

重组人截短型 IL-6 在大肠杆菌 DH5 α 中的高效表达与纯化

韩俊宏,孔令洪,郑 瑾,齐 旭,来宝长,司履生,王一理

(1. 西安交通大学 生命科学与技术学院癌症研究所,陕西 西安 710061)

摘要:为研究重组人截短型白细胞介素 6(rhIL-6)工程菌高效表达的影响因素及纯化方法的优化。观察不同培养温度对重组人截短型 IL-6 工程菌生长密度和 IL-6 表达的影响;复性蛋白终浓度对复性效率的影响;细菌诱导培养后,经破菌-洗包-溶包初步纯化后,再经柱层析纯化 IL-6。其结果为 30℃培养后 42℃诱导培养 5h 的 IL-6 表达效率最高,达 32.8%;复性蛋白终浓度在 0.5 g/L 以下时,蛋白复性效率最佳,比活性为 $4.42 \times 10^8 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$;进一步柱层析后,IL-6 的纯度达 96.5%,得率可达 46.5%。最后得出培养和纯化工艺简便易行,可获得高纯度、高比活性的截短型 rhIL-6 的结论。

关键词:重组人白细胞介素-6;大肠杆菌;高效表达;纯化

中图分类号:R786;Q784 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274 X (2003)04-0481-04

重组人白细胞介素 6(rhIL-6)具有广泛生物学功能,对多种细胞具有促进或抑制生长、诱导分化的作用,虽是分子质量为 21kD($1\text{D}=1.6601 \times 10^{-27}\text{kg}$)的糖蛋白,但其生物学活性与糖基化无关,可用大肠杆菌(*E. coli*)进行表达。目前,国内基本上都是重组表达完整的 IL-6,我们最近构建了截短型 rhIL-6 的表达质粒^[1],并在大肠杆菌中成功表达,获得具有生物活性的 IL-6 蛋白。本研究就该工程菌表达、复性、纯化方法的优化进行了探索,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌株与细胞株 截短型 IL-6 cDNA 克隆并重组于 pBV220 载体中^[1];受体菌株为 *E. coli* DH5 α 和 IL-6 依赖细胞株 7TD1 为本室保存。

1.1.2 细菌培养基 改良的 LB 培养基: Bactotryptone 15.0 g/L, Yeast Extract 7.5 g/L, NaCl 10.0 g/L, Glucose 1 g/L, pH 7.4。

1.2 方 法

1.2.1 温度和诱导时间对 rhIL-6 表达的影响

rhIL-6/pBV220/DH5 α 工程菌于 28, 30, 35℃振荡培养至 OD600 值达 0.4~0.6, 42℃诱导培养 5 h, 分别收获菌体, SDS-PAGE 电泳, 用 UVP 凝胶照相系统扫描, 并用 Gelworks 1D intermediate 软件分析扫描峰面积, 经自动面积积分求出 rhIL-6 表达效率。

1.2.2 不同诱导时间的 rhIL-6 表达试验 转化细菌于确定的培养温度(30℃)振荡培养扩增, 42℃诱导 1~7 h 后, 收集细菌经 SDS-PAGE 电泳, 检测 rhIL-6 表达效率。

1.2.3 包涵体的提取、洗涤、变性及复性 将收获的菌体用 1% NaCl 洗涤后, 加细菌裂解液混匀, 于 -70℃冷冻过夜, 次日冰浴超声破菌, 电流 350 mA, 间隔 10 s 超声 5 min \times 3 次(中间冻融处理), 镜检应无完整的菌体, 12 000 r/min, 4℃离心 20 min 收集包涵体, 经 PBST 和 TNMFX 缓冲液^[2]洗涤后, 用含 6 mol/L 盐酸胍的 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L)对洗涤后包涵体进行变性处理。

1.2.4 变性蛋白的复性及复性蛋白终浓度对复性效率的影响 复性液为含 0.6 mol/L 盐酸胍及谷胱甘肽氧化还原体系(GSSG/GSH=1/5)的 Tris-HCl

收稿日期:2001-10-26

基金项目:美国中华医学会资助项目(GMB92-550)

作者简介:韩俊宏(1969-),男,陕西西安人,西安交通大学博士生,从事免疫病理、肿瘤免疫及基因工程下游研究。

缓冲液。复性采用稀释复性方法,即将复性液缓慢加入变性蛋白液中,室温搅拌至少 24 h。

测定复性蛋白液的最终浓度,并用生物学方法测定复性蛋白的比活性。

1.2.5 凝胶柱层析纯化 充分复性的蛋白液,离心除去沉淀,经 85% 饱和度的硫酸铵沉淀浓缩重组蛋白,并用 100 mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 重悬沉淀,对 100 mmol/L Tris-HCl pH7.4 缓冲液充分透析,去除残留的盐酸胍及硫酸铵。

