

# 人 GM-CSF 在大肠杆菌中的表达及纯化

李迎秋 徐帆 许琳 龙紫新 王<sub>王</sub>章

(中山大学昆虫学研究所, 广州 510275)

**摘要** 通过 PCR 定点突变, 对编码人 GM-CSF 因子成熟蛋白基因的 5' 端进行改造. 将改造的 GM-CSF 基因克隆入质粒 pBV 220, 构建成表达质粒 pBV 220-GM-CSF. 将其转化 DH5a 感受态菌后, 在温度诱导下, GM-CSF 非融合基因获得了表达, 表达产物以包涵体形式沉积在细胞内, 占细胞总蛋白的 13%, 并能特异地与抗人 GM-CSF 单克隆抗体结合. 通过对包涵体的提取、裂解, 得到变性的 GM-CSF, 再经疏水柱层析, 凝胶过滤, 可纯化出 GM-CSF, 纯度达 99% 以上, 比活达  $1.28 \times 10^6$  u/mg, 能维持依赖人 GM-CSF 的 TF-1 细胞的生长.

**关键词** 粒巨噬细胞集落刺激因子, PCR, 包涵体, 表达纯化, 活性鉴定

**分类号** Q 78

GM-CSF-人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte macrophage colony stimulating factor) 是一种可以刺激骨髓前体细胞增殖、分化形成粒巨噬细胞集落的造血因子<sup>[1]</sup>. 临床上主要用于刺激免疫受抑患者, 特别是经化疗、放疗的肿瘤患者的粒巨噬细胞的迅速增殖.

本文在对 GM-CSF 基因进行改造的基础上, 用大肠杆菌表达, 对该表达产物进行纯化和活性鉴定, 以期结合我国国情摸索出一条 GM-CSF 的纯化路线, 为大批量重组 GM-CSF 的生产提供技术与理论基础, 并为开发其它基因工程产品积累经验.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 含 GM-CSF cDNA 的质粒 p91023(B) 来自美国波士顿遗传研究所<sup>[1]</sup>, 质粒 pBV 220 由中国预防医学科学院病毒基因工程国家重点实验室构建, 宿主菌 DH5a 为本室保存.

1.1.2 酶及其它试剂 EcoRI, BamHI, T4DNA ligase 购自 GIBCO BRL, 抗人 GM-CSF 单克隆抗体购自 Boehringer 公司, Phenyl Sepharose CL-4B 及 Sephadex G-100 为 Pharmacia 产品. 其它生化试剂均为国产分析纯.

### 1.2 方法

1. 2. 1 PCR及其扩增产物的纯化 PCR扩增条件: 每一循环 94℃变性 0.5 min, 55℃退火 0.5 min, 72℃延伸 1 min, 共 30个循环. PCR扩增产物的纯化参照文献 [2] DEAE纤维素膜电泳回收法.
1. 2. 2 诱导表达 将含有 pBV 220-GM-CSF的大肠杆菌 30℃摇动培养约 4~5 h, 至 A<sub>600</sub> 值达 0.4左右, 再转 42℃培养 4 h.
1. 2. 3 包涵体的提取、裂解 超声波破碎菌体, 释放出包涵体. 再分别用 20 mmol/L PB (pH7.2), 含 1 g/L脱氧胆酸钠的 TE缓冲液及含 0.5% TritonX-100的 20 mmol/L PB反复洗涤包涵体, 得纯化的包涵体. 每克包涵体加入 10 mL裂解液 (8 mol/L Urea, 10 mmol/L dithiothreitol, 20 mmol/L PB), 25℃裂解 2 h后, 离心 17 000 r/min, 15 min, 收集上清.
1. 2. 4 复性 包涵体的裂解上清中加等体积含 2M尿素的复性液 (20 mmol/LPB, 0.15 mol/L NaCl, 5% Sucrose, 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH7.2), 混匀; 再按 1:50比例加入复性液, 使蛋白终浓度不超过 500 mg/L, 尿素终浓度 0.5~1 mol/L, 置 4℃过夜.
1. 2. 5 Phenyl Sepharose CL-4B疏水柱层析 用含 5%硫酸铵的 20 mmol/LPB (pH7.2) 平衡疏水柱 (1cm×20cm). 在复性样品液中加入固体硫酸铵至终浓度 10%, 待其完全溶解后, 过滤上柱, 流速为 2 mL/min, 收集流出液 (以备检查样品吸附程度). 上样完毕, 用 20 mmol/L PB (pH7.2) 进行洗脱, 流速为 2 mL/min, 收集洗脱峰液.
1. 2. 6 Sephadex G-100凝胶过滤 用 50 mmol/L PB (pH7.2) 平衡凝胶柱 (1.4 cm×40 cm). 用 PEG20, 000浓缩疏水柱洗脱峰液至 2 mL左右, 上柱, 用含 0.25 mol/L NaCl的 50 mmol/L PB (pH7.2) 洗脱, 流速为 1.4 mL/min, 收集洗脱峰液.
1. 2. 7 用 TF-1细胞 MTT染料掺入法测定终纯化产物的生物学活性 TF-1细胞 (中国药品生物制品检定所提供) 是用白血病患者血细胞建立的细胞系, 其生长依赖 GM-CSF或 IL-3, 比活 (u/mg) 等于样品标定浓度 (g/L) 与细胞增值反应体积 (本方法采用 0.1 mL) 乘积的倒数, 即 1/标定浓度×0.1.

