



投稿



查稿



网上商城



考试



期刊



视频

专科文献



在线投稿



稿件查询



期刊阅读



搜索

请输入您想要的信息

搜索

高级搜索

您当前位置: 首页 >> 专科文献 >> 血液内科

血液内科

新型重组免疫抑制融合毒素蛋白B7-2-PE40KDEL的分离纯化

发表时间: 2011-12-9 9:25:14 来源: 创新医学网医学编辑部推荐

作者: 关海容,孙玉英,袁志宏,张惠丽,梁飞 作者单位: 军事医学科学院附属医院免疫学研究室及国家生物医学分析中心免疫学研究室, 100071

【摘要】为了建立高效快捷能分离大量重组B7-2-PE40KDEL融合蛋白的下游纯化路线,比较了不同组合的纯化策略和条件,包括反相层析、金属螯合层析、阴离子交换层析、蓝染料亲和层析和凝胶过滤层析等,并采用MTT法检测该融合蛋白的靶向杀伤活性。结果表明,在反相层析分离中疏水相分别采用了常规的甲醇和乙腈,结果为所分离的该重组融合蛋白均发生了变性,从色谱柱中分离出来就生成了絮状沉淀。在蓝染料亲和层析一步分离中,由于全菌体蛋白中与亲和树脂发生非特异结合的成分较多,极难区分目的蛋白和杂蛋白。但是,PRSETA-B7-2-PE40KDEL表达载体上带有翻译增强序列T7-g10,可在表达目的蛋白N端融合6个组氨酸,这十分有利于通过Ni-NTA金属螯合层析快速高纯度地纯化表达产物。根据这一特性,经反复筛选实验设计最终确定了金属螯合层析、阴离子交换层析和凝胶过滤层析三步法的纯化路线,用于纯化分离 B7-2-PE40KDEL融合蛋白。所得的目的蛋白的纯度可达95%以上,总回收率为8%。Western-blot实验显示,所得蛋白可与B7-2及PEA抗体特异性结合;MTT生物活性测定表明,该融合蛋白对表达CD28受体的人T细胞系Jurkat产生特异性杀伤作用,而对不表达CD28的淋巴细胞系Raji无任何杀伤作用。结论:建立了高效快速纯化大量重组B7-2-PE40KDEL融合蛋白的技术路线,所纯化的重组B7-2-PE40KDEL融合蛋白能特异性靶向杀伤表达CD28受体的人T细胞。

析法快速高纯度地纯化表达产物。根据这一特性,经反复筛选实验设计最终确定了金属螯合层析、阴离子交换层析和凝胶过滤层析三步法的纯化路线,用于纯化分离 B7-2-PE40KDEL融合蛋白。所得的目的蛋白的纯度可达95%以上,总回收率为8%。Western-blot实验显示,所得蛋白可与B7-2及PEA抗体特异性结合;MTT生物活性测定表明,该融合蛋白对表达CD28受体的人T细胞系Jurkat产生特异性杀伤作用,而对不表达CD28的淋巴细胞系Raji无任何杀伤作用。结论:建立了高效快速纯化大量重组B7-2-PE40KDEL融合蛋白的技术路线,所纯化的重组B7-2-PE40KDEL融合蛋白能特异性靶向杀伤表达CD28受体的人T细胞。

【关键词】 重组外毒素融合蛋白

Abstract This study was aimed to establish downstream purification procedure by which the protein of interest can be purified to higher purity rapidly and efficiently. The different combinations of various purification strategies, methods and conditions were compared, including reversed phase chromatography, metal chelating chromatography, anion exchange chromatography, blue dye affinity chromatography, filtration chromatography and so on. The results showed that in reversed phase chromatography, isolated protein of interest was denatured and precipitated immediately after chromatography because methanol or acetonitrile were adopted as the organic phase. In blue dye affinity chromatography expecting to purify the protein of interest in one step, protein of interest was difficultly differentiated from mixed protein as much proteins bound to the chromatography media by non-specific affinity. While there is a translation-enhancing sequence T7-g10 in the PRSETA-B7-2-PE40KDEL expression vector, so it adds 6 histidines to the N terminus of the protein of interest, this allows to purify the protein of interest by metal chelating chromatography. Based on this characteristic, a three-step chromatography line including metal chelating chromatography, anion exchange chromatography and filtration chromatography was finally established after repeated experiments. By this way the purity of protein of interest reached 95% and the total recovery rate was 8%. The result of Western blot indicated that the expressed and purified recombinant B7-2-PE40KDEL could specifically bind with mAb against human B7-2 and multiple antibody against PEA. The cytotoxicity of the recombinant toxin tested by MTT method showed that the B7-2-PE40KDEL could selectively kill Jurkat cell line expressing CD28 receptor well and had no killing effect on the Raji cell line unexpressing CD28 receptor. It is concluded that a high efficient and speedy three-step purification procedure for the purifying recombinant