以 100mmol/L Tris-HCl pH7.4 缓冲液平衡 Sephacryl S-100 和洗脱,上样量 20 mL (蛋白含量 0.48 mg/mL),流速为 1.5 mL/min。

1.2.6 蛋白定量 采用改良 Lowry's 法测定蛋白质的含量。

1.2.7 rhIL-6 活性检测和蛋白电泳鉴定分析 应用 IL-6 依赖细胞株 7TD1 细胞检测样品中 IL-6 活性,并与标准品比较,换算为国际单位。将经凝胶柱层析纯化后蛋白上样 10 μ g,用 15% SDS-PAGE 凝胶电泳,经考马斯亮蓝 G250 染色;相同纯化样品电泳后以硝酸银染色后薄层扫描,测定蛋白的纯度。

2 结果

2.1 培养温度对细菌生长与 IL-6 表达的影响

工程菌的前期培养分别采用 28, 30 和 35 $^{\circ}$ C 3 种不同的温度。结果表明,28 $^{\circ}$ C 培养时,细菌生长速率较低,密度增加缓慢,生物量较低;35 $^{\circ}$ C 细菌生长速率维持较快,菌密度明显增加,此时细菌生物量最高;而 30 $^{\circ}$ C 培养时各项观察指标居中(图 1)。

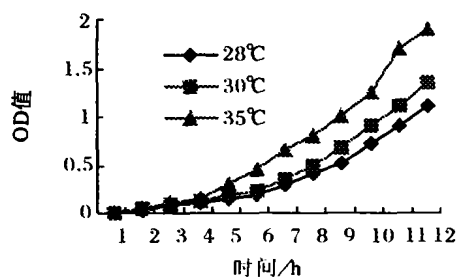


图 1 培养温度对细菌密度的影响

Fig. 1 Effects of culture temperature on the bacterial densities

3 种不同的温度,培养细菌生长至对数中期后,升温至 42 $^{\circ}$ C,诱导 5 h,收菌并用 SDS-PAGE 检测工程菌 IL-6 的表达量,28 $^{\circ}$ C 表达量为 28.9%,30 $^{\circ}$ C

为 32.6%,35 $^{\circ}$ C 为 28.5%。

2.2 不同诱导时间对 IL-6 表达效率的影响

经 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h 和 7h 不同时间的诱导表达,用 SDS-PAGE 电泳并薄层扫描分析, rhIL-6 表达率分别为 12.1%, 22.5%, 27.2%, 30.4%, 32.8%, 30.8%, 25.2%, 以诱导 5 h 的表达率最高, 6 h 次之, 4 h 居第 3 位, 7 h 后呈下降趋势(图 2)。

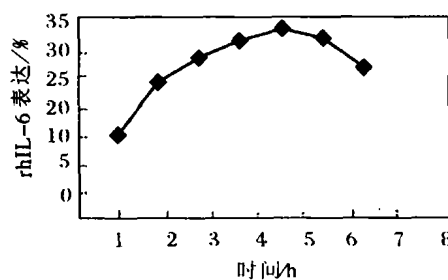


图 2 工程菌升温诱导不同时间与 rhIL-6 表达

Fig. 2 Expression of rhIL-6 at different inducing time points

2.3 复性蛋白终浓度对复性效率的影响

当将盐酸胍变性蛋白稀释至终浓度 0.5 g/L 时,复性蛋白的细胞生物比活性最高,达到 $4.42 \times 10^8 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。随着蛋白终浓度的递增,比活性呈下降趋势,当蛋白终浓度 $> 3 \text{ g/L}$ 时,生物比活性仅为最高时的 1/4(见图 3)。

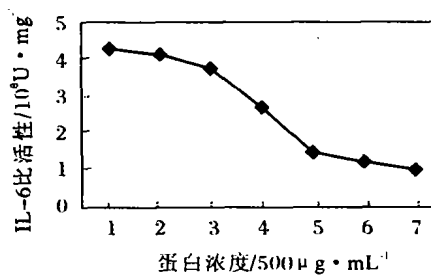


图 3 IL-6 复性蛋白浓度与比活性的关系

Fig. 3 Effects of protein folding concentration on rhIL-6 bioactivity

2.4 IL-6 的纯化和活性鉴定

复性所得 IL-6 粗制品经 Sephacryl S-100 柱层析,出现 2 个洗脱峰,其中 2 号峰为 rhIL-6 蛋白。2 号峰蛋白经 SDS-PAGE 硝酸银染色后薄层扫描分析纯度为 96.5%,得率为 46.5%。用 7TD1 细胞 MTT 法测定生物活性和 Lowry's 法测定蛋白含量后,经计算其比活性为 $4.42 \times 10^8 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$ (表 1)。

