

义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞中 TGF α mRNA 的表达具有较强的抑制作用。

表 1 BIU 87 细胞中 TGF α mRNA 斑点杂交扫描测量

	IOD	抑制率/%
对照 (空白)	0.94	
对照寡聚核苷酸	0.54	42.5
反义寡聚核苷酸	0.36	61.5

3 讨 论

本实验采用了两条由 23 碱基组成的寡聚脱氧核苷酸链, 一条链与 TGF α cDNA 转录起始区及前 6 个密码子互补, 可在复制、转录等水平上抑制 TGF α 表达; 另一条链所含碱基数目及比例均与前者相同, 但与 TGF α 基因无互补性, 为对照寡聚核苷酸, 衡量寡聚核苷酸对本实验体系的非特异性影响。

本实验中, TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞的细胞计数及 ^3H -TdR 参入作用的结果基本一致: 反义寡聚核苷酸可抑制 BIU 87 细胞的生长及其 DNA 合成, 其抑制作用随浓度升高而增强。相同条件下, 对照寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞的抑制率较低, 且无剂效关系。提示: TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞的作用有一定特异性。从本实验结果还可看出: TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞生长的抑制作用随着时间过分延长而降低, 据文献报道认为是寡聚核苷酸被细胞中释放的核酸酶所降解^[8]。

为进一步了解反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞抑制作用的机理, 本实验应用分子杂交分析显示: 反义寡聚核苷酸可明显抑制 TGF α mRNA 的表达, 但对照寡聚核苷酸也显示出一定的抑制作用。可能是寡聚核苷酸本身对细胞产生的非特异性毒副作用。在 CSF-1, TGF β 3 和 bFGF 的反义寡聚核苷酸的研究中也发现有高非特异性毒副作用^[5-7], 这是目前反义寡聚核苷酸应用所面临的一个重要问题, 如何减少其毒副作用也是当前研究反义寡聚核苷酸的一个主要方面。

该反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞中 TGF α 蛋白表达水平的作用有待进一步研究。

本实验进一步证实了 TGF α 在 BIU 87 细胞增殖中的重要作用, 并为膀胱癌的反义寡聚核苷酸治疗提供了实验基础。

参 考 文 献

- 1 胡 征, 周爱儒. 北京医科大学学报, 1991; 23: 286
- 2 石东平, 周爱儒. 生物化学杂志, 1991; 7: 455
- 3 俞利章. 中华泌尿外科杂志, 1989; 10: 131
- 4 葛正龙, 周爱儒. 生物化学杂志, 1991; 8: 486
- 5 Birchenall-Roberts M C, Ferrer C, Ferrer D *et al.* J Immunology, 1990; 145: 3290
- 6 Becker D, Meier C N, Merlyn M. EMBO J, 1989; 8: 3685
- 7 Potts J D, Dagle J M, Walder J A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 1516
- 8 许 毅, 邓国仁. 中国科学 B 辑, 1990; 1: 64
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, 2nd ed, New York: CSHL Press, 1989

人重组 IL6/IL2 融合蛋白的变性、复性及纯化*

赵春华 凌世淦 毛 宁 唐佩弦

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 经超声破碎, 分离已表达 CH925 包涵体, 较系统地研究变性剂浓度、融合蛋白浓度对蛋白折叠的影响。在还原型及氧化型谷胱甘肽复性条件下, 成功地将融合蛋白 CH925 折叠成具有 IL6 及 IL2 双

活性蛋白, IL6 的比活为 $2.3 \times 10^6 \text{U/mg}$, IL2 比活为 $2.2 \times 10^6 \text{U/mg}$. 经阴离子交换、凝胶过滤层析, 获得一定纯度的 CH925, 配合反相 HPLC, 洗脱收集蛋白峰, CH925 纯度为 98%.

关键词 融合蛋白 IL6/IL2, 蛋白变性、复性, 蛋白纯化

白介素 2 (IL2)^[1] 主要是受抗原与 T 细胞受体结合刺激分泌的 T 细胞生长因子, 可促进多种细胞因子的产生, 激活自然杀伤(NK)、激活杀伤淋巴(LAK)细胞, 为提高机体免疫力、肿瘤治疗的主要生物调节剂. 白介素 6 (IL6)^[2] 为一种多功能细胞因子, 可诱导 IL2 或促进 IL2 受体表达, 协同或增强 IL2 诱导 LAK 活性, 也可直接作用于杀伤细胞促进其功能分化. IL2 及 IL6 受体分布在激活 T 细胞、LAK 等细胞表面, 其结构特征具有相似性. 两者均为细胞因子超家族成员之一. 我们通过 PCR 基因拼接技术克隆并高效表达了 IL6/IL2 融合蛋白^[3], 为进一步观察 CH925 与 IL2 或和 IL6 生物学特性差异, 本文对 CH925 的变性、复性及其纯化进行了研究.

