文章编号:1000-5404(2009)12-1181-04

论著

重组人睫状神经因子的表达、纯化以及聚乙二醇修饰

王 彦[1],范 开[2],夏永鹏[3],张继兰[2],梅 翔[2],陈海容[2],李秀梅[4],邱宗荫[1] ([1]重庆医科大学药学院,重庆 400042;[2]重庆理工大学化学与生物工程学院制药工程系,重庆 400050;[3]重庆市卫生局,重庆 400042;[4]重庆市药品检验所生化与生物制品室,重庆 401121)

摘 要:目的 研究重组人睫状神经因子(rh-CNTF)的表达、纯化及聚乙二醇化修饰、纯化方法。**方法** 重组人睫状神经因子(rh-CNTF)工程菌经37 ℃培养至对数生长期,加入IPTG诱导4 h,经Q Sepharose F.F凝胶柱纯化和复性后得到纯化的rh-CNTF。以体外培养鸡胚背根神经节(DRG)方法测定重组蛋白rh-CNTF的神经营养活性。用单甲氧基聚乙二醇丁醛(mPEG-ButyrALD-20 k)对rh-CNTF进行修饰,所得修饰产物经DEAE Sepharose F.F和Superdex 75凝胶分离纯化后获得mPEG-rh-CNTF偶联物。**结果** 目的蛋白占总蛋白30%左右,为包涵体,经Q Sepharose F.F凝胶柱纯化和复性,获得纯度达90%的rh-CNTF。表达的rh-CNTF能促进培养的鸡胚背根神经节神经突起的生长。修饰后的单聚PEG-rhCNTF经DEAE Sepharose F.F和Superdex 75凝胶纯化后纯度达到95%。**结论** 确立了rh-CNTF蛋白表达纯化及PEG修饰的方法。

关键词: 重组人睫状神经因子;表达;纯化;聚乙二醇修饰
中图法分类号: R914.5;R977.6 **文献标识码:** A

Expression, purification and PEGylation of recombinant human ciliary neurotrophic factor

WANG Yan[1], FAN Kai[2], XIA Yong-peng[3], ZHANG Ji-lan[2], MEI Xiang[2], CHEN Hai-rong[2], LI Xiu-mei[4], QIU Zong-yin[1] ([1]School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400042; [2]Faculty of Parmaceutical Engineering, College of Chemical and Biotechnology Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050; [3]Chongqing Municipal Health Bureall Faculty of Parmaceutical Engineering, Chongqing 400042; [4]Chongqing Institute for Drug Control, Chongqing 401121, China)

Abstract: Objective To investigate the method for the expression, purification, and PEGylation of the recombinant human ciliary neurotrophic factor (rh-CNTF). Methods rh-CNTF strains were cultured at 37 ℃ to logarithmic phase. After induction with IPTG for 4 h, the target protein was harvested as the inclusion body and then refolded and purified with Q Sepharose FF to gain highly purified rh-CNTF. The in vitro bioactivity of rh-CNTF was evaluated by chicken embryo dorsal root ganglia (DRG) method. rh-CNTF was modified with mPEG-ButyrALD-20 k, the product of which was modified and purified by DEAE Sepharose FF and Superdex 75 to obtain mPEG-rh-CNTF conjugates. Results The interesting protein expression level as the inclusion body in *E. coli* accounted for 30% of total protein and 90% purity of rh-CNTF was obtained by one step refolding and purification of Q Sepharose FF column. rh-CNTF could promote the growth of DRG tubercles. The purity of monomer PEG-rhCNTF purified by DEAE Sepharose FF and Superdex 75 reached as high as 95%. Conclusion The method for the expression, purification, and PEG-modification of rh-CNTF has been established.

