DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.014

文章编号:1000-5404(2000)01-0033-03

hIL-3 突变体在大肠杆菌中的表达及纯化

王 燕,毛琼国,万 瑛,纪贤文,刘 昕 (第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要 目的:将天然型 hIL-3 蛋白经定点突变为 hIL-3 突变体蛋白,并在大肠杆菌中表达及纯化。方法:超声破碎细菌得到包涵体,经 DEAE Fast Flow,SephaecrylS-200HR 等层析步骤纯化。结果:经以上一系列纯化,得到的人 IL-3 突变体蛋白纯度达 90%,比活性为 7.3×10^4 U/ml,总回收率为 100%。结论:突变体 hIL-3 在大肠杆菌中得到高效表达,并获得高纯度、高活性的 hIL-3 蛋白。

关键词 hIL-3 突变体;大肠杆菌;纯化

中图法分类号 R378.21;R394 文献标识码 A

Purification of hIL-3 mutant highly expressed in *E.coli*

WANG Yan, MAO Qiong-guo, WAN Yin, JI Xian-wen, LIU Xin (Department of Molecular Biology, Faculty of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To purify hIL-3 mutant from *E.coli*. Methods: Inclusion bodies were collected after the breakage of bacteria. Then the pure hIL-3 mutant was obtained by DEAE sepharose fast flow and sephacryl S-200HR. Results: The purity of the product was about 90%. *In vitro* test of the TF-1 cells showed the relative activity of hIL-3 mutant was 7.3×10^4 unit/ml. The total recovery of this protocol was approximately 100%. Conclusion: hIL-3 mutant is highly expressed in *E.coli*. hIL-3 protein with high purity and activity is obtained.

Key words human IL-3 mutant; *E.coli*; purification

IL-3 是由活化 T 细胞产生的一种多集落刺激因子,具有刺激造血细胞增殖分化和免疫调节功能。临床用于治疗造血障碍性疾病,收到较好的效果。hIL-3cDNA 克隆化[1,2] 及表达[3] 为基础研究和临床应用提供了条件。但天然型 IL-3 蛋白由于自身的原因难以在大肠杆菌中高效表达,本室在前期工作中成功的将天然型的 hIL-3 蛋白进行改造,得到突变体 hIL-3 蛋白在大肠杆菌中高效表达。我们在此基础上,进一步对突变体 hIL-3 的纯化方法进行了研究。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

pSM53MVhIL-3 质粒,由本室构建,宿主菌为 *E.coli* TAP106,由第四军医大学陈苏民教授惠赠。

1.2 TF-1 细胞

购于上海细胞所。

作者简介:王 燕(1961.12),女,江苏省常州市人,博士,讲师,主要从事蛋白质工程方面的研究,发表论文 3 篇。电话:(023)68752257

收稿日期:1999-04-15;修回日期:1999-10-15

1.3 试剂

SephaecrylS-200HR, DEAE Sepharose Fast Flow 购自美国 Sigma 公司。

1.4 诱导表达

将含有 pSM53MVhIL-3 的大肠杆菌经 30℃增菌培养,再转 42℃诱导表达,收获菌体。

1.5 包涵体处理

超声破碎细菌细胞,释放包涵体。离心 10 000 r/min 15 min,弃上清,将沉淀用 0.7 mol/L 尿素,0.5% TritonX-100,10 mmol/L EDTA 反复洗涤处理得纯化包涵体。包涵体用 8 mol/L 盐酸胍含 20 mmol/L β-疏基乙醇溶解变性(pH 8.5)。

1.6 复性

将变性溶解的 hIL-3 突变体蛋白离心 10 000 r/min, 15 min,清除不溶性杂质,上清直接用复性液,50 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 5 mmol/L GSH(还原型谷胱甘肽), 5 mmol/L GSSG(氧化型谷胱甘肽), 1 mmol/L PMSF 稀释,使蛋白质终浓度不超过 100 μg/ml,尿素终浓度为 0.5~1 mol/L,置 4℃ 10 h。超滤浓缩后用 50 mmol NaAc-HAC pH 6.0 透析平衡。

1.6.1 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析

用 50 mmol NaAc-HAC pH 6.0 平衡 DEAE 离子交换层析(1.5 cm×20 cm)。将浓缩平衡后蛋白柱液上柱,流速为 1.5 ml/min,收集 Runthrough 部分。

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

1.6.2 SephaecrylS-200HR 凝胶过滤 将 DEAE 离子交换层析纯化的样品浓缩后，然后过 Sephaecryl S-200 HR 凝胶过滤层析柱(1.5 cm× 50 cm)进一步纯化，流速 0.5 ml/min，收集峰并进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 活性测定