## 2 结 果

### 2.1 GM-CSF基因片段的 PCR引物设计、扩增及其序列测定

人 GM-CSF基因全长 435 bp, 5'端的 51个碱基为 GM-CSF的信号肽编码序列, 成熟蛋白的 5'端序列有多个大肠杆菌的稀有密码子 CCC, 且 G, C含量较高<sup>[1]</sup>. 为避免 5'端 mRNA二级结构的形成和 GM-CSF DNA编码序列因含大肠杆菌稀有密码子而影响其表达量, 本研究在不改变所编码氨基酸的前提下, 利用 PCR进行定点突变, 将第 6, 12位碱基 C及第 15, 30位碱基 G突变成碱基 T, 第 18, 24位碱基 C突变为 G, 并在成熟蛋白编码序列的 5'端加上 EcoRI识别序列和翻译起始密码子 ATG, 3'端加上 BamHI酶切识别序列. 其中, 5'端引物:

5'-AGgaattcatg GC ACCTGCCCGTTCTCCGAGCCCGAGCACTCAGCCGTGG-3', 3'端引物: 5'-GGgatccTCACTCCTGGAC-3' (下划线表示定点突变的碱基, 小写表示酶识别序列及起始密码子). 以含 GM-CSF DNA的质粒 p91023 (B) 为模板, 经 PCR反应扩增出改造的 GM-CSF基因片段, 长度近 400 bp, 与预期大小一致. 测序分析扩增产物, 表明合成的引物与 PCR扩增无误, 5'端部分序列测定结果见图 1.