Key words: recombinant human ciliary neurotrophic factor; expression; purification; PEGylation

人睫状神经营养因子(human ciliary neurotrophic factor,hCNTF)是一种多功能神经营养因子,能诱导神经元的分化和促神经干细胞的分化,有神经营养和损伤保护作用[1,2]。由于hCNTF缺乏糖基化修饰,易经

作者简介:王 彦,女,重庆市人,博士研究生,主要从事蛋白药物开发及临床应用方面的研究。E-mail:sswdoctor@126.com
通信作者:邱宗荫,电话:(023)68485727,E-mail:zongyin141@126.com
收稿日期:2009-03-02;修回日期:2009-03-18

肾小球滤过,也易为血液中的各种蛋白酶降解,因此静脉注射体内半衰期极短[3],仅为 2.9 min。聚乙二醇(polyethyleneglycol,PEG)类化合物无免疫原性,其生物相容性已通过 FDA 认证[4],当 PEG 与蛋白表面基团共价连接后,增加了蛋白相对分子质量,延长了蛋白在体内的存留时间,同时 PEG 分子在蛋白质表面形成巨大的亲水性外壳,遮蔽了表面抗原,降低了蛋白的免疫原性。本研究拟根据天然 CNTF cDNA 的序列,设计 CNTF 突变基因($A^{17}R^{63}15$),用大肠杆菌高效表达重组人 CNTF(rh-CNTF),并对其进行 N 端 PEG 修饰,以改善天然蛋白 CNTF 的生物学特性,为其临床药用研究工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

表达载体质粒 pET-3c、pUC18-CNTF/DH5α、*E. coli* DH5α 和 BL21(DE3)plysS 菌种均为由富进生物医药有限公司保存。mPEG-ButyrALD-20 k(单甲氧基聚乙二醇丁醛,纯度 >95%,相对分子质量为 20×10^3)购自 Nektar 公司,氰基硼氢化钠(CH_3BNNa)溶液购自 ACROS 公司。

1.2 质粒 pET-3c-rhCNTF 的构建与鉴定

质粒 pUC18-rh-CNTF/DH5α 和表达载体质粒 pET-3c 用限制性内切酶 *Nde* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切,根据 1% 琼脂糖电泳结果,回收 pET-3c 酶切后约 4 638 bp 片段,回收 pUC18-rh-CNTF/DH5α 酶切后约 550 bp 片段,将 2 个片段用 T_4 连接酶进行连接,用 LB-Amp 平板筛选重组子,*Nde* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切鉴定,阳性克隆。正确质粒命名为 pET-3c-rhCNTF。见图 1。

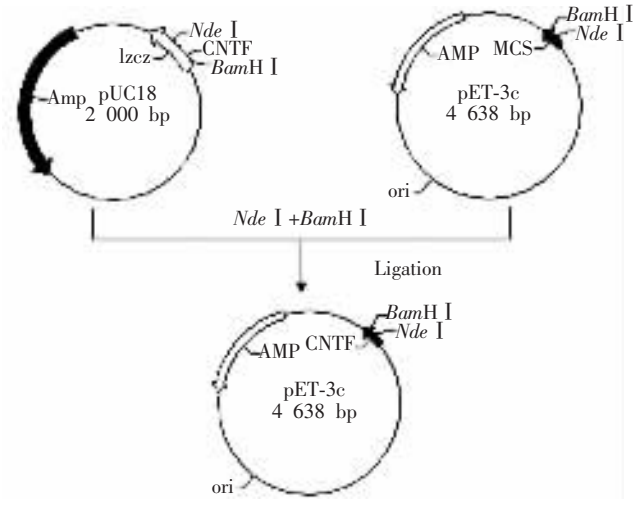


图 1 重组表达载体 pET-3c-rhCNTF 构建示意图

1.3 重组质粒的转化

$CaCl_2$法[5]制备 *E. coli* BL21(DE3)plysS 感受态。将重组质粒转入 BL21(DE3)plysS 铺 LB-Amp 平板 37 ℃恒温培养 12 ~ 16 h。

