

利用制备性等电聚焦仪 Rotofor^R 纯化人重组 IL-3*

冯 岚 马大龙 肖 波 周宝宏 狄春辉 阎 海 宋泉声 龙振洲

(北京医科大学免疫室, 北京 100083)

提 要

将表达人重组 IL-3 的工程菌热诱导表达后超声裂菌, 洗涤处理沉淀物, 得到纯化包涵体。8 mol/L 尿素将其变性溶解后, 直接利用制备性等电聚焦仪 Rotofor 一步纯化, 获得纯度 90% 以上的人重组 IL-3, 回收率约 60%, 每次回收 15—20mg 蛋白。纯化的人重组蛋白保持了 IL-3 生物活性

关键词 白介素-3, Rotofor^R 等电聚焦

白介素-3 (IL-3) 系由活化 T 细胞产生的一种细胞因子, 又称多集落刺激因子 (multi-colony stimulatory factor), 具有促进造血干细胞增殖及定向分化作用, 并能增强某些成熟血细胞的功能^[1]。在临床上可用于治疗造血功能障碍性疾病, 具有广泛的应用前景。由于天然来源 IL-3 极少, 因而基因工程制备的人重组 IL-3 为唯一来源。本室成功地在大肠杆菌表达出人重组 IL-3 蛋白, 并进行了初步纯化研究^[2], 为更高效简便地纯化人重组 IL-3, 我们探讨了美国 Bio-Rad 公司的制备性等电聚焦仪 Rotofor^R 对大肠杆菌基因工程产品的纯化效率, 获得较满意的结果。

1 材料与 方法

1.1 表达质粒及菌株

pECIL-3c 由本室构建的表达人重组 IL-3 融合蛋白的质粒, 宿主菌为 *E. coli* pop2136^[3]。

1.2 试剂与仪器

LB 培养基(含胰蛋白胨, 酵母提取物), 两性电解质 (pH3—10)、尿素、Rotofor[®]cell 及 Electrophoresis Power Supply 均购自美国 Bio-Rad 公司, Vibra-Cell[™] 购自美国 Sonics & Materials INC。

1.3 细胞株

BMU-2 髓样白血病细胞株, 由北京医科大学杨景山教授提供, 它依赖于人 IL-3 和 GM-CSF 在半固体培养基上形成集落^[4]。

1.4 方法

1.4.1 细菌培养 将含有表达质粒 pECIL-3C 的大肠杆菌接种于 2 ml LB 培养基中(含氨苄青霉素), 30℃过夜, 次日以 1:10 比例增大培养体积, 再在 30℃培养至细菌浓度 A_{600nm} 为 0.6 左右。然后以 1:1.5 比例加入新鲜 LB 培养基转 42℃振荡培养 4—5 h。离心 3 000 r/min 20 min 收集细菌, 并悬浮于 50 ml 超声缓冲液中, 放 -20℃备用。

1.4.2 处理包涵体 待冻存细菌悬液融化后在冰浴中超声裂解细菌, 离心 8 000 r/min 15 min, 弃上清。所得沉淀反复洗涤、离心。最后以 10 000 r/min, 5 min 离心得纯化包涵体保存 -20℃备用。

1.4.3 人重组 IL-3 纯化 纯化包涵体加 8 mol/L 尿素, 20 mol/L 2-巯基乙醇使包涵体内蛋白变性溶解。离心 10 000 r/min, 5min, 去除不溶性杂质。将全部溶解的上清与 50 ml 等电聚焦液混匀(聚焦液成分为两性电解质 pH3—10、尿素, 甘油)。而后用注射器将其全部

* 本文为 863 计划资助课题

收稿日期: 1991-08-12

修回日期: 1991-10-20

注入 Rotofor 聚焦室。接通电源, 功率恒定在 12 W, 4—5 h 后收集。

1.4.4 透析复性 收获的 20 管样品液各取 20 μ l 进行 SDS-PAGE 分析鉴定。将目的管中样品加 1 mol/L NaCl 装入透析袋于 0.15 mol/L PBS 透析, 以去除两性电解质、尿素, 同时重组蛋白得以复性。