1 材料与方法

1.1 试剂

低分子标准蛋白、盐酸胍、尿素、双丙烯酰胺、二硫苏糖醇、氧化型和还原型谷胱甘肽等购自华美公司.

1.2 CH925 工程菌

由作者构建并在富含微量元素的 M_9CA 培养基诱导表达 4—6h, 测得 CH925 表达量占菌体总蛋白 32%.

1.3 仪器

超声粉碎机, 高速低温离心机为德国 B. Braun 公司产品; DEAE-Sepharose 6B 高分辨分子凝胶购自 Pharmacia; 反相 C18 柱为 Synchropak 产品; 高压液相色谱仪为 Waters 510 型 Millipore 产品.

1.4 方法

1.4.1 包涵体分离 经 6000r/min 离心 5min 收集高效表达菌体, 用 50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.2 缓冲液清洗 3 次, 超声破菌, 10000r/min 离心 10min, 回收沉淀

物, 经 4mol/L 尿素洗涤后用含 7mol/L 盐酸胍, 5mmol/L β -巯基乙醇 50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 裂解包涵体, 10000r/min 离心回收溶解上清液中蛋白. 经含 0.2mol/L Tris-HCl pH7.2 缓冲液透析, 待常压凝胶过滤色谱层析. 过柱后洗脱液采用 Amicon 超滤浓缩, 超滤膜截留分子量为 10 000.

1.4.2 离子交换色谱 DEAE-Sepharose 6B 柱 (1.2cm $\times$ 20cm) 用 50mmol/L Tris-HCl, pH7.2 缓冲液平衡, 蛋白样品上样前经相应缓冲液稀释盐酸胍浓度低于 0.1mmol/L.

1.4.3 反相色谱 Spherisorb RPC-18 (300A 孔径) 填料 (0.5cm $\times$ 20cm) 由德国进口, 经 10% 乙腈、0.1% 三氟醋酸平衡, 蛋白样品为经凝胶过滤后的 CH925 粗品, 脱盐后可直接上样, 洗脱采用 0.1% 三氟醋酸-10%—70% 乙腈梯度, 流速 1ml/min.

1.4.4 IL2, IL6 活性及纯度鉴定 IL2 活性用 MTT-CTL 方法, IL6 用 MTT-7TD1 方法, 15% SDS-PAGE 电泳鉴定纯度^[4].

2 结果与讨论

2.1 包涵体的纯化

将 1g 菌体溶于 10ml Tris 缓冲液中, 约加 1mg/ml 溶菌酶, 超声 60s, 间隔 60s, 4℃ 10 000r/min 离心 15min, 将沉淀重新悬起, 重复超声 1 次. 离心收集沉淀物, 经 Tris 缓冲液清洗后, 以 4mol/L 尿素在室温下作用 30min, 该工作浓度下 CH925 溶解率低于蛋白包涵体中表达产物总量的 10%, 损失少量 CH925, 但融合蛋白包涵体纯度增加了, 再次离心沉淀, 随后以 1mol/L NaCl 洗涤沉淀物. 经上述化学方法处理后, 可大大提高包涵体的纯度, 由 50% 增加到 76%, 便于纯化. 一般沉淀物中含有菌体膜蛋白、脂质、多糖以及核酸物质, 4mol/L 尿素可除去其中部分膜蛋白与脂质,

高浓度 NaCl 可清除核酸物质, 上述措施不仅提高了包涵体纯度, 同时也减少了纯化过程中干扰物质。见表 1。

表 1 不同处理方法对包涵体纯度和得率的影响

	Tris 缓冲液	4mol/L 尿素 + 1mol/L 氯化钠
菌体湿重/g	8	8
总蛋白量/mg	600	600
包涵体总量/mg	55	43
CH925 包涵体纯度/%	50	76