1.4 工程菌的筛选及表达

从 1.3 所得 LB-Amp 平板中挑选 5 个单菌落分别进行摇床表达,选取表达最佳的菌株保存,再将此工程菌接种进行 20 L 上罐发酵,37 ℃培养,至菌液 $D(600) = 8 \sim 14$。加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG,进行诱导表达。诱导 3 ~ 4 h 后收集菌液,8 000 r/min离心 10 min,弃上清,沉淀放入 -20 ℃冰箱保存备用。

1.5 表达后包涵体洗涤

将菌体按 M/V = 1∶10 放入细菌裂解液(50mmol/L Tris-HCl pH 8.0,5 mmol/L EDTA,0.2 mg/ml 溶菌酶)中破菌,收集包涵体。包涵体经洗涤后,用包涵体溶解液(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,7 mol/L 盐酸胍,0.25 mol/L NaCl,2 mmol/L EDTA)溶解包涵体。溶解液中逐步加入 10 倍体积的复性液(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0),置于 4 ℃、100 r/min 搅拌,进行稀释复性。复性样品上 Q-sepharose 层析柱,分别用洗脱液 1(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,0.15 mol/L NaCl)和洗脱液 2(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,0.4 mol/L NaCl)进行洗脱,分别收集洗脱峰。用 15% SDS-PAGE 检测纯化效果,并用 Lowry 法测定目的蛋白浓度[6]。

1.6 hCNTF 的生物活性测定[7]

取 10 d 龄鸡胚(E40)背根神经节(DRG),在 D-Hanks 液中用 0.125% 胰酶消化并打散成 5×10^5 ml^{-1} 的单细胞悬液,在 60 mm 塑料培养皿上预培养 4 h 以除去非神经元细胞,然后再依次用多聚鸟氨酸-层粘连蛋白包被过的 96 孔细胞培养板上,每孔加入 2 000 个神经元及 100 μl 含胎牛血清(10%)的 DMEM 培养液,分别加入 100 ng/ml 经包涵体复性后纯化的 rh-CNTF(设为实验组)、100 ng/ml 经上清纯化的 rh-CNTF(设为阳性对照组)、等量空载 pET-3c 质粒转化菌纯化的蛋白(设为阴性对照组)。37℃、5% CO_2下培养 24 h 后倾去培养液,观察结果。

1.7 PEG 修饰 rh-CNTF

用 100 mmol/L PB pH 6.5 将 rh-CNTF 原液稀释至 1 ~ 2 mg/ml,补入终浓度 20 mmol/L 的 CH_3BNNa 母液,按质量比为 1∶1(rh-CNTF∶mPEG-ButyrALD-20 k)加入 mPEG-ButyrALD-20 k,4 ℃,100 r/min 过夜 24 h 反应。

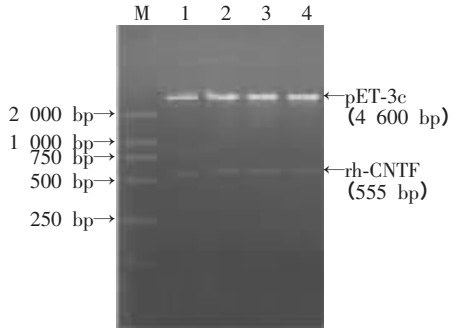
1.8 修饰产物的分离纯化

PEG 修饰样品,用 10 × DDW 透析后上 DEAE Sepharose F.F 层析柱,用洗脱 1(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,0.02 mol/L NaCl)、洗脱 2(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,0.06 mol/L NaCl)、洗脱 3(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,0.3 mol/L NaCl)进行洗脱,分别收集穿透峰及各个洗脱峰,并取样分别进行 SDS-PAGE 电泳分析。用 10 mmol/L PB,pH 7.4 平衡 Superdex 75 凝胶上样后,再用 10 mmol/L PB,pH 7.4 平衡。随后收集先后出来的峰Ⅰ和峰Ⅱ。分别取样进行 SDS-PAGE 电泳分析。