表 1 Sephacryl 100 柱过柱后蛋白得率及效价

Fig. 1 The yield and bioactivity of IL6 protein by sephacryl 100 gel siltration column

批次	上样蛋白量 /mg	过柱后蛋白量 /mg	得率 /%	比活性 / $\times 10^8$ U \cdot mg $^{-1}$
1	9.6	4.46	46.5	4.35
2	9.6	4.53	47.2	4.50
3	9.6	4.37	45.5	4.43

3 讨 论

IL-6 cDNA 自 1986 年首次克隆成功^[3],许多研究者对 IL-6 进行了研究,证实它具有多种生物功能,在宿主防御机制中起重要作用,其中最诱人的用途是纠正血小板数量减少和抗肿瘤活性。然而,天然状态的 IL-6 含量极低,直接从 IL-6 高分泌细胞株培养上清虽可得到有活性的产品,但产量低、成本高,因此,利用基因工程技术获得大量的 rhIL-6 成为首选。

构建高效表达的载体是外源基因在大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 中高效表达的前提,但优化工程菌的培养条件是十分必要的。pBV220/rhIL-6 质粒含温度诱导型启动子 PRPL,细菌于 30 $^{\circ}$ C 培养可维持较高的溶解氧水平,满足菌体生长的最佳条件,从而获得较高的菌体收获量和表达率。同时,42 $^{\circ}$ C 诱导不同时间比较 rhIL-6 表达效率,结果表明,42 $^{\circ}$ C 诱导 5 h 的表达效率最高,以后随时间延长呈现下降趋势。提示对于温度诱导表达靶蛋白的工程菌,诱导时机和诱导时间对菌体的生长密度和表达量均有较大影响,掌握诱导时间对工程菌表达外源基因蛋白是很重要的,并不是诱导时间越长越好。

变性蛋白质的空气氧化复性最主要的缺点是很难准确控制整个氧化过程。为了提高活性蛋白产量,通常在复性缓冲液中加入少量(2.5 mmol/L)的金属铜离子,以加快蛋白折叠的空气氧化过程;同时,用 1:5 的氧化型与还原型谷胱甘肽辅助变性蛋白分子内形成正确的二硫键。本研究所采用的谷胱甘肽氧化复性系统,其氧化型和还原型浓度之比为 1:5,比例虽大于文献报道的 1:10,但实际用量远小于文献中应用的 0.1 mol/L 还原型谷胱甘肽,仍然获得了高活性的复性蛋白。提示靶蛋白结构不同,二硫键的多寡也不同,则其复性条件也不同。

以往研究发现,蛋白质浓度高,蛋白质分子间作

用力增强,使重组蛋白分子间聚合趋向增大,不利于复性,而浓度过低不仅降低了产率而且易被蛋白酶降解^[4]。变性态蛋白质分子由于疏水基团的过度暴露,很容易与其他变性蛋白分子相互作用,形成不稳定的中间态产物而聚集、沉淀。其中,特别是浓度较高时,更容易形成聚合体,产生不溶性蛋白沉淀。这是稀释法和透析法复性时常出现的现象。因此,正确控制变性蛋白质浓度对复性效果尤为重要,一般来说,蛋白质浓度宜控制在 1 g/L 之下。本研究调节蛋白终浓度为 0.5 g/L,复性效率较高,细胞培养确定比活性为 4.42×10^8 μ mol/min \cdot mg $^{-1}$ 。

本研究中,rhIL-6 与天然 IL-6 相比,N 端缺失 24 个氨基酸^[1],经复性、纯化后,其比活性达到 4.42×10^8 μ mol/min \cdot mg $^{-1}$,高于报道的完整 IL-6 的蛋白活性(5.07×10^7 μ mol/min \cdot mg $^{-1}$),与 Brankenhoff 等^[5]在克隆 IL-6 基因时,有意缺失信号肽和信号肽后 15 个氨基酸的 IL-6 活性相当,提示 N 端前 24 个氨基酸残基并非 IL-6 活性所必需,而缺失疏水性信号肽及 N 端氨基酸残基,可降低分子间的聚合作用,因而有利于正确形成二硫键,提高复性效率。

