

人白细胞介素-2 在大肠杆菌高效表达及其纯化与鉴定

虞建良 范佩芳 郑宏大 孙兰英 王子轩
郑仲承 李伯良 陈寅 唐建伟 刘新垣*

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 研究了各种因素对 IL-2 表达的影响, 发现(1)在本工作的条件下, 消除 IL-2 基因 3' 端的部分非翻译区, 能提高 IL-2 的表达效率; (2) IL-2 基因终止密码子与终止信号间的距离对表达有影响, 增加此距离(D)会大大降低 IL-2 表达效率; (3)启动子 P_L 与 P_R 串联与否对表达效率无关重要, 即带 P_R $\overrightarrow{clts857}$ P_L 元件与带 $\overrightarrow{clts857}$ P_R P_L 元件对表达 IL-2 的效率基本一致; (4)目的基因与选择基因的表达方向对表达 IL-2 的效率也无影响. 在此基础上构建了高效表达的质粒(pLY-4), 由它产生的 IL-2 达到菌体总蛋白的 30% ~ 40%, 表达 γ -干扰素时, 可达 60% ~ 80%.

还建立了简易迅速纯化 IL-2 的方法, 分离包涵体后可达 80% 纯度, 以后再用一步分子筛柱层析即可得到 95% 以上纯品.

关键词 人重组白细胞介素-2(rIL-2) P_L 启动子 表达载体的构建 高效表达 rIL-2 的纯化

白细胞介素-2(IL-2)是 Morgan 等^[1]发现的, 它由辅助性 T 细胞所分泌, 又能参与 T 细胞诱导、分化并维持其增殖, 是很重要的免疫调节因子. Taniguchi 等^[2]克隆和测定了 IL-2 基因的全部顺序并初步进行了表达, 此后用基因工程方法获得大量高纯度的人重组 IL-2(rIL-2), 为临床研究提供了必要的条件和广阔的应用前景.

目前基因工程生产有很多表达系统, 大肠杆菌(*E. coli*)仍然是廉价而效果最好的系统之一. 在 *E. coli* 的高效表达时, 通常要考虑以下几个因素: (1)采用强的启动子; (2)很好的 SD 顺序; (3)SD 顺序和起始密码 ATG 的距离要适当; (4)注意翻译起始区域(TIR)的结构, 避免有害的二级结构; (5)有效的转录终止信号顺序, 并使其与终止密码的距离要适当; (6)应用高拷贝的表达质粒; (7)选用 *E. coli* 偏爱的密码子; (8)选择较好的受体菌. 我们的工作全面考虑了上述各因素, 此外, 对 P_L 与 P_R 启动子串联与否, 目的基因与选择性标记基因的表达方向对表达有何影响我们也作了研究. 在此基础上, 我们构建了高效表达质粒 pLY-4, 用于表达 IL-2, 取得好效果, 将它用于表达 γ -干扰素, 肿瘤坏死因子, 链激酶, 葡激酶, 其产物可达菌体

1993-09-23 收稿, 1995-03-11 收修改稿

*联系人

总蛋白的 50% ~ 80%(待分别发表)。

基因工程菌表达产品的分离纯化方法对产品的开发具有重要价值,方法越简单,回收率越高,经济价值越大。传统的 rIL-2 纯化方法,常选用离子交换(如:DEAE-Sepharose, S-Sepharose FF 等),分子筛层析,亲和层析(如 IL-2 的单抗或受体)、或用反相高效液相层析(RP-HPLC)等。由于操作步骤多、成本高,不利于大规模生产。我们只需用两个主要步骤(分离包涵体和 Sephacryl S-200 分子筛柱层析),即可使产品达到 96% 以上纯度,回收率在 50% 左右。是目前国内外最为简单、迅速而高效的纯化方法之一。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 菌种 JF1125 由刘爱萍同志赠予;K802 本室传代,质粒 pTZ-12, pLR-1, pLY-M 均由本实验室构建。终止信号 $t_1 t_2$ 来自 5s-rRNA 基因和 pTL 质粒。

