

提高成纤维细胞生长因子-21产率和纯度

于丹*, 叶贤龙*, 任桂萍, 徐鹏飞, 厉书杰, 牛泽杉, 李德山

东北农业大学生命科学学院 生物制药教研室, 黑龙江 哈尔滨 150030

于丹, 叶贤龙, 任桂萍, 等. 提高成纤维细胞生长因子-21产率和纯度. 生物工程学报, 2014, 30(4): 658-668.

Yu D, Ye XL, Ren GP, et al. Improvement of yield and purity of human fibroblast growth factor-21. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 658-668.

摘要: 成纤维细胞生长因子-21 (FGF-21) 作为近期发现的新型代谢调节因子, 因其具有独立于胰岛素调节糖脂代谢、增加胰岛素敏感性等作用, 有望成为治疗糖尿病的新型药物。包涵体形式表达外源蛋白表达量及纯度高, 但是以 pET 载体表达时, FGF-21 以包涵体形式表达, 且复性率及产率低, 蛋白活性降低^[1]。针对这一瓶颈问题, 用 SUMO 载体首次以包涵体形式表达带有 SUMO 标签的 hFGF-21, 通过优化培养条件, 并应用中空纤维柱膜过滤技术对菌体进行富集, 对包涵体进行洗涤、变性及复性, 经过亲和层析、凝胶过滤层析的纯化方法, 得到了成熟的 hFGF-21, 在保证蛋白活性的同时增加了蛋白的产量及纯度。通过检测 HepG2 细胞葡萄糖吸收及 2 型糖尿病 db/db 小鼠短期及长期血糖变化鉴定其降糖生物学活性。结果表明, 以包涵体形式表达 hFGF-21 (ihFGF-21) 的表达量是可溶形式表达的 hFGF-21 (shFGF-21) 的 3 倍, 最终 ihFGF-21 的收率为 20 mg/L, 而 shFGF-21 的收率仅为 6 mg/L。ihFGF-21 的纯度可达到 95%以上, 而 shFGF-21 仅能达到 90%左右; 在细胞水平和动物水平上两者的降糖生物学活性一致。在保证 hFGF-21 生物学活性的前提下, 与传统包涵体途径提取目的蛋白的方法相比, 应用中空纤维柱膜过滤技术使 hFGF-21 的生产周期缩短了约 1/3 左右。综上所述, 此法为 FGF-21 中试及工业化生产提供了高效、经济的策略。

关键词: 成纤维细胞生长因子-21, 中空纤维柱膜过滤技术, 蛋白表达, 糖尿病

Received: August 14, 2013; **Accepted:** November 12, 2013

Supported by: Heilongjiang Development and Reform Commission (No. [2011]1570), Heilongjiang Postdoctoral Scientific Research Foundation (No. LBH-Q09162), Heilongjiang Education Department of Science and Technology Research Project (No. 12521z004), National Natural Science Foundation of China (No. J1210069/J0106).

Corresponding author: Deshan Li. Tel: +86-451-55190645; E-mail: Deshanli@163.com

*These authors contributed equally to this study.

黑龙江省发展和改革委员会重大前期项目 (No. 黑发改项目[2011]1570), 黑龙江省博士后科研启动基金项目 (No. LBH-Q09162), 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (No. 12521z004), 国家自然科学基金 (No. J1210069/J0106) 资助。

网络出版时间: 2013-12-06

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131206.0847.003.html>

Improvement of yield and purity of human fibroblast growth factor-21

Dan Yu^{*}, Xianlong Ye^{*}, Guiping Ren, Pengfei Xu, Shujie Li, Zeshan Niu, and Deshan Li

Biopharmaceutical Teaching and Research Section, College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: Fibroblast growth factor -21 (FGF-21) is a recently discovered metabolic regulation factor, regulating glucose and lipid metabolism and increasing insulin sensitivity. FGF-21 is expected to be a potential anti-diabetic drug. Expression of FGF-21 as inclusion bodies has advantages for high yield and purity, but the bioactivity of the protein is almost totally lost after denature and renature. That is why FGF-21 is currently expressed in soluble form. As a result, the yield is considerably low. In this study, we used SUMO vector to express SUMO-human FGF-21 (SUMO-hFGF-21) in form of inclusion body. We optimized the culture conditions to increase the yield of the bioactive human fibroblast growth factor-21. We applied the hollow fiber membrane filtration column to enrich the bacteria, wash, denature and renature inclusion bodies. After affinity and gel filtration chromatography, we examined the hypoglycemic activity of FGF-21 by the glucose uptake assay in HepG2 cells. We also detected the blood glucose concentration of type 2 diabetic db/db model mice after short or long-term treatment. The results show that the yield of ihFGF-21 was 4 times higher than that of shFGF-21. The yield was 20 mg/L for ihFGF-21 vs. 6 mg/L for shFGF-21. The purity of ihFGF-21 was above 95%, while shFGF-21 was 90%. Compared with the traditional method of extracting inclusion bodies, the production cycle was about three times shortened by application of hollow fiber membrane filtration column technology, but the bioactivity did not significantly differ. This method provides an efficient and cost-effective strategy to the pilot and industrial production of hFGF-21.

