维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0451－03

重组人瘦素的分离纯化

刘先俊[1]，刘方欣[2]，漆洪波[3]

(1.重庆医科大学基础医学院生化教研室;2.重庆医科大学基础医学院核医学教研室;
3.重庆医科大学临床学院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索毕赤酵母表达的人瘦素的非亲和层析纯化方法。方法:采用强阴离子交换柱(Sepharose Q fast flow)和疏水层析柱(Phenyl Sepharose 6 fast flow)在 pH 7.5 的条件下进行纯化。结果:经 Q 柱一步纯化后,产物纯度由 42.3%到达 89.6%,随后通过疏水层析纯化后,产物纯度达到 96.2%。经 SDS－PAGE 证实为单一蛋白条带。结论:通过上述手段已成功分离纯化得到纯度较高的由毕赤酵母表达的重组人瘦素。

【关键词】人瘦素;纯化;离子交换层析;疏水层析

【中国图书分类法分类号】R786 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－01－17

The purification of human recombinant leptin

LIU Xianjun, et al

(*Department of Biochemistry, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To explore the purification method of non－ affinity chromatography for leptin expressed in Pichia Pastoris. *Methods*: Ion exchange chromatography (Sepharose Q fast flow) and hydrophobic interaction chromatography (Phenyl Sepharose 6 fast flow) were used to purify human leptin in pH 7.5. *Results*: After purification by Q column, the purity of leptin increased from 42.3% to 89.6%. Subsequently, after hydrophobic interaction chromatography , its purity reached 96.2%. In SDS－PAGE, leptin was shown as one specific band. *Conclusion*: The human recombinant leptin expressed by Pichia Pastoris yeast can be successfully purified by ion exchange chromatography plus hydrophobic interaction chromatography.

【Key words】 Human recombinant leptin; Purifacation; Ion exchange chromatography; Hydrophobic interaction chromatography

瘦素(Leptin,也称瘦蛋白)是主要由脂肪组织肥胖基因(Obese gene)表达的一种蛋白质,通过血循环到达大脑的饱食中枢,从而控制食欲与食物吸收[1]。自 1994 年 Zhang[2]等人克隆以来,人们已对其生理作用进行了广泛的研究。结果表明,瘦素不仅作为血循环的信号分子将身体的脂肪量传送给大脑中枢[1];也具有其它重要的作用如抑制骨形成[3]、调控免疫系统[4]、控制生殖器官的发育与成熟[5]、抑制细胞凋亡[6]等。此外,也发现,肥胖基因的碱基突变可导致严重的肥胖症与糖尿病和应用重组瘦素具有减轻肥胖动物体重的作用[7]。

为了获得基因工程表达的人瘦素,我们曾将编码人瘦素的 cDNA 片段克隆至毕赤酵母(Pichia Pastoris Yeast)表达载体— pPICZα 中,构建了表达人瘦素的工程菌—pPICZα－leptin/GS115,获得了毕赤酵母表达的可溶性人瘦素,并进行了亲和层析法纯化[8],在此基础上也探索了其非亲和层析的纯化条件,现报道如下。

作者简介:刘先俊(1964－),男,讲师,硕士,
主要研究方向:肥胖基因。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与器材

酵母提取物(yeast extract),胰蛋白胨(tryptone):Oxford 产品。

酵母氮碱,DTT、PMSF:上海生工产品。

疏水柱介质(Phenyl Sepharose 6 fast flow),离子交换介质(Q Sepharose fast flow):Pharmacia 产品。

蛋白质分子量标准:低分子量标准蛋白质,上海西巴斯生物技术开发有限公司。

Zoecin:Invitrogen 产品。

冷冻离心机(Avanti^{TM}J－20):美国 Beckman Coulter。

台式冷冻离心机,微量可调定量加样器:德国 Eppendorf。

维普资讯 http://www.cqvip.com

微量水平电泳装置:美国 Bio－Rad。

纯化仪:PharmaciaÄAKTA Primer。

摇床:哈尔滨东联电子技术开发公司。

其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 pPICZα－leptin/GSll5 工程菌的培养与诱导表达。