2.2 融合蛋白的变性和复性

CH925 含有 IL2 及 IL6 双活性功能区, 原核细菌表达时常常由于蛋白质不能正确折叠, 失去生物活性, 尤其是 IL2^[5,6] 二硫键的错配极大地降低了其活性。相比而言, IL2 较 IL6 复性难度大, 要求高。因此把握了 IL2 的复性规律, IL6 的生物活性也可获得较满意的结果。以下我们以 IL2 活性为观测指标对复性参数进行分析 and 选择。

图 1 观察了不同融合蛋白浓度对复性的影响, 我们选取 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml,

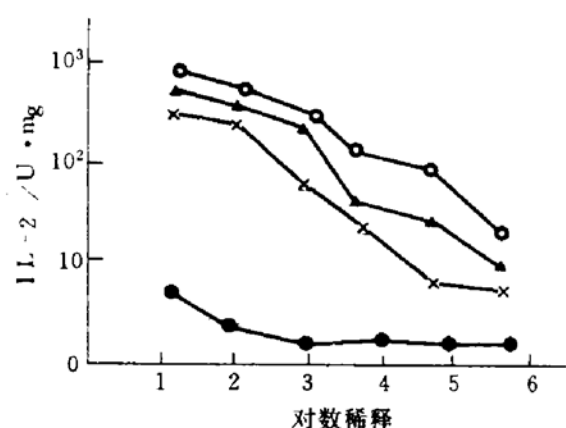


图 1 不同浓度 CH925 对蛋白复性的影响

●—●, 1 mg/ml, ▲—▲, 0.5 mg/ml, ○—○, 0.1 mg/ml, ×—×, 0.01 mg/ml.

0.5 mg/ml, 1 mg/ml 四个不同浓度的 CH925, 复性后测定 IL2 生物活性。从图 1 中明显看出, 0.1 mg/ml 水平复性效果最理想。

采用 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 氧化型及 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽为复性条件, 观察了 PEG 6000 (聚乙二醇) 等多种蛋白保护剂对复性的影响。

图 2 显示: 随着 PEG 与融合蛋白分子比增加, 复性后 IL2, IL6 生物比活性也增加, 在分子比为 20—80 之间达到较好复性效果。

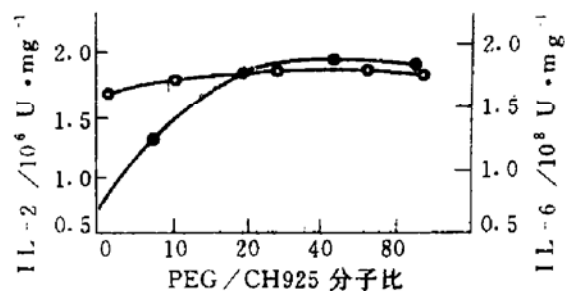


图 2 PEG 对 CH925 复性的影响

●—●, IL2, ○—○, IL6.

本文采用温敏表达载体, 42℃ 诱导 4—5 h, 获得融合蛋白高效表达 (32%)。该温度下细菌内肽链不易形成天然蛋白; 表达的融合蛋白中 IL6 含有 4 个半胱氨酸, IL2 含有 3 个半胱氨酸, 加之蛋白折叠过程中多种限速氨基酸残基影响蛋白复性, 使得变性、复性更加复杂, 形成包涵体机率明显增加。我们着重解决了以下的问题, 通过稀释或透析的方法使变性剂的浓度降低到一定水平, 既维持融合蛋白溶解状态, 又不会因变性剂浓度太低致使融合蛋白沉淀, 同时控制融合蛋白浓度, 为了避免融合蛋白分子间或分子内二硫键的错误搭配, 减少多聚体的形成, 将融合蛋白浓度控制在 0.1 mg/ml 左右, 加之在较适复性条件下, 使蛋白以最低自由能形式正确折叠, 融合蛋白具有 IL2 及 IL6 双活性, IL2 比活性为 2.2×10^8 U/mg, IL6 比活达 2.3×10^8 U/mg。

2.3 融合蛋白的纯化

2.3.1 阴离子交换色谱 经变性、复性后融合蛋白在阴离子交换柱上全部吸附, 以 0—0.5 mol/L NaCl 梯度多数蛋白均能被洗脱。

图 3 经 SDS-PAGE 电泳分析, 1 个洗脱主

峰中, 3 和 4 峰均以融合蛋白为主体, 生物活性试验结果与之相吻合. 分析看出: 融合蛋白分布于二个峰中, 原因可能为融合蛋白分子构象不均一或复性不完全所致, 也不排除融合蛋白与核酸等分子结合后引起离子极性的改变.

