

人白介素 2-人血清白蛋白融合蛋白的纯化及活性鉴定

李波¹, 段作营¹, 张红梅¹, 雷健勇², 陈 蕴²,
唐瑜菁^{1, 3}, 金 坚², 李华钟^{*1}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122; 3. 泰山医学院 生命科学系, 山东 泰安 271016)

摘要: 采用课题组已构建的携带人白介素 2-人血清白蛋白融合蛋白(rhIL-2-HSA)基因的重组毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 进行 rhIL-2-HSA 的分离纯化研究。发酵上清液经超滤浓缩、Blue Sepharose 亲和层析、Octyl Sepharose 疏水层析和 DEAE Sepharose 离子交换层析纯化获得较高纯度的目的产物, SDS-PAGE 检测为单一条带。Western Blot 分析结果显示, 目的产物同时具有 HSA 和 IL-2 的抗原性, 为 HSA 和 IL-2 的融合分子。经 CTLL-2/MTT 细胞增殖法测定, 纯化的融合蛋白的生物学活性为 1.147×10^7 IU/mg。

关键词: 人白介素 2; 人血清白蛋白; 融合蛋白; 纯化

中图分类号: TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)03-0289-05

Purification and Bioactivity of the Fusion Protein Human Interleukin-2/Human Serum Albumin

LI Bo¹, DUAN Zuo-ying¹, ZHANG Hong-mei¹, LEI Jian-yong², CHEN Yun²,
TANG Yu-qing³, JIN Jian², LI Hua-zhong^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Department of Bioscience, Taishan Medical University, Taian 271000, China)

Abstract: The purification of fusion protein of human interleukin-2 and human serum albumin (rhIL-2-HSA) that was expressed and secreted in fermentation broth with recombinant *Pichia pastoris* GS115/pPIH was reported in this paper. Highly purified rhIL-2-HSA was separated from fermentation supernatant by ultra filter, Blue Sepharose affinity chromatography, Octyl Sepharose hydrophobic chromatography, DEAE Sepharose ion exchange chromatography. The purified fusion protein showed one single band on SDS-PAGE. The purified fusion protein could react with antibodies to IL-2 and HSA in Western Blot analysis. CTLL-2/MTT cell proliferating assay showed that the special activity of rhIL-2-HSA was 1.147×10^7 IU/mg.

Key words: human interleukin-2, human serum albumin, fusion protein, purification

人白介素 2 (intedeukin-2, IL-2) 是 1976 年 Morgan 等^[1] 用植物血凝素 (PHA)、刀豆蛋白 A

收稿日期: 2010-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970029); 江南大学教育部工业生物技术重点实验室开放课题(KLIB-KF200704)。

* 通信作者: 李华钟(1958-), 男, 山东龙口人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物制药研究。

E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

(ConA)等刺激 T 淋巴细胞时发现的一种细胞生长因子。IL-2 能促进 T 细胞和 B 细胞及自然杀伤细胞(NK 细胞)的增殖与分化,刺激活化 T 细胞分泌 IFN- γ 、CSF 等细胞因子的产生,诱导肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)及淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)的产生。因此,IL-2 在治疗肿瘤、免疫缺陷性疾病、肝炎、麻风等疾病中有重要作用^[2]。IL-2 前体由 153 个氨基酸组成,其中 N 端前 20 个氨基酸组成信号肽,因此成熟的 IL-2 由 133 个氨基酸组成,相对分子质量为 15 500^[3]。目前,IL-2 已完全采用基因工程方法生产,但由于其相对分子质量小,在人体内半衰期只有 6.9 min^[4],因此需要频繁大剂量给药,这不但增加了患者的治疗费用,而且容易引发一系列毒副作用。而通过人血清白蛋白融合技术,构建重组人 IL-2 和人血清白蛋白融合蛋白(rhIL-2-HSA),可使血浆半衰期延长,从而有望大大提高 IL-2 的治疗效率。

本课题组已成功构建含有 rhIL-2-HSA 融合基因的重组质粒 pPIH,并在 *Pichia pastoris* GS115 中成功表达^[5-6]。在此基础上,作者探讨了 rhIL-2-HSA 融合蛋白的纯化工艺,制备较高纯度的 rhIL-2-HSA,并对纯化的 rhIL-2-HSA 的生物学活性进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌种

携带 rhIL-2-HSA 融合基因的重组毕赤酵母菌株 *P. pastoris* GS115/pPIH;由作者所在课题组构建并保存。

1.2 培养基

YPD、BMGY、BMMY 等培养基的配方参见文献^[7]。

1.3 主要试剂

SDS-PAGE 相关试剂:日本 Takara 公司;Western Blot 试剂:英国 Abcam 公司产品;考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒:上海生工生物工程公司;微量白蛋白检测试剂盒:上海名典生物工程公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.4 主要仪器

