

疏水层析分离正确折叠与错误折叠的复合干扰素

Separation of Correctly Refolded and Mis-refolded Consensus Interferon by Hydrophobic Interaction Chromatography

赵荣志^{1,2}, 刘永东², 王芳薇^{2,3,4}, 李京京², 夏 新⁵, 苏志国^{2*}ZHAO Rong-Zhi^{1,2}, LIU Yong-Dong², WANG Fang-Wei^{2,3,4}, LI Jing-Jing², XIA Xin⁵ and SU Zhi-Guo^{2*}

1. 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083

2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

3. 大连理工大学, 大连 116024

4. 大连医科大学附属二院, 大连 116027

5. 中国环境监测总站, 北京 100029

1. *Civil & Environmental Engineering School, University of Science and Technology of Beijing, Beijing 100083, China*2. *State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*3. *Dalian University of Technology, Dalian 116024, China*4. *Second Clinical College, Dalian Medical University, Dalian 116027, China*5. *Environmental Monitoring in China, Beijing 100029, China*

摘 要 采用疏水层析纯化重组复合干扰素, 成功去除了复性过程中产生的错误折叠体、聚集体及杂蛋白, 并考察了配基类型、盐浓度、pH 值和流速对疏水层析纯化效果的影响, 结果表明采用 Butyl Sepharose 4FastFlow、硫酸铵初始浓度 0.8mol/L、缓冲液 pH 值 8.3、线流速为 90cm/h 时疏水层析纯化效果最佳, 最终目标蛋白反相高效液相色谱检测纯度达到 99.6%, 还原及非还原型 SDS-PAGE 电泳均呈单一条带, 其比活为 2.3×10^9 IU/mg, 回收率为 36.7%。

关键词 复合干扰素, 纯化, 疏水层析

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0451-05

Abstract Hydrophobic interaction chromatography was used to separate correctly refolded and mis-refolded consensus interferon. The effects of ligand types, salt concentration, pH and flow rate were investigated. The best result could be obtained by using Butyl Sepharose 4 Fast Flow, 0.8 mol/L of ammonium sulfate, pH 8.3 and 90cm/h of linear flow rate. Reverse-phase HPLC analysis showed the purity of the pooled fraction was as high as 99.6%. The specific activity of purified consensus interferon was 2.3×10^9 IU/mg. The mass recovery of target protein was 36.7%.

Key words consensus interferon, purification, hydrophobic interaction chromatography

Received: November 12, 2004; Accepted: January 24, 2005.

The work was supported by a grants from the National Nature Science Foundation of China(No.20136020).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62561817; E-mail: zgsu@home.ipe.ac.cn

国家自然科学基金资助项目(No.20136020)。

复合干扰素 (Consensus Interferon) 是 Fieschko J 等合成的一种非天然的 I 型干扰素。他们将已知的 13 种 α 干扰素序列进行比较, 把出现频率最高的氨基酸分配到各自相应的位置, 并对个别位置进行修改后组合得到复合干扰素的氨基酸序列, 然后通过基因重组技术在大肠杆菌中进行表达^[1]。此后, 许多研究者又做了不同的改进, 采用不同的序列, 显示了不同的效果。

临床上干扰素已被用于治疗多种病毒性疾病, 通过大肠杆菌表达的重组复合干扰素比天然干扰素活性更高, Hu CJ 等^[2]就复合干扰素的抗病毒、抗增殖及激活 NK 细胞的生物功能与 IFN- α_{2a} 和 IFN- α_{2b} 进行了对照。他们的研究表明复合干扰素的生物活性明显高于 IFN- α_{2a} 和 IFN- α_{2b} , 其抗 VSV Hela 病毒的活性为 2.5×10^9 , 是后两者的 10 倍, 对 Daudi cells 的抗增殖性和诱导 NK 细胞等生物功能也明显优于 α_{2a} 和 α_{2b} ; 而且毒性副作用更小和病毒消除率更高。因此纯化具有高活性、高纯度的复合干扰素具有重要的意义。