用 IL-3 依赖细胞株测活性[3] 。

2 结果

2.1 包涵体处理

包涵体变性溶解后 SDS-PAGE 分析，结果见图 1，其蛋白纯度约为 90%。

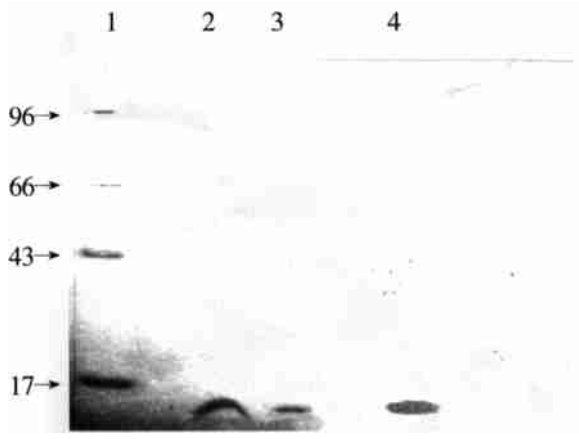


图 1 纯化 hIL-3 突变体蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig 1 SDS-PAGE analysis of purified hIL-3 matution protein

Lane 1 :mw standards ; Lane 2 :Protein purified by sephaecryls-200HR ; Lane 3 : Protein purified by DEAE FF ; Lane 4 :Inclusion body

2.2 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析

经诱导表达后得到 hIL-3 突变体蛋白，过 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱，见图 2，hIL-3 突变体蛋白主要集中在 Run-through 部分。

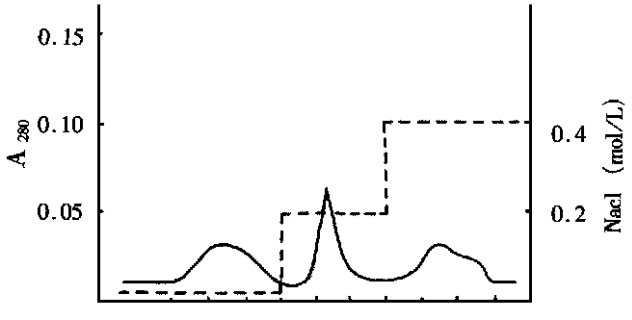


图 2 hIL-3 突变体 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析

Fig 2 DEAE sepharose fast flow chromatography of hIL-3 mutation protein

2.3 SephaecrylS-200HR 凝胶过滤层析

收集 DEAE Fast Flow 分离的 hIL-3 进一步用 Sephaecryl S-200HR 凝胶过滤层析分离，取主峰进行 SDS-PAGE 分析鉴定其纯度达 90%，见图 3。

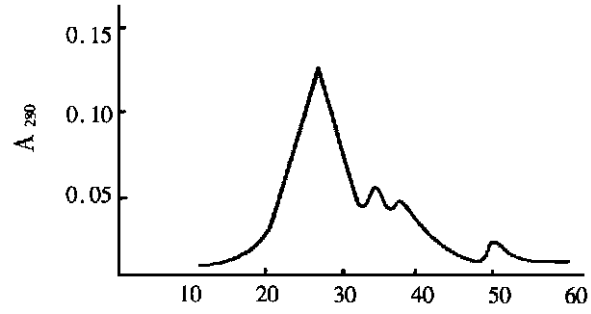


图 3 hIL-3 突变体 Sephaecryl S-200 HR 凝胶过滤层析

Fig 3 Sephaecry IS-200 HR gel filtration of hIL-3 mutation protein

2.4 活性测定

用 IL-3 依赖细胞株检测经离子交换，凝胶过滤层析纯化处理的包涵体，后得到大肠杆菌表达有活性的 hIL-3 突变体蛋白，纯度 90%以上的纯品，见表 1。

表 1 hIL-3 突变体的活性测定

Tab 1 Activity of hIL-3 mutant

Purificativity stages	Activity($\times 10^4$ U/ml)
Inclusion bodies	1.2
DEAF FF	5.7
Sephaecry1S-200HR	7.3

3 讨论

在 *E. coli* 中高效表达的外源基因产物都以包涵体的形式存在于其胞浆中[4] ，暗视野显微镜下可见细胞浆内有折光性很强的颗粒。在进行 hIL-3 突变体纯化过程中，都将遇到包涵体的处理。因包涵体中除含有重组蛋白以外，还含有细菌杂蛋白，遗传物质及内毒素等成分。利用包涵体密度大，水不溶性特点，通过离心技术和低浓度变性剂 0.7 mol/ L尿素， 0.01% Triton-100 反复洗涤，抽提大部分可溶性杂质，使包涵体纯度达到 90%，其中比较了含 1 mg/ ml 脱氧胆酸钠 (DOC)的 TE 溶液洗涤包涵体，效果不如 0.7 mol/L 尿素，DOC 的 TE 溶液可部分溶解包涵体，导致较多的 hIL-3 蛋白丢失。而包涵体的变性溶解及复性才是获得有效纯化的关键。包涵体变性溶解后，需要在适当条件下才能使重组蛋白正确折迭恢复活性，同时去除了一些不溶性沉淀的杂蛋白质，复性效率与蛋白质终浓度高低及复性速度有关。蛋白质浓度过高或复性过快都会造成复性