### 2.2 GM-CSF表达质粒的构建及酶切鉴定

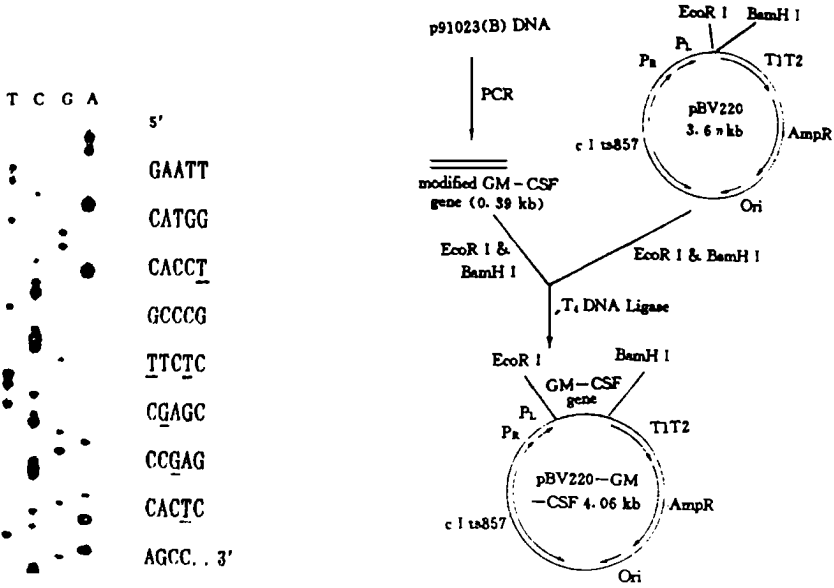


图1 GM-CSF基因5端部分序列的双脱氧-测序胶放射自显影图谱 (定点突变的碱基用下划线标出) 图2 重组质粒 pBV220-GM-CSF的构建

将 EcoRI+ BamHI酶切的 PCR片段插入到载体质粒 pBV220-EcoRI+ BamHI切开的窗口, 构成含 PCR片段的表达质粒 pBV220-GM-CSF. 其构建过程如图 2. 酶切片分析重组质粒, 表明 GM-CSF基因片段已正确克隆入载体质粒 pBV220.

### 2.3 GM-CSF基因在大肠杆菌中的表达

SDS-PAGE分析显示, 经 42°C 热诱导后, pBV220-GM-CSF转化菌的蛋白样品中出现了一条分子量约为 14.6 kD的蛋白带, 与推算的 GM-CSF分子量相符, 说明 GM-CSF基因在大肠杆菌中得到了表达. 密度扫描结果表明, 表达产物约占菌体总蛋白的 12% 左右. 将表达菌体的总蛋白 SDS-PAGE之后, 转移到 NC膜, Western blotting 显示该 14.6 KD的蛋白能特异地与抗人 GM-CSF单克隆抗体反应 (图 3), 证明该表达产物具有天然 GM-CSF同样的抗原性.



图3 GM-CSF基因在大肠杆菌表达产物的免疫学鉴定 a载体质粒 pBV220 b含 GM-CSF基因的载体质粒 pBV220-GM-CSF c标准分子量蛋白 (箭头所指为一特异蛋白带, 分子量 14.6 k Da)

### 2.4 包涵体的纯化及裂解

通过相差显微镜观察及对 GM-CSF菌体蛋白的上清进行 SDS-PAGE分析, 得知应用本系统, GM-CSF基因在大肠杆菌的表达产物是以包涵体的形式存在的. 纯化后的包涵体中 GM-CSF电泳纯度约 63% (图 4 b). 从 500 mL摇瓶培养的培养物中可得到 50 mg左右的包涵体. 以每克包涵体加 10 mL裂解液的比例裂解已纯化的包涵体, 可较彻底裂解之.

### 2.5 GM-CSF的复性

对溶解的 GM-CSF加入复性液进行蛋白复性,当复性体积小,蛋白浓度高时,发现溶解的 GM-CSF重又聚集沉淀;而当复性液中的蛋白浓度低于 500 mg/L时,沉淀现象消失,复性效果最好.

### 2.6 GM-CSF的柱层析

对复性后的 GM-CSF进行疏水层析,其层析图谱如图 所示,洗脱得一主峰, SDS-PAGE显示该峰主要含 GM-CSF,纯度为 97% (图 4 c),得率为 30%,即从 50 mg 电泳纯度为 63%包涵体中,可得到 10 mg 复性的 GM-CSF.

将疏水柱层析洗脱主峰用 PEG 2000进一步浓缩至体积 2 mL左右,进行凝胶过滤层析,先后得到三个洗脱峰 A, B, C,经 SDS-PAGE,表明洗脱峰 A B为细菌杂蛋白峰,主峰 C是纯化了的 GM-CSF蛋白, SDS-PAGE鉴定为一条带,纯度达到 99% 以上 (图 4 d),得率为 50%,即从 500 mL菌体中最终得到电泳纯的 GM-CSF 5 mg.

