

重组人白细胞介素 2-绿脓杆菌外毒素融合蛋白的纯化及复性

胡志明,林来兴妹,周明乾,陈泽洪,王小宁 (第一军医大学分子免疫研究所,广东 广州 510515)

摘要:目的 探讨该所发明的新方法对重组人白细胞介素 2-绿脓杆菌外毒素 (IL2-PE66^{4Glu})融合蛋白进行纯化与复性的效果。方法 采用该所发明的新方法提纯包涵体,包涵体复性后,样品经 DEAE-SepharoseFF 离子交换层析,获得融合蛋白纯品。结果 获得的具有生物学活性的融合蛋白纯度达到 95%,复性回收率为 80%。结论 此包涵体分离纯化技术简便、实用,可为中试研究和规模化生产提供基础。

关键词:白细胞介素 2;绿脓杆菌外毒素;融合蛋白;纯化;复性

中图分类号:R392.11 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2002)03-0206-02

Purification and renaturation of recombinant human interleukin-2-pseudomonas exotoxin IL2-PE66^{4Glu} fusion protein

HUZhi-ming,LINLAIxing-mei,ZHOUMing-qian,CHENZE-hong,WANGXiao-ning
InstituteofMolecularImmunology,FirstMilitaryMedicalUniversity,Guangzhou510515,China

Abstract Objective To evaluate the effect of a novel approach for purification and renaturation of recombinant human interleukin-2-pseudomonas exotoxin (IL2-PE66^{4Glu}) fusion protein. Methods A novel purification method established in our laboratory was adopted for the purification of the inclusion body, and after renaturation, recombinant human IL2-PE66^{4Glu} fusion protein was purified by DEAE-Sepharose FF ion-exchange chromatography. Results The purity of the fusion protein that retains its biological activity was as high as 95%, and a recovery rate over 80% of the refolded IL2-PE66^{4Glu} fusion protein was achieved. Conclusion The purification and refolding method for inclusion body adopted in this study is simple and practical, which lays the foundation for large-scale production of the fusion protein.

Keywords interleukin-2;pseudomonas exotoxin;fusion protein;purification;renaturation

当前,疾病的导向治疗已成为生物医学研究的热点,重组免疫毒素的利用不失为一条切实可行的途径。重组人白细胞介素 2-绿脓杆菌外毒素 (IL2-PE66^{4Glu}) 融合蛋白是通过 IL-2 基因与改构的绿脓杆菌外毒素基因在体外重组表达的一种嵌合蛋白,能通过 IL-2 识别 IL-2R 靶细胞并利用 Pseudomonas 的细胞毒性作用选择性地杀灭这类细胞,可用于移植物排斥反应以及某些淋巴瘤 T 淋巴细胞白血病、自身免疫性疾病的治疗 [1]。本所成功构建了 IL2-PE66^{4Glu} 融合基因并在大肠杆菌中高效表达,其表达产物以包涵体的形式存在。由于包涵体无活性且难溶解,因此其纯化复性一直是生物工程制药中的难点 [2]。我们应用本所发明的包涵体纯化工艺,对 IL2-PE66^{4Glu} 融合蛋白的纯化与复性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

PLY5-IL2-PE66^{4Glu} 工程菌株 (本所构建) [3];

Tryptone、Yeast Extract (Oxford); 尿素 (Promega); Tris (上海伯奥生物科技公司); DEAE-Sepharose FF (Pharmacia); 其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 IL2-PE66^{4Glu} 在大肠杆菌中诱导表达 从 LB 琼脂平板上挑取单菌落接种于 4ml LB 试管中,30 培养过夜,以 1:50 在 LB/M9 培养基中放大,30 培养至对数生长期,升温至 42 诱导培养 4h,离心收集菌体,蛋白电泳鉴定表达量。

