

小分子伴侣协助重组人 γ -干扰素体外复性研究*

关怡新** 费峥峥 罗 曼 姚善泾

(浙江大学化学工程与生物工程学系, 杭州 310027)

摘要 考察了小分子伴侣在游离和固定化两种情况下, 对重组人 γ -干扰素 (rhIFN- γ) 体外重折叠复性的作用. 实验结果表明, 小分子伴侣 GroEL191 ~ 345 的加入有效地促进了 rhIFN- γ 的复性, 在初始蛋白质浓度为 100 mg/L 时, rhIFN- γ 复性后蛋白质回收率提高了 2.2 倍, 总活性提高了近 3 倍; 将小分子伴侣固定化在 NHS-activated Sepharose Fast Flow 凝胶后, 不但能重复利用, 而且进一步提高了 rhIFN- γ 复性效率, 在初始蛋白质浓度为 400 mg/L 时, 仍使蛋白质回收率达到 46.29% 和比活达到 1.95×10^7 U/mg.

关键词 小分子伴侣 GroEL191 ~ 345, 重组人 γ -干扰素, 复性, 包涵体

学科分类号 Q511

小分子伴侣 GroEL191 ~ 345 是 GroEL 顶端区域氨基酸残基 191 ~ 345 片段编码序列的表达产物. 它是一种新型的协助蛋白质在生物体内和体外重折叠体系, 能有效地促进硫氰酸酶、亲环蛋白 A 以及芽孢杆菌 RNase 等^[1]的复性. 由于小分子伴侣具有分子质量小、易于固定化、协助复性时不需 ATP 和 GroES 等辅助因子等优点, 在协助蛋白质体外折叠复性方面具有很好的应用前景, 近年来引起了人们的关注.

γ -干扰素 (interferon-gamma, IFN- γ) 是干扰素家族中比较特殊的一类, 除了具有抗病毒作用以外, 它还是人体内一种双向免疫调节因子, 在抗肿瘤、治疗自身免疫性疾病方面有广阔的应用前景. 天然人 γ -干扰素因来源不足, 含量低, 不易大量制备获得, 多年来影响了人 γ -干扰素的作用机理和临床应用的研究. 1981 年 Goeddel 等^[2]和 1982 年 Gray 等^[3]先后开发出获得重组人 γ -干扰素 (rhIFN- γ) 的方法, 并成功用于生产. 但是, 由人 γ -干扰素 cDNA 转化的大肠杆菌往往不能直接分泌 γ -干扰素, 在高度表达时, 这种外源蛋白会聚集在菌体内, 并通过疏水作用相互连接形成不溶性聚合物即包涵体^[4]. 由于包涵体空间结构不正确, 需经体外折叠复性方可获得生物活性. 目前常用的包涵体复性方法如稀释法和透析法等, 回收率一般低于 30%, 是 rhIFN- γ 整个工艺的瓶颈, 还未见用分子伴侣片段来进行 rhIFN- γ 复性的报道.

本文将研究采用分子伴侣片段 GroEL191 ~ 345 对 rhIFN- γ 进行体外复性, 通过考察游离小分子伴侣 GroEL191 ~ 345 协助 rhIFN- γ 复性效果, 探索其

复性机理, 对其复性过程进行优化, 并对固定化 GroEL191 ~ 345 协助 rhIFN- γ 复性进行了探索, 期为开发小分子伴侣复性 rhIFN- γ 的新方法提供一些有用数据.

1 材料和方法

1.1 材料

rhIFN- γ 包涵体^[5]及小分子伴侣 GroEL191 ~ 345^[6]由本实验室制备; NHS-activated Sepharose Fast Flow 购自 Amersham Biosciences 公司; 人羊膜细胞株 (WISH)、水泡性口炎病毒株 (VSV) 和干扰素 α 标准品 (Lot 03/94, 效价 12 000 U/ml) 由第二军医大学惠赠; Eagle's 最低限度培养基 (MEM) 粉末购自 Gibco 公司; 新生小牛血清购自四季青生物工程材料有限公司; 盐酸胍和 DTT 购自上海生工生物工程有限公司; 其余均为进口分装或国产分析纯试剂.