1.1.2 酶和其它试剂 各种工具酶购自 Promega 公司;SDS, DTT 购自 Serva 公司;盐酸胍购自 Sigma 公司;Sephacryl S-200, H. R 购自 Pharmacia 公司;标准 rIL-2 购自 Boehringer Mannheim 公司;RPMI1640 购自 Gibco 公司;酪蛋白水解物购自 Sigma 公司,蛋白质低分子量标准购自上海东风试剂厂,其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分子克隆技术 分子克隆的常规技术均参照文献[3]有关方法进行。

1.2.2 工程菌发酵 (1)实验室摇瓶:在含氨苄青霉素的 LB 中培养种子菌,次日接种于 M9CA 培养基中,30℃ 培养,42℃ 诱导 3 h。(2)15 L 发酵罐:先培养 200 mL 种子菌,次日接种于 10 L M9CA 中,其他同上。

1.2.3 IL-2 的分离纯化 (1)包涵体的制备:菌体悬浮于 PBS 溶液中,超声破碎,离心,沉淀用 PBS 洗 3 次,尽量除去杂蛋白及核酸。离心得到粗制包涵体,再用 NH_4Ac -SDS 液(内含 0.1 mol/L NH_4Ac , pH7.0, 1%SDS)溶解包涵体,离心,上清用于分子筛柱层析。(2)分子筛柱层析:Sephacryl S-200 分子筛柱(2.6 cm×140 cm):柱子经平衡液(0.1 mol/L NH_4Ac 缓冲液 pH7.0, 内含 1%SDS, 2 mmol/L 巯基乙醇)平衡过夜。上样后,用上述平衡液进行洗脱,收集 IL-2 峰,纯度大于 96%,再用 NH_4Ac pH7.0 缓冲液,2 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 进行复性。

1.2.4 产品理化性质鉴定 (1)产品 SDS-PAGE 电泳分析:分离胶为 15%,采用 Laemmli 等人的方法^[4]。(2)产品 HPLC 分析:仪器为 Beckman 公司的 Gold System,柱子 TSK 3000SW, 7.5 mm×300 mm,样品浓度为 0.5 mg/mL,还原型在样品液中加 5% 巯基乙醇,煮沸 5 min,离心,取上清,进样量 20 μL ,流速 1 mL/min,检测波长 220 nm,流动相为磷酸缓冲液 pH7.0。(3)N 末端氨基酸序列测定:用 Edman 降解法,在生化所氨基酸序列分析仪(ABI-477A)上测定。

1.2.5 IL-2 活性检测 参照 Gillis 等报道的 IL-2 测定方法^[5]。以 Boehringer 的 rIL-2 (2×10^6 U/mg)为标准对照,此单位比国际标准单位大。1993 年后我们也改用国际标准。

2 结果

2.1 各种因素对表达的影响及 IL-2 高效表达质粒的构建

2.1.1 pLY-1 质粒的构建及 IL-2cDNA3' 端非编码区对其表达的影响 在构建原核细胞表

达质粒(非分泌型)时, cDNA 的 5' 端非编码区是当然要去除的, 关于 3' 端非编码区是否应该去除, 则因不同情况而异. 据报道对 α_1 -干扰素 (IFN- α_1), 除去其 3' 端非编码区使表达效率降低^[9], 对 γ -干扰素 (IFN- γ), 则会使表达效率增加, 对 IL-2 亦如此^[7, 8]. 我们除去 IL-2 的 3' 端非编码区一部分, 将此基因装入表达载体 pLXY-1 中(图 1), 其表达效率比原基因提高很多(表 1).

在目的基因之后, 加终止信号与否, 对基因表达效率也会产生一定的影响^[7~9]. 早在研究 IFN- α D 的表达时, 我们就注意了这点并构建了 pTL 表达质粒^[10]. 因此我们在构建新的表达