Keywords: fibroblast growth factor-21, hollow fiber membrane filtration column, protein expression, diabetes

成纤维细胞生长因子-21 (FGF-21) 是成纤维细胞因子家族的新成员^[1],具有不依赖胰岛素调节糖脂代谢^[2],改善胰岛素抵抗,提高靶组织对胰岛素敏感性等多种代谢调控功能,不会导致低血糖、水肿、过敏等毒副作用^[3]。FGF-21在糖尿病临床应用方面具有很大的潜力,给糖尿病患者带来新希望^[4]。

大肠杆菌以包涵体形式表达外源蛋白,具有表达量及纯度高的突出优点,而可溶形式表达目的蛋白不仅产量低,而且上清中含有大量宿主细胞染色体翻译表达的杂质蛋白,纯化工艺复杂^[5-6]。目前,科研人员却仍以大肠杆菌表

达可溶形式 FGF-21,这是因为 FGF-21 蛋白本身结构与性质使其表达量及复性率降低^[1-7],复性后蛋白活性减弱甚至丧失。科研人员曾用多种表达载体及优化各种方法以包涵体形式表达 FGF-21,但均未能解决上述问题。

本实验采用 SUMO 表达载体首次以包涵体形式表达 hFGF-21,突破了传统包涵体离心洗涤,人工变复性的复杂生产工艺,将中空纤维柱膜过滤技术应用于包涵体形式蛋白的整个生产过程中。最终,90%以上 SUMO-hFGF-21 形成包涵体,其表达量约为可溶性表达的 3 倍;由于复性条件温和及作为分子伴侣的 SUMO

标签促进了蛋白质的正确折叠^[8],使 hFGF-21 复性率显著提高,获得的 ihFGF-21 生物学活性较 shFGF-21 无显著差异,为 hFGF-21 由实验室向中试及产业化生产提供了更经济、更高效的策略。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 工 程 菌

携带 pSUMO-hFGF-21 质粒的工程菌由东北农业大学生物制药教研室提供。

1.1.2 试 剂

异丙基硫代 β -D-半乳糖苷 (IPTG)、溶菌酶、氨苄青霉素 (Amp) 购自 TaKaRa 公司。葡萄糖检测试剂盒购自北京金豪制药股份有限公司。Quixstand 膜处理系统,750 kDa 和 10 kDa 中空纤维柱,AKTATMpurifier100 系统,Ni Sepharose 6 FF 及 HiPrep 26/10 Desalting 均购自 GE 公司。

1.1.3 实 验 细 胞 及 动 物

HepG2 细胞为东北农业大学生物制药教研室提供。db/db 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物质量合格证号 SCXK(沪)2013-0002。

1.2 方 法

1.2.1 人 成 纤 维 细 胞 生 长 因 子 -21 融 合 蛋 白 (iSUMO-hFGF-21) 的 包 涵 体 表 达

取保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的携带 pSUMO-hFGF-21 质粒的工程菌,在含有氨苄青霉素 (100 U/mL) 的 TB 固体培养基上划线,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜;挑取单菌落,接种于 20 mL TB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 h 后,以 1 : 100 的比例接种于 500 mL 含氨苄青霉素

(100 U/mL) TB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 3.5 h, $A_{600}=0.6\text{--}0.8$ 时加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L,37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h 后,4 000 r/min 离心 30 min 收集菌体,15% SDS-PAGE 鉴定表达量。

1.2.2 iSUMO-hFGF-21 包涵体的提取、洗涤、变性 及 复 性

将收集的菌体按 1 g/10 mL 的比例悬浮于平衡缓冲液 (40 mmol/L 咪唑,500 mmol/L NaCl,20 mmol/L Na_3PO_4 ,pH 7.4) 中,加入终浓度为 1 mg/mL 的溶菌酶,冰上放置 1 h,超声波破碎菌体细胞 (工作 1 s,间隔 1 s,4 min/次,共 3 次)。

用 750 kDa 中空纤维柱超滤膜富集包涵体,弃去渗透端流出液体。当总体积约为 50 mL 时,加入 200 mL 洗涤液 (20 mmol/L Na_3PO_4 ,2 mol/L 尿素,150 mmol/L NaCl,pH 8.0) 洗涤包涵体,当溶液体积为 50 mL,再向其中加入洗涤液至 200 mL。重复上述实验 4 次。

在 750 kDa 的中空纤维柱超滤膜中,关闭渗透端,向洗涤后的包涵体中加入 200 mL 的变性液 (20 mmol/L Na_3PO_4 ,8 mol/L Urea,150 mmol/L NaCl,pH 8.0),循环变性 2 h。完全变性后,打开渗透端,渗透端收集液即为 iSUMO-hFGF-21 变性液。用 10 kDa 中空纤维柱对变性后的 iSUMO-hFGF-21 进行复性:将盛有复性液的三角瓶 (20 mmol/L Na_3PO_4 ,150 mmol/L NaCl,pH 8.0) 用胶皮管与中空纤维柱的储液器连接。向储液器中加入变性液后,打开透过端,由于储液器中产生负压,使复性液以一定的速度滴加至变性液中,缓慢复性。当加入复性液总体积为变性液体积 20 倍时,8 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,收集上清,即完成 iSUMO-hFGF-21 的复性。

