DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.009
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol.25, No.16
1424 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)16-1424-04

非融合型重组人白细胞介素-18的纯化及鉴定

朱永红,邹全明 (第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 获得高纯度的重组人白细胞介素-18(rhIL-18)。方法 采用溶菌酶加超声破菌的方法抽提包涵体,以8 mol/L尿素溶解包涵体,变性条件下以阴离子柱层析进行首步纯化,复性后再进行凝胶过滤层析。对纯化的样品进行了SDS-PAGE、HPLC、N端氨基酸序列、免疫印迹及生物学活性分析。结果 rhIL-18在大肠杆菌中以不溶性包涵体形式存在,所提取的包涵体中重组蛋白纯度可达到80%以上,包涵体经二步柱层析纯化后,HPLC分析纯度达98%以上,SDS-PAGE测定其分子质量约19×10³,N端15个氨基酸序列与预期一致,生物学活性分析证实纯化的rhIL-18具有诱导人外周血单个核细胞(PBMC)产生IFN-γ的能力。结论 所建立的纯化rhIL-18的方法简便有效,为开展rhIL-18的结构活性关系研究及其大规模纯化打下了良好的基础。

关键词:重组人白细胞介素-18;纯化;鉴定
中图法分类号:R392.12;R394;R446.1 文献标识码:A

Purification and characterization of non-fusion recombinant human interleukin-18 expressed in *E. coli*

ZHU Yong-hong, ZOU Quan-ming (Department of Clinical Microbiology and Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To develop the purification method of rhIL-18 expressed in *E. coli*. Methods The harvested cells were disrupted using lysozyme and sonication. The rhIL-18 inclusion bodies were extracted by centrifugation. Washed inclusion bodies were solubilized in 8 mol/L urea. The solubilized inclusion bodies were first purified by ion exchange chromatography under denaturing conditions. After renaturation, gel filtration chromatography was used for further purification. Samples were analyzed by SDS-PAGE, HPLC, Western blotting and N-terminal amino acid sequencing. The biological activity of purified rhIL-18 was also measured. Results It was found that rhIL-18 was expressed intracellularly in *E. coli* as insoluble inclusion bodies. The purity of rhIL-18 in extracted inclusion bodies was above 80%. The final purified rhIL-18 was of high purity and exhibited the mass of molecule 19×10³ by SDS-PAGE. The sequence of 15 amino acid residues form NH2-terminus of the purified rhIL-18 was consistent with the predicted sequence. The purified rhIL-18 also induced IFN-γ production of Con A stimulated human PBMC. Conclusion The established method for purifying rhIL-18 is simple and effective and might be useful in the development of the large-scaled purification process of rhIL-18.

Key words: reco

白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)是一种重要的免疫调节因子,大量研究证实,其在抗肿瘤、抗感染免疫中发挥重要作用,具有潜在的临床应用前景[1~4]。有活性的成熟的人IL-18(Human IL-18, hIL-18)是由157个氨基酸组成的多肽,分子质量约19×10³,不含疏水信号肽及糖基化位点,适合于在大肠杆菌中表达[5]。我们在已构建重组hIL-18(rhIL-18)非融合型高效表达菌株的基础上,建立了一种简便有效的分离纯化rhIL-18的方法,并对纯化产物进行了理化及生物学活性鉴定,为进一步开展rhIL-18构象活性关系研究及其大规模纯化制备打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

表达rhIL-18的工程菌株由本室构建[6]。鼠抗hIL-18单克隆抗体为美国Biosource公司产品;HRP标记的羊抗鼠IgG为中山生物技术公司产品;人IFN-γ ELISA定量检测试剂盒为晶美

基金项目:重庆市医学科技计划资助项目(20011020)
作者简介:朱永红(1966-),男,湖北省荆门市人,博士,副教授,主要从事基因工程药物研究与开发方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752315
收稿日期:2002-07-12;修回日期:2003-02-17