1.2.2 包涵体制备 取 5g 菌体溶于 50ml 含 25mmol/L Tris-HCl (pH=8.0)、2mmol/L EDTA 培养液中,加溶菌酶 25mg,搅拌 10min 后,置于 4 冰箱过夜。冰浴中超声 30s×10 次,每次间隔 60s。裂解液于 4℃,10000r/min 离心 10min,收集沉淀。将沉淀物经 Tris 缓冲液清洗后,加 50ml 4mol/L 尿素在室温下作用 30min,充分搅拌后,10000r/min 离心 10min,收集沉淀。再用 50ml 0.5% Tritonx-100 (含 10mmol/L EDTA) 洗涤一遍,10000r/min 离心 10min,收集沉淀。最后用 10mmol/L Tris-HCl 清洗两遍以去除沉淀中可能含有的上述洗液。离心收集沉淀,即为包涵体。将包涵体经我所专利技术 (专利号: CN1169998A) 精制处理,即为精制包涵体。

1.2.3 IL2-PE66^{4Glu} 融合蛋白的复性 在进行复性条件

收稿日期:2001-10-15

基金项目:国家自然科学基金(39800164);广东省医学科研立项课题(A1998310)

作者简介:胡志明(1966-),男,湖北黄冈人,1997年毕业于第一军医大学,硕士,助理研究员,电话:020-85148322,E-mail:hzm@fimmu.edu.cn

研究时,仅一条件[如氧化型谷胱甘肽(GSSG)浓度、复性液 pH 值、复性时间]改变,其他维持不变。采用一步稀释(a)和分步稀释(b)两种方法复性:(a)将精制包涵体溶解于 8mol/L 尿素中,蛋白质浓度调至 7 mg/ml,4 ℃ 搅拌,每 10min 用复性液(pH8.0,含 20 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 4 mmol/L GSSG)将尿素浓度降低 1mol/L 直至终浓度为 1mol/L,然后将其一步降至 0.1mol/L,继续搅拌 10min 后,4 ℃ 放置 20h (b)取与(a)法同样样品,用复性液一步将尿素浓度稀释至 0.1mol/L,4 ℃ 放置 20h

1.2.4 IL2-PE66^{4Glu}融合蛋白的离子交换层析 DEAE-SepharoseFF 柱(4 cm×8 cm),用 20mmol/L Tris-HCl pH8.0 缓冲液平衡,将复性后的样品上柱,流速 2.0 ml/min,用 0~0.5 mol/L NaCl 线性梯度洗脱,分管收集各洗脱峰。蛋白电泳鉴定纯度。

1.2.5 IL2-PE66^{4Glu}融合蛋白生物活性测定^[4] 分别用刀豆蛋白(ConA)诱导的小鼠脾细胞,植物血凝素(PHA)诱导的人外周血淋巴细胞作靶细胞,检测 IL2-PE66^{4Glu}融合蛋白的杀伤效应。

2 结果

2.1 IL2-PE66^{4Glu}的表达

经 42 ℃ 诱导,收集菌体,10% SDS-PAGE 电泳,经考马斯亮蓝染色,在相对分子质量 80000 处有一明显表达带,经扫描,表达量约占菌体总蛋白量的 20% (图 1)。

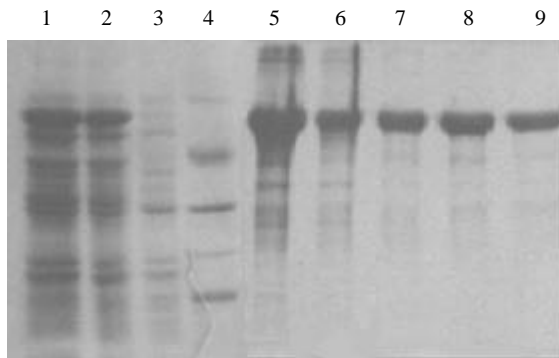


图 1 IL2-PE66^{4Glu}融合蛋白 SDS-PAGE(10%)电泳分析
Fig.1 SDS-PAGE 10% analysis of IL2-PE66^{4Glu} fusion protein

1,2: Total cellular lysate of *E. coli* at 42 ℃ ; 3: Total cellular lysate of *E. coli* at 30 ℃ ; 4: Low molecular weight protein markers ($M_r = 97000, 66200, 43000, 31000, 20000$); 5, 6: IL2-PE66^{4Glu} inclusion bodies; 7: Inclusion body purified by a novel invention; 8: IL2-PE66^{4Glu} after renaturation; 9: IL2-PE66^{4Glu} purified by DEAE-Sepharose FF ion-exchange chromatography