1.2.3 ihFGF-21 的纯化

用平衡缓冲液(40 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Na₃PO₄, pH 7.4) 平衡 Ni Sepharose 6 FF 亲和层析柱 5 个柱体积后, 上样。再用平衡缓冲液洗去非特异性吸附的杂质蛋白, 洗脱液 (500 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Na₃PO₄, pH 7.4) 洗脱融合蛋白 iSUMO-hFGF-21, 收集洗脱峰。经 Sephadex G-25 脱盐柱将 iSUMO-hFGF-21 置换到磷酸盐缓冲溶液 (50 mmol/L Na₃PO₄, 150 mmol/L NaCl, pH 7.0) 中, 加入 SUMO 蛋白酶 I 至终浓度为 2 mmol/L, 4 °C 酶切过夜^[9]。再经 Ni Sepharose 6 FF 亲和层析, 收集流穿液, 15% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白 ihFGF-21 的产量及纯度。

1.2.4 shFGF-21 的表达与纯化

将携带重组质粒 pSUMO-hFGF-21 的工程菌, 划线培养; 单菌落接种至 20 mL 含氨苄青霉素 (100 U/mL) LB 培养基中, 37 °C 培养 10 h, 按 1% 的比例接种于 500 mL/瓶含氨苄青霉素 (100 U/mL) LB 培养基三角瓶中, 37 °C 培养 2.5 h, A₆₀₀=0.3-0.4 时, 加入 IPTG 至浓度为 0.25 mmol/L 进行诱导, 4 h 后 4 000 r/min、4 °C 离心 30 min, 以 1 g/10 mL 的比例重悬菌体, 放置 -20 °C 保存; 待收集上述菌体 20 L 后, 超声波破碎; 破碎完全后 4 000 r/min、4 °C 离心 30 min。shFGF-21 纯化策略, 产量和纯度检验方法与上述 ihFGF-21 相同。

1.2.5 免疫印迹法检测 ihFGF-21

以 shFGF-21 作为阳性对照, BSA 作为阴性对照, 将纯化的产物进行 15% SDS-PAGE 电泳然后转至硝酸纤维素膜上。转膜完成后, 经 5%

脱脂奶粉-PBS-0.05% Tween 20 室温封闭 2 h, 与兔抗人 FGF-21 单抗反应 12 h, PBS 洗涤 5 次, 每次 5 min。再与 HRP 偶联的羊抗兔二抗室温反应 2 h, 洗涤后加入发光底物 DAB 避光显影。

1.2.6 ihFGF-21 与 shFGF-21 细胞水平上生物学活性的比较

利用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法 (GOD-POD)^[10] 检测 hFGF-21 促进细胞糖吸收的生物学作用。HepG2 细胞饥饿 12 h 后, 分别用 10、100 及 1 000 nmol/L 的 ihmFGF21 蛋白和 shFGF21 蛋白刺激细胞 24 h; 在 24 h 时, 分别取培养上清液 2 μL, 加入到 200 μL 葡萄糖检测液中, 37 °C 反应 5-10 min, 在 490 nm 波长下检测其 OD 值。每孔重复 3 次, 按公式计算细胞对葡萄糖的消耗率并运用 SPSS 软件分析实验结果, 两组间数据比较采用 *t* 检验。

计算培养液中残留的葡萄糖的浓度, 公式为:

$$\text{葡萄糖浓度 (mmol/L)} = \text{OD}_{\text{样品}} / \text{OD}_{\text{标准}} \times 5.55 \text{ mmol/L}.$$

计算细胞对葡萄糖的消耗率, 公式为:

$$\text{细胞葡萄糖消耗率 (\%)} = [(C_{\text{空白葡萄糖}} - C_{\text{给药葡萄糖}}) / C_{\text{空白葡萄糖}}] \times 100\%.$$

1.2.7 ihFGF-21 与 shFGF-21 调节 2 型糖尿病模型 db/db 鼠短期与长期生物学活性的比较

将成模的 db/db 小鼠随机分为 3 组, 每组 5 只。通过皮下注射的方式, 给予各实验组相应的蛋白 1 次, 剂量 0.5 mg/kg, 模型对照组注射相同体积的生理盐水, 给药 3 h 后, 尾静脉取血检测血糖浓度, 比较两种蛋白调节模型小鼠血糖的短期降糖效果。每天早上 8 点给药, 连续注射 16 d, 每两天检测各处理组小鼠的血糖 1 次, 停药后继续观察小鼠血糖 3 d, 观察两种蛋白的长期降糖活性的差异。

2 结果与分析

2.1 iSUMO-hFGF-21 与 sSUMO-hFGF-21 的表达量分析

取 3 mL 菌液, 离心、破碎完全后, 15% SDS-PAGE 电泳比较 iSUMO-hFGF-21 与 sSUMO-hFGF-21 的表达量, 根据凝胶成像灰度分析软件分析表明, iSUMO-hFGF-21 的表达量约是 sSUMO-hFGF-21 的 3 倍, 结果如图 1 所示。

2.2 iSUMO-hFGF-21 包涵体的提取、洗涤、变性及复性

菌体破碎完全后, 应用中空纤维柱对包涵体进行洗涤, 除去部分杂质蛋白、脂质、核酸等。重复洗涤 3 次后, 溶解包涵体, 当溶液呈棕黄色、透明状态时, 打开渗透端, 收集渗透端流出液即为完全变性的 iSUMO-hFGF-21。用 10 kDa 中空纤维柱对融合蛋白 iSUMO-hFGF-21 进行复性后, 8 000 r/min、4 °C 离心 20 min, 收