Lab Scable TFF 超滤系统:美国 Millipore 公司;AKTA Basic 蛋白纯化系统以及 Blue Sephar-

ose FF、Octyl Sepharose FF、DEAE Sepharose FF 层析柱:美国通用电器公司;Multiskan MK3 酶标仪:美国 Thermo 公司;蛋白质电泳仪:美国 Bio-Rad 公司。

1.5 重组菌发酵表达

将-80℃保藏的 *P. pastoris* GS115/pPIH 在 YPD 平板上划线,30℃培养 24 h。挑取单菌落接种于装有 50 mL YPD 的 500 mL 三角瓶,30℃、200 r/min 培养 24 h 左右,作为种子培养液。

将种子培养液以体积分数 5% 的接种量接种 BMGY 培养基,30℃、200 r/min 培养 24 h,收集菌体并重悬于 BMMY 培养基,每 24 h 加体积分数 3% 甲醇进行诱导,连续诱导 72 h 后收获发酵液。

1.6 rhIL-2-HSA 融合蛋白的分离纯化

1.6.1 超滤浓缩 取 500 mL 发酵上清液,选取截留相对分子质量为 10 000 的滤膜进行超滤,超滤浓缩至 2 倍、3 倍、5 倍、10 倍、20 倍时分别取样,进行 SDS-PAGE,测 rhIL-2-HSA 含量并计算回收率。

1.6.2 Blue Sepharose FF 层析 用平衡缓冲液(20 mmol/L PB,100 mmol/L NaCl pH 7.0)平衡 Blue Sepharose FF 层析柱(1.5 cm×11 cm)后,以 2 mL/min 的流速将上述超滤浓缩液上样。经平衡缓冲液淋洗后,以 3 mL/min 流速用洗脱缓冲液(20 mmol/L PB,2 mol/L NaCl pH 7.0)洗脱,收集洗脱液。

1.6.3 Octyl Sepharose FF 层析 将 Blue Sepharose FF 层析收集到的目标峰溶液中加入适量高浓度(NH₄)₂SO₄ 溶液,至电导与流动相 A(20 mmol/L PB,1.7 mol/L (NH₄)₂SO₄ pH 7.0)一致,上样于预先用流动相 A 平衡的 Octyl Sepharose FF 层析柱(1.5 cm×9 cm),然后以流动相 A 冲洗柱子,设置流动相 A 和流动相 B(20 mmol/L PB, pH 7.0)自动梯度混合,以 2 mL/min 的流速进行线性洗脱,收集洗脱液,最后用流动相 C(50%乙二醇溶液)洗脱,收集洗脱液。

1.6.4 DEAE Sepharose FF 层析 将 Octyl Sepharose FF 层析的目的峰收集液上样,上样后用洗涤缓冲液(20 mmol/L PB,100 mmol/L NaCl pH 7.0)冲洗柱子(1.5 cm×13 cm),然后再以 3 mL/min 流速,用洗脱缓冲液(20 mmol/L PB,0.15、0.25、0.35、1 mol/L NaCl,pH 7.0)进行阶段洗脱,收集洗脱液。

1.7 蛋白纯度分析

蛋白纯化过程中,样品纯度采用 SDS-PAGE [9] 进行分析,分离胶质量浓度 12 g/dL。

1.8 总蛋白质浓度测定

采用考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒进行测定,具体操作如下:将样品适当稀释,96 孔酶标板中每孔加入 20 μ L 样品、200 μ L 考马斯亮蓝工作液,在酶标仪上波长 570 nm 处测量吸光值,同时以 BSA 为标准品作标准曲线,据此计算出总蛋白质浓度。

1.9 融合蛋白质浓度测定

采用尿微量白蛋白检测试剂盒检测样品中 HSA 含量,并依据 HSA 与 IL-2 按摩尔比 1 : 1 结合,根据公式: $C_{\text{rhIL-2-HSA}} = C_{\text{HSA}} \times (8.2 \times 10^4 / 6.6 \times 10^4)$ 计算融合蛋白质的含量;式中 6.6×10^4 为 HSA 相对分子质量, 8.2×10^4 为 rhIL-2-HSA 融合蛋白相对分子质量。