1.2.1.1 培养

从 YPD 平板(YPD:1%酵母提取物、2%胰蛋白胨、2%葡萄糖,加 2%琼脂和 Zoecin 100μg/ml)上挑取单菌落接种于 3ml BMGH(BMGH: 1% 硫酸铵、0.34% 酵母氮碱、100mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0、4×10^{-3}% 组氨酸、2×10^{-4}% 生物素、1% 甘油,含 Zoecin 100μg/ml)中,30℃、250r/min 振荡培养过夜(约 16～18h),转种于 50 ml BMGY(BMGY:BMGH 加 1%酵母提取物、2% 胰蛋白胨)中(500 ml 摇瓶),30℃、250r/min 振荡培养约 20～24h(OD_{600}通常达 50～60)。

1.2.1.2 诱导

将上述培养物于 4℃、5000r/min 离心 5min,收集细胞沉淀,重新悬浮于 20ml BMMH 培养基(BMMH,1%硫酸铵、0.34%酵母氮碱、100mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.0、4×10^{-3}%组氨酸、2×10^{-4}%生物素、0.5%甲醇)中,30℃、250r/min 振荡培养约 72h,每隔 12h 补加 0.5%的甲醇(终浓度)以维持诱导。

1.2.2 培养液的收集

将 1.2.1.2 之培养物于 4℃、8000r/min 离心 30min,收集上清液,加 PMSF 至终浓度 0.5mmol/L,－20℃保存以备纯化。

1.2.3 离子交换层析

Q 柱(1cm × 20cm)预先用缓冲液(50mmol/L Tris－HCl pH7.5,lmmol/L EDTA)平衡,将 1.2.2 离心后收集的上清液上样(流速 2ml/min),再用上述缓冲液洗涤至无蛋白质流出为止(纯化仪检测),最后进行线性梯度洗脱(缓冲液 50mmol/L Tris－HCl pH 7.5,1mmol/L EDTA,含 0～0.3mol/L NaCl,洗脱总体积 300ml),分部收集洗脱液,15%SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS－PAGE)检测[9],考马斯亮兰染色。合并收集目的蛋白所在管,准备下一步纯化。

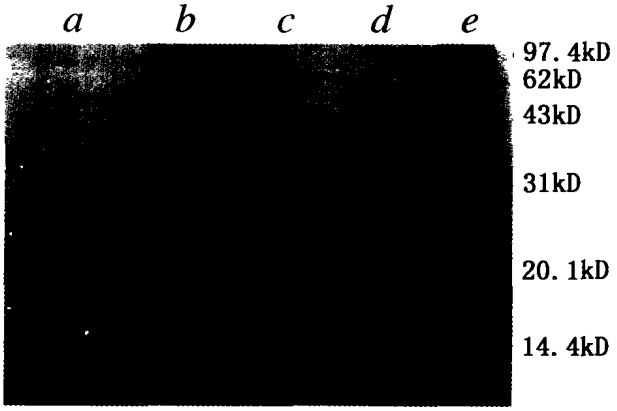
1.2.4 疏水层析

预先用缓冲液(50mmol/L Tris－HCl pH 7.5,1mmol/L EDTA,1mol/L 硫酸铵)平衡,将上步纯化后的溶液(已加固体硫酸铵至终浓度 1mol/L)上样(流速 2ml/min),再用平衡柱的缓冲液洗涤至无蛋白质流出为止(纯化仪检测),最后用缓冲液(50mmol/L Tris－HCl pH 7.5,lmm EDTA)洗脱,收集洗脱峰,15%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测[9]。将洗脱液对 1 mmol/L NH_4HCO_3(pH 7.5)、4℃透析过夜(中间更换缓冲液 2～3 次)。冷冻干燥后保存。