2　结果

2.1　重组质粒 DNA 的鉴定

经 1% 琼脂糖电泳鉴定,CNTF 已正确嵌入质粒 pET-3c 中。见图 2。

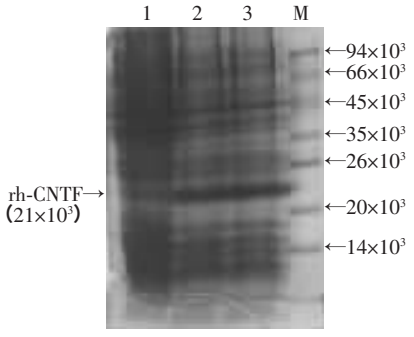


M:标准(DL 2 000);1-4:pET-3c-CNTF 由 *Nde* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切后

图 2　重组质粒鉴定酶切的琼脂糖电泳图谱

2.2　重组 hCNTF 在大肠杆菌中的表达

rh-CNTF 在发酵罐中稳定表达,目的蛋白表达量为菌体总蛋白的 15% ~20%,能够为下游纯化提供足够的样品。见图 3。

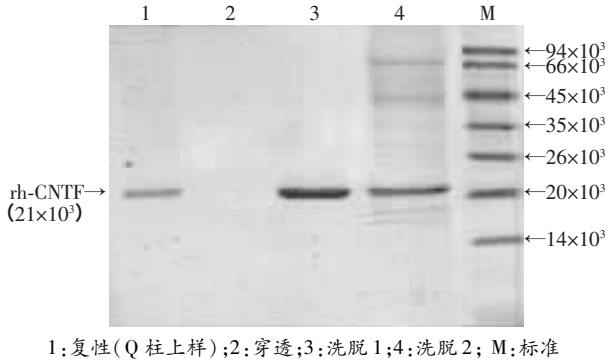


1:对照;2:诱导 3 h;3:诱导 4 h;M:标准

图 3　rh-CNTF 在大肠杆菌中的表达的 SDS-PAGE 图谱

2.3　rh-CNTF 纯化

洗脱 1 洗脱的为目的蛋白 rh-CNTF,纯度达到 90%;洗脱 2 洗脱的杂蛋白中含少量目的蛋白 rh-CNTF。见图 4。



1:复性(Q 柱上样);2:穿透;3:洗脱 1;4:洗脱 2; M:标准

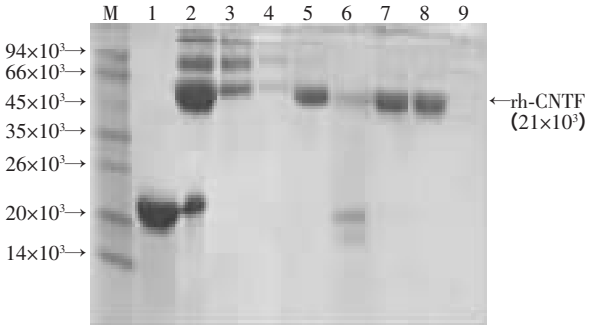
图 4　rh-CNTF 纯化的 SDS-PAGE 图谱

2.4　生物活性测定

培养的鸡胚背根神经节,实验组和阳性对照组可见神经节周围有放射状的神经突起生长,阴性对照组无突起,只有少量成纤维细胞生长。

2.5　修饰产物的分离纯化

DEAE Sepharose 柱能有效将多聚 PEG-rhCNTF 和单聚 PEG-rhCNT、rh-CNTF 较好地分离,穿透部分为多聚 PEG-rhCNTF 和少量单聚 PEG-rhCNTF,洗脱 1 将结合在 DEAE 填料上的多聚 PEG-rhCNTF 和单聚 PEG-rhCNTF 洗脱,洗脱 2 为单聚 PEG-rhCNTF,即目的蛋白,洗脱 3 将未修饰的 rh-CNTF 洗脱。Superdex 75 凝胶层析能将多聚 PEG-rhCNTF 与单聚 PEG-rhCNTF 能有效的分离,洗脱Ⅰ为多聚 PEG-rhCNTF,洗脱Ⅱ为单聚 PEG-rhCNTF。见图 5。