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

生物工程有限公司产品。HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR 预装柱和 Q Sepharose High Performance 阴离子交换层析填料为 Amersham Pharmacia 产品。

1.2　方法

1.2.1　rhIL-18 在大肠杆菌中的表达　　挑取单菌落种于 2 ml LB 培养基(含 Amp 100 μg/ml)中, 37 ℃振摇培养 12 h, 将菌液以 1∶100 接种于新鲜培养基, 振摇培养至 D_{600}≈0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 诱导培养 5 h, 离心收集细菌, SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。

1.2.2　包涵体的分离和初步纯化　　将收获的菌体以 0.1 g/ml 悬于 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中, 每克湿菌加入 80 μl 溶菌酶(10 mg/ml), 室温搅拌 30 min, 至溶液变得粘稠, 然后以超声波仪破碎菌液, 直至菌液变得不再粘稠, 12 000× g 离心 10 min, 去上清, 沉淀以 10 倍体积的 1% Triton X-100(TE 缓冲液配制)悬浮, 室温搅拌 10 min 后, 12 000× g 离心 10 min, 沉淀再以相同方法洗涤 1 次, 最后用不含 Triton X-100 的 TE 缓冲液洗涤 1 次。所得沉淀以 8 mol/L 尿素(含 20 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, pH 8.0)室温搅拌溶解 2 h, 离心弃除不溶物, 得到包涵体初提物。

1.2.3　离子交换柱层析　　用 Q Sepharose High Performance 层析填料装柱(Pharmacia XK 16/20 柱), 经洗涤及再生后, 以 Buffer A (8 mol/L Urea, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)平衡柱子后上样, 上样后以 Buffer B (Buffer A + 1 mol/L NaCl)进行线性梯度洗脱, 流速为 4 ml/min, 收集各蛋白峰进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.4　复性　　将离子交换柱分离的目的蛋白用 Buffer A 稀释至 0.5 mg/ml, 以复性缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)缓慢稀释至尿素浓度为 2 mol/L, 4 ℃搅拌 10 h 后以 20 mmol/L PB (pH 8.0)充分透析去除尿素, 最后样品以 Satorius 超滤膜盒进行浓缩。

1.2.5　凝胶过滤层析　　用 20 mmol/L PB, 150 mmol/L NaCl (pH 8.0)平衡 HiPrep 26/20 Sephacryl S-100 HR 预装柱后, 将复性后浓缩样品上样, 上样总体积为 5 ml, 流速为 1 ml/min。

1.2.6　rhIL-18 的纯度和分子量测定　　采用还原型和非还原型 SDS-PAGE 方法测定, 分离胶浓度为 15%, 经考马斯亮蓝 R250 染色后, 用 UVP 图像扫描仪测定 rhIL-18 的纯度, 通过与标准分子质量蛋白的迁移率比较计算重组蛋白的分子质量。

1.2.7　N 端氨基酸序列分析　　将目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后, 电转移至 PVDF 膜, 寄送北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室以 Edman 降解法测定 N 端 15 个氨基酸残基顺序。

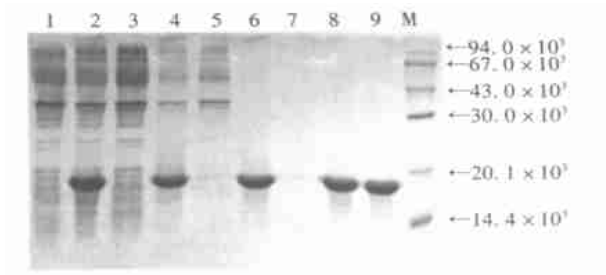
1.2.8　免疫印迹分析　　样品经 SDS-PAGE 电泳后, 将 SDS-PAGE 胶上的重组蛋白切成 2 份, 1 份作考马斯亮蓝染色, 1 份作免疫印迹分析, 所用一抗为鼠抗 hIL-18 单抗, DAB 显色。

