

无血清培养基生产重组人红细胞生成素的纯化

李琳 邓继先 卢建申 周江

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 用无血清培养基在生物反应器中培养 CHO-EPO C2 细胞株, 培养上清中重组人红细胞生成素表达水平达 10~21 mg/L. 培养上清经过三步纯化后纯度可达到 98% 以上, 比活性约为 1.5×10^5 U/mg. 纯化第一步使用反相柱层析, 可将样品体积浓缩约 30 倍. 取其收集液进行 DEAE-离子交换柱层析, 最后进行分子筛层析, 全过程回收率为 40% 左右. SDS-PAGE 表明, 所制备终产品分子质量为 35~40 ku, 等电聚焦方法测其等电点在 3.75~4.15 之间, 均属文献报道范围; ELISA 和蛋白质印迹实验结果证明其具有天然红细胞生成素抗原性; 采用溴化氰裂解方法做肽谱电泳, 结果与理论推测相符. 该纯化路线简单、迅速、高效, 重复性好, 可用于规模化生产临床使用重组人红细胞生成素.

关键词 重组人红细胞生成素, 纯化, 性质

红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 是一种糖蛋白激素, 它通过刺激红细胞前体细胞分化生成成熟红细胞以调节外周血红细胞水平^[1,2]. 该激素产生于成人肾脏或婴儿肝脏中^[3]. 所以慢性肾衰^[4]或其他原因造成的肾实质损害会造成 EPO 产量降低而引起贫血. 在该类贫血或一些其他贫血患者的治疗中需要大量纯品 EPO^[5]. 早期 EPO 主要来自于尿中^[6], 很难获得足量纯品用于研究或临床使用. 80年代后期利用基因重组技术在哺乳类动物细胞中高水平表达重组人EPO (recombinant human EPO, rHuEPO)^[7~10]获得成功, 使规模化制备 EPO 纯品成为可能. 现在 rHuEPO 纯品已用于临床, 产生了很好的社会效益和经济效益. 本所在 CHO 细胞 (CHO-EPO C2) 中成功地表达了 rHuEPO, 我实验室已完成该细胞株无血清高密度培养的中试工艺研究.

在生物反应器中灌流培养 CHO-EPO C2 细胞株, 我们采用有血清培养扩增细胞, 无血清培养生产 rHuEPO, 培养上清中 rHuEPO 含量可达 2 000~3 000 U/ml. 在我们的纯化工艺中, 第一步采用反相柱层析, 随后采用阴离子交换柱层析、最后使用分子筛柱层析进一步纯化, 最终得到可用于临床的产品.

本文报道的纯化方法避免了许多中间处理步骤, 全过程采用高压液相柱层析 (high presser liquid chromatography, HPLC), 简捷、高效、迅速并且重复性好, 可用于临床使用纯品的大规模生产.

1 材料和方法

1.1 细胞和培养基

rHuEPO 生产细胞株 CHO-EPO C2 由本所构建. 细胞扩增培养使用含 5% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 5×10^{-7} mol 氨甲喋啶 (methotrexate, MTX) 的 DMEM 培养基 (GIBCO 公司产品). 生产培养使用无 FBS 的 DMEM: F12 (1:1) 培养基 (GIBCO 公司产品), 另添加有一些维生素和小分子多肽.

1.2 培养设备

滚瓶、滚瓶机为美国 Bell Co 产品. 堆积床反应器为 Celligen Plus (NBS 公司产品).

1.3 培养方法和 rHuEPO 生产

取冻存细胞进行扩增培养, 随后采用 0.025% 胰蛋白酶消化并接种于堆积床反应器,

收稿日期: 1996-04-18, 修回日期: 1996-08-12

细胞生长至 1×10^7 细胞/ml 以上后, 进行无血清培养基灌流培养.

1.4 仪器和层析柱

HPLC 仪为 Waters delta prep. 4000 型 (美国 Waters 公司产品). RI 型反相柱 (5 cm $\times$ 40 cm) 填料为 POROS 50 R1 型介质 (美国 Perceptive 公司产品); DEAE 离子交换层析柱 (2 cm $\times$ 10 cm) 填料为 DEAE 40 HR (Waters 公司产品); 分子筛层析柱 (5 cm $\times$ 120 cm) 的填料为 Sephacryl S-200 (Pharmacia 公司产品). 纯化过程所用层析柱均为自装柱, 用于产品纯度分析的分子筛层析柱为 200 SW 柱 (8 mm $\times$ 300 mm) (PE 公司产品).