原核细胞表达的复合干扰素往往以包涵体的形式存在, 除了杂蛋白外, 从包涵体变性的复合干扰素在复性过程中常形成部分氧化的错误折叠结构和聚集体(也是一种错误折叠)。这些部分氧化的结构在存放过程中易于生成聚集体^[3], 并且自由巯基易发生反应, 可能生成有毒物质, 影响产品的稳定性。为了安全使用, 这些错误折叠、聚集体均应在纯化过程与杂蛋白一起同时去除。根据错误折叠异构体疏水性较正常结构的蛋白质强的特点^[4], 我们设计了一套疏水层析路线, 用以分离天然结构和错误结构的复合干扰素。与离子交换层析相比, 疏水层析可以在高盐浓度下操作, 避免了层析前脱盐过程, 是一项过程集成的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 重组复合干扰素工程菌 *E. coli* BL21, 由中科院微生物所唐宏研究员提供。

1.1.2 实验仪器: 层析系统 ÄKTA Purifier100、Hoefel MiniVe 垂直电泳系统、疏水层析自装柱 ($\Phi 16\text{mm} \times 135\text{mm}$) (GE Healthcare); Waters 650 HPLC 系统 (介质 Vaydic-C4, $\Phi 4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$) (Waters)。

1.1.3 主要试剂与介质: 疏水介质 Butyl Sepharose 4Fast Flow、Octyl Sepharose 4Fast Flow、Phenyl Sepharose

6Fast Flow; Sephadex G-25 脱盐柱 ($\Phi 26\text{mm} \times 200\text{mm}$) (GE Healthcare)。SDS-PAGE 中分子量标准蛋白质 (上海升正生物技术有限公司); 牛血清白蛋白 (Sigma); 乙腈 (Fisher Scientific UK Limited.); Tris (Amresco)。

1.2 方法

1.2.1 发酵培养: 挑取工程菌于 LB (含 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp) 平板上划线, 37°C 培养 12h。取单菌落接种于 LB 培养基, 37°C 摇床培养 12h; OD_{600} 达到 2.0 时将培养液接种于 7L 搅拌发酵罐 37°C 培养, OD_{600} 达到 2.0 时加入 0.1% IPTG 诱导 3 h。发酵液离心收集菌体。

1.2.2 菌体破碎、包涵体变性和复性: 菌体以缓冲液 ($20\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl, pH 8.3) 1:6 (W:V) 充分悬浮, 冰浴超声破碎 30min, $12000\text{r}/\text{min}$ 离心 15min, 收集沉淀。沉淀用洗涤液 ($2\text{mol}/\text{L}$ 脲, $2\text{mmol}/\text{L}$ 巯基乙醇, $1\text{mmol}/\text{L}$ EDTA, 0.5% Triton X-100, $20\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl, pH 8.3) 充分悬浮, $12000\text{r}/\text{min}$ 下离心 15 min; 重复洗涤 3 次, 得较纯包涵体。

将包涵体以 1:10 (W:V) 的比例加入变性液 ($6\text{mol}/\text{L}$ 盐酸胍, 1% 巯基乙醇, $1\text{mmol}/\text{L}$ EDTA, $20\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl, pH 8.3), 搅拌数小时; $12000\text{r}/\text{min}$ 离心 15min 后收集上清液。将上清液以 1:100 滴加到复性缓冲液 ($0.2\text{mmol}/\text{L}$ EDTA, $0.5\text{mol}/\text{L}$ 精氨酸, $25\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl, pH 8.3) 中, 分 5 次加入, 间隔 1h。每次混匀后静置。完全加入后 4°C 静置 48h。

1.2.3 分离纯化: 复性复合干扰素溶液中加入 $0.8\text{mol}/\text{L}$ 硫酸铵, 进样至缓冲液 A ($20\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl, $0.8\text{mol}/\text{L}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8.3) 平衡的疏水柱 ($\Phi 16\text{mm} \times 135\text{mm}$)。缓冲液 A 淋洗 2 个柱体积, 然后用 12 个柱体积进行线性梯度洗脱, 梯度范围从 30% 上升至 100% 的缓冲液 B ($20\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl, pH 8.3), 收集含复合干扰素正确折叠体的洗脱峰, Sephadex G-25 柱 ($\Phi 26\text{mm} \times 200\text{mm}$) 脱盐 (缓冲液为 $10\text{mmol}/\text{L}$ PBS, pH 7.0), 收集活性峰待分析测定。

