

TTTTGGACTGGTTTTT-3'。上游引物中引入Nde I位点；下游引物中引入BamH I位点和6His标签。PCR反应条件：94 °C预变性3min；94 °C 30 s，58 °C 30 s，72 °C 90 s，30个循环。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，切胶回收目的片段，连接入pUCm-T载体，转化DH5 α 感受态细菌，Amp⁺平板筛选。挑取阳性单菌落，抽提质粒，用Bam H I和Nde I双酶切测序正确的pUCm-T/ mGM-CSF质粒和pET-11c表达载体，连接，转化DH5 α 感受态细菌，酶切鉴定。

1.5 mGM-CSF蛋白的表达

将连接正确的表达质粒转化入BL21(DE3)感受态细菌。挑取单菌落，接种于10 ml TH肉汤培养基(Amp⁺)中小量摇菌，250 r/min，37 °C培养过夜，1:100活化至1 L TH肉汤培养基(Amp⁺)中扩大培养，37 °C振荡至OD600 1.0，加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG，32 °C诱导4 h，6 000 g离心10 min，收集菌体，用菌体洗涤液(20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)洗涤，SDS-PAGE鉴定。

1.6 包涵体的提取

按1:10(w/v)用菌体裂解液(50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、1 mg/ml溶菌酶，pH8.0)重悬菌体，超声破碎后，4 °C、12 000 g离心15 min，收集沉淀。按1:10(W/V)依次用包涵体洗涤液A(20 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L EDTA, pH8.0)、B(20 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L EDTA、2 mmol/L β -ME、0.1% Triton X-100, pH8.0)、C(20 mmol/L Tris-HCl、2 M Urea、2 mmol/L EDTA, pH8.0)、D(20 mmol/L Tris-HCl、50%异丙醇、2 mmol/L EDTA, pH8.0)、E(20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)洗涤包涵体。12 000 g离心15 min，沉淀为包涵体。

1.7 蛋白的变、复性

按1:10(W/V)的比例用7 M盐酸胍变性液(50 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、100 mmol/L β -ME、7 mol/L Gu·HCl, pH8.0)溶解包涵体，16 000 g离心15 min，收集上清。采用含低浓度盐酸胍(0.75 mol/L、1.0 mol/L、1.25 mol/L、1.5 mol/L、1.75 mol/L、2.0 mol/L)的谷胱甘肽复性液(50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L GSSG、1 mmol/L GSH, pH8.0)对变性蛋白进行稀释复性，即在磁力搅拌下，将变性蛋白以20 μ l/20 sec的速度稀释于14倍体积的复性液中，置于4 °C 12 h。4 °C、16 000 g离心15 min，收集上清。700 g、4 °C超滤离心，将复性蛋白更换至0.1 mol/L PBS缓冲液体系并浓缩5倍。

1.8 表达产物的纯化

取复性蛋白过Ni²⁺亲和树脂层析柱，然后用平衡液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L咪唑(Imidazole), pH8.0)和洗涤液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 60 mmol/L Imidazole, pH8.0)依次清洗柱，最后用洗脱液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 300 mmol/L Imidazole, pH8.0)洗脱目的蛋白，收集吸收峰。纯化产物进行15% SDS-PAGE, Bradford法检测蛋白浓度。

1.9 Western blotting鉴定

15% SDS-PAGE电泳分离蛋白，利用半干电转仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜上，丽春红S染色检测转膜效果。用2%脱脂奶粉于37 °C封闭2 h后，加入鼠源HisoTag[®]单克隆抗体(1:4 000稀释)37 °C孵育1 h，PBST洗涤6次，加入偶联辣根过氧化物酶的羊抗鼠IgG二抗(1:500稀释)室温孵育30min。洗涤后用DAB显色试剂盒显色。

1.10 生物学活性检测

取BALB/c小鼠骨髓细胞作为检测细胞，用噻唑蓝(MTT)法进行测定。拉颈处死8~10周BALB/c小鼠，分离股骨和胫骨，用1 ml注射器吸取无血清RPMI 1640冲洗骨髓腔，收集骨髓细胞。用无血清RPMI 1640洗涤细胞3次，然后用含10%小牛血清的RPMI 1640稀释细胞，以每孔105个细胞接种于96孔板中，待测样品与标准品分别用含10%小牛血清的RPMI 1640倍比稀释后加到各孔，检测液总体积200 μ l。37 °C、5%CO₂培养箱培养96 h后，加入5 g/L MTT染料20 μ l/孔，继续培养4 h后吸出培养上清，每孔加100 μ l DMSO，震荡10 min后测定D570。

2.1 pET-11c/mGM-CSF表达载体的构建与鉴定

PCR扩增的mGM-CSF基因片段长度为372 bp，与预计大小相符。将其插入pUCm-T载体，转化宿主菌DH5 α ，提取质粒，DNA序列分析证实与国外文献的报道一致。重组表达质粒pET-11c/mGM-CSF经Bam HI和Nde I双酶切鉴定，得到相应的片段(图1)。