2.2 不同提纯法对包涵体的纯度及溶解性的影响

常规方法提取的包涵体纯度达到 60% 左右^[5]。采用新工艺对包涵体进行处理后,包涵体的纯度有了较

大的提高,经凝胶光密度图像分析系统分析,结果显示其纯度提高至 90% (图 1),且包涵体的可溶性大大提高,用 8mol/L 尿素溶解包涵体,在尿素浓度降低至 0.1mol/L 时,包涵体仍保持很高的溶解度,而用常规方法制备的包涵体,尿素浓度稀释至 4mol/L 时,有大量的蛋白析出。

2.3 IL2-PE66^{4Glu}融合蛋白的复性研究

两种方法复性结果显示,采用分步稀释法复性,复性的回收率是 80%,而采用一步稀释法复性,回收率为 50%。因此,采用分步稀释法复性 IL2-PE66^{4Glu} 优于一步稀释法。

2.4 IL2-PE66^{4Glu}融合蛋白的活性测定

用两种方法复性 IL2-PE66^{4Glu}, IL2-PE66^{4Glu} 对 PHA 诱导人外周血淋巴细胞的 50% 致死浓度分别是 25 和 28ng/ml,对 ConA 诱导小鼠脾细胞的 50% 致死浓度分别是 55 和 52ng/ml。

3 讨论

大肠杆菌具有结构简单、易培养、转化简便、高表达等优点,但其表达产物通常以不溶性的包涵体形式存在,为其纯化、复性带来了困难,因此解决好包涵体纯化与复性的问题对生物工程制药具有重大意义^[5]。我所构建的 IL2-PE66^{4Glu} 可在大肠杆菌内得到高效表达,表达产物以包涵体形式存在。现有包涵体提取工艺存在包涵体在盐酸胍和脲素中的溶解度有限的技术难题,需浓度较高,一般所需尿素浓度 8~10mol/L,盐酸胍 6~8mol/L^[6,7]。在如此高浓度变性剂条件下采用凝胶过滤,离子交换等方法进一步纯化,不但成本高,而且得率极低,且分离效果不理想^[8]。我所建立的包涵体提取工艺解决了这一难题,大大提高了包涵体的纯度和溶解度,因此,可在包涵体这一步直接复性,再进行色谱分离纯化。为了取得较好的复性效果,我们对复性的稀释方法,氧化剂的浓度,复性液的 pH 值,复性时间等参数做了较系统的研究,确定了重组蛋白 IL2-PE66^{4Glu} 复性的最适宜条件。因此,我们所用的包涵体纯化复性工艺是一个先进的、实用的包涵体分离纯化技术,为中试研究和规模化生产打下了基础。

参考文献:

- [1] Strom TB, Kelley VR, Woodworth TG, et al. Interleukin-2 receptor-directed immunosuppressive therapies: antibody-or cytokine-based targeting molecules [J]. *Immunol Rev*, 1992, Oct: 291-31-63.
- [2] Williams DC, Van Frank RM, Muth WL, et al. Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing human insulin proteins [J]. *Science*, 1982, 6: 95.
- [3] 高基民, 黄洪莲, 王小宁, 等. 人白细胞介素-2-绿脓杆菌外毒素融合基因的克隆及高效表达 [J]. *生物工程学报*, 1996, 12 (2): 129-33.

行亲和筛选,并已筛选出多种器官特异性和肿瘤特异性短肽。1996~1998年 Pasqualini^[6]和 Rajotte^[7]共筛选出 10种器官特异性亲和肽。1998年 Arap^[3]在荷瘤鼠体内筛选,得到了与乳腺癌血管内皮特异性结合的短肽,分别含有整合素配体的基序 RGD-4C及 CNGRC,将之与阿霉素交联用于荷瘤鼠靶向化疗,结果显示疗效明显增强而毒性反应降低。

关于噬菌体呈现技术在活体组织器官中的应用,目前国内外研究还仅限于在肿瘤细胞或动物模型中进行筛选,在人类活组织中的筛选则未见报道。以人类活组织为靶进行的生物淘筛的意义在于可更直接地应用于临床,但是,肿瘤组织或血管在离体条件下,血管内皮产生的抗原及各种生物大分子的保存问题尚未得到很好解决。