1.2.4 生物活性测定法: 按文献 [5], 以病变抑制法测定蛋白活性。

1.2.5 蛋白浓度测定: 以牛血清白蛋白为标准蛋白, 采用 Bradford 法^[6] 测定总蛋白量。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳: 按文献 [7], 分离胶浓度为 15%, 浓缩胶浓度为 5%, 以氨银染色。染色后的凝胶, 在激光电泳扫描仪上进行扫描。

1.2.7 反相高效液相色谱 (RP-HPLC): Waters 650 HPLC 系统, 流动相 A: 0.1% 三氟乙酸; 流动相 B:

88%乙腈,0.1%三氟乙酸,2%异丙醇。

2 结果和讨论

2.1 疏水层析纯化复性的复合干扰素

考虑到正确折叠体与错误折叠体及聚集体的疏水性存在差异的特点,我们探索了采用疏水层析来纯化复性后的复合干扰素,结果如图1所示。

从图1上可以看出,采用线性梯度洗脱时,复性操作得到的溶液可以分离成 P_1 及 P_2 两个洗脱峰。对两洗脱峰进行活性分析,发现两者的比活存在较大差异。 P_1 洗脱峰的比活为 2.3×10^9 IU/mg,与文献报道一致^[2],而 P_2 峰的比活为 0.3×10^9 IU/mg,仅有 P_1 峰的13%,接近于IFN- α 。为确定 P_2 峰的低活性是由于错误折叠或是混有杂质引起,我们分别对其进行了还原型和非还原型SDS-PAGE电泳,结果如图2所示。可以看出,两者还原型电泳的迁移率一致,分子量均为19kD左右,与复合干扰素的分子量一致,说明两峰均可能是复合干扰素。但是,在非还原型电泳中,两者的迁移率不同,其中 P_1 峰的迁移率与文献报道的正确折叠结构一致,而 P_2 峰的迁移率与部分氧化的错误折叠体的位置一致^[8]。对两洗脱峰进行RP-HPLC(图3)分析,发现 P_2 峰的保留时间较 P_1 峰的保留时间长,表明其疏水性更强。为进一步证实两洗脱峰的结构,分别用质谱对其进行二硫键定位,发现 P_1 峰中有一对二硫键,而 P_2 峰中未检测到二硫键。因此,我们可以判断 P_1 峰为正确折叠的复合干扰素, P_2 峰为错误折叠体或折叠中间体。虽然 P_2 峰也有活性,但实验中发现 P_2 峰易于生成聚集体;并且由于存有未配对的自由巯基,易被氧化成有毒物质,影响产品的稳定性,因此应在纯化过程中将其去除。在已有的文献中,Felix AM^[3]等采用HPLC对IFN- α A中错误折叠进行了分离,HPLC处理量小,而且放大成本很高,不适于大规模生产。

本文通过疏水层析,复合干扰素的正确折叠体和错误折叠体也得到了成功的分离,并且疏水层析

易于放大,介质价格低廉,易于得到高纯度高活性的复合干扰素,为此,我们对复合干扰素的疏水层析条件进行了优化。

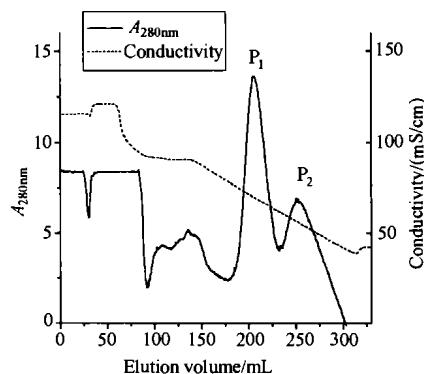


图1 疏水层析纯化复合干扰素

Fig.1 Hydrophobic interaction chromatography for consensus interferon

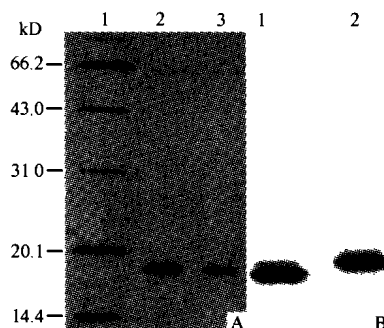


图2 疏水层析各洗脱峰还原型与非还原型电泳

Fig.2 SDS-PAGE of fractions from hydrophobic interaction chromatography under reducing(A) and nonreducing(B) conditions