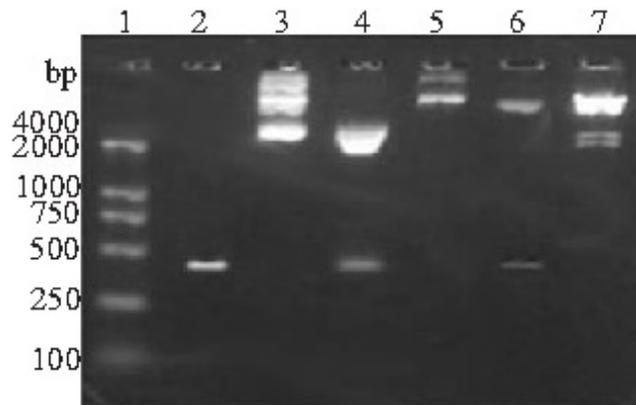


图1 pET-11c/mGM-CSF表达载体的构建与鉴定

Fig.1 Construction and identification of pET-11c/mGM-CSF expression vector

2.2 蛋白表达及包涵体提取

重组质粒pET-11c/mGM-CSF转化BL21(DE3)感受态细菌，经IPTG诱导表达，目的蛋白占菌体总蛋白的60.6%，以包涵体的形式存在，分子量为14.4 kDa，与文献报道一致。采用本实验室专利方法提取包涵体，目的蛋白纯度达80%(图2)。

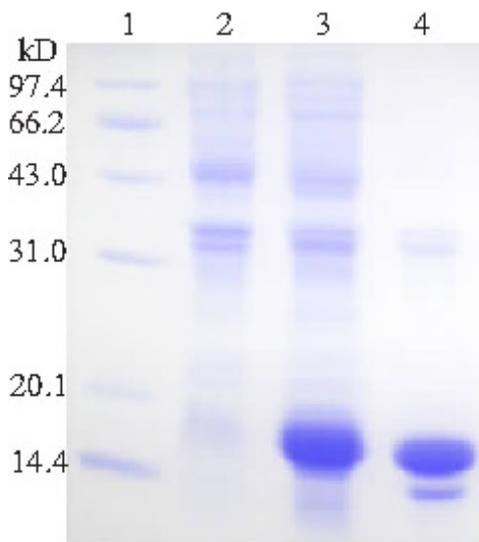


图2 mGM-CSF蛋白的表达及其纯化、鉴定

Fig.2 Expression, purification and identification of mGM-CSF

Lane 1: Protein molecular weight marker; Lane 2: BL21/pET-11c/ mGM-CSF before induction; Lane 3: BL21/pET-11c/mGM-CSF after induction; Lane 4: mGM-CSF IB

2.3 蛋白的变、复性

包涵体溶解于7 mol/L盐酸胍变性液，继而分别在含不同浓度盐酸胍的复性液中稀释复性，结果表明，盐酸胍浓度低于1.5 mol/L时，蛋白比活随着盐酸胍浓度的增加而升高；在1.5 mol/L时，蛋白比活最高，达 4.2×10^6 U/mg，约为标准品比活的84%，并且在这一过程中几乎无蛋白析出；之后，随着盐酸胍浓度升高，

蛋白比活逐渐下降(图3)。

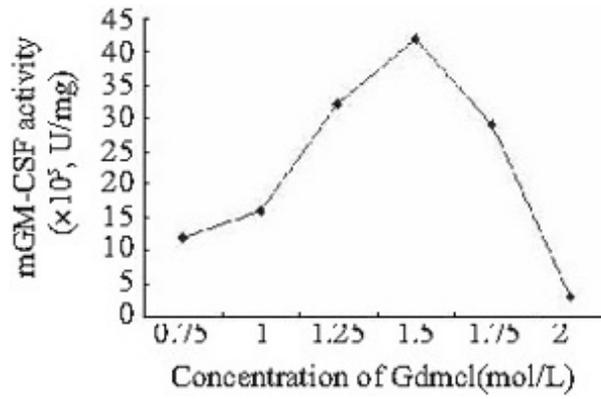


图3 不同浓度的盐酸胍复性液对mGM-CSF蛋白复性的效果
Fig.3 Influence of GdmCl concentration on mGM-CSF renaturation

2.4 目的蛋白的纯化、免疫学及生物学活性鉴定

复性后蛋白经过亲和层析一步纯化，纯度达95%以上(图4)。Western blot结果证实，目的蛋白是带有6His标签的重组蛋白。MTT法检测结果表明，纯化蛋白的比活达 5×10^6 U/mg，与标准品相当(图5)。