特色服务

Serves

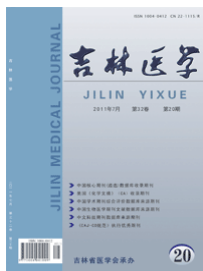
- 在线投稿
- 投稿指南
- 绿色通道
- 特色专区
- 服务流程
- 常见问题
- 编辑中心
- 期刊阅读

期刊约稿

- 中国社区医师
- 医学信息
- 吉林医学
- 按摩与康复医学
- 临床合理用药杂志

推荐期刊

吉林医学



- 期刊介绍
- 在线阅读
- 在线订阅
- 在线投稿

职称晋升政策汇总

让您的晋升不留下半点遗憾

Key words recombination exotoxin fusion protein;B7-2-PE40KDEL;protein purification;selective killing;biological activity

众所周知,在原核表达载体的宿主菌大肠杆菌菌体内有上千种的各种杂蛋白,有些蛋白在很多方面与外源重组蛋白具有相同或相似的理化特性,甚至可能会与外源重组蛋白发生非特异性作用乃至于将其酶解,因此,重组蛋白质的纯化分离始终是基因工程研究中一个重要的限速环节[1, 2]。再者,由于不同的重组蛋白的理化性质千差万别,不可能有一个适于纯化各种蛋白固定的纯化模式或程序,因此必须根据不同重组目的蛋白的特性选择组合不同的纯化方案。这往往需要反复摸索各种纯化条件方能建立起比较理想的能适合相应目的蛋白的纯化策略或方法[3, 4]。

近年来人们在探索重组蛋白的下游纯化研究中,为了更快、更好、更有效地分离纯化目的蛋白,提高纯化效率,多倾向于在最初设计构建重组蛋白时,就在其N端或C端添加一段相关序列,以作为纯化标记。目前这样的纯化标记有多种,如GST、6个组氨酸等等。它们的共同特点就是可以与相应的亲和树脂高特异性的结合,从而极大地提高纯化的效率[5-7]。本研究室在设计构建pRSETa-B7-2-PE40KDEL表达载体时,首先考虑到了上述业已存在的纯化问题[8]。所以,除了在其表达载体上采用了带有翻译增强和蛋白稳定序列T7-g10外,还在所要表达的目的蛋白B7-2-PE40KDEL N端融合有6个组氨酸的标签,这将十分有利于通过高选择性亲和和二价镍离子(nickel-nitrilotriacetic acid Ni-NTA)金属螯合层析法高效纯化表达产物。本研究旨在通过比较多种纯化方法及多种纯化条件,最终确立一条能高效、快捷、行之有效的可分离大量新型重组免疫抑制融合蛋白B7-2-PE40KDEL的下游纯化路线。

材料和方法

菌种

pRSETa-B7-2-PE40KDEL/BL21 pLysE为本研究室构建保存的工程菌种[8]。

主要试剂和材料

咪唑及兔抗PEA多抗(Sigma公司),胰蛋白酶、酵母提取物(Oxoid公司),MTT、NBT/BCIP试剂盒及碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体(华美生物工程公司),硝酸纤维素膜(Amersham Pharmacia),Tris(Augis),透析袋(Pierce公司),0.22 μm滤膜、滤器(Pall公司),超滤器(Millipore公司)。2YT培养基按照《分子克隆实验指南》配制。树脂分别为Ni-NTA binding resin(Novagen公司),Mono Q HR(5/5)及Superdex 75(Amersham Pharmacia)。

工程菌的培养及诱导表达

将工程菌种pRSETa-B7-2-PE40KDEL/BL21 pLysE接种于2YT培养基中,30℃培养12小时,按2%浓度接种于2YT培养基Amp+中,22℃培养5.5小时,然后加入0.1 mmol/L IPTG诱导培养12小时。