1.4.5 分析鉴定技术 a. 蛋白质测定: 按 Bio-Rad 蛋白检测试剂盒测定蛋白含量, 以 BSA 为标准。

b. SDS-PAGE: 按本室方法^[4]。上样量为 10—20 μ g/孔。

c. 分析型 IEF: 按 SERVA 分析型 IEF 试剂盒进行蛋白质等电点分析。

d. 内毒素测定: 用鲎试剂 (厦门鲎试剂厂) 检测内毒素含量。

e. 生物活性测定: 用 RPMI-1640 (含 30% 胎牛血清) 将白血病细胞株 BMU-2 细胞稀释为 1×10^5 细胞/ml 的细胞悬液。将 3 ml 含有 0.3% 琼脂和 1×10^4 BMU-2 细胞的细胞悬液加到 6 孔培养板 (GIBCO 公司), 做 3 个复孔, 实验组每孔加入纯化重组 IL-3, 终浓度为 0.2 μ g/ml。置 37℃ 含有 5% CO₂ 的培养箱孵育。5 天以后计细胞集落数。

2 结 果

2.1 包涵体的处理

在大肠杆菌表达的人重组 IL-3 其表达量约占菌体蛋白的 25—30%。经包涵体处理可以去除大量细菌杂蛋白, 最后得到的包涵体纯度达 60% 以上 (图 1)。

2.2 Rotofor 纯化结果

所得包涵体变性溶解后进一步用 Rotofor^R 纯化, 纯度达 90% 以上 (图 1, 2), 且回收率达 60% (表 1), 每次回收蛋白约 15 mg。经 Rotofor 纯化的蛋白直接进行 SDS-PAGE 分析 (图 3), 分子量为 28 kD 人重组 IL-3 融合蛋白主要集中在 9—13 号管内, 而细菌杂蛋白集中在 5—9 号管内。进一步进行分析型等电聚集电泳, 人重组 IL-3 融合蛋白的等电点在

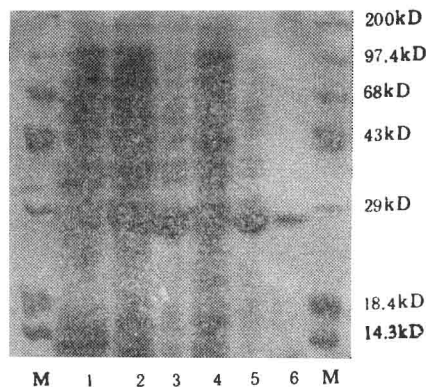


图 1 SDS-PAGE 分析处理的包涵体及经 Rotofor 纯化的人重组 IL-3

M: 蛋白质标准, 1: *E. coli* POP2136 菌总蛋白, 2: 表达菌 *E. coli* POP2136/pECIL-3c 总蛋白, 3: 裂解后包涵体沉淀, 4: 裂解后上清, 5: 洗涤处理包涵体, 6: Rotofor 纯化后人重组 IL-3

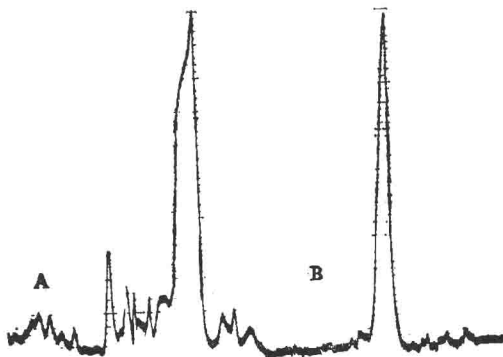


图 2 SDS-PAGE 扫描

A: 洗涤处理的包涵体; B: 经 Rotofor 纯化的人重组 IL-3

表 1 Rotofor 纯化 rhIL-3 回收率

	rhIL-3 蛋白量 (mg)		回收率 (%)
	纯化前	纯化后	
1	22.50	14.50	65.44
2	28.00	15.75	56.25
3	26.25	14.70	56.00
4	28.00	14.80	52.85
平均值			57.63