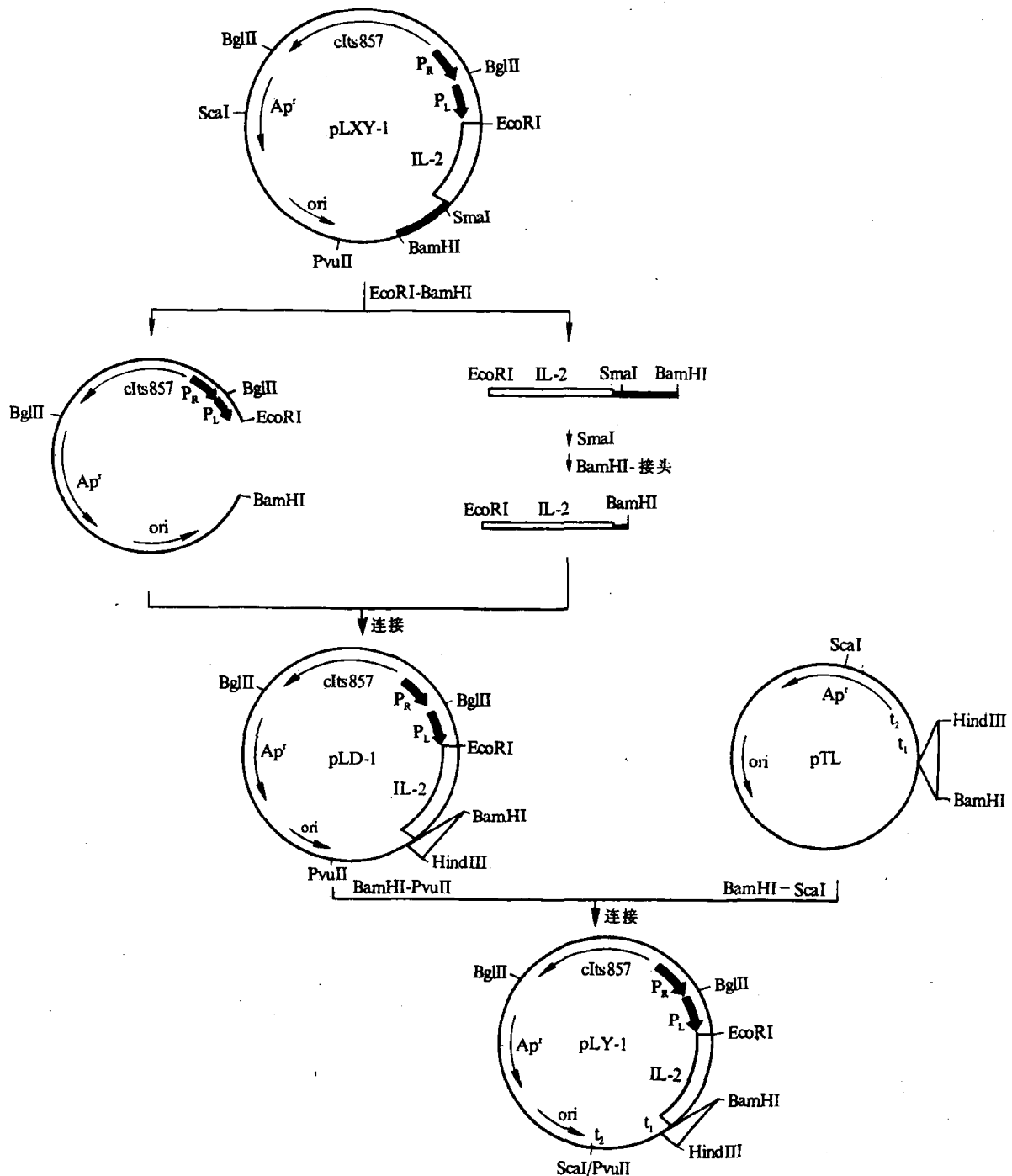


图 1 IL-2 表达质粒 pLY-1 的构建

表 1 比较不同质粒表达 IL-2 的水平

质 粒	O. D. ^{a)} _{600 nm}	蛋白表达量 ^{b)} /% 总蛋白	IL-2 活性 / 单位 · L ⁻¹
pLXY-1	0.36	18.9	1.29×10^6
	0.40	20.0	2.81×10^6
	0.46	19.6	2.03×10^6
pLD-1	0.33	27.8	8.58×10^6
	0.49	27.9	9.98×10^6
pLY-1	0.30	37.9	9.12×10^6
	0.45	32.0	9.86×10^6

a) 当 *E. coli* 在 30℃ 时, M9 培养基培养到 0.54_{600 nm} 值时, 升温至 42℃ 诱导 3 h

b) SDS-PAGE 蛋白电泳扫描结果

质粒时, 在 IL-2 基因之后加了终止信号 t_1t_2 (图 1), 以增强表达质粒的稳定性和提高它的转录效率, 结果 rIL-2 的表达率又有进一步提高 (表 1). 因此, pLY-1 的表达效率比 pLXY-1 高约 4 倍 (按生物活性计算), 同样按 rIL-2 在菌体总蛋白中所占比例计算也有所提高 (表 1).