A. 1: marker; 2: P_1 with DTT; 3: P_2 with DTT; B. 1: P_1 without DTT; 2: P_2 without DTT.

2.2 疏水层析条件的优化

以下我们以各种条件对正确折叠体的回收率的影响为评价指标,对各种层析条件进行了考察。

2.2.1 配基对疏水层析的影响:疏水层析介质的配基具有不同的疏水性,疏水性的大小导致与蛋白结合能力的大小,选择合适的配基有利于提高目标蛋

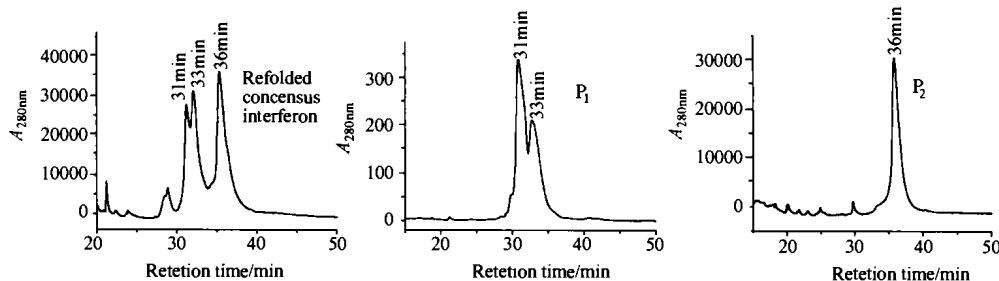


图3 复合干扰素复性上清与疏水层析中 P_1 、 P_2 反相高效液相色谱图

Fig.3 RP-HPLC for refolded consensus interferon, P_1 and P_2

白的回收率。丁基、辛基和苯基为三种常见的疏水层析介质的配基,其疏水性大小顺序为:丁基 < 辛基 < 苯基。图 4 中列出了三种不同配基对目标蛋白回收率的影响。采用丁基配基时目标蛋白回收率明显高于辛基和苯基配基,说明配基疏水性增强对蛋白回收率不利。因此,本文采用丁基疏水介质纯化复合干扰素。

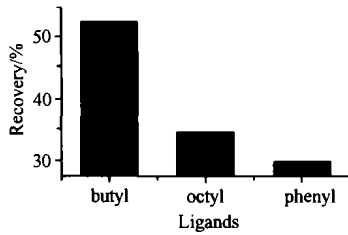


图 4 不同配基对复合干扰素回收率的影响

Fig. 4 The effects of different ligands on the recovery of consensus interferon

Buffer A: 20mmol/L Tris-HCl, 0.8mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8.3; Buffer B: 20mmol/L Tris-HCl, pH 8.3; Line Flow Rate: 90cm/h.

2.2.2 盐浓度对疏水层析的影响:考察了硫酸铵浓度对疏水介质洗脱能力的影响。硫酸铵浓度增加蛋白质暴露疏水基团增多,使蛋白质与疏水配基的结合能力加强,结合能力会影响不同蛋白分离程度,从而影响目标蛋白的回收率。静态盐析浓度实验:取试管 8 只,保持蛋白质浓度相同,硫酸铵浓度分别为:0.3、0.5、0.65、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0mol/L,静置 6h 后观察,浓度为 1.5mol/L 和 2.0mol/L 均产生沉淀,表明复合干扰素在硫酸铵浓度大于 1.2mol/L 时容易产生沉淀,因此我们将硫酸铵浓度限制在 1.2mol/L 以下。图 5 表明了初始硫酸铵浓度对目标蛋白回收率的影响。

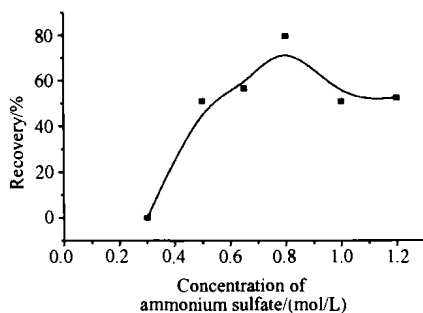


图 5 不同浓度的硫酸铵对复合干扰素的回收率的影响

Fig. 5 The effects of different concentration of ammonium sulfate on the recovery of consensus interferon

Buffer A: 20mmol/L Tris-HCl, 0.3 ~ 1.2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8.3; Buffer B: 20mmol/L Tris-HCl, pH 8.3; Line Flow Rate: 90cm/h; Ligand: Butyl.