M:标准;1:rh-CNTF;2:PEG 修饰 rh-CNTF;3:DEAE-穿透;4 ~6:分别为 DEAE 洗脱峰 1 -3;7、8:分别为凝胶洗脱峰Ⅱ前半峰、后半峰;9:凝胶柱洗脱Ⅰ

图 5　纯化产物的 rh-CNTF 及 PEG-rhCNTF 的 SDS-PAGE 图谱

3　讨论

有研究表明,CNTF 的 C 端缺失 15 个氨基酸其活性增高[8]。为了获得能表达 C 端缺失 15 个氨基酸并具有高活性的 CNTF 突变体蛋白的工程菌,本研究根据天然 hCNTF cDNA 的序列,设计了带有 *Nde* Ⅰ酶切位点和 ATG 翻译起始密码子,下游引物则带有 *Bam*H Ⅰ酶切位点和 TAA 终止密码子,全部使用大肠杆菌偏爱密码子,C 端去掉 15 个氨基酸,增加其生物活性,同时将 17 位 Cys 突变为 Ala,63 位 Gln 突变为 Arg,命名为 rh-CNTF($A^{17}R^{63}15$),理论相对分子质量为 21 113.96,交由宝生物工程(大连)有限公司全基因人工合成 pUC18-rhCNTF/DH5α,采用表达载体质粒 pET-3c,使 rh-CNTF 突变基因高效表达。

本研究的 rh-CNTF 属于包涵体表达。包涵体是蛋白分子之间形成共价或非共价结合,相互作用形成的细胞内不溶性表达产物[9]。虽然包涵体表达一般具有表达量高、易纯化的优势,但包涵体形成后,表达蛋

白不具生物学活性,因此必须溶解包涵体并对其进行复性。我们采用稀释法逐步降低变性剂浓度,从而缓慢复性。复性后经鸡胚背根节活性测定实验证明以上方法制备的 rh-CNTF 能够促进神经元存活,具有生物学活性。

本研究表达纯化所得蛋白 rh-CNTF 经四级杆质谱(Agilent 1956B LC/MSD)测定相对分子质量为21 108.74,与目的蛋白的理论相对分子质量 21 113.96 相差 5.22(0.0247%)。因此,质谱分析结果确认本研究所设计的重组制备路线是正确的。

rh-CNTF 理论等电点为 5.98,在 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中带负电荷可在阴离子交换柱 Q-Sepharose FF 上保留,经不同盐浓度洗脱得到分离。PEG 修饰后的蛋白质的纯化难度大,且纯化产物的得率通常较低[10]。本实验选用 DEAE 阴离子交换层析和凝胶过滤层析起到了良好的分离纯化效果。由于 PEG 修饰剂与 rh-CNTF 的 N 端的氨基结合,而氨基在酸性环境下带正电荷,因此修饰产物的正电荷数会减少。另一方面,PEG 自身不带电荷,当其覆盖于蛋白质表面时,可能会阻碍蛋白质与离子交换树脂侧链的结合,因而修饰产物上结合的 PEG 分子越多,其带电荷数越少,它与离子交换树脂侧链结合强度就越弱,越易被盐溶液洗脱。我们采用 DEAE 弱阴离子交换层析即可很简便地进行修饰产物的分离纯化,层析结果证实了这种推测。本研究曾多次进行 DEAE 柱、SP 柱层析实验比较,结果显示:PEG-rhCNTF 在 SP 柱中只能用高 pH 值才能洗脱。PEG-rhCNTF 在 DEAE 柱纯化中操作稳定、分离度高、蛋白总回收率大于 80%,纯度大在 85% 左右,优于 SP 柱纯化,故本研究选择 DEAE 柱纯化。凝胶过滤层析主要是利用具有网状结构的凝胶过滤的分子筛作用,根据 rh-CNTF 与 PEG-rhCNTF 分子大小不同来进行分离的。此方法有分离条件温和,样品回收率高等优点。本研究中经 DEAE 柱纯化后的样品再经凝胶过滤层析后,多聚 PEG-rhCNTF 与单聚 PEG-rh-CNTF 能有效分离,单聚 PEG-rhCNTF 的纯度达到 95%。

