

重组人睫状神经营养因子的复性研究*

咸海青 范明¹⁾ 吴燕 邱宗荫²⁾

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 利用凝胶层析对人睫状神经营养因子原核基因工程产品进行复性研究, 发现此方法的复性率高于稀释透析法, 而且在复性的同时也进行了一步纯化工作. 该方法简单、迅速、高效、重复性好, 可用于规模生产.

关键词 重组人睫状神经营养因子, 复性, 包涵体

学科分类号 Q503

睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) 是神经生长因子家族之外的另一类型神经营养因子. 它对外周及中枢神经元有广泛的促存活作用, 对星形胶质细胞有促分化作用, 对少突胶质细胞有促存活及成熟作用, CNTF 在临床研究中很有意义. 90 年代初有 4 家实验室利用基因重组技术得到了 CNTF 的表达^[1~4]. 本实验室也于 1994 年获得了 CNTF 的原核高效表达, 表达量达 45%~55%^[5].

原核基因工程产品有生产成本低, 表达量高, 包涵体蛋白易于纯化等优点. 但包涵体的复性工作却是一个难点和关键环节, 其意义重大. 如果这一问题得不到很好解决, 所复性的蛋白质活性不好、复性率不高, 那么原核基因工程产品就谈不上经济有效, 即使表达量再高也毫无意义.

本文报道了两种复性方法的比较, 认为应用凝胶过滤柱进行复性是一个高效重复性好且经济的方法.

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

分析纯的盐酸胍、Tris 购自 Sigma 公司, Sephacryl S-200 柱 (3 cm × 100 cm) 购自 Pharmacia 公司, 液相色谱仪购自 LKB 公司.

1.2 包涵体的提取与洗涤

将 hCNTF 重组工程菌 (由本室构建) 在 LB 培养基中培养并诱导表达, 收集菌体进行超声破碎提取包涵体, 用 STE (pH 8.0), 2 mol/L 尿素, 0.05% Triton X-100 等洗涤. 具体见文献 [5].

1.3 稀释透析复性方法

用 7 mol/L 盐酸胍, 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0), 250 mmol/L NaCl 溶液溶解包涵体, 并将蛋白质浓度调整至 0.1、0.3 g/L, 于室温放置

12 h 后, 于 16℃ 用 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0) 逐步稀释. 缓慢搅拌当变性剂浓度达 0.5 mol/L 时于 4℃ 在 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0) 溶液中透析. 超滤浓缩后用考马斯亮蓝染料结合法测蛋白质浓度计算复性率, 并用 10 日龄鸡胚背根节测定复性蛋白质的生物活性.

1.4 凝胶过滤复性法

用 7 mol/L 盐酸胍, 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0), 250 mmol/L NaCl 溶液溶解包涵体, 蛋白质浓度为 10 g/L. 在 2~10℃ 环境中过 Sephacryl S-200 柱, 流速为 1 ml/min, 平衡液为 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0), 250 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 80, 2.5 mmol/L EDTA. 收集 CNTF 蛋白峰, 于 4℃ 在 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0) 溶液中透析. 用考马斯亮蓝染料结合法测蛋白质浓度计算复性率, 并用 10 日龄鸡胚背根节测定复性蛋白质的生物活性.

1.5 用非还原 SDS-PAGE 测定复性液中单体含量

制备浓度为 12% 的凝胶, 上样缓冲液中除了不含 DTT 或巯基乙醇外, 其他成分与还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳相同^[6], 电泳凝胶采用银染法^[6]染色, 蛋白质分子质量标准购自华美公司.

1.6 测蛋白质浓度

用 BSA 作标准曲线, 采用考马斯亮蓝染料结合法^[6], 测定蛋白质浓度.

1.7 CNTF 活性测定

取 10 日龄鸡胚背根节进行分散细胞培养^[5], 以神经生长因子 (购自军事医学科学院) 为阳性对照.

* 国家“863”项目 (青年) 基金资助 (94) 国科生字 106 号.

¹⁾ 通讯联系人. 北京太平路 27 号三所一室.

²⁾ 重庆医科大学, 重庆 400046.

收稿日期: 1999-01-10, 修回日期: 1999-04-09

2 结 果

2.1 包涵体的获得

经提取洗涤后得到纯度高的包涵体, 经还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结合光密度扫描可知包涵体中 CNTF 的含量可达 88% (图 1). 高纯度的包涵体为下一步蛋白质复性奠定了良好的基础.