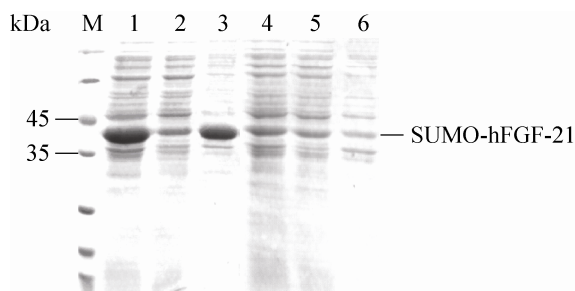


图 1 SDS-PAGE 比较分析 iSUMO-hFGF-21 与 sSUMO-hFGF-21 诱导 4 h 的表达量

Fig. 1 Expression analysis of the iSUMO-hFGF-21 and sSUMO-hFGF-21 proteins. M: the relative molecular mass of standard proteins; 1: total protein of iSUMO-hFGF-21 cell lysates; 2: supernatant of iSUMO-hFGF-21 cell lysates; 3: precipitate of iSUMO-hFGF-21 cell lysates; 4: total protein of sSUMO-hFGF-21 cell lysates; 5: supernatant of sSUMO-hFGF-21 cell lysates; 6: precipitate of sSUMO-hFGF-21 cell lysates.

集上清。经 SDS-PAGE 分析可知, 洗涤及复性过程中 iSUMO-hFGF-21 几乎无损失, 且洗涤后 iSUMO-hFGF-21 包涵体的纯度为 73%, 说明应用中空纤维柱膜过滤技术, 不仅提高了蛋白的收率, 而且提高目的蛋白的纯度, 结果如图 2 所示。

2.3 ihFGF-21 的纯化

结果显示, 经过 Ni Sepharose FF 亲和层析 (图 3), Sephadex G-25 脱盐, 酶切以及再次应用

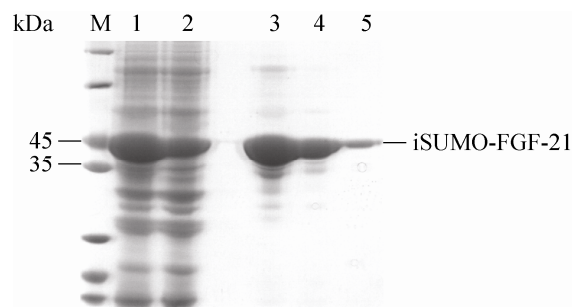


图 2 SDS-PAGE 分析 iSUMO-hFGF-21 的纯度

Fig. 2 Purity analysis of the iSUMO-hFGF-21 protein by SDS-PAGE. M: the relative molecular mass of standard proteins; 1: iSUMO-hFGF-21 before washing (20 μ L); 2: iSUMO-hFGF-21 before washing (10 μ L); 3: iSUMO-hFGF-21 after washing; 4: supernatant of iSUMO-hFGF-21 after denaturing; 5: supernatant of iSUMO-hFGF-21 after refolding.

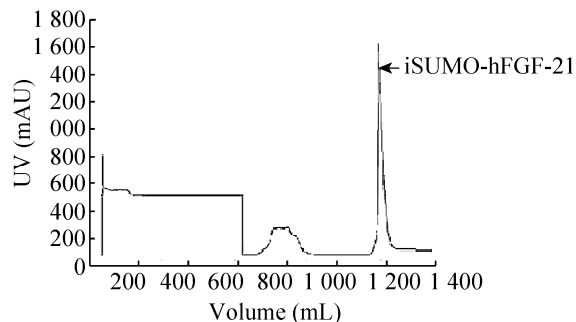


图 3 iSUMO-hFGF-21 亲和层析纯化结果

Fig. 3 Affinity chromatography result of iSUMO-hFGF-21.

亲和层析 (图 4) 后, 收集流穿液即为成熟的 ihFGF-21, 15% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白 hFGF-21 的浓度及纯度。根据凝胶成像分析软件灰度分析表明, ihFGF-21 的纯度约为 95% 以上, 最终收率约为 20 mg/L (图 5)。

2.4 shFGF-21 的表达与纯化

结果显示, 经过 Ni Sepharose FF 亲和层析 (图 6), Sephadex G-25 脱盐, 酶切以及再次亲和

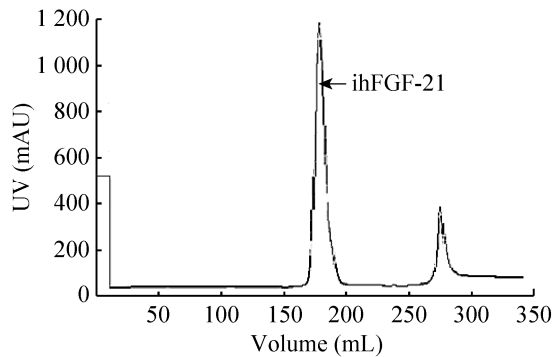


图 4 ihFGF-21 亲和层析纯化结果

Fig. 4 Affinity chromatography result of ihFGF-21.