包涵体上清的分离

将大量诱导表达的菌液于4℃ 4500 rpm离心20分钟,收集菌体。以1/20体积的缓冲液重悬冻于-20℃,1小时后室温水浴融化,再冻融2次,超声破碎仪冰浴破碎(德国Braun公司)(大探头,功率100,时间20秒,频率0.5赫兹,重复3次),4℃ 12000 rpm离心15分钟,将获得的上清以0.2 μm滤膜过滤备用。

金属螯合层析

以3倍体积的缓冲液〔50 mmol/L Na₂HPO₄ (pH 7.2)、0.3 mol/L NaCl〕平衡金属螯合层析柱,然后将滤好的包涵体上清上样于His-binding柱,流速为1 ml/min,再以3倍体积的缓冲液冲洗后,以洗涤液〔50 mmol/L Na₂HPO₄ (pH 7.2)、0.3 mol/L NaCl、40 mmol/L咪唑〕冲洗至紫外吸收值不再变动,以收集液〔50 mmol/L Na₂HPO₄ (pH 7.2)、250 mmol/L咪唑〕洗柱并分段收集,10% SDS-PAGE检测纯化的结果。

阴离子交换层析

将经金属螯合层析纯化后的目的蛋白对透析液〔50 mmol/L Na₂HPO₄ (pH 7.2)、2 mmol/L EDTA、0.1 mol/L NaCl〕透析(1:50),期间换液2次备用;以含10%B液的A液〔50 mmol/L Na₂HPO₄ (pH 7.2)、2mmol/L EDTA〕平衡Mono Q阴离子交换柱后,以1 ml/min的流速将透析后的蛋白液上样,再以3 ml含10%B液的A液平衡层析柱后,进行梯度洗脱,即经20分钟B液〔50 mmol/L Na₂HPO₄ (pH 7.2)、2 mmol/L EDTA、1 mol/L NaCl〕含量由0至100%,流速是1 ml/min,分段收集与按峰收集相结合,无峰处每1 ml一收,有峰处起每0.5 ml一收,10% SDS-PAGE检测纯化的结果。

凝胶过滤

以3倍柱体积的C液〔50 mmol/L Na₂HPO₄ (pH 7.2)、2 mmol/L EDTA、0.2 mol/L NaCl〕平衡凝胶柱Superdex 75后,用YM10超滤浓缩阴离子交换纯化后的目的蛋白液,取200 μl上样后,以C液进行分离,流速为0.3 ml/min,分段收集与按峰收集相结合,无峰处每1 ml一收,有峰处起每0.5 ml一收,10% SDS-PAGE检测纯化的结果。

我要立即投稿

--最便捷的绿色通道

在线客服...

QQ留言 1254635326
QQ交谈 4006089123
545493140(重要)
400-6089-123 68590972

将纯化后的目的蛋白液分别制样进行10% SDS-PAGE蛋白电泳, 将分离胶胶片与硝酸纤维素膜用转移缓冲液平衡30分钟, 并将专用滤纸用转移缓冲液浸湿。按照半干转移仪说明操作, 将蛋白转移到膜上;用含10%的小牛血清/PBS/叠氮钠液封闭2小时, 加入一抗孵育1-2小时;用PBS洗涤3次后, 再用0.1 mmol/L Tris-HCl、0.05 mol/L NaCl洗涤, 尽量将磷酸盐洗净;然后用10%小牛血清、Tris-HCl作为二抗稀释液稀释二抗, 二抗与膜孵育1小时;随后用0.1 mol/L Tris-HCl、0.15 mol/L NaCl至少洗涤3次, 最后用NBT/BCIP试剂盒进行显色, 至适当显色程度用蒸馏水洗去染色液终止反应。

蛋白含量的测定

考马斯亮蓝G-250法(Bradford法), 标准蛋白溶液由BSA 配制。紫外吸收法: 用紫外分光光度计, 分别测定蛋白溶液在280 nm、260 nm下的吸收值, 按照公式计算。

特异性杀细胞活性的MTT法检测

分别收集处于对数生长期的Jurkat细胞和Raji细胞, 将细胞用RPMI 1640洗3遍后计数, 以 5×10^4 个/孔的细胞浓度加入96孔培养板中, 将纯化的蛋白以0.22 μ m孔径的滤膜过滤除菌后, 按照2倍梯度稀释后加入培养孔中, 37°C、5% CO₂、全湿度条件下培养72小时, 用MTT法检测B7-2-PE40KDEL融合蛋白的细胞毒杀伤作用。