1.5 纯化方法

R1 反相层析 $\rightarrow$ 稀释 $\rightarrow$ DEAE 离子交换层析 $\rightarrow$ Sephacryl S-200 分子筛层析 $\rightarrow$ 半成品, RI 型反相柱采用无离子水平衡, 使用 10% ~ 80% 乙醇进行线性梯度洗脱, 检测并收集含 EPO 主峰, 经稀释后用于下一步的分离步骤. DEAE 离子交换层析柱使用 10 mmol Tris $\cdot$ HCl (pH 7.0), 加入不同浓度的 NaCl 进行截状梯度洗脱, 分别测定洗脱峰中 EPO 含量. 分子筛层析采用 20 mmol/L 柠檬酸钠-100 mmol/L NaCl (pH 7.0) 作为流动相.

1.6 EPO 检测

使用 EPO ELISA 检测盒 (德国 Boehringer 公司产品) 检测蛋白洗脱峰. 体外活性采用小鼠骨髓细胞集落法测定^[11], 体内活性采用大鼠饥饿摄取⁵⁹Fe 法^[12]测定. 测定结果均用德国 Boehringer 公司的 CHO 细胞生产的 rHuEPO 进行校正.

1.7 蛋白质测定

除终产品外, 其余蛋白质浓度均采用考马斯亮蓝 G-250 染料结合法^[13]进行测定, 标准曲线使用生物制品检定所出售的标准 BSA 制作. 终产品采用 Lowry 改良法^[14]测定, 同时使用 SDS-PAGE 电泳经光密度扫描与已知浓度蛋白质比较获得蛋白质浓度.

1.8 SDS-PAGE

按照文献 [15] 方法操作. 试剂均为

GIBCO 公司产品. 电泳凝胶采用铬银染色法^[16]染色, 标准分子质量蛋白 (华美公司提供) 为 94 ku、67 ku、43 ku、30 ku、17.5 ku. 可通过测量蛋白质的相对迁移率计算得出分子质量.

1.9 肽谱电泳

参照溴化氰裂解法^[17].

1.10 蛋白质印迹

参照文献 [18] 方法操作. EPO 单抗为德国 Boehringer 公司产品, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自华美公司.

1.11 等电聚焦电泳

按文献 [19] 方法操作. 两性电解质为 Pharmacia 公司产品, pH 范围 3.15 ~ 6.5 之间.

1.12 内毒素测定

使用鲎试剂法测定. 细菌内毒素及鲎试剂购于厦门鲎试剂厂.

2 结 果

2.1 rHuEPO 的生产

CHO-EPO C2 细胞在含 5% FBS 的 DMEM 培养基中培养生产, 2 L 滚瓶中培养生产 72~96 h 后, 细胞基本生长成单层, 接种堆积床生物反应器, 经 6~7 d 的培养后, 细胞密度可达 1×10^7 /ml 以上, 改换无血清培养基进行生产培养. 收集培养上清经体内活性测定为 2 000~3 000 U/ml. 培养上清贮存于 4℃ 待纯化.

2.2 rHuEPO 的分离纯化

取培养上清过滤除细胞碎片等杂质进行高压液相反相柱层析, 以 70 ml/min 流速上样, 柱结合蛋白量约 4.5 g/L, 上样完毕, 水平衡反相柱至检测基线, 用 10% 和 80% 乙醇进行线性梯度洗脱, ELISA 测定结果表明, 60% ~ 70% 乙醇洗出活性 EPO (图 1). 含 EPO 峰收集液用 4 倍体积的 10 mmol Tris $\cdot$ HCl (pH 7.0) 稀释后用于 DEAE 型离子交换柱层析分离.