1.2.9　生物学活性分析　　在 96 孔板上用完全 RPMI1640-10%FCS 培养基按 10 倍稀释法稀释 rhIL-18, 每个稀释度 3 个平行孔。分离的人外周血 PBMC 用相同培养基配制成 3× 10^6/ml, 加入 ConA 至终浓度为 0.5 μg/ml, 然后在稀释好的孔板中接种细胞 100 μl, 37 ℃、5% CO_2 孵育 48 h 后, 收集细胞培养上清, 用人 IFN-γ 定量检测试剂盒测定 IFN-γ 的含量。

2　结果

2.1　rhIL-18 在大肠杆菌中的表达及初步纯化

工程菌经诱导培养 5 h, 重组蛋白的表达量达菌体总蛋白的 35%以上, 分子质量约 19× 10^3, 在细菌中以不溶性包涵体形式存在, 提取的包涵体经洗涤后目的蛋白含量达到 80%以上, 见图 1。



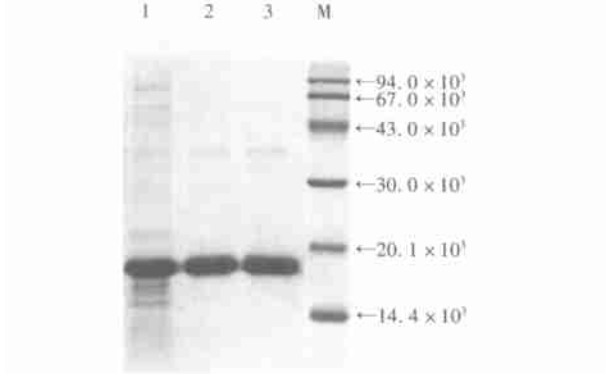
1: Lysate of *E. coli* (petTT) after induction of IPTG; 2: Lysate of *E. coli* (petTT/hIL-18) after induction of IPTG; 3: Supernatant of *E. coli* (petTT/hIL-18) after sonication; 4: Pellet of *E. coli* (petTT/hIL-18) after sonication; 5: Washed supernatant of the pllet in lane 4; 6: Washed pellet of the pellet in lane 4; 7: Washed supernatant of the pellet in lane 6; 8: Washed pellet of the pellet in lane 6; 9: Inclusion body solubilized by 8 mol/L urea; M: Molecular mass marker protein indicating Mr on the right

图 1　15% SDS-PAGE 分析 rhIL-18 在大肠杆菌中的表达及包涵体的分离纯化

Fig 1　Expression of rhIL-18 in *E. coli* and purification of rhIL-18 inclusion body

2.2　rhIL-18 的柱层析纯化

包涵体经 8 mol/L 尿素溶解后, 直接进行 Q Sepharose HP 柱层析, SDS-PAGE 鉴定目的蛋白纯度已达到 95%以上, 见图 2, 回收率达 84.7%。样品复性后有少量二聚体及多聚体形成, 经凝胶过滤层析后进一步去除微量杂蛋白及蛋白聚体, 见图 3, 活性回收率达 92.6%, 电泳及 RP-HPLC 鉴定纯度达 98%以上。

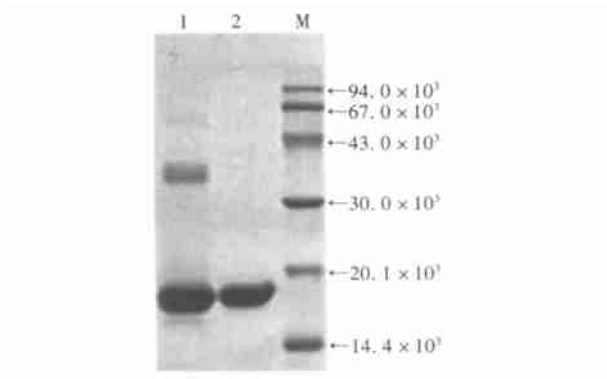


1: rhIL-18 inclusion bodies; 2, 3: Purified rhIL-18 by Q Sepharose HP chromatography; M: Molecular mass marker