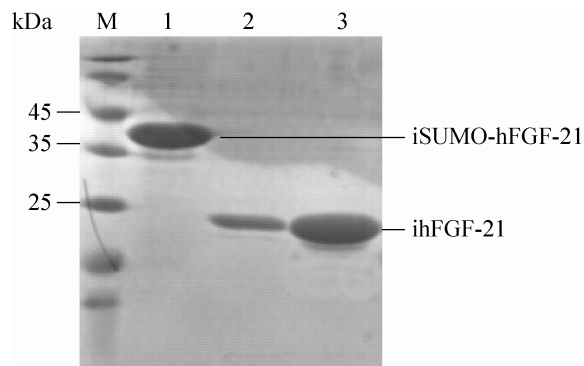


图 5 iSUMO-hFGF-21 和 ihFGF-21 纯化后蛋白表达量与纯度分析

Fig. 5 Yield and purity analysis of the ihFGF-21 protein after purification. M: the relative molecular mass of standard proteins; 1: iSUMO-hFGF-21 protein; 2, 3: mature ihFGF-21 after enzyme digestion and purification.

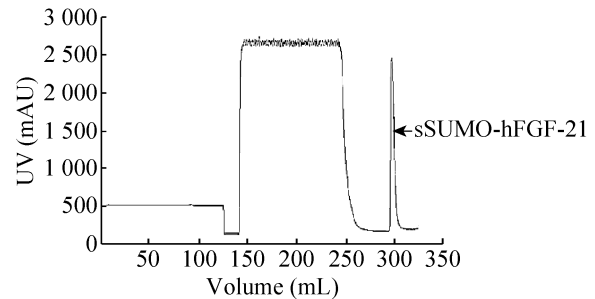


图 6 sSUMO-hFGF-21 亲和层析纯化结果

Fig. 6 Affinity chromatography result of sSUMO-hFGF-21.

层析后, 收集流穿液即为成熟的 ihFGF-21, 15% SDS-PAGE 电泳检测 hFGF-21 的浓度及纯度。根据凝胶成像分析软件灰度分析表明, shFGF-21 纯度为 90%, 总的表达量为 6 mg/L (图 7)。

2.5 ihFGF-21 与 shFGF-21 免疫印迹比较理化性质的差异

经 Anti-ihFGF-21 单抗的免疫印迹实验(其

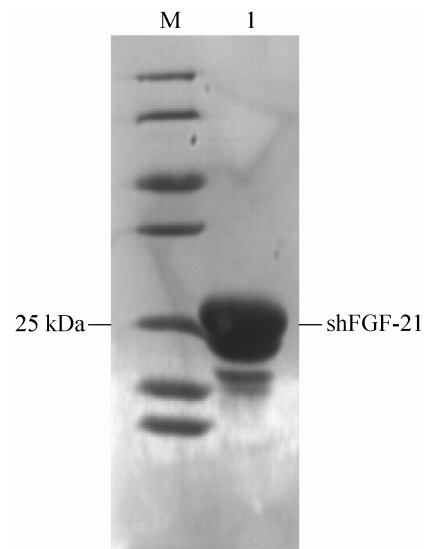


图 7 SDS-PAGE 分析纯化后 shFGF-21 的收率及纯度

Fig. 7 Yield and purity analysis of the shFGF-21 protein after purification. M: the relative molecular mass of standard proteins; 1: mature shFGF-21.

中 BSA 为阴性对照, shFGF-21 为阳性对照), 硝酸纤维素膜上, 阴性对照 BSA 泳道为空白, 阳性对照 shFGF-21 与实验组 ihFGF-21 均出现单一条带 (图 8), 证明纯化的目的蛋白为成纤维细胞生长因子-21。

2.6 ihFGF-21 与 shFGF-21 细胞水平上生物学活性的比较

结果如图 9 所示, 经过 10、100、1 000 nmol/L shFGF-21 与 ihFGF-21 分别刺激后的细胞, 采用 GOD-POD 法检测其葡萄糖吸收率; 实验结果表明, 与空白对照组相比, 两者均能显著增加细胞葡萄糖吸收率, 且呈剂量依赖性; 不同浓度的 shFGF-21 与 ihFGF-21 促进细胞糖吸收的生物学活性无显著差异 ($P=0.563>0.05$), 说明 ihFGF-21 与 shFGF-21 细胞水平上促进 HepG2 细胞糖吸收的生物学活性并没有显著差异, 证明了采用中空纤维柱提取包涵体形式表达的 FGF-21 时, 并没有降低蛋白的生物学活性, 此种提取工艺可行。

2.7 ihFGF-21 与 shFGF-21 对 db/db 糖尿病模型鼠的短期降糖生物学活性的比较

注射前后, 注射生理盐水的模型对照组血糖没有变化; 注射 3 h 后, 模型对照组的血糖由 (16.02 ± 4.29) mmol/L 升至 (16.18 ± 1.79) mmol/L, shFGF-21 组血糖由 (15.92 ± 4.301) mmol/L 降至 (10.02 ± 3.43) mmol/L, ihFGF-21 组血糖由 (16.15 ± 3.67) mmol/L 降至 (10.00 ± 1.59) mmol/L。与模型对照组相比, 无论作用效果还是作用时间, 两种途径获得的成熟蛋白都表现出了良好的降糖效果, 血糖在注射 1 h 开始下降, 注射 3 h 降糖效果较模型对照组相比差异极显著, shFGF-21 组与 ihFGF-21 组差异不显著, 结果如图 10 所示。

2.8 ihFGF-21 与 shFGF-21 对 db/db 糖尿病模型鼠的长期降糖生物学活性的比较

连续注射 16 d 后, 检测血糖。在长期调节 2 型糖尿病模型 db/db 鼠血糖的生物学功能上, 与模型对照组相比, ihFGF-21 与 shFGF-21 均表现出了显著的差异, 但两者之间无显著差异; 两者均能长期持续的调节 2 型糖尿病模型 db/db 鼠的血糖, 停止注射 3 d 后, 均恢复至与模型对照组相同的血糖水平 (图 11)。说明此法可以保

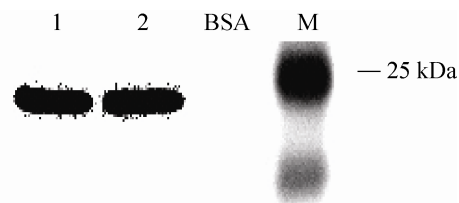


图 8 ihFGF-21 与 shFGF-21 免疫印迹比较理化性质差异的分析

Fig. 8 Physical properties analysis of the difference between the ihFGF-21 and shFGF-21 proteins.

