

小鼠粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子的表达、纯化与鉴定

温茜¹, 马骊¹, 苏瑾¹, 罗微¹, 王小宁²(¹南方医科大学生物技术学院分子免疫学研究所, 广东 广州 510515; ²华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510641)

摘要:目的 构建小鼠粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子(mGM-CSF)工程菌,通过摸索其变、复性和纯化条件,得到高纯度高比活的重组 mGM-CSF 蛋白。方法 以本实验室构建的 hIL-2/mGM-CSF 融合蛋白表达载体为模板,PCR 扩增 mGM-CSF 基因,克隆入 pET-11c 表达载体,转化 BL21,构建 BL21/pET-11c/mGM-CSF 工程菌,用本所专利方法提取包涵体,在含低浓度盐酸胍的复性液中复性,采用镍离子亲和层析纯化。结果 工程菌采用 TH 肉汤培养,32 ℃、0.1 mmol/L IPTG 双重诱导,表达量达菌体蛋白总量的 60.6%。提取包涵体在含 1.5 mol/L 盐酸胍的谷胱甘肽复性液中复性效果最好,比活达 4.2×10⁶ U/mg。经过亲和层析一步纯化,目的蛋白纯度达 95%,比活与标准品相当。结论 构建了高效表达 mGM-CSF 的工程菌,建立了其复性和纯化工艺,为进一步研究 DC、GM-CSF 体内抗肿瘤功能奠定了基础,并可为 IL-2/GM-CSF 双功能分子的生物学功能研究提供对照。

关键词:小鼠粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子;表达;纯化

中图分类号:R394.2 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)08-1124-04

Expression, purification and identification of mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

WEN Qian¹, MA Li¹, SU Jin¹, LUO Wei¹, WANG Xiao-Ning²

¹Institute of Molecular Immunology, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China

Abstract: Objective To construct mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (mGM-CSF) expression vector and express, purify and refold mGM-CSF protein. **Method** Based on previously constructed fusion protein hIL-2/mGM-CSF expression vector, pET-11c/mGM-CSF expression vector was constructed routinely and transformed into BL21 (DE3). The inclusion body protein was washed with our patented method and refolded with renaturation buffer containing low-concentration guanidinium chloride (Gu·Cl). The refolded protein was purified with affinity chromatography. **Results** pET-11c/mGM-CSF vector was constructed successfully. The host bacteria was cultured in TH broth and induced with 0.1 mmol/L IPTG at 32 ℃, which resulted in the expression level of 60.6%. The best refolding effect was achieved with the renaturation media containing glutathione and 1.5 mol/L Gu·HCl. After purification with affinity chromatography, the purity of the target mGM-CSF protein reached 95% with activity of 5×10⁶ U/mg. **Conclusion** Engineered bacteria BL21/pET-11c/mGM-CSF with efficient mGM-CSF expression and laboratory scale renaturation and purification of mGM-CSF have been established, which facilitates further researches into the anti-tumor function of the dendritic cells and GM-CSF *in vivo*.

Key words: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(mGM-CSF), mice; expression; purification

GM-CSF 能刺激粒细胞和巨噬细胞形成集落。重组人 GM-CSF 制剂作为治疗造血系统异常的有效药物,已得到广泛的临床应用^[1]。GM-CSF 在促进树突状细胞(DCs)、以及粒细胞、酸性粒细胞和巨噬细胞等前体细胞的增殖和分化中发挥关键作用^[2-4],从而诱导产生系统性的免疫反应;并通过促进抗原提呈而增强特异性免疫反应,在先天性免疫和适应性免疫之间建立联系,因而在抗肿瘤免疫中的作用越来越受到

重视。除作用于抗原呈递细胞和非特异性免疫细胞外,GM-CSF 还能增加活化 T 细胞表面 IL-2 受体的表达^[5],直接或间接地改变 T 细胞反应。近年来,GM-CSF 与 T 细胞活性之间的关系开始受到关注,不断深入的研究发现,GM-CSF 的功能研究和临床应用还有诸多值得探讨之处^[6]。

人和小鼠 GM-CSF 的基因同源性达 70%,氨基酸同源性达 56%,但两者的生物学功能具有种属特异性^[6]。本实验室创新性开展了 IL-2/GM-CSF 双功能分子的构建和抗肿瘤活性研究,mGM-CSF 成为其体内生物学功能研究必不可少的对照品,但其目前主要依赖进口,使研究成本大大增加。

本文构建了 mGM-CSF 原核高效表达载体,建立了其复性和纯化工艺,可为进一步研究 DC、GM-CSF

收稿日期:2006-06-20

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973)资助(2001CB510008)

Supported by national 973 Program (2001CB510008).