图 2　Sepharose HP 柱层析纯化 rhIL-18 的 SDS-PAGE 分析

Fig 2　SDS-PAGE pattern of Q Sepharose HP chromatographic purification for rhIL-18

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



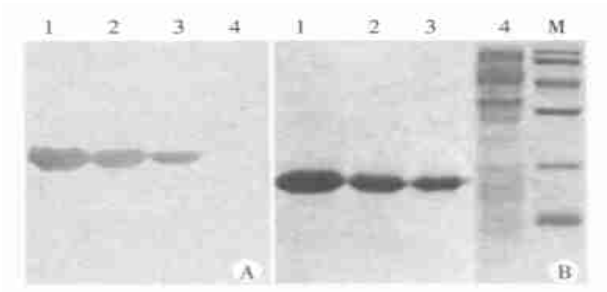
1: Renatured rhIL-18 from ion exchange chromatographic step (non-reduced); 2: Purified rhIL-18 from gel filtration chromatography (non-reduced); M: Molecular mass marker protein

图 3 凝胶过滤层析纯化 rhIL-18 的 SDS-PAGE 分析

Fig 3 SDS-PAGE pattern of gel filtration chromatographic puification for rhIL-18

2.3 重组蛋白的理化特性

纯化后的 rhIL-18 经 SDS-PAGE 检测分子质量约为 19× 10^3，免疫印迹证实与抗 hIL-18 单抗有较好的反应性，见图 4。氨基酸序列分析 N 端 15 个氨基酸残基的顺序为 MYFGKLESKLSVIRN，与预期的序列一致[5]。



A: Immunoblotting with membrane probed using monoclonal antibody raised to rhIL-18; B: Coomassie brilliant blue staining of the same gel; 1~3: Purified rhIL-18; 4: Lysate of *E. coli* (petTT) after induction of IPTG; M: Molecular mass marker

图 4 免疫印迹鉴定纯化的 rhIL-18

Fig 4 Characterization by immunoblotting of the purified rhIL-18

2.4 生物学活性分析

以人 PBMC 为反应细胞，单独加入 rhIL-18 刺激的细胞培养上清中检测不到 IFN-γ，在 0.5 μg/ml ConA 的共同刺激下，加入 rhIL-18 刺激后细胞培养上清中 IFN-γ 含量升高，并且随 rhIL-18 浓度的增加而提高。在浓度为 0.273 nmol/L、2.73 nmol/L 和 27.3 nmol/L 时，诱导产生 IFN-γ 的量分别为 111.6、218.3 和 403.2 pg/ml。

3 讨论

目前，有关 rhIL-18 表达及纯化方面的研究较多，国内有多家单位开展了人 IL-18 的克隆表达研究，但大多为融合表达，不太适合进行基因工程药物开发及其结构活性关系研究，进行非融合表达的，其纯化效果尚不理想，且未见较为详细的纯化工艺介绍。国外也未见 rhIL-18 纯化工艺的报道。

本研究在大肠杆菌中以包涵体形式表达非融合型 rhIL-18，所采用的溶菌酶加超声破菌抽提包涵体的方法十分有效，抽提的包涵体中目的蛋白的纯度已达到 80%以上，非常有利于下一步的纯化。对包涵体蛋白的纯化有多种方案可供选择，一是先对包涵体蛋白进行复性处理，再进行纯化，二是先进行纯化后再复性。我们采用的方案为，先在变性条件下纯化，然后再对纯化的蛋白进行复性处理。变性条件下纯化的优点在于操作简便，目的蛋白的回收率高，纯化效果也十分理想，经一步纯化，目的蛋白的纯度即已达到 95%以上。此外，目的蛋白经纯化后再复性，可降低杂蛋白对目的蛋白复性的影响，还有可能提高目的蛋白的复性效果。rhIL-18 经复性后主要以单体形式存在，再经凝胶过滤层析，可进一步去除微量杂蛋白及少量的蛋白聚体，对活性峰进行 SDS-PAGE 分析，为单一条带，HPLC 分析为单一对称峰，主峰面积达 98%以上。层析样品经生物学活性分析有较好的诱导人 PBMC 产生 IFN-γ 的能力。经测序证实，纯化的 rhIL-18 其 N 端 15 个氨基酸序列与预期一致，免疫印迹证实纯化的 rhIL-18 具有较好的抗原性。