1: mature ihFGF-21; 2: mature shFGF-21; 3: BSA; M: the relative molecular mass of standard proteins.

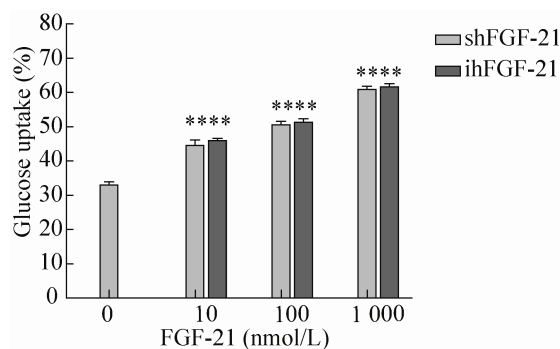


图 9 ihFGF-21 与 shFGF-21 细胞水平上生物学活性的比较

Fig. 9 Comparison of biological activity of ishFGF-21 and shFGF-21 on cell level. The cells were treated with 10, 100 or 1 000 nmol/L shFGF-21 or ihFGF-21. After 24 h treatment, glucose uptake by the model cells were examined using GOD-POD method. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of 3 independent measurements. ** $P < 0.01$ vs control.

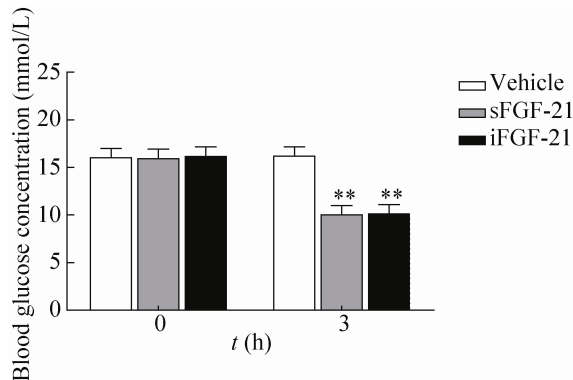


图 10 ihFGF-21 与 shFGF-2 对 db/db 糖尿病模型鼠的短期降糖效果的比较

Fig. 10 Comparison of ihFGF-21 and shFGF-21 on short-term hypoglycemic effect. The db/db mice were treated with 0.5 mg/kg shFGF-21 or ihFGF-21. The blood glucose level of the model mice were examined at 0 h and 3 h. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of 6 independent measurements. ** $P < 0.01$ vs control.

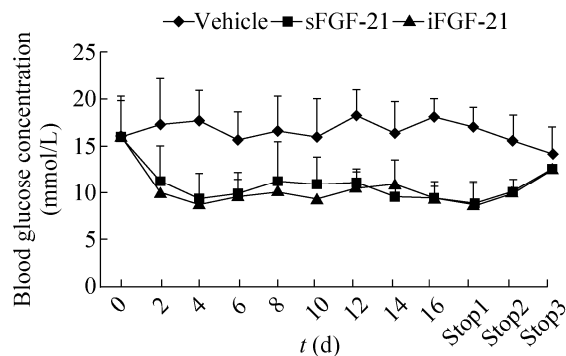


图 11 ihFGF-21 与 shFGF-21 对 db/db 糖尿病模型鼠的长期降糖生物学活性的比较

Fig. 11 Comparison of ihFGF-21 and shFGF-21 on long-term hypoglycemic effect. The db/db mice were administrated once a day with saline (control), 0.5 mg/kg shFGF-21 or ihFGF-21 for 16 d. The blood glucose level of db/db mice were examined before injection each day at 8 am. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of 6 independent measurements.

证获得的 ihFGF-21 的生物学活性, 是提取 hFGF-21 的有效方法。

3 讨论

近年来, 随着人们对成纤维细胞生长因子-21 (FGF-21) 结构和功能的深入研究, FGF-21 安全、可靠, 不依赖胰岛素单独调节糖脂代谢, 改善胰岛素抵抗, 无副作用的报道, 使其成为治疗糖尿病、肥胖、脂肪肝等代谢疾病的潜力药^[11-12]。目前, FGF-21 的生产已经逐渐由实验室向中试规模转变, 开发高效、高纯度的 FGF-21 的生产工艺, 成为科研人员共同关注的焦点。

