

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0126-03

基因工程人干细胞因子原核表达、纯化及生物学活性研究

陈国友¹, 厉永建¹, 蒋应明¹, 张 意¹, 黄 欣¹, 姜 波², 施群英¹, 卢 琳¹, 陆君燕¹(1. 第二军医大学免疫学研究所, 上海 200433; 2. 第二军医大学长海医院放射科)

[摘 要] 目的: 摸索一种适合于中试生产的重组人干细胞因子(recombinant human stem cell factor, rhSCF)的发酵表达与纯化工艺。方法: 研究不同培养基和热诱导时间对 rhSCF 表达量影响; 探索最佳纯化工艺和各因素对 rhSCF 得率和生物学活性的影响。结果: rhSCF 工程菌在含甘油、酪蛋白水解物、酵母浸出粉、胰蛋白胨及微量元素的培养基中表达量最高。灰度扫描显示热诱导后 2 h 开始表达, 6 h 表达量最高, 目的蛋白约可达菌体总蛋白 30%。高表达蛋白经复性后, 可用酸沉淀作粗分离纯化, 随后用阳离子交换层析分离, 纯度达 80%, 经反相层析去除二聚体后, 最后用 DEAE 柱浓缩后并经 S200 转换缓冲液, 最终获得纯度 >95% 和比活性 >6 × 10⁵ U/mg 的 rhSCF 制品。结论: 成功地建立了注射用 rhSCF 的中试生产工艺, 为随后进行的临床前研究及临床试验奠定基础。

[关键词] 干细胞因子; 蛋白纯化; 蛋白表达

[中图分类号] TQ929+.1; TQ937 [文献标识码] A

Prokaryotic Expression, Purification and Bioactivity Determination of Recombinant Human SCF

CHEN Guo-you, LI Yong-jian, JIANG Ying-ming, ZHANG Yi, HUANG Xin, JIANG Bo, SHI Qun-ying, LU Lin, LU Jun-yan (Department of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Objective: To set up an optimal method of fermentation and purification of recombinant human stem cell factor (rhSCF). Methods: The effect of culture medium on the expression of rhSCF and the contents of rhSCF after different induction time were observed. The optimal condition for purification of rhSCF was also studied by changing pH, concentration of protein and chromatography procedure. The bioactivity of rhSCF was determined by UT-7 proliferation. Results: The expression level of rhSCF increased significantly in M9 culture medium containing glycerol, casein hydrolysate, yeast extract, peptone, and trace element. The optimal induction time for rhSCF expression was 6 h, approximately 30% of total protein. The insoluble inclusion body of rhSCF was denatured by 8M urea. After refolding for 24 h, the protein was firstly purified by acid precipitation and the supernatant was applied to an Source 30S column. The disulfide-linked dimeric rhSCF was excluded by reverse phase chromatography. The buffer was converted to PBS by S200. The purity of final product was over 95% with the biological activity more than 6 × 10⁵ U/mg. Conclusion: The optimal condition for rhSCF preparation was successfully established, which can be used for scale-up production in the future.

[Key words] stem cell factor; purification; prokaryotic expression

* 干细胞因子(stem cell factor, SCF)又称为肥大细胞生长因子(MGF), c-kit 配体及 Steel 因子为 c-kit 原癌基因编码的蛋白受体的配体蛋白^[1]。SCF 主要由基质细胞产生, 是一类刺激早期造血干细胞及祖细胞增殖和定居的造血生长因子, 是造血干细胞增殖分化的关键因子。单用及与其它细胞因子(如 GM-CSF、IL-3)合用时, 能极大地促进造血细胞的增殖^[2]。可用于

放疗、化疗及骨髓功能衰竭等引起的难治性贫血。在抗急性辐射损伤及基因治疗等方面也有较好的应用前景。另外, 还参与机体发育过程中的多种细胞生长的调控, SCF 在黑色素生成以及生殖细胞发育中发挥着

* [作者简介] 陈国友(1968-), 浙江兰溪人, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤免疫和蛋白质工程的研究。

重要作用^[3]。在临床上, SCF 用于治疗肾衰后贫血及癌症放射治疗及化学治疗后引起的难治性贫血。由于 SCF 在临床上具有较广阔的应用前景, 国外有多家研究单位开展了基因工程人 SCF 的研制。在大肠杆菌中表达的重组人 SCF(rhSCF)具有同天然可融性 SCF 相同的生物活性。本研究将构建好的编码人 SCF1-165 氨基酸原核表达载体转化到大肠杆菌中进行非融合表达, 旨在建立 SCF 稳定高效的原核表达体系, 并摸索适合于后续生产的生产工艺流程, 并对其活性进行了检测, 为基因工程人 SCF 的产业化打下坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