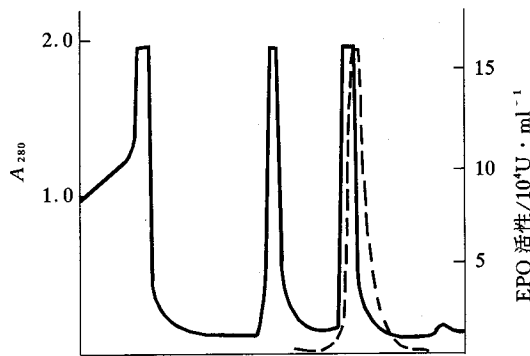


图1 R1反相柱HPLC分离EPO的结果
——: 蛋白质280 nm处吸收曲线; -----: EPO含量曲线.

用10 mmol Tris·HCl (pH 7.0) 缓冲液平衡DEAE型离子交换柱, 取已稀释收集液上样, 流速为50 ml/min, 柱结合蛋白量为约20 g/L, 上样完毕, 用上述缓冲液平衡层析柱至基线, 随后在缓冲液中加入NaCl进行截状梯度洗脱, NaCl浓度分别为: 50 mmol/L、100 mmol/L、500 mmol/L. 用EPO-ELISA

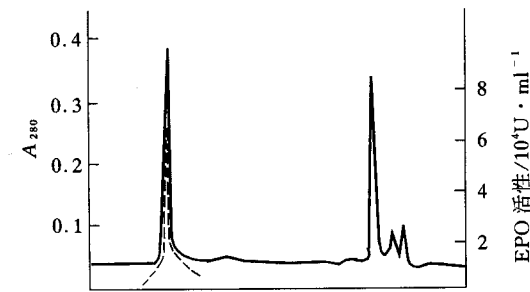


图2 DEAE柱分离EPO的结果
——: 蛋白质280 nm处吸收曲线; -----: EPO含量.

检测盒测定各收集峰中的EPO含量, 其结果表明50 mmol/L洗脱峰中含EPO (图2).

取DEAE离子交换柱收集含EPO峰液体进行Sephacryl S-200凝胶柱层析. 每次上样体积为80~140 ml, 流速10 ml/min, 使用流动相为20 mmol/L柠檬酸钠-100 mmol/L NaCl缓冲液, rHuEPO保留时间约为120 min (图3). 该层析柱收集到的rHuEPO样品比活性可以达到 1.5×10^5 U/mg.

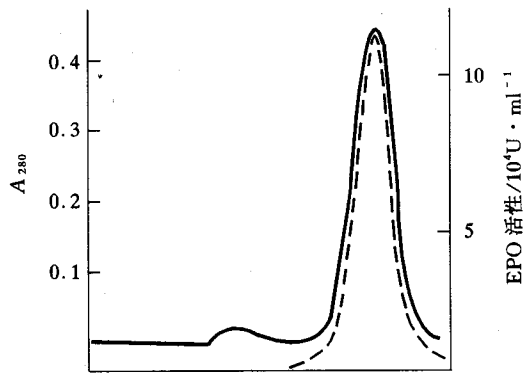


图3 Sephadex S-200柱分离rHuEPO的结果
——: 蛋白质280 nm处吸收曲线; -----: EPO含量.

2.3 纯度测定

经EPO-ELISA检测含有EPO的各收集峰, 每步纯化产品进行SDS-PAGE, 对终产品进行紫外扫描结果见图4. 从表1中可知无血清培养上清, 经过三步纯化后即可获98%以上纯度rHuEPO. 分析型的凝胶柱200 SW柱对获得纯品进行HPLC纯度分析, 纯度均在98%以上, 结果见图5.

表1 培养上清中rHuEPO的纯化

步骤	体积 /L	蛋白质浓度 /g·L ⁻¹	EPO浓度 /U·ml ⁻¹	比活性 /U·mg ⁻¹	总活性 /U	回收率 /%
培养上清	12	0.176	0.2×10^4	1.137×10^4	2.4×10^7	—
R1 HPLC	0.39	1.429	5.661×10^4	3.962×10^4	2.208×10^7	92
DEAE	0.14	0.695	9.936×10^4	14.296×10^4	1.391×10^7	63
分子筛层析	0.18	0.344	5.133×10^4	14.920×10^4	0.924×10^7	66.43
总回收率						38.5