### 2.7 活性测定

经 MTT法检测,应用本文方法获得的纯化 GM-CSF比活为  $1.28 \times 10^7$  u/mg.

在培养基中加入 3 ng/mL纯化的 GM-CSF维持的 TF-细胞,生长状态正常;对照组没加 GM-CSF,几天后细胞死亡,说明本实验纯化的 GM-CSF能够维持 TF-依赖细胞株正常生长.

## 3 讨论

在大肠杆菌表达系统中,密码子的偏爱性对外源基因表达效率的影响主要是通过翻译过程中 tRNA的浓度对蛋白质合成速度的限制进行的,较多的稀有密码子,会使外源蛋白的合成产生明显停顿.为避免稀有密码子造成的不利因素,本研究通过 PCR 技术对天然成熟蛋白 GM-CSF的编码基因 5'端进行了一些改造,将天然 GM-CSF基因 5'端所含的大肠杆菌使用频率低的密码子 CCC,改为大肠杆菌偏爱密码子 CCT或 CCG<sup>[3]</sup>;另外,天然 GM-CSF DNA 5'端 GC含量高,转录成 mRNA后易形成二级结构,从而影响翻译起始,故把一些密码子最后一个 G或 C改成 A或 T.改造后的非融合蛋白 GM-CSF在大肠杆菌中得到较高的表达量,且与天然 GM-CSF抗原性一致.

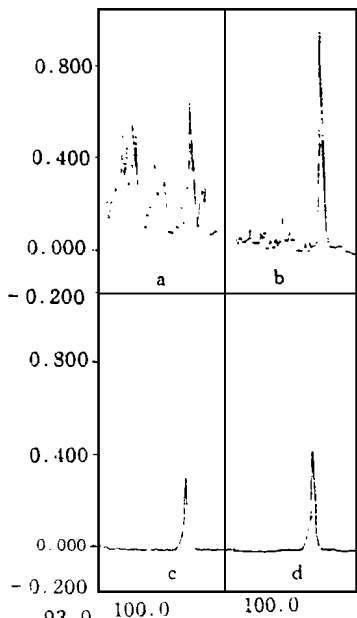


图 4 纯化产物的纯度鉴定

a 宿主菌总蛋白 b 纯化的包涵体 c 经疏水层析的样品 d 经凝胶过滤的样品

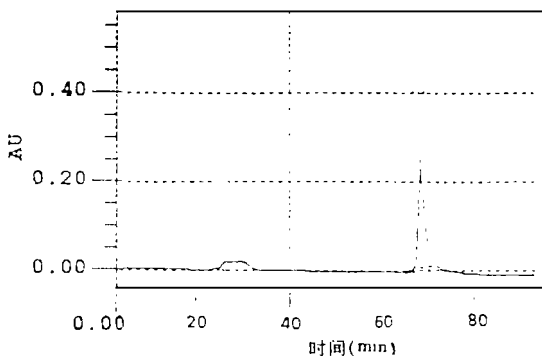


图 5 复性后的 GM-CSF疏水柱层析

所获得的非融合蛋白 GM-CSF 是以不溶性包涵体形式存在于胞浆中. 首先利用超声波破碎菌体, 离心沉淀出包涵体, 除去大部分可溶性的细菌杂蛋白; 然后用低浓度去垢剂 (1% 脱氧胆酸钠和 1% TritonX-100) 抽提, 增溶细菌膜蛋白, 并通过离心除去. 这种处理的结果可使包涵体的纯度达到 70% 左右. 进一步对包涵体的变性裂解及 GM-CSF 的复性是纯化出高活性 GM-CSF 的关键, 发现对于 GM-CSF, 选用 8 M 尿素作裂解剂效果最好. 由于 GM-CSF 肽链中含半胱氨酸, 在包涵体中形成没有活性的二硫键, 且菌体破碎后, 在空气氧化作用下, GM-CSF 与杂蛋白也可形成二硫键, 因此, 用 8 M 尿素裂解包涵体时加入 10 mmol/L 二硫苏糖醇, 以使溶解的 GM-CSF 彻底还原. 包涵体变性裂解后, 需要在适当条件下才能使重组蛋白正确卷曲恢复活性. 实验中发现, 在较低的蛋白质浓度下进行复性, 能显著提高复性效率, 因为低浓度可以避免分子间相互作用, 相互缠绕; 同时复性过程中存在适量的变性剂, 既能抑制蛋白质聚集, 防止分子间错误的二硫键的形成, 又不干扰重组蛋白的折叠复性<sup>[4]</sup>, 故将复性液中蛋白质终浓度控制在 0.5 g/L 以下, 变性剂尿素浓度维持在 0.5 M 左右. 鉴于 GM-CSF 含两对二硫键, 数目较少, 因而直接通过扩大复性体积, 延长复性时间, 依靠空气的氧化作用, 恢复表达蛋白 GM-CSF 的正确构型.

