DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.038
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

文章编号:1000-5404(2000)07-0703-02

技术方法

应用 SoftLink™ Soft Release Avidin 树脂亲和层析纯化融合 IL-16 蛋白

Purification of fusion IL-16 by SoftLink™ Soft Release Avidin Resin affinity chromatograph

曹廷兵,甘立霞 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 分离、纯化大肠杆菌中表达的融合 IL-16 蛋白。方法 采用 SoftLink™ Soft Release Avidin Resin 亲合树酯分离、纯化由大肠杆菌产生的生物素化融合 IL-16 蛋白。结果 融合 IL-16 蛋白成功地在该系统中被分离、纯化,每升细菌培养物可获得 1.4 mg 重组融合蛋白。纯化蛋白经 SDS-PAGE 和毛细管电泳检测均为 1 条蛋白质带。结论 此系统纯化 IL-16 融合蛋白操作方便、快捷,所得蛋白纯度和产率高。

白细胞介素-16(Interleukin-16, IL-16)是近年来报道的一个新的细胞因子,其 C 端 130 个氨基酸的分泌型 IL-16 广泛地参与了体内的免疫调节及炎症反应,并且具有抑制 HIV 复制等多种功能[1,2]。SoftLink™ Soft Release Avidin Resin 纯化系统是专为生物素化的原核表达系统 Pinpoint™ Xa 载体而设计的。本系统是利用生物素与亲和素结合原理纯化生物素化的蛋白质。生物素和亲和素结合迅速,洗脱时采用游离生物素竞争取代以解离被 Avidin 吸附的生物素化融合蛋白,洗脱条件温和,不需在变性条件下进行。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Pinpoint™ Xa 融合表达系统及纯化系统购自美国 Promega 公司。

1.2 IL-16 cDNA 在融合表达载体 Pinpoint™ Xa 上的克隆

将含 IL-16 的重组质粒 PEGM-3ZF(+)-IL-16 及 Pinpont™ Xa 表达载体按融合表达的要求进行酶切、连接、转化、鉴定等按常规方法进行[3,4]。

1.3 IL-16 融合蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化

挑取克隆质粒 Pinpoint™ Xa-IL-16 于含 100 μg/ml AP, 200 μmol/L 生物素的 20 ml LB 液中,37 ℃振荡过夜培养,第 2 天按 2%的比例以相同条件转接于 1.5 L 的 LB 液中,培养至 $D_{600}\approx 0.6\sim 0.8$ 时,加入 100 μmol/L IPTG 诱导表达 4 h,诱导完毕置于 4 ℃冷却 20 min 后,8 000× g 离心 10 min,4 ℃,离心收菌。

按每克湿菌体 10 ml 加入 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6~8.0)50 mmol/L NaCl 和 5%甘油的细菌裂解液,以下操作均在冰浴或 4 ℃冷柜中进行。悬浮细菌后加入 1 mg/ml 溶菌酶,搅拌 20 min 后加入 10% Triton X-100 至终浓度为 0.1%,继续搅拌 5 min,此时溶液变粘稠,然后加入 DNase Ⅰ 粉末少许,再搅拌 10 min,直至粘稠完全消失。然后把上述溶液 10 000× g 4 ℃离心 15 min,取上清于灭菌的烧杯中,置冰浴准备上柱纯化。加上述样品于预处理和再生的 5 ml Pinpoint™ Xa 亲和层析柱上,以 0.5 ml/min 流速进行上样。上样完毕后以 5 倍柱体积裂解缓冲液洗柱,直至记录仪指针回到基线,然后用含 5 mmol/L 生物素的裂解缓冲液洗脱,当 1/2 柱体积洗脱液进入柱子后,关闭流出阀,让生物素充分交换出生物素化的融合 IL-16 蛋白,15 min 后,再进行正常洗脱,洗脱流速仍为 0.5 ml/min,以每管 1 ml 收集洗脱峰。

2 结果

2.1 亲和层析纯化产物的 SDS-PAGE 鉴定

收集上述亲和层析洗脱峰流出液,每管 1 ml,分别取 3 管收集液进行 15% SDS-PAGE 电泳。用考马斯亮蓝 G-250 染色后,可见在 33×10^3 处出现了与预期相符的重组蛋白分子量完全相同的蛋白带[4~6],见图 1。

2.2 重组蛋白免疫印迹

用羊抗人 IL-16 的多抗对融合 IL-16 进行免疫学鉴定,图 2 为 Western 印迹结果,可以看出重组蛋白体中的确有能与抗 IL-16 抗体反应的融合蛋白带(33×10^3 位置),而在 Pinpoint™ Xa 的对照质粒中的相应位置则没有特异性的抗原抗体复合物条带出现[4]。

2.3 重组蛋白的纯度检测

取 15 μg 亲和层析纯化产物,进行毛细管电泳检测其纯度,电泳结果,只有一个蛋白峰出现,见图 3。

基金项目:全军"九五"医药卫生基金资助项目(99—6—3)及重庆市攻关项目

作者简介:曹廷兵(1968—),男,重庆市璧山县人,实验师,主要从事真核基因表达调控方面的研究。电话:(023)68752261

收稿日期:1999-11-01;修回日期:2000-03-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