为了证明终止密码子与终止信号间的距离 (D) 对表达 IL-2 的影响, 我们在 pLY-1 的多克隆切点 (MCS) 中加了一段 300 bp 的无关

DNA 顺序构成 pLY-1D, 则 IL-2 表达率随距离的增长而降低很多 (图 2).

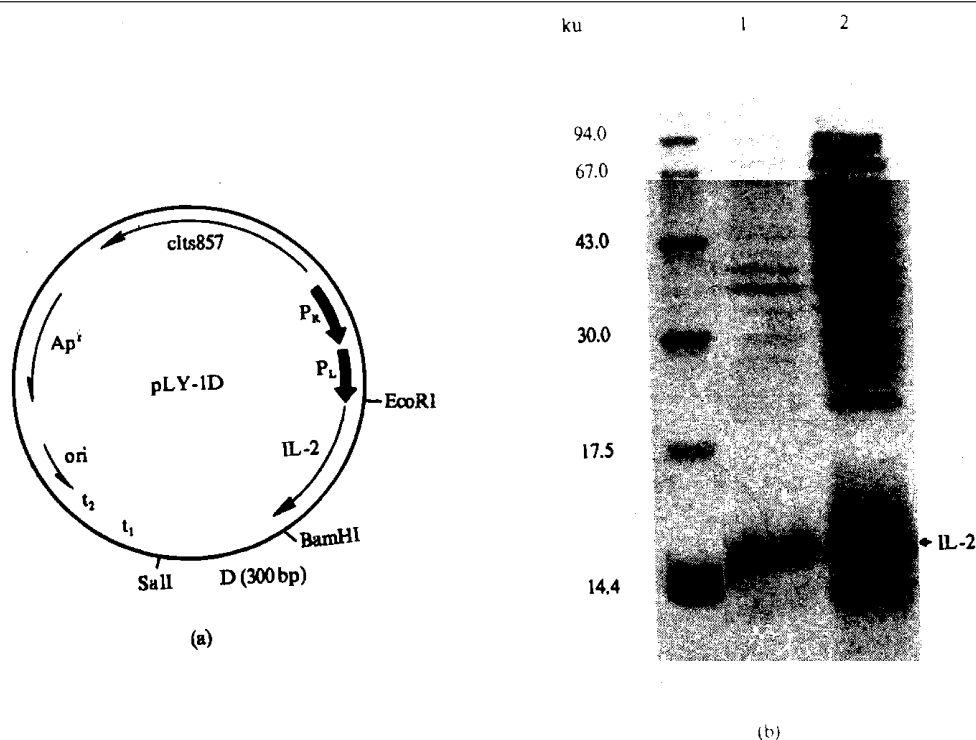
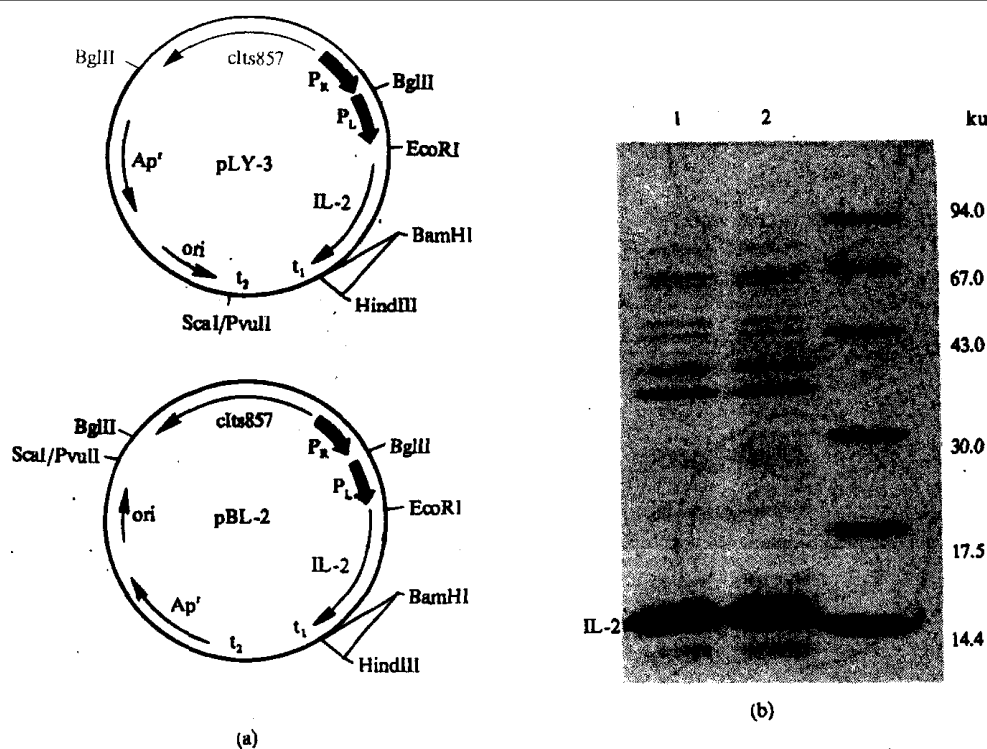