2 结 果

2.1 pPICZα－leptin/GS115 工程菌的诱导表达

毕赤酵母是能以甲醇或甘油作为唯一碳源的微生物[10]。表达外源蛋白通常需要 2 个阶段的培养:一是增菌阶段(在含甘油的 BMGY 培养基中约需 16～18h),使酵母细胞的数目大量增多,以有利于大量表达外源蛋白;二是诱导表达阶段,除去培养基中的甘油,转用甲醇代替,通过甲醇诱导醇氧化酶(AOX)的表达而达到表达外源蛋白的作用[10]。典型的诱导条件是 24h 补加 0.5%的甲醇(终浓度)以维持诱导[10]。采用每隔 12h 补加 0.5%的甲醇(终浓度)以维持诱导,在培养上清液中,通过 SDS－PAGE 检测,在分子量约 16kD 处有明显的表达蛋白条带,与人瘦素的理论预计值相符(图 la),其表达效果好于每隔 24h 补加 0.5%的甲醇(终浓度)以维持诱导。



a:诱导后的上清液;b、c:Q 柱纯化后;d:疏水层析纯化后;e:蛋白质分子量标准)

图 1 重组人瘦素的 SDS－PAGE 结果

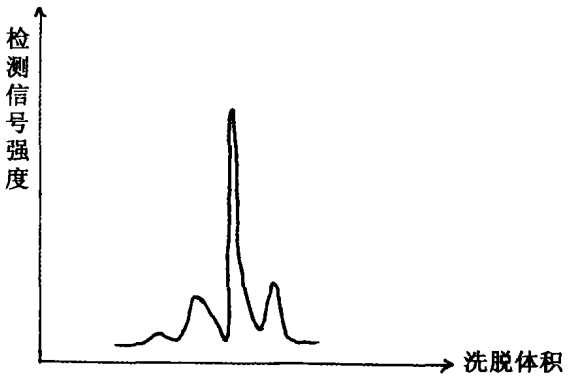


图 2 Q 柱纯化之连续梯度洗脱曲线

2.2 Q 柱层析分离纯化人瘦素

人瘦素是一种等电点(pI)偏低的酸性蛋白质(pH<7.0),在 pH 7.5 的缓冲液中带负电荷。因此,在 pH7.5 的条件下通过阴离子交换柱(Q

维普资讯 http://www.cqvip.com

Sepharose)时,可与阴离子交换填料(Q Sepharose)结合,而其它等电点呈碱性或中性等的蛋白质由于不能与阴离子交换填料结合或结合能力弱,因而会穿过阴离子交换柱。再通过逐步增加离子强度(NaCl)的线性梯度洗脱,可根据其与阴离子交换柱结合能力从弱至强而将不同的蛋白质分别洗脱下来(图 2)。通过阴离子交换柱可将培养液中大部分的杂蛋白去除(图 1b、c)。

2.3 疏水柱层析分离纯化人瘦素

疏水柱层主要是根据蛋白质表面的疏水特性进行分离纯化的。含人瘦素的毕赤酵母培养液经阴离子交换柱层析后,与瘦素的等电点相差较大的杂蛋白已被除去,凝胶扫描显示,重组人瘦素的纯度已由 42.3%提高至 89.6%,说明大部分的杂蛋白已被除去。在样品液中加入 1mol/L 硫酸铵(终浓度)以有利于蛋白质与疏水介质(Phenyl Sepharose 6)结合,再在低离子强度的条件下(50mM Tris－HCl pH 7.5,1mmol/L EDTA)将瘦素洗脱下采(图 3)。经 SDS－PAGE 检测,为单一条带(图 1d),凝胶扫描显示,重组人瘦素的纯度为 96.2%。