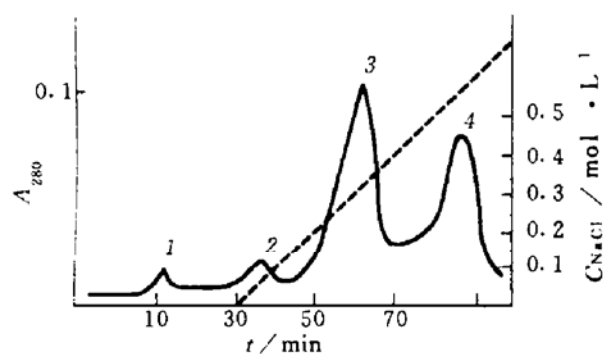


图 3 CH925 离子交换层析

实线表示回收蛋白峰; 虚线表示 NaCl 的梯度.

1, 2: 杂蛋白峰; 3, 4: 融合蛋白峰.

2.3.2 凝胶过滤色谱 柱(1.5cm×100cm)经磷酸缓冲液平衡后, 将变性后蛋白直接上柱, 检测灵敏度为 0.2, 流速 10ml/h, 上样体积为 3ml. 图 4 显示融合蛋白经凝胶过滤层析的结果, 虚线表示融合蛋白活性区, 经 SDS-PAGE 电泳证实, 3 号主峰为融合蛋白峰, 1 和 4 号峰为菌体杂蛋白峰.

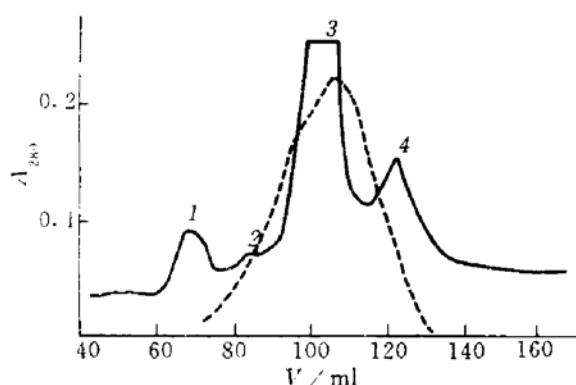


图 4 CH925 凝胶色谱图

----: CH925 活性. 1, 2, 4: 菌体杂蛋白峰; 3: 融合蛋白峰.

2.3.3 反相色谱纯化融合蛋白 我们采用 C18 柱色谱柱的硅胶粒度在 5—10 μ m, 柱长 15—30cm, 流动相采用极性溶剂 (水、乙腈). 在较适 pH 下, 乙腈梯度洗脱. 0—10min,

0.1% TFA 乙腈溶液由 0 至 20%, 10—45min, 由 20% 增至 70%, 检测波长 280nm. 图 5 显示经分子凝胶过滤层析后的反相色谱图.

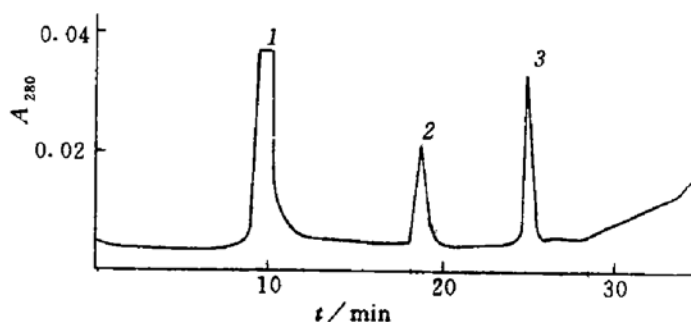


图 5 粗纯化后的 CH925-RP-HPLC 图

2: 融合蛋白峰; 1, 3: 溶剂峰.

在相应蛋白洗脱位置, 呈单峰状, 收集样品进行生物活性检测及电泳分析, 峰 2 生物活性阳性且电泳呈一条带, 蛋白薄层扫描结果: CH925 纯度达 98%.