1.2 实验方法

1.2.1 游离小分子伴侣协助复性: 将人 γ -干扰素包涵体粗品加入到 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 配制的 0.5% TritonX-100 洗涤液中, 于磁力搅拌器上洗涤 2 h. 8 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清, 取沉淀. 取浓度为 17.8 g/L 的 rhIFN- γ 变性裂解液 (30 mmol/L PBS pH 8.0, 7 mol/L 盐酸胍,

* 浙江省自然科学基金 (201099) 和教育部留学回国人员科研启动基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0571-87951982, Fax: 0571-87951015

E-mail: guanyx@che.zju.edu.cn

收稿日期: 2004-04-26, 接受日期: 2004-06-30

10 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl), 用复性缓冲液 (30 mmol/L PBS, 1 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl 和一定浓度的脲) 稀释一定倍数, 加入一定量的小分子伴侣, 复性后转入透析袋中, 4℃ 在 30 mmol/L PBS (pH 8.0) 中充分透析后, 8 000 r/min 离心15 min, 取上清测蛋白质浓度以及 rhIFN-γ 生物活性.

1.2.2 固定化小分子伴侣协助复性: 固定化小分子伴侣制备过程如下. 将 3 ml 新鲜的固定化缓冲液 (50 mmol/L NaHCO₃, pH 8.3, 500 mmol/L NaCl) 和 1 ml 小分子伴侣纯品 (浓度为 13.4 g/L) 快速加入 1 ml NHS-activated Sepharose Fast Flow 湿胶中, 室温下混合 2 h, 500 r/min 离心 10 min 弃上清. 再用 4 ml 终止缓冲液 (2.5 mol/L 氨基乙醇, pH 8.3, 500 mmol/L NaCl) 和 1 ml 湿胶在室温下混合 2 h, 屏蔽未吸附蛋白质的活性基团. 最后用洗涤缓冲液 1 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 500 mmol/L NaCl) 和洗涤缓冲液 2 (100 mmol/L 醋酸, pH 4.0, 500 mmol/L NaCl) 交替洗胶数次, 转移至 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中, 保存于 4℃ 冰箱备用^[7,8], 根据吸附前后蛋白质浓度差可知, 每毫升凝胶吸附小分子伴侣 GroEL191~345 约 5 mg. 取 1 ml 固定化小分子伴侣的湿胶, 加入适量变性蛋白质, 用复性缓冲液稀释至终体积 5 ml, 一定温度下复性后, 500 r/min 离心 10 min, 取上清转入透析袋, 4℃ 充分透析后, 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清测蛋白质浓度以及 rhIFN-γ 生物活性.

1.2.3 蛋白质浓度测定: 用改进的 Lowry 法^[9].
1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 浓缩胶 5%, pH 6.8; 分离胶 15%, pH 8.8. 用 0.025% 考马斯亮蓝 G-250 染色^[10].
1.2.5 rhIFN-γ 生物活性的测定: 用 VSV 病毒攻击 WISH 细胞株, 根据结晶紫染色法测定 rhIFN-γ 活性, 详见文献 [11].

2 结 果

2.1 小分子伴侣对 rhIFN-γ 复性的促进作用

取一定量的 rhIFN-γ 变性溶解液, 用复性缓冲液 (pH 8.0, 含 1 mol/L 脲) 稀释至初始蛋白质浓度为 100 mg/L, 添加小分子伴侣 GroEL191~345 与 rhIFN-γ 的摩尔比为 2:1, 15℃ 下复性 4 h. 实验结果如表 1 所示. 加入小分子伴侣后, 使 rhIFN-γ 复性后的总活力从 2.88 × 10⁵ U/ml 提高到 6.63 ×

10⁵ U/ml, 表明小分子伴侣的加入确能促进复性效果. 从机理上分析, 因为小分子伴侣片段保留了 GroEL 顶部区域的多肽结合位点, 能够和底物蛋白质以 1:1 形成瞬间的结合物, 使变性蛋白相应地成单分散形式, 防止多肽链的错误折叠, 抑制聚集体的形成, 保证在隔离的条件下进行复性, 从而促进了 rhIFN-γ 的折叠复性.