我们重组了人 CNTF 基因,在大肠杆菌中获得了稳定高效的表达,并纯化得到了具有生物学活性的 rh-CNTF 蛋白;在优化的反应条件下,rh-CNTF 与 PEG 成功偶联;通过 DEAE 弱阴离子交换层析和凝胶过滤层析可以得到纯度较高的单聚 PEG-rhCNTF。但是对偶联产物单聚 PEG-rhCNTF 的修饰位点还需要作进一步的测定。本研究所用的 mPEG-ButyrALD-20 k 进行蛋白质 PEG 修饰主要位于 N 末端的 NH_2 残基,同时有部分修饰在赖氨酸(Lys)的 ω-NH_2 残基上,由于 rh-CNTF 分子中存在数个 Lys,即便是都是单聚 PEG-rhCNTF,修饰产物往往是不均一的。本研究将在后期的工作中,对修饰产物 PEG-rhCNTF 的修饰位点、理化性质、结构特征、体内半衰期及免疫原性等进一步研究,考察 rh-CNTF 经 PEG 修饰后能否最终克服其原有的缺点,成为修复营养神经、调节物质代谢和能量代谢的改良药物。

参考文献:

[1] Dutta R, McDonough J, Chang A, *et al*. Activation of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) signalling pathway in cortical neurons of multiple sclerosis patients[J]. Brain, 2007, 130(Pt 10): 2566 - 2576.

[2] Tripathi R B, McTigue D M. Chronically increased ciliary neurotrophic factor and fibroblast growth factor-2 expression after spinal contusion in rats[J]. J Comp Neurol, 2008, 510(2): 129 - 144.

[3] Emerich D F, Thanos C G. Intracompartmental delivery of CNTF as therapy for Huntington's disease and retinitis pigmentosa[J]. Curr Gene Ther, 2006, 6(1): 147 - 159.

[4] Veronese F M, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies[J]. BioDrugs, 2008, 22(5): 315 - 329.

[5] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 91 - 99.

[6] 国家药典委员会编著. 中华人民共和国药典 2005 年版[S]. 第 3 部. 北京: 化学工业出版社,2005: 附录 29 - 30.

[7] Li H, Ma Y, Su T, *et al*. Expression, purification, and characterization of recombinant human neurturin secreted from the yeast Pichia pastoris[J]. Protein Expr Purif, 2003, 30(1): 11 - 17.

[8] Talbott J F, Cao Q, Bertram J, *et al*. CNTF promotes the survival and differentiation of adult spinal cord-derived oligodendrocyte precursor cells in vitro but fails to promote remyelination in vivo[J]. Exp Neurol, 2007, 204(1): 485 - 489.

[9] Chen D Y, Liu L M, Liu S J, *et al*. Single-chain antibody against human lipocalin-type prostaglandin D synthase: construction, expression, purification, and activity assay[J]. Biochemistry (Mosc), 2008, 73(6): 702 - 710.

[10] Sainathan S K, Tu L, Bishnupuri K S, *et al*. PEGylated murine Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: production, purification, and characterization[J]. Protein Expr Purif, 2005, 44(2): 94 - 103.

(编辑 龙 亮)