我们采用双夹心 ELISA 方法, 对纯化融合蛋白进行检测: 以 IL6 单抗包被, 加入 5 倍梯度稀释的融合蛋白, 与标记辣根过氧化物酶 IL2 单抗孵育加底物显色, 从检测曲线分析, CH925 浓度与测定结果有较好的线性关系, 表明经蛋白折叠, 纯化后融合蛋白自身含有 IL2 及 IL6 结构域, 一端可与 IL2 单抗结合, 另一端同时可与 IL6 单抗结合.

我们以双活性 CH925 纯品, 观察了其对克隆化 LAK 活性细胞增殖的影响^[7]. 初步结果表明: 融合蛋白 CH925 可明显增强 LAK 细胞的增殖, 呈剂量依赖曲线, CH925 较含有相同单位 IL2 加 IL6 具有更强的细胞增殖效应.

参 考 文 献

- 1 Rosenberg S A, Lotze M T, Muul L M *et al.* N Engl J Med, 1985; 313: 1485
- 2 Van Snick J. Annu Rev Immunol, 1990; 8: 253
- 3 Zhao Chunhua, Wang Jiaxi, Mao Ning *et al.* Exp Hematol, 1993; 21: 1147
- 4 Laemmli V K. Nature, 1970; 227: 680
- 5 Tsuji T, Nakagawa R, Sugimoto N *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1987; 26: 3129
- 6 Weir M P, Sparks J. Biochem J, 1987; 245: 85
- 7 Zhao Chunhua, Tang Peihsen, Wang Jiaxi *et al.* Chinese J Exp Hematol, 1993; 3: 11

mRNA expression.

Key words vascular endothelial growth factor. Dot blot. tumor. SGC-7901 cell line. mRNA expression

The Inhibition of BIU87 Cell Proliferation and TGF α mRNA Expression by an TGF α Antisense Oligodeoxynucleotide. Sun Congmei. Wang Dong. Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 429—432

Two 23-mer unmodified oligodeoxynucleotides have been synthesized, one to hybridize with the region across the transcription initiation site of TGF α cDNA called antisense, and the second with an identical base composition, but the nucleotide sequence randomized. The random oligodeoxynucleotide was used to control for any non-specific effects of the oligodeoxynucleotides. TGF α antisense inhibited cell proliferation and DNA synthesis from 31% to 44% and 25.8% to 88.0% respectively. This effect is specific and dose-respondered. However, at the same condition, the inhibition by random is only 10% to 17% and 17% to 27%. This effect is not dose-respondered. By RNA dot blot analysis, the addition of 3 μ mol/L TGF α antisense and random upon BIU87 cells resulted in 61.4% and 42.5% inhibition in TGF α mRNA expression respectively. These results suggested that TGF α may play an important role in the proliferation of BIU87 cell line and provide a rational basis for the development of selective cancer therapeutical approaches.

Key words oligodeoxynucleotide. TGF α (transforming growth factor α). BIU87 cell. antisense oligodeoxynucleotide

Purification and Renaturation of Recombinant Fusion Protein IL6/IL2. Zhao Chunhua. Ling Shigan. Mao Ning. Tang Peihshien. (*Institute of Basic Medical Science, AMMS, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 432—435

The expressed CH925 was aggregated into inclusion bodies (IB) in *E. coli* cytoplasm. The IBs were isolated by centrifugation and sonication. CH925 were refolded and reoxidated in a glutathione redox system following denaturation of the IBs in 7mol/L guanidine hydrochloride. The specific activities of IL2 and IL6 assayed by CTLL-2 and 7TD1 cell line were 2.2×10^6 U/mg and 2.3×10^8 U/mg, respectively, following renaturation. The renatured CH925 was chromatographed through DEAE-Sephacryl column and Sephacryl column. The active fractions were pooled and applied to HPLC with reversed-phase C-18 column, while CH925 was eluted through 10%—70% acetonitrile gradient. It showed only one protein peak and SDS-PAGE confirmed that the purified CH925 was almost homogeneous.

Key words fusion protein IL6/IL2. denaturation. renaturation. protein purification

Effects of C-17 Deletion in the Spacer on the Strength of β -Lactamase Gene Promoter. Sun Naien. Wang Yan. Xie Wei. Zhu Dexu. (*National Laboratory of Medicine Biotechnology, Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210008*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 436—439

The C : G base-pair at position -17 in the spacer of β -lactamase gene promoter was removed by restriction with BspH I. partial filling-in with Klenow fragment, and trimming with mung bean nuclease. The β -lactamase activities of both bacteria harboring the wild-