作者简介:温茜(1976-),女,硕士,助教,E-mail:wencaoxi@163.com

通讯作者:马骊,副教授,电话:020-61648322,E-mail:maryhmz@126.com;

王小宁,教授,电话:020-87114240,E-mail:xnwang@21cn.net

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 μl。37 °C、5%CO₂ 培养箱培养 96 h 后, 加入 5 g/L MTT 染料 20 μl/ 孔, 继续培养 4 h 后吸出培养上清, 每孔加 100 μl DMSO, 震荡 10 min 后测定 D₅₇₀。

2 结果

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 DH5α, 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)。

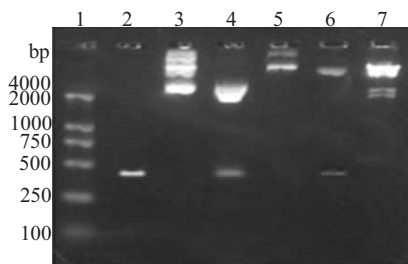


图 1 pET-11c/mGM-CSF 表达载体的构建与鉴定

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

Lane 1: DL2000 DNA ladder; Lane 2: PCR product of mGM-CSF gene; Lane 3: pUCm-T/mGM-CSF; Lane 4: pUCm-T/mGM-CSF digested by Bam HI and Nde I; Lane 5: pET-11c/mGM-CSF; Lane 6: pET-11c/mGM-CSF digested by Bam HI and Nde I; Lane 7: λ-Hind III digestion DNA ladder

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)。

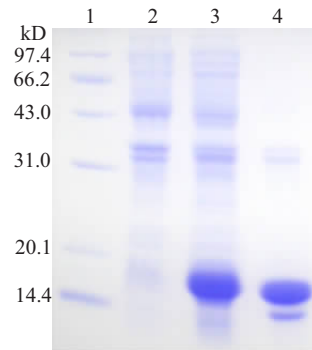


图 2 mGM-CSF 蛋白的表达及其纯化、鉴定
Fig.2 Expression, purification and identification of mGM-CSF

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 4.2×10⁶ 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)。

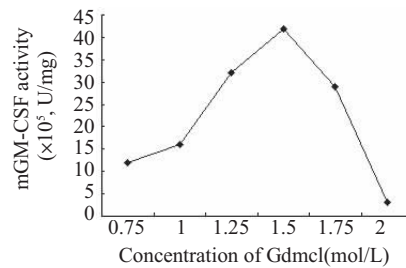


图 3 不同浓度的盐酸胍复性液对 mGM-CSF 蛋白复性的效果

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 5×10⁶ U/mg, 与标准品相当(图 5)。

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

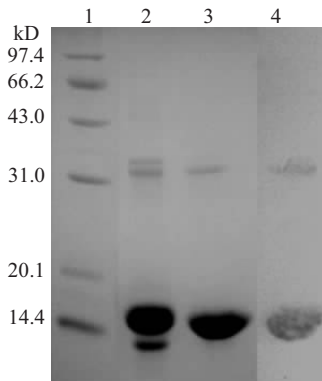


图 4 mGM-CSF 蛋白的纯化及鉴定

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

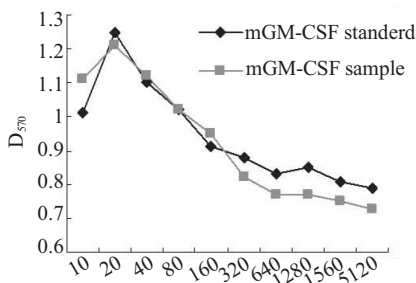


图 5 纯化 mGM-CSF 蛋白的活性测定

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

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。

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 recobinant proteins [J]. Curr Opin Bio-technol, 1998, 9(2): 157-3.

(责任编辑:吴锦雅)