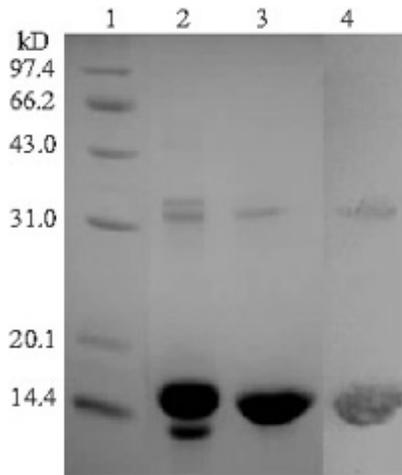


图4 mGM-CSF蛋白的纯化及鉴定

Fig.4 Expression, purification and identification of mGM-CSF by Western blotting
Lane 1: Protein molecular weight marker; Lane 2: mGM-CSF IB; Lane 3: mGM-CSF protein purified by affinity chromatography; Lane 4: Western blotting of mGM-CSF protein

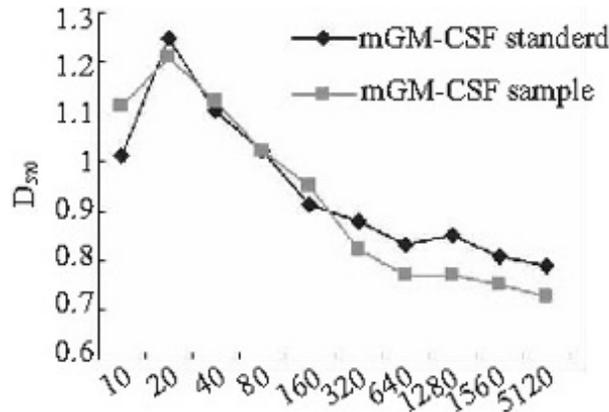


图5 纯化mGM-CSF蛋白的活性测定

Fig.5 Biological activity detection of recombinant GM-CSF protein with murine marrow cells

3 讨论

为进一步研究DC和GM-CSF的体内抗肿瘤功能,以及满足IL-2/GM-CSF双功能分子新生物学功能研究对mGM-CSF对照的大量需求,本研究构建了高效表达mGM-CSF的工程菌BL21/pET-11c/mGM-CSF,目的蛋白表达量达60.6%,采用本实验室专利方法提取的包涵体纯度达80%,有利于蛋白复性。表达产物携带6His标签,为纯化提供了便利。

本实验采用pH8.0的谷胱甘肽氧化还原系统作为复性母液,并在其中添加低浓度盐酸胍作为复性辅助因子,这是因为盐酸胍能保护解叠的或部分折叠分子的疏水基,防止它们相互作用而聚集[7], [8],蛋白在盐酸胍的保护下缓慢折叠,有助于正确构象的形成。据文献报道,在复性液中加入1.25 mol/L的盐酸胍可使1g/L变性的溶菌酶几乎全部复性[9]。我们比较了盐酸胍浓度对mGM-CSF复性的影响,发现在盐酸胍为1.5 mol/L时复性效果最好,并且整个过程中几乎无蛋白析出。所采用的这一蛋白变、复性方法简单有效,采用强变性剂盐酸胍变性包涵体,蛋白得率高;而稀释至低浓度的盐酸胍是很好的复性促进剂,从变性到复性无需经过体系转换;用逐滴稀释方法复性,实现了高蛋白浓度下的复性[10],大大减少了复性液的使用。

本研究建立了mGM-CSF蛋白的表达、复性和纯化工艺,纯化后蛋白纯度达95%以上,比活与标准品相当,可满足mGM-CSF的体内外功能研究的需要,为国内大量展开DC、GM-CSF等体内抗肿瘤功能研究提供了基础。

(责任编辑:吴锦雅)

参考文献:

- [1]孙卫民,王惠琴.细胞因子研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1999:620-6.
- [2]Markowicz S, Engleman EG. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro [J]. J Clin Invest 1990, 85, 955-961.
- [3]Sief CA. Hematopoietic growth factors[J]. J Clin Invest 1987, 79, 1549-57.
- [4]Sisson SD, Dinarello CA. Production of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor by human mononuclear cells stimulated with granulocyte-macrophage colony stimulating factor[J]. Blood, 1988, 72: 1368-74.
- [5]Elias EG, Zapas JL, Beam SL, et al. GM-CSF and IL-2 combination as adjuvant therapy in cutaneous melanoma: early results of a phase II clinical trial[J]. Oncology (Williston Park), 2005, 19 (4 Suppl 2): 15-8.
- [6]Shi YF, Liu CH, Roberts AI, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know[J]. Cell Res, 2006, 16: 126-33.
- [7]吴丽金,陈宇光.包涵体内重组蛋白质的复性[J].生命的化学,2001,21(4):315-8.
- [8]方敏,黄华樑.包涵体蛋白体外复性的研究进展[J].生物工程学报,2001,17(6):608-12.
- [9]Diane L. Hevehan, Eliana De Bernardez Clark. Oxidative renaturation of lysozyme at high concentrations[J]. Biotechnol Bioeng, 1997, 54(3): 221-30.
- [10]de Bernardez CE. Refolding of recombinant proteins[J]. Curr Opin Biotechnol, 1998, 9(2): 157-3.