Table 1 Effects on rhIFN-γ refolding in the presence and absence of GroEL191~345

Refolding mode	Protein yield /%	Total activity /(10 ⁵ U · ml ⁻¹)	Specific activity /(10 ⁷ U · mg ⁻¹)
Spontaneous	14.77	2.88	1.95
GroEL191~345 mediated	32.50	6.63	2.04

2.2 小分子伴侣协助 rhIFN-γ 复性的条件优化

首先, 考察了复性温度对小分子伴侣 GroEL191~345 协助 rhIFN-γ 复性的影响. 用复性缓冲液 (pH 8.0, 含 1 mol/L 脲) 稀释 rhIFN-γ 变性溶解液, 至初始蛋白质浓度为 100 mg/L, 添加小分子伴侣 GroEL191~345 与 rhIFN-γ 的摩尔比为 2:1, 在不同温度下进行复性, 每隔 30 min 测定活性蛋白质回收率, 确定最高活性蛋白质回收率的时刻为复性终止时刻, 然后测定 rhIFN-γ 总活性 (4℃ 复性 12 h, 15℃ 复性 4 h, 25℃ 复性 2 h 和 33℃ 复性 1 h, 分别为最高活性蛋白质回收率时刻, 即为复性终止时刻). 从图 1 可以看出, rhIFN-γ 复性后的总活性随温度的增加先升高后下降, 在 15℃ 复性 4 h 达到最高值. 一方面, 在高离子强度

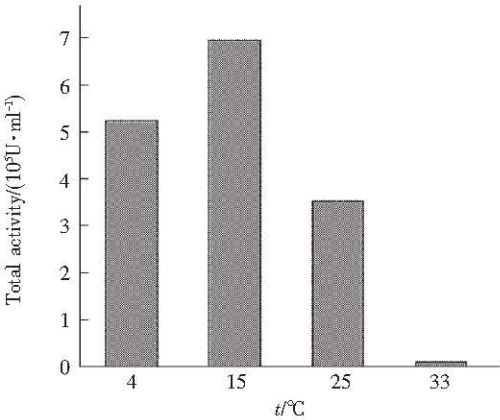


Fig. 1 Effects of temperature on the refolding of rhIFN-γ mediated by GroEL191~345

下, 温度的升高有利于蛋白质疏水部位的失水, 促进了小分子伴侣与 rhIFN- γ 分子间的疏水性吸附结合作用, 但是蛋白质正确折叠的主要竞争者——聚集体也更容易形成, 特别是在小分子伴侣加入后由于溶液中蛋白质分子数目增多和粘度增大, 使得分子间局部的聚集作用增强进而容易引起聚集共沉淀^[12,13]. 另一方面, 低温下操作, 不仅要增加能耗, 而且分子间振动扩散太慢又不利于分子伴侣与蛋白质分子的结合和解离. 因此过高和过低的温度对复性过程都是不利的, 本实验结果表明, 小分子伴侣促进 IFN- γ 体外折叠的适宜温度为 15℃.

在以上预实验的基础上, 通过 4 因素 3 水平的正交试验 (表 2), 详细考察了初始 rhIFN- γ 浓度、GroEL191 ~ 345 与 rhIFN- γ 摩尔比以及复性缓冲液 pH 和脲浓度对游离 GroEL191 ~ 345 协助 rhIFN- γ 复性的作用. 由实验得到优化的复性条件为: 初始蛋白质浓度 100 ~ 200 mg/L, GroEL191 ~ 345 与 rhIFN- γ 的摩尔比 2: 1, 复性缓冲液 pH 7.7, 脲浓度 1 mol/L. 由极差比较表明, 各因素对复性的影响由强到弱依次为: GroEL191 ~ 345 与 rhIFN- γ 摩尔比 $\gg$ 初始 rhIFN- γ 浓度 > pH > 脲浓度.