1.10 rhIL-2-HSA 融合蛋白的 Western Blot 分析

取少量纯化后的融合蛋白冻干粉,用一定量的无菌水复溶,进行 SDS-PAGE,电转移蛋白至硝酸纤维素膜上,用含 50 g/L 脱脂奶粉的 1 $\times$ TBS 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 15 mmol/L NaCl, pH 7.5) 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,用 TBS 清洗后分别用鼠抗人血清白蛋白 (1 : 100, 单抗) 或兔抗人白介素 2 的抗体 (1 : 500, 单抗) 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,用 TBS 清洗后分别加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗 (1 : 2000) 或山羊抗兔二抗 (1 : 5000) 室温孵育 2 h,用 TBS 清洗后用 DAB 试剂显色。

1.11 rhIL-2-HSA 融合蛋白的生物学活性测定方法

根据中国药典 2005 年第三部中关于人白介素 2 的生物活性的检测方法,即 CTLL-2/MTT 法 [10],对融合蛋白质的生物学活性进行检测。样品白介素 2 效价按下式计算:

待检样品 IU/mL =

$$\frac{\text{标准品 IU/mL} \times \frac{\text{待检样品预稀释倍数}}{\text{标准品预稀释倍数}} \times \frac{\text{待测样品 A 值最大值的 50\% 稀释倍数}}{\text{标准品 A 值最大值的 50\% 稀释倍数}}}$$

2 结果与分析

2.1 rhIL-2-HSA 融合蛋白的分离纯化

2.1.1 超滤 采用截留相对分子质量为 10 000 的

滤膜考察了不同超滤浓缩倍数时融合蛋白质的回收率,结果见表 1。从表 1 可以看出,随着超滤浓缩倍数的增加,目的蛋白质有一定程度的损失,但当超滤浓缩 20 倍时,目的蛋白质回收率仍在 80% 以上,说明超滤作为融合蛋白质的一种浓缩手段具有较好的效果。

表 1 超滤浓缩不同倍数时 rhIL-2-HSA 的回收率
Tab. 1 Recovery of rhIL-2-HSA in different multiples of ultra filter

超滤倍数	总蛋白质质量/(mg)	总蛋白质回收率/%	rhIL-2-HSA 质量/mg	rhIL-2-HSA 回收率/%
发酵液	262.7	100	152.4	100
2	231.9	88.3	139.8	91.7
3	215.7	82.1	133.5	87.6
5	208.6	79.4	128.9	84.6
10	193.9	73.8	126.3	82.9
20	188.2	71.6	123.1	80.8

2.1.2 Blue Sepharose FF 层析 Blue Sepharose FF 为一种染料亲和层析填料,能与白蛋白、干扰素结合,经过该柱层析后,色素绝大部分被流穿,收集到的样品为无色透明溶液。电泳结果显示,洗脱收集后的样品中还含有相对分子质量 70 000 的杂带,66 000 的杂带大部分被去除,相对分子质量较高的杂带以及 45 000 以下的杂带已经基本去除。

2.1.3 Octyl Sepharose FF 层析 将 Blue Sepharose 层析收集的样品电导调整到与平衡缓冲液一致,首先采用流动相 B (20 mmol/L PB, pH 7.0) 进行线性洗脱,层析图谱见图 1。

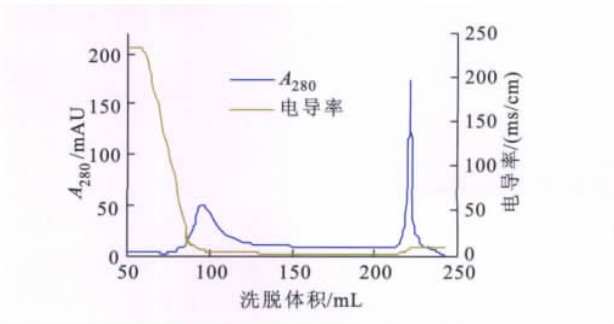


图 1 Octyl Sepharose 疏水层析图谱
Fig. 1 Chromatogram on Octyl Sepharose
(NH₄)₂SO₄ 浓度大约在 0.1 mol/L 时,出现了蛋白质峰 I,后又用流动相 C (50% 乙二醇溶液) 洗

脱,出现峰Ⅱ。电泳结果显示,大多数目的蛋白在峰Ⅰ中,且纯度较高,除含有少量 70 000 的杂带外,其他杂蛋白质条带已基本上看不到,而峰Ⅱ中,杂蛋白质较多,纯度不高,可见杂蛋白质的疏水性要强于目的蛋白。

2.1.4 DEAE Sepharose FF 层析 将 Octyl Sepharose FF 层析峰Ⅰ收集的样品进行 DEAE 离子交换层析,采用阶段式洗脱,层析图谱见图 2,图 3。电泳结果显示,大多数目的蛋白质在 0.35 mol/L NaCl 浓度的洗脱组分中(即图 2 中峰Ⅲ),杂带已全部被去除,目的蛋白质达到了电泳纯。