图 2 终止密码子与终止信号间的距离对 IL-2 表达水平的影响

(a) IL-2 表达质粒 pLY-1D 的结构, 终止密码子与终止信号间增加了无关的 300 bp 顺序; (b) 用 SDS-PAGE 检测终止密码子与 t_1t_2 间距离 (D) 对表达的影响: 1——pLY-1 (D 约为 30 bp) 在 *E. coli* 表达, 2——pLY-1D (D 约为 330 bp) 在 *E. coli* 的表达

2.1.2 目的基因与选择基因的表达方向对表达的影响 文献报道, 选择标记基因的表达方向对目的基因的表达有一定影响^[11]. 为此, 我们构建了两方向相反的两个质粒 pBL-2 (即 pBL-I₂A) 及 pLY-3 (图 3). 在 pBL-2 中 IL-2 的表达方向与 Ap^r 一致; 而在 pLY-3 中, IL-2 的表达方向与 Ap^r 相反, 但在我们的实验条件下, 从黑度扫描判断, 表达率均在 35% 左右, 故 pBL-2

图 3 IL-2 与 Ap^r 方向对 IL-2 表达的影响

(a) IL-2 与 Ap^r 方向异同表达质粒的结构 (pBL-2 与 pLY-3); (b) 用 SDS-PAGE 检测两种质粒的表达水平: 1——pBL-2 在 *E. coli* 表达 (IL-2 与 Ap^r 表达方向相反), 2——pLY-3 在 *E. coli* 表达 (IL-2 与 Ap^r 表达方向相同)

和 pLY 的表达效率没有明显差异。

2.1.3 $P_R P_L$ 的串联与否对表达的影响 $P_R P_L$ 串联似乎能增强目的基因的表达, 其实不然。我们对质粒 pLY-1, 用 Bgl II 酶切出 cIts857 P_R 片段, 再用 T_4 DNA 连接酶联接起来, 筛选 P_R 的 2 个不同方向的表达质粒 (图 4(a)), 一个含 cIts857 P_R P_L (即原来的 pLY-1), 另一个 pLY-1R 含 P_R cIts857 P_L , 其 P_R 的表达方向与 P_L 相反, 2 个质粒表达 IL-2 的表达效率, 经黑度扫描表达率均在 35% 左右 (图 4(b))。李伯良等在表达牛生长激素时, 使用单独的 P_L 启动子比 $P_R P_L$ 的表达效率还高 (个人信息), 可见 $P_R P_L$ 串联与否并非高表达的决定因素。