Table 2 The orthogonal experiments of the refolding of rhIFN- γ mediated by GroEL191 ~ 345

No.	Initial rhIFN- γ / (mg · L ⁻¹)	Mol ratio of GroEL191 ~ 345 and rhIFN- γ	pH	c (Urea) / (mol · L ⁻¹)	Protein yield /%	Specific activity / (10 ⁷ U · mg ⁻¹)
1	100	1: 1	7.0	0	25.39	1.98
2	100	2: 1	7.7	1	26.25	2.11
3	100	4: 1	8.3	2	19.32	1.84
4	200	1: 1	7.7	2	31.76	2.00
5	200	2: 1	8.3	0	18.50	2.17
6	200	4: 1	7.0	1	16.67	1.73
7	400	1: 1	8.3	1	28.08	1.83
8	400	2: 1	7.0	2	17.96	1.66
9	400	4: 1	7.7	0	15.73	1.72

分子间的疏水作用是导致变性蛋白质发生不可逆聚集和沉淀的主导因素, 小分子伴侣 GroEL191 ~ 345 基于其暴露的疏水表面, 在一定程度上可以抑制这一作用. 但是过多的加入 GroEL191 ~ 345 造成蛋白质浓度升高, 溶液黏度增大, 局部蛋白质数目增多加大了分子间作用力, 反而容易引起聚集共沉淀的形成. 游离复性的正交试验结果表明, GroEL191 ~ 345 与 rhIFN- γ 的摩尔比是复性回收率的主要影响因素, rhIFN- γ 复性初始浓度越高, 这种现象越明显.

2.3 固定化小分子伴侣协助 rhIFN- γ 复性

为了解决上述问题, 我们采用了固定化方法, 即将小分子伴侣固定化在 NHS-activated Sepharose Fast Flow 凝胶上, 同时增大 GroEL191 ~ 345 和 rhIFN- γ 的摩尔比, 由此加大了两者的碰撞几率, 以进一步提高复性效率.

图 2 是固定化 GroEL191 ~ 345 协助 rhIFN- γ 复性的结果. 初始蛋白质浓度在 100 ~ 400 mg/L 时,

复性蛋白质回收率比相同条件下游离复性时提高了近 20%, 比活维持在 $(2.00 \pm 0.05) \times 10^7$ U/mg.

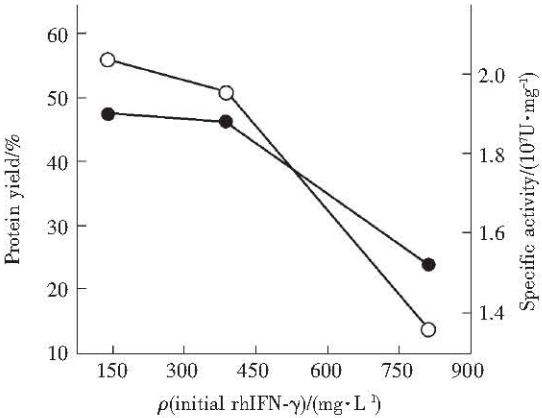


Fig. 2 Effects of initial protein concentration on rhIFN- γ refolding by immobilized GroEL191 ~ 345
●—●: protein yield; ○—○: specific activity.

2.4 小分子伴侣的重复利用

Guise 等^[14]根据完整的 GroEL 分子质量大的特点, 采用超滤法回收 GroEL. 本实验中所用小分子伴侣 GroEL191 ~ 345 其分子质量约为 18 ku, 与 rhIFN- γ 相近, 在游离复性中, 无法直接通过超滤法来回收, 因其尾部具有 Histag, 可通过亲和层析加以分离, 但会造成小分子伴侣的部分损失和加大操作成本. 本文利用小分子伴侣易于固定化这一特点, 将其固定于 NHS-activated Sepharose Fast Flow 凝胶上, 使小分子伴侣得以重复利用, 便于回收且降低了成本. 固定化后小分子伴侣的重复利用结果见图 3 所示, 初始蛋白质浓度为 400 mg/L, 连续 10 次操作后, rhIFN- γ 复性后的比活在 $1.81 \times 10^7 \sim 2.03 \times 10^7$ U/mg 之间, 与第 1 次相比, 第 10 次处理时总活性下降了 25.1%, 与游离复性 GroEL191 ~ 345 与 rhIFN- γ 摩尔比为 1:1 的条件接近, 估算 GroEL191 ~ 345 每次的损失约为 5% ~ 10%.