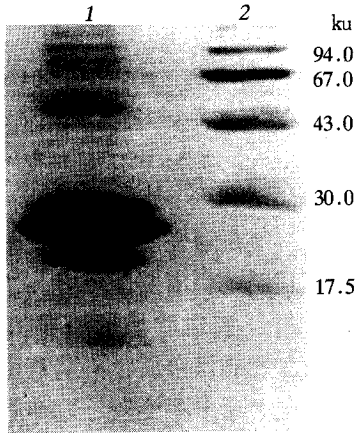


图 1 纯化的 rhCNTF 包涵体的还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
1: 洗涤后的 rhCNTF 包涵体; 2: 蛋白质分子质量标准 (上海东风试剂厂).

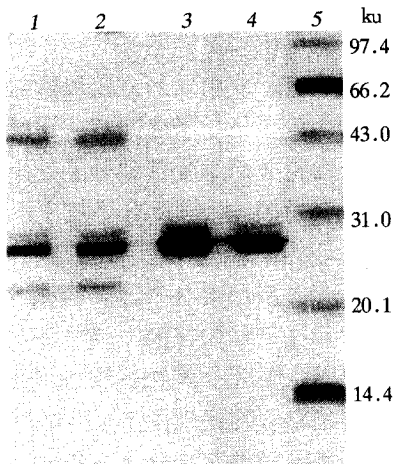


图 2 复性后 rhCNTF 的非还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
1、2: 用稀释透析复性法复性的 rhCNTF; 3、4: 用凝胶过滤法复性的 rhCNTF; 5: 蛋白质分子质量标准 (Pharmacia).

2.2 稀释复性结果

10 mg 包涵体溶解于 100 ml 变性液中, 用 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0) 缓慢逐步稀释到浓度为 0.5 mol/L, 体积为 1 400 ml, 将这 1 400 ml 液体装入透析袋进行 48 h 透析, 然后超滤浓缩至 126 ml. 测得此时蛋白质浓度为 18.8 mg/L, 得到总复性蛋白 2.37 mg, 经非还原电泳鉴定其中双体含量为 18% (图 2 的 1、2 泳道), 复性率达 23.8%.

2.3 凝胶过滤复性结果

以 2% 的柱床体积 (3 cm×100 cm) 上样一次可处理 141 mg 包涵体. 图 3 为 CNTF 过 Sephacryl S-200 柱复性的紫外检测图, 峰 1 为核酸及 CNTF 双体蛋白吸收峰, 峰 2 为 CNTF 单体蛋白峰, 峰 3 为盐峰, 经非还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 (图 2) 可知峰 2 中没有 CNTF 双体而且较纯, 高分子质量和低分子质量的蛋白质被除去. 虽然峰 1 的峰高及面积与峰 2 相近, 但峰 1 中蛋白质含量低, 大部分的 A_{280} 吸收是核酸造成的, 取峰 1, 峰 2 的峰尖部分各 5 μ l 做还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可知峰 1 中蛋白质含量低 (图 4). 合并

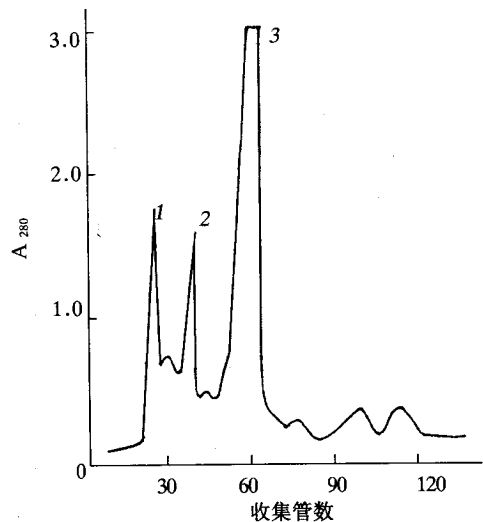


图 3 rhCNTF 经 Sephacryl S-200 凝胶柱复性时的紫外检测图

1: 经电泳鉴定为核酸及 rhCNTF 双体; 2: 经电泳鉴定为 rhCNTF 单体; 3: 盐峰.

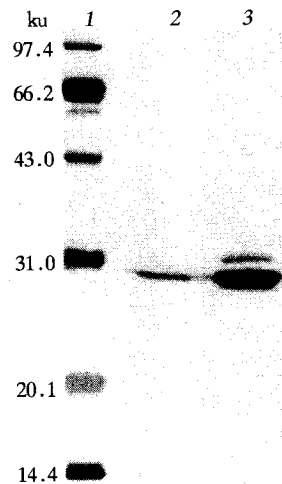


图 4 rhCNTF 经 Sephacryl S-200 柱复性时流出峰的聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定图谱

1: 低分子质量蛋白质标准; 2: 峰 1 的峰尖; 3: 峰 2 的峰尖.