本研究通过结合骨肉瘤血管特点的分析,提出了一种尽可能接近于肿瘤在体环境的肽库筛选模型,此方法简单、实用。我们采用类似于 Langendorff的血管灌流装置,简便易行,本实验研究中的 28例骨肉瘤标本均建模成功,可直接用于灌流实验且具有很好的科学性:利用噬菌体呈现技术进行生物淘筛,为了使所筛选的靶标(某些抗原、受体或配基等)不失去其生物学活性,就要求肿瘤组织离体后尽快建模及生物淘筛。本实验通过术前的 X线平片及 DSA检查能较好的进行肿瘤血管的定位,此模型最大程度地模拟了人类在体肿瘤的生理环境,其中包括压力、温度、电解质、氧气供应等的模拟,并经多项指标的检测,表明其与人体生理环境基本一致,而且建模时间短,可立即进行生物淘筛,符合实验要求,所切除肿瘤组织剖开所见也证实了所建立模型的可靠性。

我们从此模型中筛选出一种骨肉瘤血管特异性亲和肽(基序为 RLTR),而以正常组织为靶进行的生物淘筛并未筛选到特异性亲和短肽。将筛选得到的骨

肉瘤组织血管特异性亲和短肽行免疫组织化学鉴定,结果证实其与骨肉瘤组织有较高的特异性亲和作用,而与正常组织及乳腺癌组织不能明显结合,再次说明了该模型的有效性。另外,对于其他肿瘤或含血管丰富的组织来说,模拟体内环境的灌流及噬菌体肽库的筛选同样存在着很多问题,而该模型的成功建立也将为其提供很好的参考与借鉴。

在下一步的研究中,我们将对该短肽进行同源性分析及功能分析,以期找到一种骨肉瘤组织血管的特异性标识物,从而进一步揭示肿瘤血管特性,为肿瘤发生及其信号传导等的研究提供线索。同时,也可将此短肽标记放射性同位素或与肿瘤化疗药物交联以进行靶向化疗的动物实验研究(这部分实验正在进行中),并将其逐步用于临床诊断及靶向治疗。

参考文献:

[1] Koivunen E, Arap W, Rajotte D, et al. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries [J]. *J Nucl Med*, 1999, 40(5):883-8.
 [2] Okada T, Izawa N, Nakamura T. Comparison of the effects of nifedipine and nisoldipine on coronary vasoconstriction in the langendorff-perfused rat heart [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, 35:145-9.
 [3] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model [J]. *Science*, 1998, 279(5349):377-80.
 [4] Hayes AJ, Li LY, Lippman ME. Science, medicine, and the future. Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment [J]. *BMJ*, 1999, 318, 853-6.
 [5] Ruoslahti E. Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display [J]. *Semin Cancer Biol*, 2000, 10(6):135-42
 [6] Pasqualini R, Ruoslahti E. Oran targeting in vivo using phage display peptide libraries [J]. *Nature*, 1996, 380(6572):364-6.
 [7] Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, et al. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(2):430-7.

(上接 207 页)

Gao JM, Huang HL, Wang XN, et al. Cloning and high level expression of interleukin 2-Pseudomonas exotoxin fusion gene in *Escherichia coli* [J]. *Chin J Biotechnol*, 1996, 12(2):129-33.
 [4] 胡志明, 周明乾, 林来兴妹, 等. IL-2-PE664Glu 融合蛋白生物学活性测定 [J]. *第一军医大学学报*, 1998, 18(3):228-30.
 Hu ZM, Zhou MQ, Linlai XM, et al. Cytotoxicity assays of IL-2-PE664Glu fusion protein [J]. *J First Mil Med Univ*, 1998, 18(3): 228-30.
 [5] 白东亭, 许丽锋, 祁自柏, 等. 重组大肠杆菌的包涵体 [J]. *中国生*

物制品学杂志, 1996, 9(4):188-91.
 [6] 唐松山. 大肠杆菌外源基因表达产物的下游技术 [J]. *国外医学·遗传学分册*, 1995, 18(3):124.
 [7] Kane JF, Hartley DI. Formation of recombinant proteins in inclusion bodies in *E. coli* [J]. *Tibtech*, 1988, 6:95.
 [8] Buchner J, Pastan I, Brinkmann U. A method for increasing the yield of properly folded recombinant proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies [J]. *Anal Biochem*, 1992, 205(2):263-70.