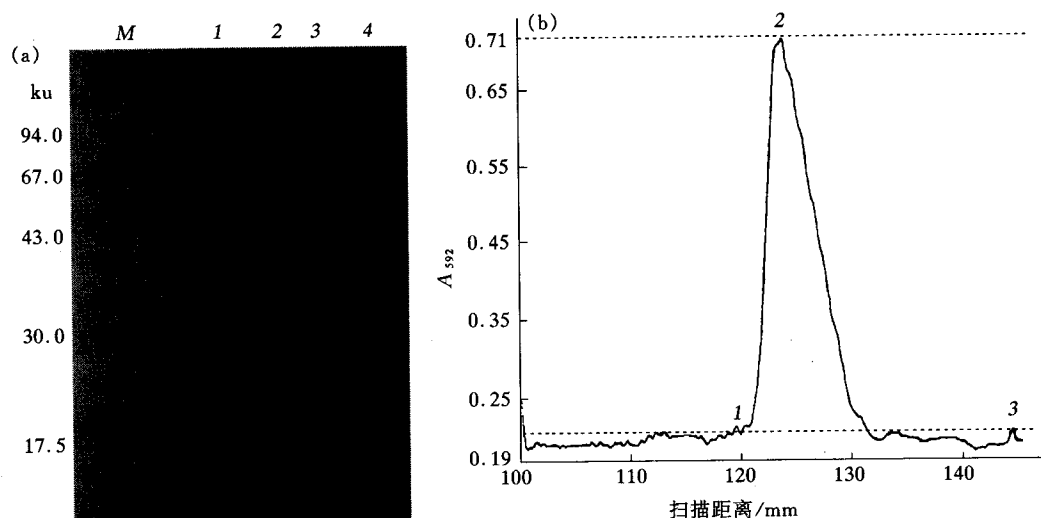


图4 纯化 rHuEPO 制品的 SDS-PAGE 及终产品紫外扫描结果

(a) SDS-PAGE 图谱, M: 标准蛋白, 1、2、3: rHuEPO 上样液, 分别为反相、离子、凝胶柱层析产品, 4: 终产品; (b) 终产品紫外扫描结果。

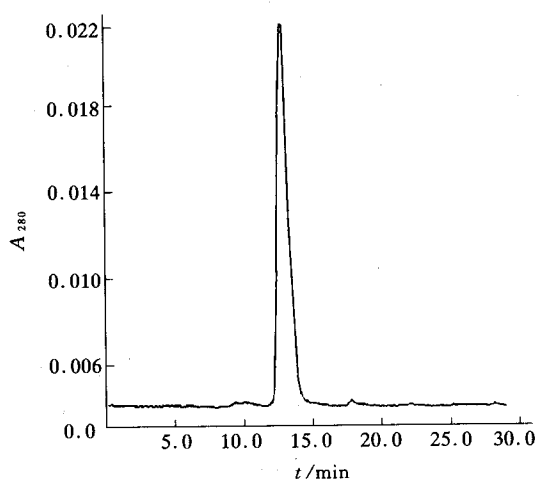


图5 SW 凝胶分析柱分析 rHuEPO 制品的纯度结果

2.4 活性和抗原性测定

所获纯品经⁵⁹Fe 体内活性测定计算的比活性为 1.5×10^5 U/mg, 这表明三步纯化法所获得制品具有体内生物活性, 且其比活性令人满意。

我们将获得的制品进行蛋白质印迹分析。该结果表明抗 EPO 抗体只能特异地与 35~40 ku 分子质量的蛋白带发生反应, 证实了我们获得的 rHuEPO 制品具有天然 EPO 的抗原。

2.5 肽图电泳

肽图是蛋白质定性和结构分析的重要指标。在 rHuEPO 中 54 位处有一甲硫氨酸, CNBr 在此将 rHuEPO 特异裂解成两段, 经 SDS-PAGE 后进行银染, 发现 CNBr 将 rHuEPO 裂解为两条肽链, 其大小分别约为 22 和 17.5 ku, 另有部分未裂解的 rHuEPO 带约为 35~40 ku (图 6)。这一结果与理论推测结果一致。