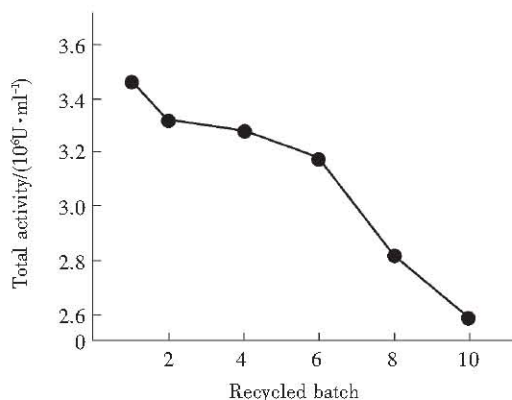


Fig. 3 Total activity of sequential 10 batches operation on rhIFN- γ refolding by immobilized GroEL191 ~ 345

3 讨 论

蛋白质体外复性的一般策略就是考虑影响复性回收率的各种因素 (如蛋白质浓度、温度、pH 值、适宜的氧化-还原体系等) 和应用实际, 尽量抑制蛋白质的聚集而促进折叠中间体向天然态的方向折叠. 传统的稀释和透析复性, 复性时蛋白质初始浓度一般为 10 ~ 100 mg/L 或更低, 复性效率较低, 目的蛋白质回收困难, 造成后续分离纯化的不便, 难以应用于工业生产. 在本工作中, 我们加入了适量的小分子伴侣, 有效地促进了 rhIFN- γ 的体

外折叠复性. 正是采用了固定化小分子伴侣这一技术, 不仅使体系中小分子伴侣的相对浓度增大, 提高了活性收率和复性效率, 还可以使小分子伴侣得以循环使用, 减少了损失, 降低了操作成本.

这些结果表明, 小分子伴侣的加入确实可以起到促进提高 rhIFN- γ 的复性效果, 为拓展小分子伴侣复性方法的应用和 rhIFN- γ 复性方法的选择提供了一个成功的实例.

参 考 文 献

- 1 Zahn R, Buckle A M, Perrett S, *et al.* Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (26): 15024 ~ 15029
- 2 Goeddel D V, Leung D W, Dull T J, *et al.* The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs. *Nature*, 1981, **290** (5801): 20 ~ 26
- 3 Gray P W, Leung D W, Pennica D, *et al.* Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature*, 1982, **295** (5877): 503 ~ 508
- 4 刘沪丽. 重组人 γ 干扰素的纯化和稳定性研究进展. 国外医学: 预防. 诊断. 治疗用生物制品分册, 1990, **13** (2): 61 ~ 64
Liu H L. Foreign Medical Sciences: Biological Products for Prophylaxis, Diagnosis and Therapy, 1990, **13** (2): 61 ~ 64
- 5 靳 挺, 关怡新, 姚善经. 人 γ -干扰素基因工程菌培养条件的研究. 浙江大学学报 (工学版), 2003, **37** (6): 724 ~ 728
Jin T, Guan Y X, Yao S J. J Zhejiang Univ (Engineering Science), 2003, **37** (6): 724 ~ 728
- 6 张佳艺, 关怡新, 姚善经. 小分子伴侣 GroEL (191 ~ 345) 在 *E. coli* 中的表达及其培养条件的优化. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2003, **29** (6): 603 ~ 608
Zhang J Y, Guan Y X, Yao S J. J Zhejiang Univ (Agriculture and Life Sciences), 2003, **29** (6): 603 ~ 608
- 7 Altamirano M M, Golbik R, Zahn R, *et al.* Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (8): 3576 ~ 3578
- 8 Altamirano M M, Garcia C, Possani L D, *et al.* Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nature Biotechnol*, 1999, **17** (2): 187 ~ 191
- 9 Sandermann H, Strominger J L. Purification and properties of C₅₅-isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 1972, **247** (16): 5123 ~ 5131
- 10 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 1970, **227** (259): 680 ~ 685
- 11 刘长暖, 刘 兰, 王军志, 等. 应用结晶紫染色法测定干扰素效价. 中国生物制品学杂志, 1999, **12** (1): 36 ~ 38
Liu C N, Liu L, Wang J Z, *et al.* Chin J Biol, 1999, **12** (1): 36 ~ 38
- 12 Guise A D, West S M, Chaudhuri J B. Protein folding *in vivo* and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies. *Mol Biotech*, 1996, **6** (1): 53 ~ 64
- 13 Seckler R, Jaenicke R. Protein folding and protein refolding. *FASEB J*, 1992, **6** (8): 2545 ~ 2552
- 14 Guise A D, Chaudhuri J B. Recovery and reuse of the molecular chaperone GroEL for *in vitro* protein refolding. *Biotechnol Prog*, 1998, **14** (2): 343 ~ 346