结果

pRSETa-B7-2-PE40KDEL/BL21 pLysE表达菌体的破碎

经2次冻融后, 大量菌体已经破碎, 但是, 由于大量核酸的释放破菌液变得非常粘稠, 经3次超声破菌后, 破菌效果比较彻底, 破菌液变为半透明状, 粘度显著下降, 经高速离心后, 有少量沉淀主体为半透明凝胶状, 其主要成分为DNA 和细胞膜碎片, 上清为淡黄色澄清液体。

B7-2-PE40KDEL融合蛋白的金属螯合层析结果

超声破碎表达菌后, 离心收集包涵体上清, 进行Ni-NTA金属螯合层析。经较高浓度咪唑(250 mmol/L)洗脱后, 收集洗脱峰, 目的蛋白和其它一些杂蛋白被洗脱下来, 如图1所示, 从电泳结果可见, 此时目的蛋白的纯度可达85%。

B7-2-PE40KDEL融合蛋白阴离子交换层析结果

经金属螯合层析的目的蛋白再经阴离子交换层析后其纯度达到约90%。图2展示了采用MonoQ柱层析进行盐梯度洗脱的结果, 目的蛋白主要位于峰1中, 在盐浓度达到0.4 mol/L时开始洗下。图3为此峰收集液的10% SDS-PAGE结果。

B7-2-PE40KDEL融合蛋白凝胶过滤层析结果

为获得更好的分离效果, 我们采用凝胶过滤层析进一步分离经前两步层析纯化后的目的蛋白, 通过降低上样体积和洗柱速度, 目的蛋白和杂蛋白能够得以更好地分离。图4展示了凝胶过滤层析的层析过程, 目的蛋白在8 ml开始洗下, 位于峰1中。图5展示了峰1收集液的10% SDS-PAGE结果, 经凝胶扫描分析显示目的蛋白纯度约为95%。图中箭头所指条带即为目的蛋白。

融合蛋白纯化效率及回收率

我们知道, 任何分离纯化过程都会有不同程度的目的蛋白的丢失或损耗, 在蛋白质工程研究中对于目的蛋白的分离纯化回收率和纯化效率的计算是一个必要过程。附表所示为本研究中各层析过程重组B7-2-PE40KDEL融合蛋白回收率和纯化效率。经Ni-NTA金属螯合层析+Mono Q阴离子层析+ Superdex 75凝胶过滤层析三步纯化, B7-2-PE40KDEL融合蛋白的最终回收率为8%。

B7-2-PE40KDEL融合蛋白纯化产物免疫印迹鉴定

Western blot检测Ni-NTA金属螯合层析、MonoQ阴离子层析及Superdex 75凝胶过滤层析各步纯化产物免疫印迹的结果见图6。由图6可见, 各部分离纯化的产物菌能与B7-2单克隆抗体和PEA多抗发生特异反应, 在70 kD处出现明显的反应带, 而对对照菌相应位置则没有免疫印迹条带。

MTT法检测特异性杀细胞活性的结果

MTT的结果显示, 重组融合蛋白在10 ng/ml的剂量下对Jurkat细胞有显著的杀伤效应, 剂量达到1 000 ng/ml时其杀伤效率可达90%, 计算其LD₅₀为160 ng/ml;而对CD28阴性的Raji细胞, 即便是在2 000 ng/ml的剂量下也未观察到任何杀伤效应, Raji细胞生长良好。由此初步证实, 我们所设计构建的全新型重组B7-2-PE40KDEL融合蛋白对CD28阳性靶细胞具有选择性杀伤效应(图7)。

讨论

人们对于未知蛋白的纯化, 通常可有多种的选择如有离子交换法、凝胶过滤法、疏水层析法、反相层析法以及亲和层析法。各种方法有各自的特点, 如离子交换是利用不同蛋白质在一定pH条件下电荷数的不同用不同的盐度从低到高洗脱, 一般碱性蛋