从包涵体变性溶解到 GM-CSF 的复性, 0.05 g 包涵体最终复性体积可达 100 mL 左右. 此时要进一步纯化, 其主要问题是从大体积稀释样品中回收目标蛋白. 因此具有分辨率高、流速大、容量大、样品体积不受限制等特点的疏水层析<sup>[5]</sup>被选择作为 GM-CSF 第一步色谱分离. 根据 GM-CSF 的疏水性质, 我们选择了疏水吸附剂苯基交联琼脂糖 4B, 它对疏水性较强的蛋白质, 通过降低洗脱液的离子强度进行解离, 可以达到很有效的分离. 对复性后的 GM-CSF 疏水层析结果表明, 可得到电泳纯达 97% 的 GM-CSF, 再通过凝胶过滤进一步纯化, 得到 SDS-PAGE 鉴定为一条带的 GM-CSF 纯品. 经活性检测, 测得其比活高达 1.28 u/mg × 10<sup>7</sup> u/mg, 进而用于维持 TF-细胞生长, 效果显著, 说明本实验已成功有效地纯化出 GM-CSF.

本研究的纯化路线为: 包涵体提纯-裂解变性-复性-疏水柱层析-PEG 浓缩-凝胶过柱层析. 整个纯化过程省时 (约 2 d), 经济, 操作方便, 上样量大, 所用疏水柱一次可至少吸附 30 g/L 以上的 GM-CSF; 纯化所得样品可达电泳纯, 且活性较高. 因此, 该纯化路线适合于放大生产.

## 参 考 文 献

- 1 Wong G G, Witek J S, Temple P A, et al. Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science*, 1985, 228: 810~815
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning* (2nd edition): New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 32~34
- 3 Grosjean H, Fiers W. Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene*, 1982, 18: 199~209
- 4 Nambiar K P, Stackhouse J, Presnell S R, et al. Expression of bovine pancreatic ribonuclease A in *E. coli*. *Eur J Biochem*, 1987, 163: 67~71
- 5 Harris E L V, Angal S. In *Protein Purification Methods: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1989.

## Expression and Purification of Human GM-CSF in *E. coli*

Li Yingqiu\* Xu Fan Xu Lin Long Qingxin Wang Xunzhang

**Abstract** Six bases mutations were introduced into 5' terminal of mature GM-CSF gene by PCR in order to enhance the expression of GM-CSF gene in *E. coli*. The expression product of the modified GM-CSF gene in *E. coli* was accumulated mainly in the form of inclusion bodies and constitute about 13% of the total bacterial proteins. Western blotting demonstrated this product could combine specifically with monoclonal antibody against human GM-CSF. After solubilization of purified inclusion bodies and renaturation of solubilized polypeptides, the authentic GM-CSF with its purity above 99% was obtained by means of hydrophobic chromatography on Phenyl Sepharose CL-4B and gel filtration on Sephadex G-100. The activity, measured by viable cell MTT staining method, was  $1.28 \times 10^7$  u/mg. The purified product could maintain the growth of TF-1 cells which depends on human GM-CSF.

**Keywords** GM-CSF, PCR, *E. coli*, expression and purification, activity assay

\* Institute of Entomology, Zhongshan University, Guangzhou 510275