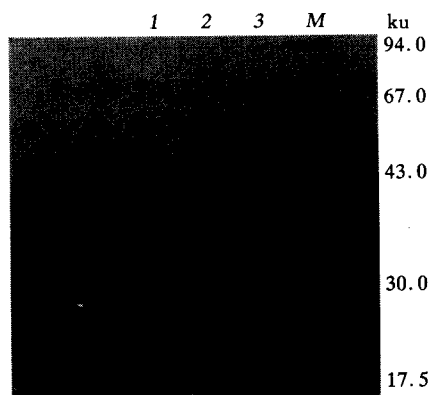


图6 rHuEPO 半成品经 CNBr 裂解后的 SDS-PAGE 结果

1、2、3: 分别为三批 rHuEPO 产品, M: 标准蛋白。

2.6 等电聚焦电泳

EPO 的等电点报道范围较宽，在 2.8~4.55^[20] 之间，我们对纯化出的 rHuEPO 半成品进行等电聚焦电泳，经计算其等电点在 3.75~ 4.15 左右 (图 7)。

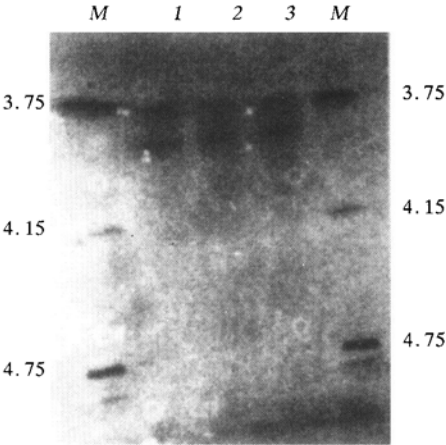


图 7 rHuEPO 制品的等电聚焦结果

1、2、3：分别为三批 rHuEPO 产品，
M：标准蛋白。

2.7 内毒素测定

鲎试剂法测定内毒素结果表明纯化的 rHuEPO 终产品每 10 000 U 中含内毒素低于 1 EU，属于正常范围。

3 讨 论

EPO 蛋白属酸性糖蛋白，具有较强的疏水性，国外和国内有关单位大多使用阴离子交换柱或亲和层析柱用于第一步纯化^[21]，需要使用超滤、透析等手段对培养上清进行浓缩和脱盐等前处理，这对于大量培养上清的规模化纯化不甚实用：首先低效耗时；其次糖蛋白对机械作用力敏感，长时间超滤等处理可能对蛋白质造成不可逆损伤，丧失活性；另外 EPO 易吸附在容器表面，处理步骤增多会引起蛋白质回收率下降。使用 R1 型反相柱层析作为第一步纯化，培养上清只需除去大颗粒杂质后即可上样，这一步层析具有快速、回收率高、活性损失较小等特点。无血清培养生产 rHuEPO，排除了牛血清白蛋白的干扰，显著提高了两种

层析柱的上样体积。在过去工作的基础上，我们放大了纯化规模，并将过去所使用的透析改为稀释，进一步缩短处理时间的同时，也避免了可能的活性丢失。以反相柱层析作为培养上清的第一步纯化国内未见报道。本实验报道的纯化方法更适用于大规模生产。

纯化全过程中流动相均采用无热原质水配制，最后一步使用无热原质水配制的柠檬酸缓冲液作流动相，进行分子筛层析，将培养上清中一部分与 rHuEPO 疏水性等电点极为接近的蛋白质彻底去除，得到 98% 以上纯度的产品，因使用其缓冲液为临床使用溶剂而不需要做进一步置换处理。

无 FBS 培养基的使用和纯化步骤的减少，提高了回收率，减少了活性丢失，终产品体内活性测定可达 1.5×10^5 U/mg。免疫学检测、体内活性测定和蛋白质分析结果表明纯化的 rHuEPO 具有天然 EPO 的生物活性和抗原性，说明本文报道 rHuEPO 的大规模纯化工艺是成功的。