Minichaperone (GroEL191 ~ 345) -mediated *In vitro* Refolding of Recombinant Human Interferon- γ Inclusion Body*

GUAN Yi-Xin**, FEI Zheng-Zheng, LUO Man, YAO Shan-Jing

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract The interferons are cytokines with antiviral, antiproliferative and immunomodulatory activities. Among three major distinguished types, interferon-gamma (IFN- γ) is more popular for its specific properties in inhibition of cell growth and modulation of immune functions. Now the recombinant DNA techniques make it possible to express recombinant IFN- γ in *E. coli* in large amounts, however this may result in the formation of inclusion bodies, and the recovery of biologically active products becomes significant. As the minimal mechanism of GroEL-mediated protein folding, minichaperones, fragments encompassing the apical domain of GroEL, can facilitate the refolding of several proteins *in vitro* without requiring GroES, ATP, or the cage-like structure of multimeric GroEL. Here minichaperone (GroEL191 ~ 345) -mediated *in vitro* refolding of recombinant human interferon gamma (rhIFN- γ) in free and immobilized GroEL191 ~ 345 systems are studied. SDS-PAGE was performed with Laemmli's Tris-glycine buffer system for protein analysis. Protein concentrations were determined by using a modification of Lowry's method with bovine serum albumin as reference and total activities of renatured rhIFN- γ were measured by CPE method. The results showed that the presence of GroEL191 ~ 345 in the refolding buffer not only enhanced the specific activity, but also promoted the refolding efficiency. With the initial protein concentration of 100 mg/L, the protein yield and total activity of rhIFN- γ assisted by GroEL191 ~ 345 was 2.2 and 3 folds of that under spontaneous condition respectively. Optimal operating parameters in refolding of rhIFN- γ assisted by GroEL191 ~ 345 were as follows: refolding temperature 15°C, refolding time 4 h, pH 7.7, initial concentration of IFN- γ 100 ~ 200 mg/L and the molar ratio of GroEL 191 ~ 345 *versus* IFN- γ 1:1 ~ 2:1. Furthermore, the immobilization of GroEL191 ~ 345 on NHS-activated sepharose fast flow made it possible to be recycled. The protein yield and the specific activity of rhIFN- γ were 46.29% and 1.95×10^7 U/mg respectively even the initial protein concentration was up to 400 mg/L.

Key words minichaperone GroEL191 ~ 345, recombinant human interferon- γ , refolding, inclusion body

* This work was supported by a grant from Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (201099) and The Scientific Research Foundation for The Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry.

** Corresponding author. Tel: 86-571-87951982, Fax: 86-571-87951015, E-mail: guanyx@che.zju.edu.cn

Received: April 26, 2004 Accepted: June 30, 2004