DH-5 α /PBV220-hSCF¹⁶⁵ 菌株, 含热敏感启动子, 该菌株在摇床上 32 $^{\circ}$ C, 200 r/min 扩增 8 ~ 12 h 后升温至 42 $^{\circ}$ C 可诱导表达 rhSCF; Source 30S、DEAE-Sepharose 层析柱为瑞典 Pharmacia 公司产品, DeltaPak C4 反相柱为 Waters 公司产品; 生物学活性检测用 UT-7 细胞株和标准 SCF 由中国生物制品检定所惠赠。

1.2 rhSCF 的复性

用高压(110 kPa)匀浆破碎细菌, 镜检确证无完整细菌, 12 000 r/min 离心 20 min 后收集沉淀。用 2 mol/L 尿素反复洗涤包涵体后, 用含 8 mol/L 尿素 Tris 缓冲液(pH = 8.0)溶解, 加入 20 mmol/L DTT, 室温 4 h, 用含 1 mmol/L GSH 和 1 mmol/L GSSG 的 Tris 缓冲液 1:10 稀释, 室温过夜。

1.3 rhSCF 的纯化

将复性后的上清超滤浓缩后调 pH 至 5.5, 离心收集上清并上样, 层析柱为 Source 30S, 缓冲液 A 为 50mM NaAc 缓冲液(pH = 5.5), 缓冲液 B 为在 A 液基础上加入 1N NaCl, 0-40% B 液线性梯度洗脱。收集 rhSCF 活性蛋白峰。加入 1/1000 体积的浓盐酸, 进一步采用 DeltaPak C4 层析柱分离。缓冲液 A 为 5% 乙醇 + 5 mmol/L HCl, 缓冲液 B 为 90% 乙醇 + 5 mmol/L HCl, 0% ~ 50% B 液 5 柱体积, 50% ~ 100% 20 柱体积洗脱, 收集蛋白峰。最后用 DEAE-sepharose 柱浓缩并转换缓冲液, 纯化的蛋白用于生物学活性检测和纯度鉴定。

1.4 生物学活性检测方法

参考文献^[4], 将纯化的 rhSCF 和标准 SCF 倍比稀释加入 96 孔板中, 设阴性和阳性对照, 同时加入传代培养 2d 的依赖性细胞株 UT-7 细胞, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱中培养 24 h, 加入 MTT, 继续培养 4 h, 用 10% 酸化 SDS 溶解细胞后, 用酶联检测仪检测 OD₅₇₀ 的值, 比较标准品曲线和待测样品曲线, 计算 rhSCF 的比活性

(U/mg)。

1.5 蛋白浓度测定

用 Lowry 氏测定法测定总蛋白浓度。rhSCF 蛋白浓度测定则依据蛋白电泳 rhSCF 条带的百分含量估算。

1.6 分子量测定

用 SDS-PAGE 法和基质辅助激光解吸附飞行时间质谱法两种方法进行, 其中 SDS-PAGE 法按照文献进行, 质谱法由上海基康公司测定。

2 结果

2.1 最适培养基的确定

工程菌在 LB、M9 及 2YT 中生长迅速, 但以 M9 和 2YT 表达量较高, 鉴于 M9 具有缓冲能力, 因此本研究在 M9 发酵培养基中添加甘油、酪蛋白水解物、胰蛋白胍、酵母浸出粉、葡萄糖和微量元素, 结果示 rhSCF 表达量可达菌体总蛋白 30% 以上, 可满足 SCF 中试生产。

2.2 最适诱导时间的选择

DH-5 α /pBV220-hSCF¹⁶⁵ 菌在 32 $^{\circ}$ C 培养后, 升温至 42 $^{\circ}$ C 进行热诱导, 观察热诱导后不同时间 rhSCF 表达量的变化。结果示细菌在热诱导后 2 h 开始表达, 6 h 达最高峰, 占细菌菌体总蛋白 31.8% (见图 1)。

图 1 不同诱导时间 rhSCF 的表达量

Fig. 1 Expression level of rhSCF after induction

1: Marker; 2: Control; 3: 1 h; 4: 2 h; 5: 3 h;
6: 4 h; 7: 5 h; 8: 6 h; 9: 7 h

2.3 蛋白浓度和复性时间对其得率和比活性影响

重组 rhSCF 在 pH > 7 的缓冲液中较易复性, 但当 rhSCF 蛋白浓度过高和过低时, 皆影响 rhSCF 得率和比活性(表 1), 将 rhSCF 蛋白浓度控制在 300 μ g/ml, 其得率和比活性最高。复性的时间对 rhSCF 的正确复性也有明显的影响, 太短时间复性不完全, 复性后的蛋白不稳定, 本研究示最佳复性时间为 24 h。