尽管大肠杆菌在表达外源基因方面有众多的优点, 但是外源基因的高效表达^[13], 除受到其本身性质影响外, 还与表达系统的特性及其他因素密切相关。本研究通过优化本实验室构建的携带 pSUMO-hFGF-21 质粒工程菌的培养条件, 采用 TB 培养基, 150 r/min 摇瓶培养, 当菌体生长至 $A_{600}=0.6-0.8$ 时进行诱导, 37 °C 诱导表达 4 h, 90% 以上的 SUMO-hFGF-21 以包涵体形式表达, 其表达量为可溶性表达表达量的 3 倍。这是由于采用包涵体形式表达 FGF-21 时, 诱导温度及转速的升高提高了细胞内相关酶的活性, 增加了溶氧; 菌体浓度的增加, 提高了蛋白的表达量; 蛋白表达过快, 无法快速正确折叠, 从而形成包涵体^[14]。包涵体形式表达 FGF-21, 提高了蛋白表达量, 降低了生产成本, 有利于规模化生产。

如何对包涵体蛋白质进行体外高效复性是基因工程技术面临的一个重要难题。传统方法提取包涵体蛋白, 不仅工艺复杂, 生产周期长, 而且复性率低, 蛋白损失严重, 复性后蛋白活

性降低甚至无活性。而应用中空纤维柱膜过滤技术提取包涵体途径纯化表达的 hFGF-21 显著提高了蛋白的复性率。这可能是因为中空纤维柱复性过程中,将复性液缓慢加入变性液中,以缓慢的速度除去变性剂;变性剂除了能溶解包涵体使其去折叠外,在复性过程中还可以有效地抑制复性中间体相互聚集,从而增加复性率^[15]。

本实验从包涵体富集到复性,都采用中空纤维柱膜过滤技术,充分发挥了其处理量大、处理能力持久的优势。与传统的离心方法相比,应用中空纤维柱对包涵体进行洗涤使生产周期缩短了 1/3,且有效降低蛋白损失;大部分杂蛋白、脂类等杂质可透过膜孔,使包涵体洗涤更加彻底;循环变性 2 h 后,直接对变性液进行澄清,然后利用密闭储藏器内产生的负压缓慢加入复性液,缓慢进行稀释复性,保证了温和的复性条件,有利于提高 FGF-21 的正确折叠效率,最后通过离心获得初级纯化后的蛋白溶液。整个过程都在 4 °C 展示柜中进行,低温环境,有利于 FGF-21 的正确折叠^[16]。经 SDS-PAGE 分析结果表明,iSUMO-hFGF-21 的纯度显著高于 sSUMO-hFGF-21,此法除去了多数非特异性吸附在层析介质上的杂质蛋白,简化了纯化工艺。

除此之外,本法获得的成熟 FGF-21 的活性与可溶性表达获得的 FGF-21 无显著差别。通过免疫印迹法,证明所获得的是 hFGF-21。在细胞实验中,两者均可促进葡萄糖的吸收,且与空白对照组相比,差异显著;在动物实验中,两种途径获得的 FGF-21 在短期药效实验中,均在注射 1 h 起作用,注射 3 h 血糖明显降低;长期药效实验中,连续注射均可使模型动物的血糖

降至正常水平,且降糖效果无明显差异,说明以包涵体途径可保证 FGF-21 的生物学活性。分析原因可能有两点:第一,作为分子伴侣的 SUMO 标签可以增强外源蛋白质抗蛋白酶水解,显著增加重组蛋白表达量^[17],促进靶蛋白正确折叠,提高可溶性^[18-19]等功能^[20-23];SUMO 标签的存在能使靶蛋白维持在具有折叠能力的状态并使它们进行正确重折叠,同时能有效地保留靶蛋白质聚集体中天然结构;其机理可能是由于 SUMO 标签作为一个高度疏水的核心为目的蛋白的折叠提供成核位点,减少了蛋白之间的相互作用,使其正确折叠,最终增加了融合蛋白的可溶性^[24];第二,采用中空纤维柱操作,条件温和,有利于蛋白质的正确折叠,操作简单,耗时短,避免了因长期暴露室温导致蛋白活性下降。

中空纤维柱膜过滤技术,现已被广泛用于菌体、细胞等的富集,菌液的澄清,缓冲液置换、蛋白浓缩等方面^[25]。本实验采用中空纤维柱膜过滤技术对 ihFGF-21 进行变复性,与 shFGF-21 相比较,生物活性上无显著差异,使其在生命科学的领域中又有了新的应用价值,为 FGF-21 的大规模生产提供了更实用、更高效的工艺。

REFERENCES

- [1] Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest*, 2005, 115(6): 1627-1635.
- [2] Zhao JZ, Sun GP, Ye XL, et al. The long lasting effect of the marine fibroblast growth factor-21 on blood glucose control of diabetic animals. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(3): 352-358 (in Chinese).