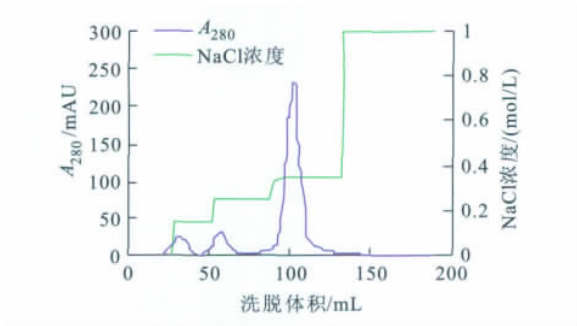
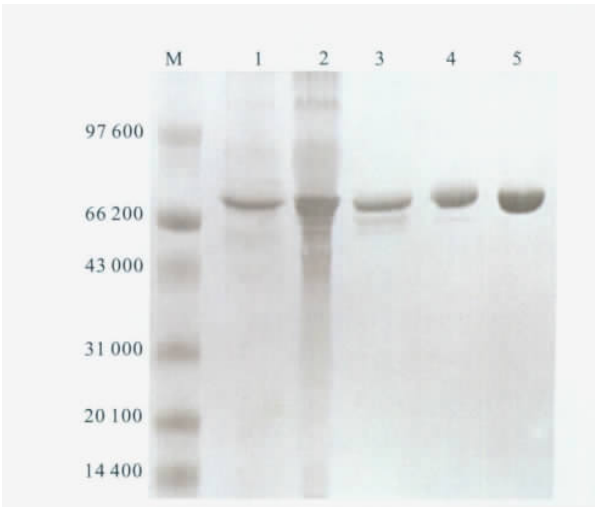


图 2 DEAE Sepharose 离子交换层析图谱
Fig. 2 Chromatogram on DEAE Sepharose



M: 相对分子质量标准蛋白质; 1: 发酵上清液; 2: 超滤浓缩液; 3: Blue Sepharose 洗脱液; 4: Octyl Sepharose 峰Ⅰ; 5: DEAE Sepharose 峰Ⅲ

图 3 rhIL-2-HSA 纯化过程电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of rhIL-2-HSA purification

2.1.5 rhIL-2-HSA 纯化过程及纯度测定 整个纯化过程中,用考马斯亮蓝总蛋白检测试剂盒测总蛋白含量,尿微量白蛋白试剂盒法测融合蛋白含量,考察目的蛋白回收率和纯化效果,结果见表 2。

表 2 rhIL-2-HSA 纯化过程汇总

Tab. 2 Total process of rhIL-2-HSA purification

纯化过程	总蛋白质质量/mg	rhIL-2-HSA 质量/mg	纯度/%	分步收率/%	总收率/%
发酵上清液	262.7	152.4	58	100	100
超滤浓缩液	188.2	123.1	65.4	80.8	80.8
Blue Sepharose 层析后	100.1	78.4	78.3	63.7	51.5
Octyl Sepharose 层析后	43.5	37.9	87	48.3	24.9
DEAE Sepharose 层析后	26.2	24.9	95.1	65.8	16.4

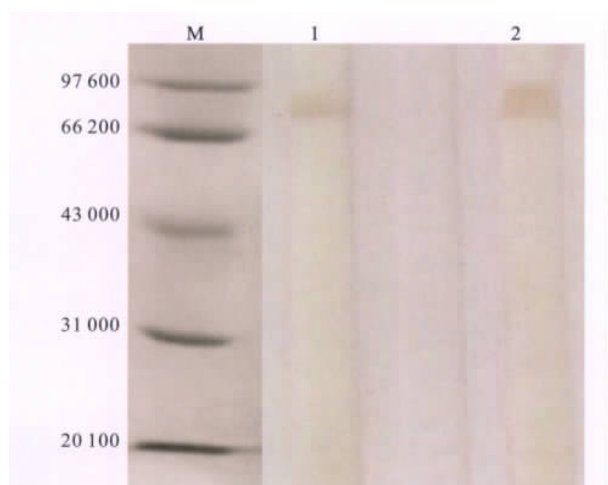
2.2 Western Blot 分析

Western Blot 分析结果见图 4。纯化后的融合蛋白 rhIL-2-HSA 相对分子质量在 82 000 左右,与理论计算值相符合,且 rhIL-2-HSA 既能与 HSA 抗体杂交,又能与 IL-2 抗体杂交,证明该融合蛋白是 HSA 和 IL-2 的融合分子。