复性后蛋白质的纯化是基因重组工程的关键技术之一。Tonouchi 等^[6]曾报道将 rhIL-6 的 cDNA 和编码 IL-2 N 端氨基酸的基因融合表达,依次经凝胶过滤和两次高压液相反相柱层析才得到蛋白纯品,其比活性为 2.5×10^7 μ mol/min \cdot mg $^{-1}$ 。Jambou 等^[7]用类似方法将 rhIL-6 与 β 半乳糖苷酶进行基因融合表达,比活性仅为 1×10^7 μ mol/min \cdot mg $^{-1}$ 。这些方法也有助于纯化,但融合蛋白作为临床应用却碰到极大的障碍。Daisuke 等^[8]先采用阳离子交换柱将复性蛋白液浓缩后,再用反相 HPLC 层析,最后经凝胶柱的 HPLC 纯化得到 rhIL-6 纯品;虽得到高纯度的产品,但纯化步骤相当复杂,所用仪器和纯化柱均为昂贵的 HPLC 级层析柱,并不适合于大规模放大。我们利用 Sephacryl 的分子筛原理,将蛋白样品中不同大小的蛋白质分子分开,从而获得纯度较高的重组蛋白。单纯采用 Sephacryl-100 柱进行纯化时,关键是柱前样品的处理,尤其是包涵体的纯化,以及选择最佳洗脱条件。这种纯化工艺简便易行,所得产品纯度高,比活性也高,为目前国内报道的惟一重组截短型 IL-6 产品,为 IL-6 的生物学功能研究、IL-6 相关疾病的诊断及治疗提供了一种经济简便的蛋白产品来源。

参考文献:

- [1] 孔令洪,王一理,韩俊宏,等. 重组人截短型白细胞介素 6 表达载体构建及其在大肠杆菌 DH5 α 中的表达[J]. 西北大学学报(自然科学版),2001,31(2):149-152.
- [2] LIN KH, CHENG SY. An efficient method to purify active eukaryotic proteins from the inclusion bodies in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology*, 1991, 11 (6): 748-753.
- [3] HIRANO T, YASUKAWA K, HARADA H, *et al.* Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin[J]. *Nature*, 1986, 324(6 092): 73-76.
- [4] RUDOLPH R, FISCHER S. Process of obtaining renatured proteins[J]. *US Patent*, 1990, 933(4): 434.
- [5] BRAKENHOFF J P, DE GROOT E R, EVERS R F, *et al.* Molecular cloning and expression of hybridoma growth factor in *Escherichia coli* [J]. *J Immunol*. 1987, 139(12): 4 116-4 121.
- [6] TONOUCI N, OUCHI N, KASHIM N, *et al.* High-level expression of human BSF-2/IL-6 cDNA in *Escherichia coli* using a new type of expression-reparation system[J]. *J Biochem*, 1988, 104(1): 30-34.
- [7] JAMBOU R C, SNOUWAERT J N, BISHOP G A, *et al.* High-level expression of a bioengineered, cysteine-free hepatocyte-stimulating factor (interleukin 6)-like protein[J]. *Biochemistry*, 1988, 85(24): 9 426-9 430.
- [8] EJIME D, WATANABE M, SATO Y, *et al.* High yield refolding and purification process for recombinant human interleukin-6 expressed in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 62 (3): 301-310.

(编辑 徐象平)

Expression and purification of recombinant truncated human interleukin-6 in *Escherichia coli*

HAN Jun-hong, KONG Ling-hong, ZHENG Jin, QI Xu,
LAI Bao-chang, SI Lü-sheng, WANG Yi-li

(Institute for Cancer Research, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Purpose to optimize the conditions for expression, renaturation and purification of human recombinant rhIL-6 produced in *E. coli*. Methods: The effects of culture temperature, expression inducing time on final bacterial yield and expression level of IL-6 in *E. coli* were observed; The methods for isolation of inclusion body and renaturation of denatured crude recombinant IL-6 were tested; Gel filtration chromatography with Sephacryl S-100 was carried out for purification; Bioactivity of resultant rhIL-6 was monitored by IL-6 dependant cell line 7TD1 proliferative assay. Results The highest bacterial yield and expression rate were obtained (32.6% of total bacterial proteins) at 30°C of initiative culture and 42°C, 5 hrs of expression induction. Efficient renaturation of IL-6 was obtained at 0.5 mg/mL of the denatured recombinant protein. After one step Gel-filtration with Sephacryl S-100, the purity of IL-6 reached 96.5%, the final yield was 46.5% and specific activity was $4.42 \times 10^8 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$. Conclusion an optimal protocol of fermentation culture, expression and purification of truncated rhIL-6 has been established. which is simple, reproducible and practical.

Key words: rhIL-6; *E. coli*; high expression; purification