既往研究报道，rhIL-18 结构中不存在二硫键[5,7]。我们对复性的 rhIL-18 进行还原/非还原 SDS-PAGE 分析后发现，rhIL-18 经复性后可形成比例不等的二聚体、三聚体等，这些蛋白聚体经还原剂 DTT 处理后转变为单体，提示 rhIL-18 可形成分子间二硫键。此外还发现，复性后的 rhIL-18 单体经 DTT 处理后在 SDS-PAGE 中的迁移速率减慢。由于在非还原型 SDS-PAGE 中，许多二硫键蛋白质的氧化型由于有更紧密的结构而比还原型迁移得稍快，一种蛋白质在还原型和非还原型 SDS-PAGE 中迁移率的差异是测定其是否含有二硫键的一种灵敏方法[8]，由此推测，复性的 rhIL-18 单体内存在二硫键。考虑到 IL-18 分子内存在 4 个半胱氨酸残基，二硫键形成可能与 hIL-18 的空间构象及生物学活性关系密切，我们目前正深入开展这方面的研究。

本研究建立的 rhIL-18 的纯化方法具有操作简便、纯化效果明显等优点，非常有利于重组蛋白的大规模制备，为进一步开展 hIL-18 的结构生物学研究及临床前应用研究打下了良好的基础。

参考文献：

[1] Dinarello C A. IL-18: A TH1-inducing proinflammatory cytokine and new

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

member of the IL-1 family[J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 101(1): 11—24.
[2] Golab J. Interleukin-18-interferon gamma inducing factor——a novel player in tumor immunotherapy[J]. ?Cytokine, 2000, 12(4): 332—338.
[3] Ohkusu K, Yoshimloto T, Takeda K, *et al*. Potentiality of IL-18 as a useful reagent for treatment and prevention of Leishmania Major infection[J]. Infect Immunol, 2000, 68(15): 2449—2456.
[4] Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, *et al*. IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice[J]. J Immunol, 2000, 164(11): 6067—6074.
[5] Ushio S, Namba M, Okura T, *et al*. Cloning of the cDNA for human IFN-γ-inducing factor, expression in *Escherichia coli* and studies on the biological activities of the protein[J]. J Immunol, 1996, 156(10): 4274—4279.
[6] 朱永红, 邹全明. 人白细胞介素-18 在大肠杆菌中的高效表达[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 194—196.
[7] 裴冬生, 胡书群, 赵惠仁. 人白细胞介素-18 大肠杆菌中的表达、纯化和复性[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(4): 397—400.
[8] Soulages J L, Arrese E L, Chetty P S, *et al*. Essential role of the conformational flexibility of helices 1 and 5 on the lipid binding activity of apolipophorin-III[J]. J Biol Chem, 2001, 276(36): 34162—34166.

(编辑 冯崇英)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)16-1427-01

晚发性新生儿出血误诊为血友病 1 例

Lated hemorrhagic disease of the newborn misdiagnosed as hemophilia

桂 芹 (第三军医大学附属西南医院小儿科, 重庆 400038)