参 考 文 献

- 1 Geissier K, Stockenhuber F, Kabrna E *et al.* Recombinant human erythropoietin and hematopoietic progenitor cells *in vivo* correspondence. *Blood*, 1989, **73**: 2229~ 2232
- 2 Umemura T, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. The mechanism of expansion of late erythroid progenitors during erythroid regeneration: target cells and effects of erythropoietin and interleukin 3. *Blood*, 1989, **73**: 1993 ~ 1998
- 3 Krantz S B, Jacobson L O. Erythropoietin and the regulation of erythropoiesis. Chicago: The University of Chicago Press, 1970. 102~ 211
- 4 Egrie J C, Stickland T W, Lane J *et al.* Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. *Immunobiol*, 1986, **172**: 213~ 224
- 5 Eschbach J W, Egrie J C, Downing M R *et al.* Correction of the anemia of end-stage renal diseases with recombinant human erythropoietin: results of a combined phase I and II clinic trial. *New Eng J Med*, 1987, **316**: 73~ 78
- 6 Miyake T, Kung C K H, Goldwasser E *et al.* Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*, 1977, **252** (15): 5558 ~ 5564

- 7 Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R *et al.* Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, 1985, **313** (28): 806~ 811
- 8 Lin F K, Suggs S, Lin C H *et al.* Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 7580~ 7586
- 9 Powell J S, Beykner K L, Lebo R V *et al.* Human erythropoietin gene: High level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 6465~ 6471
- 10 Recny M, Scoble H A, Kim Y *et al.* Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin identification of des arginine 166 erythropoietin. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 17156~ 17163
- 11 Krystal G A. Purification of human erythropoietin to homogeneity by a rapid five-step procedure. *Blood*, 1986, **67** (1): 71~ 79
- 12 Fried W, Plzak L F, Jacobson L O *et al.* Bioassay of erythropoietin in starved rats. *Proc Exp Biol Med*, 1957, **94**: 237~ 240
- 13 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~ 254
- 14 Hartee E F. Determination of protein: A modification of the lowry method that give a linear photometric response. *Anal Biochem*, 1972, **48**: 422~ 425
- 15 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 324~ 526
- 16 Ohsawa K, Ebata N. Silver stain for detecting 10-femtogram quantities of protein after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 1983, **135**: 409~ 412
- 17 Allen G. *Sequencing of proteins and preptides*. New York: Elsevier Science Publishers B. V. 1989. 231~ 253
- 18 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 4350~ 4354
- 19 李成文. 现代免疫化学技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1992. 39~ 57
- 20 Yoshiyuki E, Hiroshi N, Watanabe J Y *et al.* Heat-induced

aggregation of recombinant erythropoietin in the intact and deglycosylated states as monitored by gel permeation chromatography combined with a low-angle laser light scattering technique. *J Biochem*, 1992, **112**: 700~ 708

- 21 Kdwakita M. Purification of erythropoietin. Japanese Patent, 87-084204/12, JP62036400. 17, 02, 1987-02-17

Study of Purification of Recombinant Human Erythropoietin Produced with FBS-Free Medium. LI Lin, DENG Jixian, LU Jianshen, ZHOU Jiang (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*).

Abstract CHO-EPO C2 cells were cultured in the Packed Bed Bioreactor with free-fetal bovine serum medium, and the supernatant contained 2 000~ 3 000 U/ml of recombinant Human EPO (rHuEPO). The SDS-PAGE result of the final products from the reported purification schemes was a single band, which purity was over 98% with measurement of UV scanning. The specific activity was 1.5×10^5 U/mg protein. Research showed that the molecular weight was about 35~ 40 ku and the *pI* was about 3.75 ~ 4.15. The product possessed the antigenicity of native HuEPO. The peptide electrophoresis result was in accord with theory deduction. 15 amino acid sequence of rHuEPO N terminal was as the same as native HuEPO. All these results described above revealed that the final product were high purity rHuEPO and the purification procedure was rapid and efficient, which can be used to produce clinic rHuEPO in large scale.

Key words recombinant human erythropoietin, chromatography, purification

更 正

因本人疏忽,“通用真核质粒表达载体的构建”(《生物化学与生物物理进展》,1995, **22** (4): 331)一文的附图(图1)有误.图1(b)中多克隆位点依CMV启动子的方向,依次应为Xba I、BamH I、Sma I、Kpn I.特此更正,敬希原谅.

[龙建银]