学学报,1998,26(2):65.
- [6] O. H. Lowry *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1951, 193:265.
- [7] U. K. Laemmi. *Nature*, 1970, 227:680.
- [8] S. Rubstin *et al.* *J. virol.*, 1981, 37:755.
- [9] 耿信笃,冯文科,常建华等.高技术通讯,1991,1(7):1.
- [10] R. A. Hitzeman, D. V. Goddel *et al.* *Science*, 1983, 219:620.
- [11] Y. K. Yip, B. S. Barrowcough *et al.* *Science*, 1982, 215:411.
- [12] E. Rinderknecht, B. H. O'Connor *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1984, 259:6790.

Cultivation of Human Interferon- γ Gene Engineering *Escherichia coli* and Purification, Renaturation of its Products*

Zhang Yaodong¹ Zhang Lihua² Geng Xindu²

¹(Department of Chemistry, ShanXi Normal University, Xi'an 710062)

²(Institute of Modern Separation Science, Northwestern University, Xi'an 710069)

Abstract The expression of Recombinant Human Interferon- γ (rIFN- γ) was induced during the logarithmic growth phase of *E. coli*. When OD_{600} is about 0.35, the temperature should be raised for the expression, When OD_{600} is about 1.35 the cells must be harvested. Then the cells were frozen, disrupted by ultrasonication, the inclusion bodies were separated by centrifugation, and the rIFN- γ was extracted with 7.0mol/L guanidine hydrochloride solution, successively. In this way, the amount of the total protein obtained is 79.5~127.2 mg/L, the specific bioactivity of rIFN- γ is 5.6~8.0 $\times 10^5$ IU/mg, and the percentage of rIFN- γ is 60%~80% in the extracted solution, respectively. The crude extracted rIFN- γ in 7.0 mol/L Gua·HCl solution was directly injected to the hydrophobic interaction chromatography column to do renaturation and separation of originally denatured rIFN- γ simultaneously. Only one step, the purity of the purified rIFN- γ is more than 86%, its specific bioactivity is 2.5 $\times 10^6$ IU/mg, and its bioactivity recovery is over 208%.

Key words Interferon- γ , *E. coli*, high level expression, purification, renaturation

* Supported by Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 863-102-13-05).