2.1.4 pLY-4 表达质粒的构建及其应用 pLY-1, 3 及 pBL-2 3 个表达质粒都有很好的表达效果, 但仔细研究, 它们还有一些缺点: (1) cIts857 存在于 Bgl II 切出的 2392bp 片段中 (以下简称 2.4 kb), 还嫌太长, 实际上可以切除一些不必要的部分仍有同等效率; (2) Bgl II 切出的 2.4 kb 用于构建另外表达质粒时, 有正反两个方向, 会增加筛选的麻烦, 如用 PstI 从 Bgl II 片段中切除一些不必要的部分, 所得 Bgl II-PstI 片段完全保留原来的功能, 且载体分子量小, 表达效率高, 当用于再重组时, 方向固定, 不必要进行正反方向的筛选, 为此我们又构建了表达 IL-2 的质粒 pLY-4 (图 5)。pLY-4 的质粒大小共 4415 bp, 用限制性内切酶鉴定正确 (图略)。用它转化大肠杆菌 JF1125 或 K802 等以后, 所获得的工程菌已移交下游生产单位 (军事医学科学院 8 所及上海华新生物高技术有限公司) 进行中试研究。

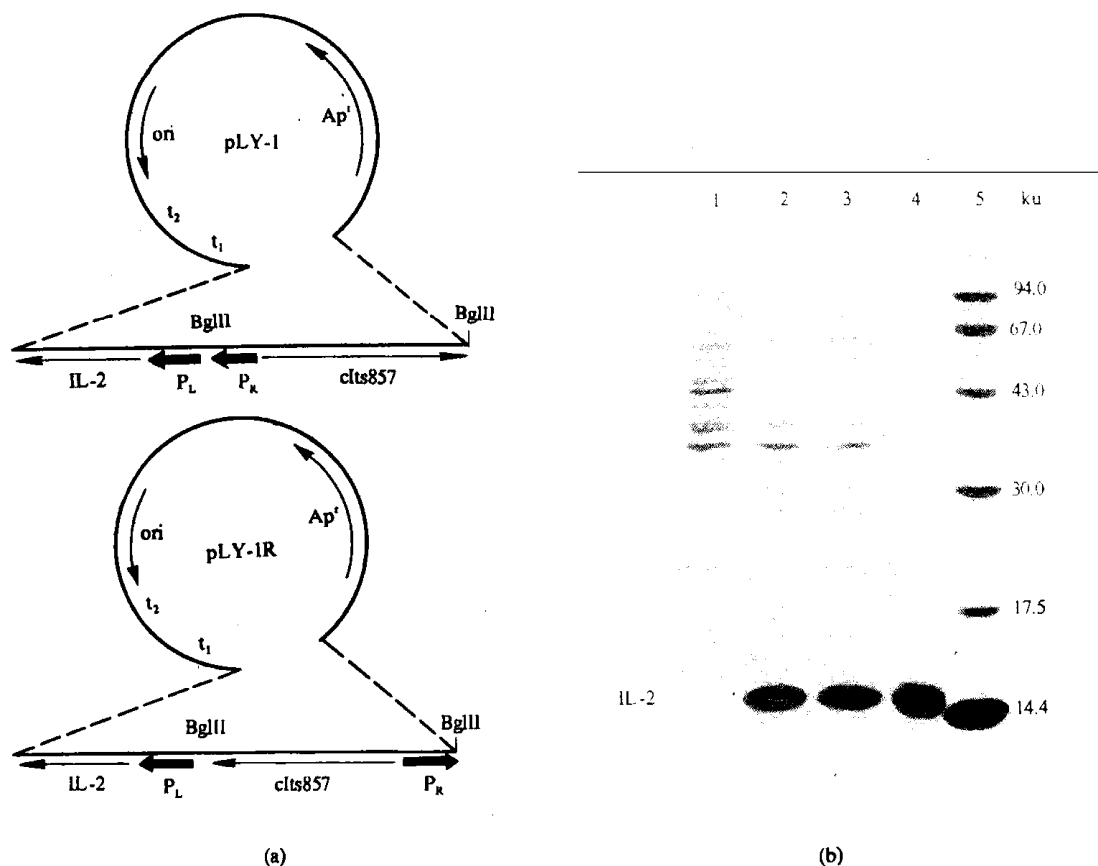


图 4 P_R 与 P_L 串联与否 (即 P_R 与 P_L 方向), 对 IL-2 表达的影响

(a) 含 P_R 与 P_L 表达方向不同的 IL-2 表达质粒的构建; (b) 用 SDS-PAGE 检测两种质粒的表达水平: 1, 2, 3 均为 IL-2 表达质粒工程菌裂解液; 1——pLY-1 质粒未经 42℃ 诱导表达; 2——pLY-1 质粒 (P_L 与 P_R 串联, 方向相同) 经 42℃ 诱导表达; 3——pLY-1R 质粒 (P_L 与 P_R 不串联, 方向相反) 经 42℃ 诱导表达; 4——纯化的 rIL-2; 5——分子量标准