峰 2 收集液共 102.5 ml, 测得蛋白质浓度为 1.12 g/L, 一次过柱得到 114.7 mg 的复性单体蛋白质, 复性率达 81.4%.

2.4 活性测定结果

两种复性方案得到的产品活性相当, 均在 0.5 μg/L 时就有促存活作用, 4 μg/L 时促存活作用

达到最高, 浓度再高活性达到平台期, 即 4 μg/L 为平台期的起点. 以 4 ng 为一个活性单位, 那么两种复性方案得到的产品的比活性均为 2.5×10^5 U/mg.

表 1 为两种复性方案的比较.

表 1 两种复性方案的比较

	操作体积及周期	每毫克蛋白质使用变性剂的量/ml	复性率 / %	最后所得复性蛋白质液中双体所占的比例 / %	比活性 / U·mg ⁻¹	复性蛋白的纯度 / %
凝胶过滤复性	小, 短	0.1	81.4	0	2.5×10^5	93
稀释复性	大, 长	10	23.8	18	2.5×10^5	62

3 讨 论

CNTF 是缺少信号肽的 22.86 ku 蛋白质, 在真核细胞中表达不能分泌到培养液中, 给纯化带来极大不便. 另此蛋白质分子上无糖基化位点, 这就决定了用原核表达体系来表达有其优越性. 我们实验室于 1994 年成功地于大肠杆菌中表达了人 CNTF, 表达量高达 45%~55%, 提取的包涵体纯度达 88%. 为蛋白质的纯化带来了极大的方便, 下一步成败的关键就在于蛋白质复性率的高低.

影响复性的因素很多^[7-9], 重组蛋白的自然特性是影响变性蛋白质折叠成有活性蛋白质的主要因素, 其次是蛋白质的纯度、溶液 pH 值、离子强度、目的蛋白浓度. 由变性到复性环境之间变换的速度及温度也是重要因素. 目前复性的方法很多, 效率不同. 即使同一方法对不同蛋白质复性效率也不相同. 这与蛋白质性质千差万别有关, 另外人们对已知蛋白质结构形成的知识知之甚少, 蛋白质的变性复性理论指导十分有限, 故大多蛋白质的复性还需要根据经验探索.

人 CNTF 有一个半胱氨酸, 易形成分子间二硫键产生双体蛋白质分子, 蛋白质分子中含大量疏水性氨基酸^[4], 造成 CNTF 疏水性极强, 在溶液中易形成沉淀. 这两点是此蛋白质复性的难点.

有人用稀释透析法可得到较高的复性率, 但我们的实验表明用盐酸胍溶解的蛋白质不宜采用此法. 有些重组蛋白表达量高, 形成的包涵体致密粗大以及一些其他原因, 使得用尿素无法溶解之, 只能用盐酸胍来溶解 (我们表达的 CNTF 就属于这种情况). 盐酸胍是极强的变性剂, 尿素是中等强度的变性剂. 复性的过程应是一个缓慢脱离变性环

境的过程, 而蛋白质在强变性能力的盐酸胍的稀释过程中几乎是大幅度地脱离变性环境, 这样不利于蛋白质的正确折叠, 蛋白质易形成异构体及寡聚体. 另外, 强疏水性的蛋白质也不适宜用稀释透析复性法, 分子在水溶液中不能较好地伸展开进行自然折叠. 另外此方法中蛋白质浓度的优化十分重要, 过低的浓度会导致蛋白质的不稳定性, 过高的浓度会造成肽链间交联形式的可溶性多聚物或可见的沉淀.

用凝胶过滤层析来复性不失为一个好方法, 在较低的蛋白质浓度下蛋白质经过凝胶颗粒时在填料之间穿行, 使得分子与分子之间有一定的距离和自由空间进行自由折叠而不受其他分子的影响. 周围的平衡液提供合适的 pH 值及离子强度, 蛋白质分子缓慢地从柱子的顶端流到底部时, 变性剂与蛋白质分子逐步分开, 蛋白质分子即可折叠成有活性的物质. 这个过程是相对匀速的, 且速率可根据不同蛋白质进行调整. 另外, 凝胶过滤层析复性法消耗变性剂的量是稀释复性法的 1%, 高纯度的变性剂价格高, 使用变性剂的量少使得生产成本降低.

本实验表明凝胶过滤复性法用 CNTF 复性是成功的. 它有简便快速复性率高等优点, 而且在复性的同时进行了初步的纯化. 其他原核重组蛋白也可尝试用此方法进行复性研究.