pH 6.5—6.9 之间 (图从略)。

2.3 内毒素测定

大肠杆菌为革兰氏阴性细菌, 裂解后释放大量的内毒素, 内毒素的去除亦为大肠杆菌表达

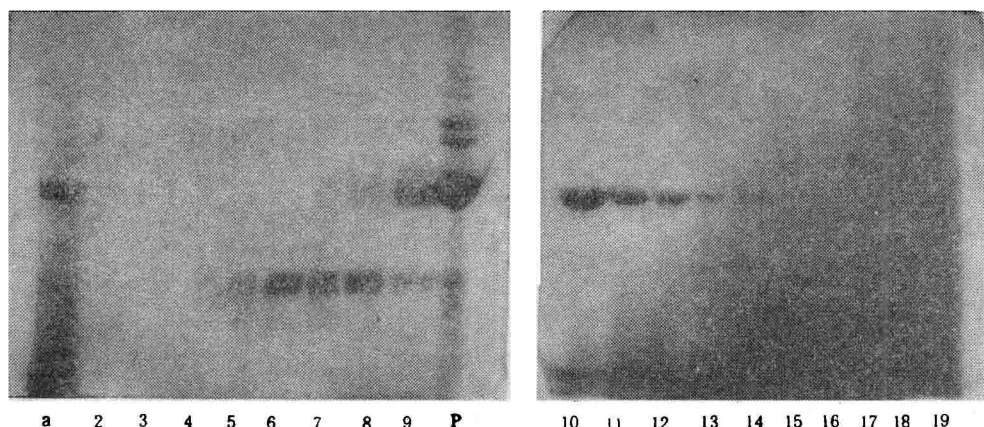


图 3 SDS-PAGE 分析 Rotofor 收获的样品液 (2—19 号管)

a: Rotofor 聚焦前样品; p: 洗涤的包涵体

的重组蛋白纯化的指标之一。本文发现经 Rotofor^R 纯化前内毒素含量为 4 000 ng—40 000 ng/mg 蛋白, 纯化后为 6—60 ng/mg 蛋白, 纯化重组蛋白的同时内毒素含量减少了近 600 倍。

2.4 生物活性测定

纯化后的人重组 IL-3 能明显刺激 IL-3 反应株 BMU-2 的体外集落形成(见表 2)。

表 2 rhIL-3 的集落形成试验

样 品	每 10 ⁴ 个细胞中的集落数
rhIL-3 (0.2 μg/ml)	780 ± 20 (P < 0.01)
对 照	112 ± 20

BMU-2 细胞株 5 天培养。

3 讨 论

有关人重组 IL-3 的纯化国外已有报道, Hecht 等^[5]利用 RP-HPLC 及毛细管电泳纯化人重组 IL-3, 但成本高, 且需大型仪器。本室曾用制备性 SDS-PAGE 小批量纯化人重组 IL-3^[2], 但有上样量少, SDS 难以去除的缺点。为此我们进一步改进, 采取包涵体洗涤和 Rotofor^R 的纯化程序, 收到较好的结果。Rotofor^R 装置利用蛋白质等电点不同来分离纯化蛋白质, 已较多应用于多种蛋白质的纯化, 包括单克隆抗体纯化^[6]及红细胞中尿卟啉原 I 合

成酶纯化等^[7]。我们用 Rotofor^R 纯化大肠杆菌表达的人重组 IL-3, 发现它有多方面的优点。本实验在 Rotofor^R 聚焦过程中加入 6 mol/L 尿素既不影响蛋白质的带电性质又解决了重组蛋白的溶解度。且 Rotofor^R 整个体系为液相自由体系, 无柱层析纯化蛋白质的非特异吸附, 使得蛋白回收率提高。我们还发现 Rotofor^R 纯化过程中能去除大部分内毒素, 这一点对大肠杆菌基因工程纯化特别重要。

本文结果表明 Rotofor^R 纯化人重组 IL-3 具有操作简单, 时间短、上样量较大, 回收率高等优点, 适用于实验室规模应用。如结合其它纯化技术其纯度可望更高。本技术也有一定缺点, 如果上样量过大则有沉淀形成, 并沉积于聚酯隔膜上, 影响纯化效果。

参 考 文 献

- 1 马大龙. 国外医学免疫学分册, 1989; 12: 7
- 2 马大龙, 庞建, 周宝宏等. 中国免疫学杂志, 1990; 6(3): 182
- 3 马大龙, 庞建, 刘白等. 863 计划生物技术领域年会论文摘要, 1988—1989: 149
- 4 Ma D L *et al.* *J Immunol*, 1985; 135:3398
- 5 Hecht R I, Coleman J F, Morris J C. *Prep Bioc-hem*, 1989, 19(4):363
- 6 Egen N B, Bliss M *et al.* *Anal Biochem*, 1988, 172:488
- 7 Joseph Vesper. *Analytical Biochemistry*, 1989, 182: 217