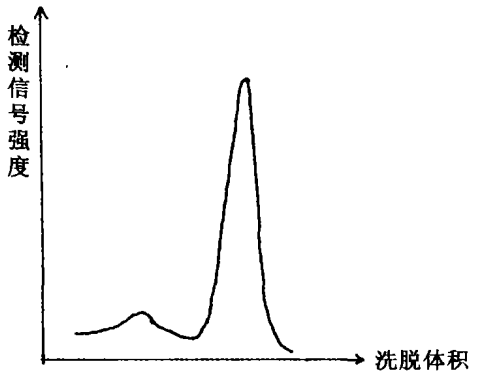


图 3 疏水柱层析之洗脱曲线

3 讨 论

自 1994 年肥胖基因 cDNA 被克隆以来[2],瘦素一直是肥胖研究的热点。为了获得重组瘦素,人们已在多个大肠杆菌表达载体中进行了表达,不幸的是表达产物几乎都以不溶解的包含体形式存在[11－13]。这些主要由变性蛋白质组成的包含体,需要经过复杂、繁琐的复性过程才能恢复其天然结构进而发挥其生物学作用。虽然大肠杆菌表达系统具有培养周期短、培养基成分简单、容易操作等优点,但其本身为原核表达系统,缺乏真核细胞固有转录、翻译后的加工修饰机制,因此,许多真核基因在大肠杆菌表达载体中的表达产物以包含体形式存在,而包含体的复性又是基因工程中的难点之一[14]。毕赤酵母(Pichia Pastoris yeast)是近年迅速发展起来的一种表达宿主[10]。由于其独特的优越性,已在多种基因工程表达蛋白质中得到广泛应用。我们在毕赤酵母表达系统中成功表达的瘦素[8],具有可溶性、分泌型的特点,再加上毕赤酵母本身的外分泌蛋白很少,因而,离心后的培养上清液中,目的蛋白通常即具有较高的纯度(表达产量越高,目的蛋白纯度越高)。表达产物(未纯化前)经凝胶扫描分析,纯度可达 42.3%。

蛋白质分离纯化一直是基因工程中研究的重要课题,其方法的选择和应用直接关系到产物的回收率、生物学活性、产品的成本等,是制约基因工程产品走向产业化的关键问题之一。曾采用表达产物——瘦素末端所带的多聚组氨酸与金属镍螯合的亲和层析法纯化表达蛋白,也获得在 SDS－PAGE 上呈现分子量约为 16kD 的单一蛋白条带的人瘦素[8],但考虑到该亲和层析成本高(镍柱价格昂贵)、纯化慢(层析时流速缓慢),采用非亲和层析法、在温和(pH 7.5)条件下进行纯化,首先将离心后的培养液直接上阴离子交换层析柱(Q 柱),后者具有流速快、结合能力强的特点,省去了浓缩培养液的步骤。因此,离子交换层析不仅具有分离纯化的作用,也具有浓缩目的蛋白质的优点。Q 柱后的含盐(NaCl)洗脱液在加入固体硫酸铵后直接上疏水层析柱,又可省去透析步骤,不仅大大节约了时间,也减少了相关试剂的耗费。下一步的工作是对其活性进行鉴定,为进一步可能的产业化研究打下了基础。

参 考 文 献

[1] Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein(Leptin) pathway－A link between adipose tissue mass and central networks[J]. Horm. Metab. Res., 1996;28(12):619－632.

[2] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature, 1994;372(6505):425－432.