白采用阳离子交换, 酸性蛋白使用阴离子交换;凝胶过滤法又称分子筛, 即按照蛋白分子量的大小分离, 大分子先分出, 小分子后分出, 可用于脱盐;疏水层析则利用蛋白的疏水性, 亲水性强的蛋白首先流出, 疏水性强的后流出, 它与离子交换相反, 用盐从高盐度洗至低盐度, 因此它可以与离子交换联用, 用于分离蛋白并脱盐;反相层析则是根据蛋白的极性与非极性分离, 在这一方法中, 反相的流动相通常采用有机溶剂如甲醇、乙腈及异丙醇。由于蛋白在有机溶剂中的溶解度一般较低, 容易产生沉淀, 变性失活, 因此首选用的比较少, 但反相层析的分辨率在所有的分离方法中是分辨率最高的;亲和层析则是在所有的纯化方法中特异性最强的[9]。

对于重组细胞因子外毒素免疫毒素的纯化而言, 用的较多是离子交换和凝胶过滤方法, 采用的分离方法多为阴离子交换, 用的交换介质大部分为Pharmacia生产的Mono Q介质;凝胶过滤则采用TSK, 如Kreitman等[10]对于IL6-PE40系列融合蛋白纯化即用的此路线, 而对于DAB389-IL2采用反相层析取得了比较好的效果。其他细胞因子外毒素融合蛋白纯化步骤由于未见文献报道而不知晓[11]。

在最初选用的反相层析分离中, 流动相分别采用了常规的甲醇和乙腈, 结果显示所分离的该重组融合蛋白均发生了变性, 从色谱柱中分离出来就生成了絮状沉淀。随后又采用了染料亲和层析, 试图一步分离得到活性产物。然而由于全菌体蛋白中与介质发生非特异结合的成分较多, 极难区分目的蛋白和杂蛋白。需强调说明的是, 由于PRSETA-B7-2-PE40KDEL表达载体上带有翻译增强序列T7-g10, 可在表达目的蛋白N端融合6个组氨酸, 这十分有利于通过金属螯合层析法快速高纯度地纯化表达产物。根据这一特性, 经反复筛选精心设计我们最终确定组合了金属螯合层析、阴离子交换层析和凝胶过滤层析组合的三步法的纯化路线, 用于纯化分离 B7-2-PE40KDEL融合蛋白。由此纯化的目的蛋白的纯度可达95%以上, 总回收率为8%。这一纯化路线所纯化的重组B7-2-PE40KDEL融合蛋白能特异性靶向杀伤表达CD28受体的人T细胞。

【参考文献】

- 1冯小黎, 金业涛, 苏志国. 分离纯化中蛋白质的不稳定性及其对策. 生物工程进展, 2000;20: 67-71
- 2唐松山, 刘钟滨. 大肠杆菌外源基因表达产物的下游技术. 国外医学·遗传学分册, 1995;18: 124-127
- 3Rudolph R, Lilie H. In vitro folding of inclusion body proteins. FASEB J, 1996;10: 49-56
- 4Vuillard L, Rabilloud T, Goldberg ME. Interactions of non-detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate in vitro protein renaturation. Eur J Biochem, 1998;256: 128-135
- 5Dobson CM, Evans PA, Radford SE. Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far. Trends Biochem Sci, 1994;19: 31-37
- 6Vuillard L, Marret N, Radbilloud T. Enhancing protein solubilization with nondetergent sulfobetaines. Electrophoresis, 1995;16: 295-297
- 7Rozema D, Gellman SH. Artificial chaperones: protein refolding via sequential use of detergent and cyclodextrin. J Am Chem Soc, 1995;117: 2373-2374
- 8袁志宏, 奚永志, 张惠丽等. 新型重组免疫抑制蛋白B7-2-L-PE40KDEL的分子构建与生物活性及结构分析. 中华医学杂志, 2002;82: 1541-1545
- 9夏其昌. 蛋白化学研究技术与进展. 北京: 科学出版社, 1999: 1-7
- 10Kreitman RJ, Pastan I. Purification and characterization of IL6-PE4E, a recombinant fusion of interleukin 6 with Pseudomonas exotoxin. Bioconing Chem, 1993;4:581-585
- 11Williams MD, Rostovtsev A, Narla RK, et al. Production of recombinant DT ct GM-CSF fusion toxin in a baculovirus expression vector system for biotherapy of GM-CSF-receptor positive hematologic malignancies. Protein Expr Purif, 1998;13: 210-221.

最热点



考试宝典-高分练兵场



揭秘论文“低价”根源



医学编辑中心



邮箱投稿视频教程



★ 加入收藏夹 👤 复制给朋友 📡 分享到外站

评论内容

请文明上网，文明评论。

发表评论 重置

▲ 上一页

当前第1页，共1页

▼ 下一页