表 1 复性液中 rhSCF 蛋白浓度对其得率和比活性影响

Tab. 1 The effect of protein concentration on the refolding of rhSCF

rhSCF 蛋白浓度 (mg/ml)	rhSCF 得率 (%)	rhSCF 比活性 (U/mg)
1.00	36.5	5.2×10^5
0.60	48.2	5.9×10^5
0.30	60.4	7.5×10^5
0.15	50.3	7.2×10^5

2.4 rhSCF 蛋白的纯化

复性后 rhSCF 蛋白经酸沉淀可去除大部分杂蛋白,再经阳离子层析柱纯化后其纯度可达 80%,经反相高效液相层析柱,可去除二聚体,经反相高效液相鉴定, A_{280} 吸收值主峰两侧对称,并带有小洗脱峰,用峰面积计算, rhSCF 蛋白的纯度达 95% 以上(图 2),连续 3 批样品经 SDS-PAGE 鉴定纯度皆在 95% 以上,分子量为 18.5 kD。用基质辅助激光解吸附飞行时间测定法示其分子量为 18642,与根据天然 hSCF 氨基酸序列计算的理论分子量 18660 相比,误差在 0.15% 以内。

图 2 用 C4 反相分析层析柱分析纯化后 rhSCF 蛋白的纯度

Fig. 2 Reverse phase chromatography of purified rhSCF by C4

2.5 rhSCF 蛋白生物学活性

用 UT-7 细胞株检测纯化后 rhSCF 蛋白的生物学活性,结果示从大肠杆菌中纯化的 rhSCF 蛋白具有明显刺激 UT-7 细胞生长的作用,比活性为 6.1×10^5 U/mg,与中检所提供的 rhSCF 标准品比活性一致。

3 讨论

本研究用基因工程方法成功地构建了表达人 SCF

的载体,并在大肠杆菌中得到高效表达。由于在大肠杆菌中表达的 rhSCF 是以不可溶的包涵体形式存在,因此需通过溶解变性、蛋白质的折叠和分子内二硫键的形成等复性过程恢复 rhSCF 的活性,复性时蛋白的浓度和还原剂作用对提高 rhSCF 的复性得率有明显的影响。由于 rhSCF 分子内存在两对二硫键,但只有 Cys⁴-Cys⁸⁹ 和 Cys⁴³-Cys¹³⁸ 配对时, rhSCF 才有生物学活性,蛋白浓度过高有利于形成分子间的二硫键,浓度过低则需延长复性时间。GSH 和 GSSG 的浓度与比例对 SCF 的二硫键的正确形成也有重要影响。复性后的 rhSCF 经过酸沉淀、离子交换和反相高效液相层析等纯化步骤后,得到纯度为 95% 以上的 rhSCF 制品。测定 rhSCF 活性的方法有多种,其中常用的有骨髓细胞集落培养法^[5]和依赖细胞株 M-07e^[6]测定法。本研究用 rhSCF 刺激人巨核细胞系造血干细胞来源的 UT-7 细胞增殖的方法测定其活性。其敏感性高,误差小,周期短,是一个 SCF 定量的简便方法。从大肠杆菌中提纯的 rhSCF 活性具有与中检所提供的标准品一致的生物学活性。

由于 SCF 在造血细胞发育过程中的重要调控作用,人们对 SCF 基因工程产品在临床上的应用前景充满了兴趣。高纯度重组人 SCF 的获得对于实验室研究和为临床应用打下了基础。

[参考文献]

- [1] Williams DE, Eisenman J, Baird A, *et al.* Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene[J]. *Cell*, 1990, 63(2): 167-174.
- [2] Nishihara M, Wada Y, Ogami K, *et al.* A combination of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances the growth of human progenitor B cells supported by murine stromal cell line MS-5[J]. *Eur J Immunol*. 1998, 28(3): 855-864.
- [3] Yoshida H, Kunisada T, Grimm T, *et al.* Melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression[J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2001, 6(1): 1-5.
- [4] 王军志, 赵阳, 陈国庆, 等. 重组人干细胞因子生物学活性测定的质量控制研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(4): 294-296.
- [5] Horsfall MJ, Hui CH, To LB, *et al.* Combination of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor mobilizes the highest number of primitive haemopoietic progenitors as shown by pre-colony-forming unit (pre-CFU) assay[J]. *Br J Haematol*, 2000, 109(4): 751-758.
- [6] Bonsi L, Bagnara GP, Strippoli P, *et al.* M-07e cell bioassay detects stromal cell production of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and stem cell factor in normal and in Diamond-Blackfan anemia bone marrow[J]. *Stem Cells*. 1993, 11(Suppl 2): 131-134.

[收稿日期] 2002-03-20

[修回日期] 2002-04-25