2.2 IL-2 的纯化与鉴定

2.2.1 包涵体的制备 发酵所得菌体首先用超声波破碎, 然后从中制备包涵体。由于我们处理的方法较好, 分离包涵体后, 其中 rIL-2 的含量可达包涵体总蛋白的 80% 以上 (图 6)。用本法分离 rIL-2 包涵体回收的蛋白量及 $O.D._{280\text{ nm}/260\text{ nm}}$ 比值均高于 2 mol/L 脲素和 2 mol/L 盐酸胍方法所得产品。这一步骤很重要, 如处理得好, 以后只需一步分子筛即可将 rIL-2 分离达到 96% 以上纯度, 否则是达不到这么高的纯度的。

2.2.2 IL-2 的进一步纯化及鉴定 将包涵体中 rIL-2 溶解, 经 Sephacryl S-200 柱层析分离后有 4 个峰, rIL-2 峰经 SDS-PAGE 电泳, 纯度大于 95%; HPLC 鉴定, rIL-2 在 12.04 min 出现, 其纯度为 99.195%; N 端 15 个氨基酸顺序测定, 第一个氨基酸有一半左右为 Met, 此乃基因工程操作时人工所加的, 其余一半仍为 Ala, 其他均与标准 IL-2 相同。此外我们对 rIL-2 进行了全波扫描, 高峰在 276 nm; 免疫印迹反应为一条带, 分子量约 15 ku; 肽图为 5 条带, 与理论值相符; 测定了残余 DNA, 每剂量小于 100 pg; 对 IL-2 的生物功能我们也作了研究^[12]。比活 1992 年为 1.0×10^7 IU/mg, 1994 年经过改进, 比活超过了 1.7×10^7 IU/mg。早已被批准临床应