参 考 文 献

- 1 McDonald J R, Ko C, Miser D, *et al.* Expression and characterization of recombinant human CNTF from *E. coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1090** (1): 70~80
- 2 Negro A, Tolosara E, Skaper S D, *et al.* Cloning and expression of human CNTF. *Eur J Biochem*, 1991, **201** (1): 289~294
- 3 Negro A, Corona G, Bigon E, *et al.* Synthesis purification and characterization of human CNTF from *E. coli*. *J Neurosci Res*,

- 1991, 29 (2): 251~ 260
- 4 Masiakowski P, Liu H X, Radziejensshi C, *et al.* Recombinant human and rat CNTF. *J Neurochem*, 1991, 57 (3): 1003~ 1012
- 5 威海青, 范明, 甘思德, 等 (Xian H Q, Fan M, Gan S D, *et al.*). 人睫状神经生长因子的原核表达纯化及其生物效应. *中国应用生理学杂志 (Chinese J Appl Physiol)*, 1996, 12 (1): 21~ 24
- 6 Daniel M B, Stuart J E. *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss Press, 1991. 50~ 160
- 7 Marston F A O, Freedman F B. Recovery and reaction of recombinant proteins. *Biochem Soc Trans*, 1988, 16 (1): 101~ 103
- 8 Marston F A O, Angal S, Lowe P A, *et al.* Scale-up of the recovery and reaction of recombinant proteins. *Biochem Soc Trans*, 1988, 16 (1): 112~ 115
- 9 Doonan S, Walter J M. Downstream processing of protein products. *Biochem Soc Trans*, 1990, 18 (1): 231~ 234

Study of Renaturation of Recombinant Human Ciliary Neurotrophic Factor Expressed in *E. coli*.

XIAN Hai-Qing, FAN Ming, WU Yan (*Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*); QIU Zong-Yin (*Medical University of Chongqing, Chongqing 400046, China*).

Abstract Renaturation of human ciliary neurotrophic factor expressed in recombinant bacteria, by gel filtration chromatograph, was studied. It was showed that the renaturation rate by this way was higher than that by dilution and dialysis, and the protein was purified at the same time. It was a simple, rapid, good reproducibility and efficient procedure which can be used to produce ciliary neurotrophic factor in large scale.

Key words recombinant ciliary neurotrophic factor, renaturation, inclusion body

高纯度藻蓝蛋白分离纯化及光谱特性研究*

王勇 钱凯先

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

董强¹⁾

(山东省医学科学院, 济南 250062)

摘要 藻蓝蛋白 (PC) 具有特征性吸收光谱和荧光光谱, 是一种新颖的荧光分子探针. 为了获取高纯度 PC, 经过反复探索研究建立了 Sephadex G-200、DEAE-Sephadex A-25、HA、Sephadex G-200 的分离纯化程序. 此法效果理想: PAGE 显示为单条电泳带; 纯度值 (A_{615}/A_{280}) 高达 14, 突破了国内外报告的最高值.

关键词 藻蓝蛋白, 螺旋藻, 柱色谱层析, 荧光光谱

学科分类号 Q2251

螺旋藻细胞蛋白质含量高达干重的 50%~70%, 其中藻蓝蛋白占总蛋白质的 7% 左右. 这是一类稀有的光合色素蛋白, 仅存于蓝藻和红藻中, 藻蓝素是一种分子质量约 0.6 ku 的开链四吡咯化合物, 其分子上的乙叉基与多肽链上的脱氨酸以硫醚键共价连接构成藻蓝蛋白. 因此, 藻蓝蛋白的分离纯化是按蛋白质的柱色谱层析进行设计的. PC 通常为六聚体 ($\alpha\beta$)₆, 与之相近的别藻蓝蛋白为三聚体 ($\alpha\beta$)₃, 在分离纯化中必须去除别藻蓝蛋白, 同时保持 PC 的荧光活性, 这是提高 PC 纯度的关键. 藻蓝蛋白可作为荧光分子探针^[1], 并且有抗肿瘤活性, 提高免疫机能等功能, 受到国内外的重视.

1 材料与方法

1.1 实验材料

盐泽螺旋藻变种 (*Spirulina subsalsa* var) 由浙江大学生物科学与技术系细胞研究室培养和保存.

1.2 主要试剂

Sephadex G-200 (Pharmacia Co.)、DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia Co.)、HA (上海华美公司)、L-巯基乙醇 (Fluka Co.)、聚乙二醇、丙烯酰胺、甲叉丙酰胺 (Bio-Red Co.)、Phycocyanin (Sigma Co.)、标准蛋白 ($M = 17.5, 94$ ku, 上海

* 浙江省自然科学基金资助项目 (396079).

¹⁾ 董强与王勇并立为第一作者.

收稿日期: 1998-08-10, 修回日期: 1999-01-07