由图 5 中可以看出,硫酸铵在 0.8 mol/L 以下蛋白回收率随硫酸铵浓度升高而增加,高于 0.8mol/L 后蛋白的回收率呈下降趋势,而产物纯度在硫酸铵

为 0.5 ~ 1.2mol/L 时基本相当。因此,初始盐浓度选用 0.8mol/L 的硫酸铵。

2.2.3 pH 值对疏水层析的影响:蛋白在接近其等电点时具有最大的疏水性,而溶液 pH 远离等电点时蛋白的疏水结合力降低,因此层析缓冲液的 pH 值同样影响目标蛋白的回收率。复合干扰素的等电点为 6.0 左右^[12],其复性缓冲液的 pH 值为 8.3,为避免因调节蛋白溶液过其等电点产生沉淀引起蛋白的损失,选择的缓冲液 pH 值大于 6.0。复合干扰素在不同 pH 值时的回收率见图 6。

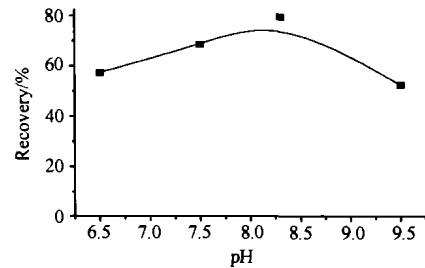


图 6 不同缓冲液 pH 值对复合干扰素的回收率的影响

Fig. 6 The effects of different pH value on the recovery of consensus interferon

Buffer A: 20mmol/L Tris-HCl, 0.8mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 6.5 ~ 9.5; Buffer B: 20mmol/L Tris-HCl, pH 6.5 ~ 9.5; Line Flow Rate: 90cm/h; Ligand: Butyl.

从图 6 可以看出缓冲液 pH 为 8.3 时目标蛋白回收率最高,几种情况下纯度差别不大,因此缓冲液的 pH 值可选定为 8.3。

2.2.4 线流速对疏水层析的影响:层析柱越高其理论塔板数越大,分离效果也就越好。但对于不同介质来说,柱高有一定的限制。我们采用的是琼脂糖为基质的疏水层析介质,当柱高度超过 15cm 时,压力降就增加很快。因此,本实验的层析柱高度设为 13.5cm。当层析柱高一定时,影响分离效果的因素是蛋白的停留时间,这一因素可用线流速来表征。线流速与蛋白的停留时间呈相反变化,不同线流速下复合干扰素回收率见图 7。

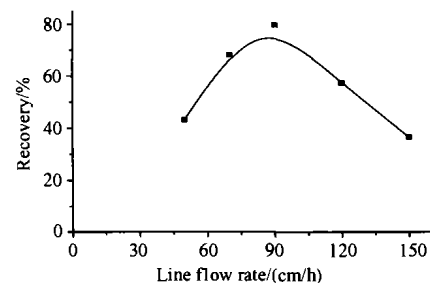


图 7 不同线流速对复合干扰素的回收率的影响

Fig. 7 The effects of different line flow rate on the recovery of consensus interferon

Buffer A: 20mmol/L Tris-HCl, 0.8mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8.3; Buffer B: 20mmol/L Tris-HCl, pH 8.3; Line Flow Rate: 45 ~ 150cm/h; Ligand: Butyl.