患儿, 男, 40 d, 发现臀部血肿 8 d 入院。患儿于 8 d 前因夜间出现夜惊, 多汗, 家长带患儿到县医院就诊, 给予"维生素 D_3、青霉素各 1 支肌注"于双侧臀部, 当时肌注部位出现渗血, 2 h 后便出现局部肿胀, 次日仍有出血, 给予热敷, 症状未缓解, 后再次到县医院就诊, 查血常规正常, 作彩超示: 双侧臀部血肿, 以左侧为甚。为进一步诊治, 到我院就诊, 以"血友病"收住院。患儿第 4 胎第 2 产, 足月顺产, 生后母乳喂养至今, 未添加其它辅食。其母孕 4 产 2, 自然流产 2 胎。有一姐姐, 5 岁, 健康, 父母平素体健, 家族中无出血性病史, 但母亲生产以后, 因乳腺炎服用大量抗生素。查体: 一般情况较差, 贫血貌, 皮肤未见淤斑淤点, 双侧臀部各有一约 3 cm×3 cm×2 cm 大小血肿, 心肺无异常, 腹软, 肠鸣音正常, 神经系统正常。根据患儿病史特点血常规检查示, WBC 16.9×10^9/L, L 0.33, N 0.67, RBC 3.2×10^{12}/L, HB 85 g/L, PLT 384×10^9/L。凝血检查见: PT 120 s, APTT 180 s, 用美国 ACL 3000 plus 做凝血因子检查 F Ⅷ: C 200%, F Ⅸ: C 1%, 同时患儿因抽血检查, 发现穿刺部位按压后仍渗血不止, 加用凝血酶局部按压后, 出血停止。根据病史及检查, 考虑血友病乙诊断明确。因 F Ⅸ活性低于 2%者为重型, 较罕见, 且出生时剪脐带时无明显出血和新生儿期剪舌系带时无明显出血, 考虑患儿的年龄小仅 40 d, 有晚发性新生儿出血症的可能, 进一步查Ⅱ因子的活性, 结果 F Ⅱ的活性仅为 2%, 考虑为维生素 K 缺乏引起的出血, 故给予输新鲜全血、血浆和维生素 K 后, 患儿经治疗后出血停止, 病情好转出院。1 个月后复查凝血因子正常, 排除了血友病乙。也支持晚发性新生儿出血症。

讨论

新生儿出血症是由维生素 K 缺乏, 体内一些维生素 K 依赖凝血因子活性低下而致的自限性出血性疾病。维生素 K 不参与凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ的合成, 但在这些凝血因子的前体蛋白转变成具有凝血生物活性的过程中, 其谷氨酸残基必需在肝细胞微粒体内羧化成γ—羧基谷氨酸, 才能螯合更多的钙, 此过程须由维生素 K 参与。新生儿出生时肠道无细菌, 维生素 K 的合成少; 母乳中维生素 K 含量少以及婴儿有先天性肝胆疾病或慢性腹泻者影响肠粘膜对维生素 K 的吸收; 而晚发型维生素 K 缺乏引起的出血主要与长期腹泻和长期使用抗生素及母乳喂养有关。而本例病儿有长期腹泻, 其母亲又因乳腺炎而长期服抗生素的病史, 且患儿自出生后一直是母乳喂养。对于新生儿早期出血和凝血障碍容易诊断为新生儿出血症, 但对于婴幼儿的出血和凝血障碍则容易诊断为血友病。血友病是一种因凝血因子缺乏而引起的遗传性出血性疾病, 为性联隐性遗传, 男性发病, 女性为携带者。多在婴儿期后发病, 血友病乙发病率较血友病甲少, 但有症状的女性遗传者比血友病甲多, 且也有新生儿发病的多篇报道[1,2], 因而在诊断血友病时应注意与维生素 K 缺乏所致的出血症作鉴别诊断, 避免引起误诊。

关键词: 新生儿出血症; 维生素 K
中图法分类号: R722.15 文献标识码: B

参考文献:

[1] 许嘉玲, 柯丹红, 郑天文. 新生儿血友病乙一例误诊分析[J]. 中国小儿血液杂志, 2001, 6(2): 79—80.
[2] 岳维真, 徐 汉. 新生儿血友病乙误诊个案分析[J]. 中国小儿血液杂志, 2001, 6(2): 53.

(编辑 陈聪连)

作者简介: 桂 芹(1964—), 女, 重庆市人, 博士, 主治医师, 主要从事儿科疾病方面的研究。电话: (023)68755320

收稿日期: 2003-02-18; 修回日期: 2003-05-08

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