- 赵景壮, 孙国鹏, 叶贤龙, 等. 鼠源成纤维细胞生长因子-21 的长效降糖效果. 药学学报, 2013, 48(3): 352-358.
- [3] Sun GP, Ye XL, Ren GP, et al. The influence of fibroblast growth factor-21 on animal models of type 1 diabetes glycogen metabolism and its mechanism. Prog Biochem Biophys, 2011, 38(10): 953-960 (in Chinese).
孙国鹏, 叶贤龙, 任桂萍, 等. 成纤维细胞生长因子-21 对 1 型糖尿病动物模型的肝糖代谢影响及机制. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(10): 953-960.
- [4] Fan K, Tan KH, Zhang C, et al. The expression and production of soluble recombinant human fibroblast growth factor -21 in *E. coli*. J Chongqing Univ Technol, 2011, 25(5): 18-22 (in Chinese).
范开, 谭克海, 张淳, 等. 大肠杆菌中可溶性表达重组人成纤维细胞生长因子-21 及制备. 重庆理工大学学报, 2011, 25(5): 18-22.
- [5] Gao F, Fan QL, Zou WY, et al. Advances in technology of inclusion body protein chromatography refolding. Biotechnol Bull, 2006(2): 56-71 (in Chinese).
高飞, 范清林, 邹文艺, 等. 包涵体蛋白的层析复性技术研究进展. 生物技术通报, 2006(2): 56-71.
- [6] Zhao XH, He XW, Li WM, et al. Development of *in-vitro* refolding of inclusion body proteins in *E. coli*. Sci Technol Food Ind, 2010, 31(6): 379-384 (in Chinese).
赵喜红, 何小维, 李文美, 等. 大肠杆菌表达包涵体蛋白体外复性研究进展. 食品工业科技, 2010, 31(6): 379-384.
- [7] Li J, Liu W, Xiao L, et al. Two strategies for efficient expression of soluble recombinant human FGF-21 protein. J East Chin Norm Univ: Nat Sci Ed, 2012(6): 114-121 (in Chinese).
李娟, 刘雯, 肖磊, 等. 实现人源 FGF-21 高效可溶性表达的两种策略. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2012(6): 114-121.
- [8] Ye XL, Gao HS, Wang WF, et al. Optimization and characterization of a novel FGF21 mutant. Acta Pharm Sin, 2012, 47(7): 897-903 (in Chinese).
叶贤龙, 高华山, 王文飞, 等. FGF21 基因优化及其生物活性研究. 药学学报, 2012, 47(7): 897-903.
- [9] Li JN, Liu MY, Hou YT, et al. Effect of human FGF-21 on glucose metabolism in adipocytes. Chin J Biochem Mol Biol, 2009, 25(6): 556-562 (in Chinese).
李晋南, 刘铭瑶, 侯玉婷, 等. 人源 FGF-21 在脂肪细胞糖代谢中的作用. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(6): 556-562.
- [10] Jing MY, Sun JY. Regulation of protein folding and the formation of inclusion body. J Zhejiang Univ: Agric & Life Sci, 2004, 30(6): 690-696 (in Chinese).
井明艳, 孙建义. 蛋白质的折叠调控与包涵体的形成. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2004, 30(6): 690-696.
- [11] Kharitononkov A, Wroblewski VJ, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. Endocrinology, 2007, 148(2): 774-781.
- [12] Coskun T, Bina HA, Schneider MA, et al. Fibroblast growth factor-21 corrects obesity in mice. Endocrinology, 2008, 149(12): 6018-6027.
- [13] Xu CL, Yang M, Xu CB. Factors of *E. coli* expression system. Chin J Anim Health Insp, 2010, 27(8): 66-68 (in Chinese).
许崇利, 杨梅, 许崇波. 大肠杆菌表达系统的影响因素. 中国动物检疫, 2010, 27(8): 66-68.
- [14] Ren GP, Jiang YY, Liu MY, et al. Research on SUMO integration system for efficient expression of soluble mouse FGF-21 and its activity. J Northeast Agric Univ, 2009, 40(5): 62-67 (in Chinese).
任桂萍, 姜媛媛, 刘铭瑶, 等. SUMO 融合系统

- 高效表达可溶性鼠源 FGF-21 及其活性的研究. 东北农业大学学报, 2009, 40(5): 62–67.
- [15] Cui ZF, Guan YX, Yao SJ. Integrated applications of several separation methods in the protein renaturation. Bull Sci Technol, 2004, 29(2): 99–104 (in Chinese).
崔志芳, 关怡新, 姚善泾. 分离技术在蛋白质复性中的集成化应用及分析. 科技通报, 2004, 29(2): 99–104.
- [16] Vera A, González-Montalbán N, Arís A, et al. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. Biotechnol Bioeng, 2007, 96(6): 1101–1106.
- [17] Li JF, Zhang J, Zhang Z, et al. Production of bioactive human beta-defensin-4 in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner. Protein J, 2010, 29(5): 314–319.
- [18] Satakarni M, Curtis R. Production of recombinant peptides as fusions with SUMO. Protein Expr Purif, 2011, 78(2): 113–119.
- [19] Marblestone JG, Edavettal SC, Lim Y, et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. Protein Sci, 2006, 15(1): 182–189.
- [20] Lee CD, Sun HC, Hu SM, et al. An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins. Protein Sci, 2008, 17(7): 1241–1248.
- [21] Sun Z, Xia Z, Bi F, et al. Expression and purification of human urodilatin by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia*. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78(3): 495–502.
- [22] Truong L, Hevener KE, Rice AJ, et al. High-level expression, purification, and characterization of *Staphylococcus aureus* dihydroorotase (PyrC) as a cleavable His-SUMO fusion. Protein Expr Purif, 2013, 88(1): 98–106.
- [23] Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, et al. SUMO fusion technology for difficult to express proteins. Protein Expr Purif, 2005, 43(1): 1–9.
- [24] Wang Z, Li H, Guan W, et al. Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility. Protein Expr Purif, 2010, 73(2): 203–208.
- [25] Diban N, Haimi S, Bolhuis-Versteeg L, et al. Hollow fibers of poly (lactide-co-glycolide) and poly (ϵ -caprolactone) blends for vascular tissue engineering applications. Acta Biomater, 2013, 9(5): 6450–6458.

(本文责编 陈宏宇)