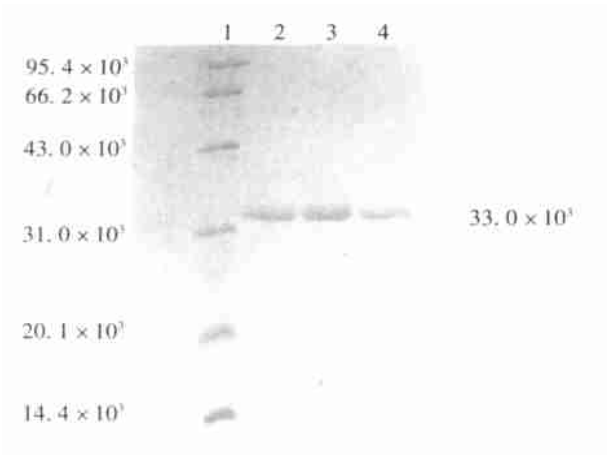


图 1 亲和纯化的融合 IL-16 蛋白 15% SDS-PAGE 电泳图谱
1: 标准蛋白分子量; 2~4: 收集洗脱峰的 3 个部份

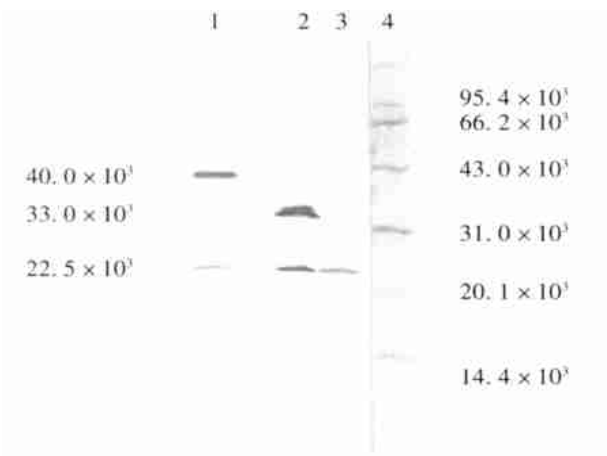


图 2 融合 IL-16 蛋白的 Western blotting 分析
1: 产生 4× 10^4 生物素化的融合蛋白的对照质粒; 2: 产生 3.3× 10^4 特异生物素化的融合 IL-16 蛋白的 Pinpoint™ Xa-IL-16 质粒; 3: 产生 22.5× 10^3 内源性蛋白的宿主菌 JM109; 4: 标准蛋白分子量

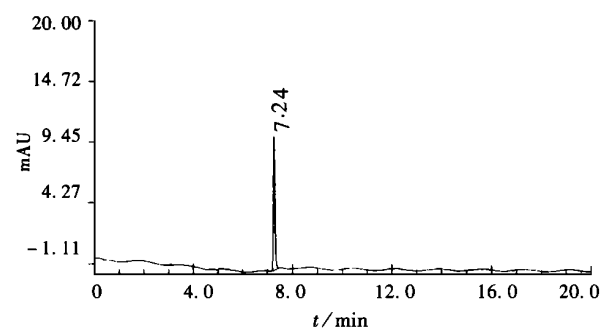


图 3 亲和纯化融合 IL-16 蛋白毛细管电泳图谱

3 讨论

在蛋白质的纯化过程中, 最容易出现的问题就是蛋白质被水解和失去生物活性, 我们在纯化过程中也遇到细菌裂解不好以及蛋白被水解等问题, 经过反复摸索, 我们较好地解决了采用该纯化系统时应注意的问题, 并积累了一些有益的经验。在用 Soft Link™ Soft Release Avidin 亲和树酯分离、纯化重组 IL-16 时我们认为下述 3 个方面的问题应特别注意: ①温度问题, 在整个操作过程中, 从离心收集菌体开始, 一定要在冰浴或 4°C 冷柜中进行, 否则蛋白被水解后得率明显降低。②蛋白抑制剂问题, 在裂解细菌时, 不宜加苯甲磺酰氟(PMSF)和 EDTA, 若在细菌裂解前加入了 PMSF, 则溶菌酶不能有效发挥裂解细菌的作用, 若在细菌裂解时加入了 EDTA, 虽有一定的抑制蛋白水解酶作用, 但对后续 DNase Ⅰ的作用有较大的影响。所以整个操作过程一定要在冰浴或 4°C 冷柜中进行, 蛋白是不会被水解和失去生物活性的。③溶液的 pH 值, 裂解菌体时, 溶液的 pH 值不能低于 pH 7.5, 溶菌酶发挥作用要求在 pH 8.0 以上, 因此 pH 在 7.5~8.0 比较合适。

我室经过几年的研究, 已得到了重组 IL-16 蛋白, 这为今后 IL-16 蛋白活性和功能的研究打下了坚实的基础。

关键词: IL-16; 融合蛋白; 表达与纯化
中图法分类号: R392.11 文献标识码: B

参考文献:

[1] Baier M, Werner A, Bannert N, *et al*. HIV suppression by interleukin-16[J]. Nature, 1995, 378(6 557): 563.
[2] Center D M, Kornfeld H, Cruikshank W W. Interleukin 16 and its function as a CD_4 ligand[J]. Immunology Today, 1996, 17(10): 476—481.
[3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 26—28.
[4] 甘立霞, 曹廷兵, 钟小林. IL-16C 端 cDNA 的克隆表达及初步鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(4): 530—536.
[5] Zhang Y, Center D M, Wu D M, *et al*. Processing and activation of pro-interleukin 16 by caspase-3[J]. J Biol Chem, 1998, 273(2): 1 144—1 149.
[6] Krautwald S. IL-16 activates the SAPK signaling pathway in CD_4^+ Macrophages[J]. J Immunol, 1998, 160(12): 5 874—5 879.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net