2.3 纯化 rhIL-2-HSA 的生物学活性测定

采用 IL-2 依赖型细胞株 CTLL-2,以标准品

IL-2 为阳性对照,以 HSA 为阴性对照,对纯化后的融合蛋白的生物学活性进行了测定。结果显示, rhIL-2-HSA 融合蛋白和 IL-2 一样,可以有效刺激 CTLL-2 细胞的增殖,说明经上述步骤纯化得到的融合蛋白具有生物学活性。经计算,纯化后的融合蛋白 IL-2 效价为 8.37×10^6 IU/mL,比活性为 1.147×10^7 IU/mg。



M:相对分子质量标准蛋白质; 1:HSA 抗体; 2:IL-2 抗体

图 4 rhIL-2-HSA 纯品的免疫杂交

Fig. 4 Western blot analysis of purified fusion protein of rhIL-2-HSA

3 结 语

将 IL-2 与 HSA 在基因水平上直接连接,进行融合表达可以延长其体内半衰期,但融合蛋白经过纯化后能否保留白介素 2 的活性需要加以证明。

发酵液经超滤后,除去了小部分色素,样品得到浓缩,通过 Blue Sepharose 层析,部分杂蛋白质被去除,色素绝大部分被流穿。收集到的高盐样品随后进行疏水层析,样品进一步得到纯化,再经 DE-AE Sepharose 离子交换层析,样品纯度达到 95% 以上。

将纯化获得的融合蛋白 rhIL-2-HSA 与标准品 IL-2 在促进白介素 2 依赖型细胞 CTLL-2 的增殖能力进行了比较。结果显示,纯化得到的 rhIL-2-HSA 融合蛋白具有天然 IL-2 的生物学活性。说明融合蛋白 rhIL-2-HSA 在整个分离纯化过程中活性得到了较好的保护,为进一步研究开发长效白介素 2 药物奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective vitro growth of lymphocytes from normal human bonemarrows[J]. *Science*, 1976, 193: 1007.
- [2] Wang Y, Li L, Liu J. The analytic domain of IL-2[J]. *Biochem Biophys Res*, 1997, 230 (3): 542—545.
- [3] 何球藻, 吴厚生. 医学免疫学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1998:72—86.
- [4] 陈红梅, 白雪帆, 黄长形,等. IL-2/FC 融合基因真核表载体的构建和表达[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(1): 12—15.
CHEN Hong-mei, BAI Xue-fan, HUANG Chang-xing. Construction and expression of eukaryotic expression vector bearing fusion gene of human IL-2 cDNA gene and Fc gene[J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2004, 17(1): 12—15. (in Chinese)
- [5] 郭泽峰, 段作营, 张莲芬,等. 人白介素-2/人血清白蛋白融合蛋白在毕赤酵母中的表达[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(1): 82—86.
GUO Ze-feng, DUAN Zuo-ying, ZHANG Lian-fen. Construction and expression of gene encoding interleukin-2/human serum album fusion protein in *Pichia pastria* [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2008, 39(1): 82—86. (in Chinese)
- [6] 金光泽, 段作营, 张莲芬,等. 重组融合人血清白蛋白-人白介素-2 C125A 突变体在毕赤酵母中的表达[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(4): 595—601.
JIN Guang-ze, DUAN Zu-ying, ZHANG Lian-fen, et al. Expression of the fusion protein human serum album/mutant human interleukin 2C125A in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(4): 595—601. (in Chinese)
- [7] 雷健勇, 张莲芬, 杨健良,等. 人 β 干扰素-血清白蛋白融合蛋白在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(7): 13—18.
LEI Jian-yong, ZHANG Lian-feng, YANG Jian-liang, et al. Secretory expression of the fusion protein IFN β -HSA in *Pichia pastoris* [J]. *China Biotechnology*, 2006, 26(7): 13—18. (in Chinese)
- [8] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 695—698.
- [9] J E 科林根著. 精编蛋白质科学实验指南[M]. 李慎涛 译. 北京: 科学出版社, 2007: 294—297.
- [10] 周道洪, 沈元珊, 赵曼瑞,等. 测定淋巴细胞转化和鼠白细胞介素 2 活性的新方法-MTT 比色分析法[J]. 中国免疫学杂志, 1986, 2(1): 39—44.
ZHOU Dao-hong, SHEN Yuan-shan, ZHAO Man-rui. The application of MTT colorimetric assay to measured the proliferation of lymphocytes and the activity of rat/mouse IL2[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 1986, 2(1): 39—44. (in Chinese)