[3] Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay:A central control of

(下转第 476 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

M 期,而不存在于静止的 G_0 期细胞,Ki67 的确切功能尚不完全清楚,但通过研究它的表达及在核内分布,认为它与细胞有丝分裂有关。本实验分析 Ki67 与 NSCLC 的关系发现,在 NSCLC 中 Ki67 的阳性表达率很高而在癌旁的正常组织无阳性表达,说明 NSCLC 的形成与细胞的异常增殖有关。它的阳性表达除与临床分期和有无淋巴结转移同样有关,与 NSCLC 患者的性别,年龄无相关性外,还与患者的吸烟及肿块大小有关,在吸烟组 Ki67 的阳性表达率高于不吸烟组,两组间差异有显著性,提示吸烟可能有持续激活并扩大细胞增殖性群落的作用。在肿块直径≥3cm 组的阳性表达率明显高于直径<3cm 组,可能是与处于增殖期的细胞数目较多有一定关系。同样,本实验也做了 Ki67 与患者 3 年生存率的比较,发现 Ki67 阳性的患者 3 年生存率为 21.8%,阴性的患者 3 年生存率为 62.5%。因此,通过检测 VEGF、CD44v6 及 Ki67 在 NSCLC 组织中的表达,可以预测患者的预后和制定较好的治疗方案,以提高 NSCLC 患者的 3 年生存率。

参 考 文 献

[1] Lababede o, Meziame MA, Rice TW. TNM staging of lung cancer: a quick reference chart[J]. Chest, 1999; 115: 223 - 235.

[2] 江晓丰,董强刚,冯久贤,等. 非小细胞肺癌组织中血管内皮生长因子表达与树状细胞分布的关系[J]. 肿瘤, 2000; 20: 25 - 27.

[3] 田丽峰. EGFR 和 Ki67 在胃不典型增生和胃癌中的表达及二者相关性[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35: 116 - 118.

[4] Gasparini G, Toi M. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in nodenegative breast carcinoma[J]. J Natl Cancer, 1997; 79: 206 - 211.

[5] Inoue K, Oneki Y, Suganuma T, et al. Vascular endothelial growth factor express in primary esophageal squmous cell carcinoma[J]. Cell, 1997; 79: 206 - 211.

[6] 李 利. CD44v6 与肿瘤浸润、转移及预后[J]. 福建医科大学学报, 2000; 34(3): 315 - 317.

[7] Tran TA, Kallakury BV, Sheehan SB, et al. Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non - small cell lung carcinoma[J]. Hum Pathology, 1997; 28: 809 - 814.

(上接第 453 页)

bone mass[J]. Cell, 2000; 100(2): 197 - 207.

[4] Martin - Romero C, Santos - Alvarez J, Goberna R, et al. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes[J]. Cell Immunol, 2000; 199(1): 15 - 24.

[5] Kiess W, Reich A, Meyer K, et al. A role for leptin in sexual maturation and puberty? [J]. Horm. Res, 1999; 51(Suppl 3)55 - 63.

[6] Shimabukuro M, Wang MY, Zhou YT, et al. Protection against lipoapoptosis of beta cells through leptin - dependent maintenance of Bcl - 2 expression[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998; 95(20): 9558 - 9561.

[7] Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight - reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene [J]. Science, 1995; 269(5223): 543 - 546.

[8] 刘先俊,刘方欣,漆洪波,等. 人瘦素在毕赤酵母中的表达及其分离纯化[J]. 重庆医科大学学报, 2002; 27(3): 250 - 252.

[9] 汪家政、范 明,主编. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2000; 77 - 101.

[10] 王会文,赵晓瑜. 甲醇酵母表达系统[J]. 生命的化学, 2000; 20(3): 271 - 273.

[11] Qi K, Jiang Z, Ding Z, et al. Cloning of Chinese obese cDNA and its expression in E. coli[J]. Chin Mecl J (Engl), 2000; 113(1): 44 - 48.

[12] Jeong KJ, Lee SY. High - level production of human leptin by fed - batch cultivation of recombinant Escherichia coli and its purification[J]. Appl Environ Microbiol, 1999; 65(7): 3027 - 3032.

[13] Altmann SW, Timans JC, Rock FL, et al. Expression and purification of a synthetic human obese gene product[J]. Protein Expr Purif, 1995; 6(6): 722 - 726.

[14] 吴丽金,陈宇光. 包含体内重组蛋白质的复性[J]. 生命的化学, 2001; 21(4): 315 - 318.