图7中显示随着线速度的增加回收率逐步提高,在线流速90cm/h时,蛋白的回收率最高,此后回收率渐渐降低。这是由于线速度降低时,蛋白质分子的扩散会使相邻两个峰趋于重叠,影响了分辨率和回收率;但当线速度增加一定值后,流动相的电导率变化过快,使得目标蛋白未解析完全时其它蛋白也一同解析下来,同样也影响了分辨率和回收率,另外,在上样时线速度过大,使蛋白质来不及与介质充分作用而流出层析柱,也会造成回收率降低。本文选择最佳的线流速为90cm/h。

根据上述实验最终选定的疏水层析条件:选用丁基介质、吸附蛋白的硫酸铵初始浓度0.8mol/L、缓冲液pH值8.3、线流速为90cm/h。经分离纯化,本文得到复合干扰素的总回收率可达36.7%,其比活性为 2.3×10^9 IU/mg(表1)。

表1 各步分离纯化的结果

Table 1 The results in separation and purification process

Procedure	Specific activity (IU/mg, $\times 10^9$)	Purification factor	Recovery /%
Denatured consensus interferon	—	1	100
Refolded consensus interferon	0.54	2.6	53.6
Butyl 4 FF	2.4	4.8	37.5
G-25	2.3	1	36.7

2.3 纯化产物的鉴定

经疏水层析纯化后可有效去除错误折叠体而呈现单一清晰的复合干扰素条带(图8),其纯度达到了电泳纯,大于95%。Klein ML等证实复合干扰素中具有三种亚型,这三种亚型的活性相当^[9],疏水层析后的复合干扰素在反相高效液相色谱上有两个洗脱峰(约31min和33min)(图3),对两种保留时间的

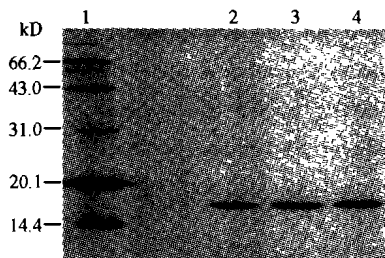


图8 纯化产物及其RP-HPLC洗脱峰的非还原型SDS-PAGE电泳图

Fig. 8 Non-reducing SDS-PAGE of purified consensus interferon and fractions from RP-HPLC

1: marker; 2: purified consensus interferon; 3: 31 min fraction from RP-HPLC; 4: 33 min fraction from RP-HPLC.

蛋白取样进行非还原型电泳分析(图8, lane3、4),表明这两种蛋白迁移率相同,推测为复合干扰素的两种或三种亚型。对HPLC图谱进行归一法积分分析,两种保留时间的蛋白纯度可达99.6%。

3 结论

研究表明,利用疏水层析能够成功地将复合干扰素正确折叠体与错误折叠体分离,这对以包涵体形式表达的蛋白的分离纯化不失为优先选择的层析方法。在对各种层析参数进行对比的基础上,确定了疏水层析纯化复合干扰素的最优条件,成功提取到具有高活性、高纯度的复合干扰素纯品,为复合干扰素的工业化生产提供了有力的实践依据。同时也为利用疏水层析纯化其他蛋白积累了参考数据。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Fieschko J, Ritch T. Production of human alpha consensus interferon in recombinant *Escherichia coli*. *Chem Eng Commun*, 1986, 45: 229 - 240
- [2] Hu CJ, Ozes ON, Klein SB *et al.* Comparison of the *in vitro* host range of recombinant met-interferon-con1, interferon- α_{2a} , and interferon- β . *J Interferon and Cytosine Research*, 1995, 15: 231 - 234
- [3] Felix AM, Heimer EP, Wang CT *et al.* Analysis of different forms of recombinant human leukocyte interferon and synthetic fragments by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1985, 327: 359 - 368
- [4] Li M, Su ZG. Separation and identification of different refolding components. *Journal of Biotechnology*, 2003, 103: 119 - 127
- [5] The National Committee of Biologics Standardization. Requirements for Biologics of China. 2000 ed. (中国生物制品标准化委员会编. 中国生物制品规程. 2000年). Beijing: Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2000, pp. 672
- [6] Bradford MM. 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
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Pestka S, Kelder B, Tarnowski DK *et al.* Specific immunosay for protein dimers, trimers and higher oligomers. *Anal Biochem*, 1983, 132(2): 328 - 333
- [9] Klein M L, Bartley TD, Davis JM *et al.* Isolation and structural characterization of three isoforms of recombinant consensus α interferon. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1990, 276(2): 531 - 537