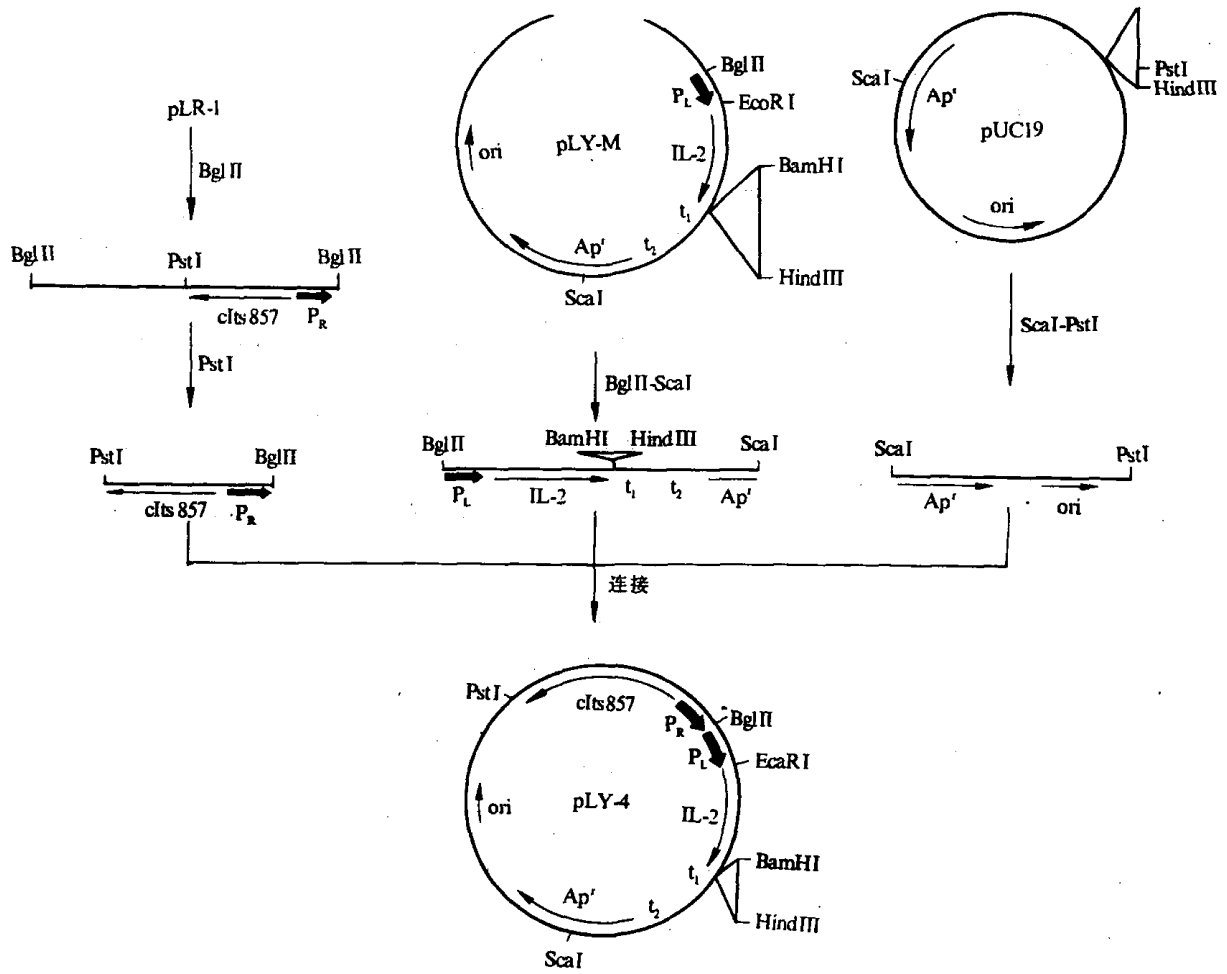


图 5 IL-2 高效表达质粒 pLY-4 的构建

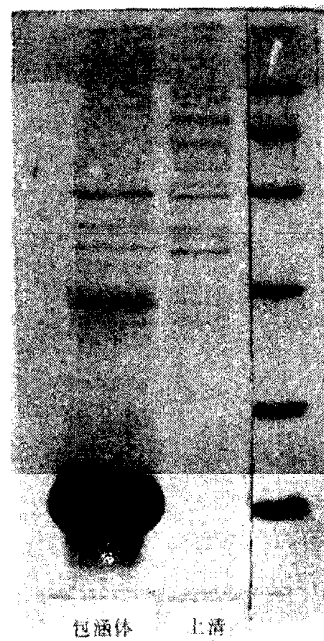


图 6 rIL-2 包涵体的 SDS-PAGE

用,经 159 例肿瘤患者试用,全身静注效果与国外同类产品相同,局部应用获得较好的疗效,1994 年获卫生部批准试生产。

参 考 文 献

- 1 Morgan D A, Ruscetti F W, Gallo R *et al.* Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, 1976, 193: 1 007~1 008
- 2 Taniguchi T, Matsui H, Fujita T. *et al.* Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*, 1983, 302: 305~310
- 3 Sambrook I, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York: CSHL Press, 1989
- 4 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680~685
- 5 Gillis S, Ferm M M, Ou W *et al.* T cell growth factor parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol*, 1978, 120: 2 027~2 032
- 6 侯云德, 李建新, 杨新科等. 人基因工程白细胞干扰素的研制总结鉴定资料(存卫生部档案室). 1985
- 7 Miyaji H, Nishi T, Saito A *et al.* Expression of mature human interleukin-2 and its derivatives in *Escherichia coli* and comparison of their biological activity in vitro. *Agric Biol Chem*, 1987, 51: 1 135~1 142
- 8 Sato T, Matsui H, Shibahara S *et al.* New approaches for the high-level expression of human interleukin-2 cDNA in *Coli*. *J Biochem*, 1987, 101: 525~534
- 9 Wang H C, Chang S. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83: 3 233~3 237
- 10 安淑芳, 胡裕文, 刘新垣等. 乙型肝炎病毒核心抗原基因在大肠杆菌中的表达. *病毒学报*, 1985, 1: 185~186
- 11 Remaut E, Stanssens P, Fiers W. Plasmid vectors for high efficiency expression controlled by the P_L promoter of coliphage lambda. *Gene*, 1981, 15: 81~93
- 12 刘新垣, 虞建良, 郑宏大等. 基因工程人白细胞介素-2 的生物功能研究. *生物工程学报*, 1991, 17: 18~23