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

不完全而形成较多沉淀。从我们的实验中发现复性时蛋白浓度应控制在 100 μg/ml 以下，hIL-3 突变体蛋白稀释到一定浓度才能避免分子间相互作用，相互缠绕。复性过程中尿素浓度保持在 0.5～1 mol/L 之间，使其既能维持 hIL-3 突变体蛋白溶解性，又不干扰蛋白的折迭复性。直至将盐酸胍完全复性后溶液经 10 000 r/min 离心，去除不溶性沉淀，上清再经离子交换层析和凝胶过滤层析，得到 hIL-3 突变体蛋白纯品。用 TF-1 细胞检测其活性，达到 7.3×10^4 U/ml。此纯化结果表明我们在 *E.coli* 中变效表达了具有活性的 hIL-3 突变体，并初步解决了在大肠杆菌中表达 hIL-3 突变体的复性及纯化问题，得到了高纯度，高活性的 hIL-3 突变体，从而为 hIL-3 突变体的大规模生产，临床应用提供了条件，也为 IL-3 蛋白质的结构的研究提供了基础。

参考文献

[1] Merlin S, Rowold E, Abegg A, *et al*. Phage presentation and affinity selection of a deletion mutant of human interleukin-3[J]. Appl iochem Biotechnol, 1997, 67(3): 199－201.

[2] Phillips J A, Lopez A F, Milton S E, *et al*. Synthesis and expression of the gene encoding human interleukin-3[J]. Gene, 1989, 84(2): 501－503.

[3] 王　燕, 朱锡华, 万　瑛, 等. 人白细胞介素-3 突变体的构建及在大肠杆菌中表达的研究[J]. 中国免疫学杂志, 1999, (1): 12－14.

[4] Kane J F, Harthey D L. Formation of recombinant Protein inclusion bodies in *Escherichia coli*[J]. Trends in Biotechology, 1988, 6(1): 95－96.

（编辑　冷怀明）

文章编号: 1000-5404(2000)01-0035-01

经验与短篇

糖尿病患者换瓣术后血清无机磷改变 1 例

Change of serum inorganic phosphorus of diabetic patient after valve replacement (1 case)

邵丽丽, 潘　瑾　　(第三军医大学附属新桥医院检验科, 重庆 400037)

磷与钙、镁等无机离子一样在体内具有广泛的生物学作用和临床意义。最近我们发现一例行心脏瓣膜置换术的糖尿病患者术后血清无机磷(IP)浓度显著下降，现报道如下。

1　临床资料

患者男，40 岁，因风心病、二尖瓣狭窄伴闭锁不全行瓣膜置换手术入院。查体：体温 36.5℃，心率 102 次/min，左心房及左心室明显增大，心尖区可闻及收缩期及舒张期杂音，心电图示房颤律，偶发室早。呼吸及血压正常，钾 4.72 mmol/L，肝肾功能、心肌酶谱、尿常规正常，血红蛋白 134 g/L，白细胞 9.8×10^9/L，中性 64%，淋巴 30%，单核 6%，血小板 139×10^9/L，凝血酶原时间 14 s(正常对照 14 s)，空腹血糖 7.7 mmol/L，餐后 2 h 血糖 14.5 mmol/L。患者于 1998 年 8 月 7 日体外循环下行二尖瓣瓣膜置换术。术中用预充液 2 715 ml，极化液含胰岛素 50 U。术后每日早晚 2 次胰岛素，分别为 10 及 6 U。

实验室检查：手术于当日 12：40 结束，13：00 查 IP 0.38 mmol/L，15：00 为 0.42 mmol/L，术后第 2 天 8：00 为 0.51 mmol/L，18：00 为 0.61 mmol/L，术后第 3 天分别为 1.02 mmol/L 及 1.14 mmol/L。术后第 2 天钾 4.15 mmol/L，钙 1.97 mmol/L，术后第 3 天钾 4.29 mmol/L，钙 2.39 mmol/L。

作者简介: 邵丽丽(1953.2)，女，河北省望都县人，副主任技师，主要从事临床生化方面的研究，发表论文 15 篇。电话: (023) 68755114-74702

收稿日期: 1999-05-03; 修回日期: 1999-10-15

2　讨论

血磷实际上指血中的 $H_2PO^-_4$ 和 HPO^{2-}_4。通常以无机磷表示。健康成人体内血磷含量为 1.0～1.6 mmol/L[1]。糖、脂类、蛋白质的代谢过程特别是糖代谢的氧化磷酸化作用均需磷酸参加，许多代谢物尤其是糖的中间代谢产物都是磷酸酯。患者术中使用的极化液中含有较大浓度的胰岛素，胰岛素对代谢的主要作用在于葡萄糖的利用中促进葡萄糖通过细胞膜，糖原合成时活化糖原合成酶，促进诱导糖原合成。脂代谢中促进脂肪酸的合成，调节脂肪和蛋白质代谢等。在这些代谢中都有能量(ATP)的参加及消耗，使细胞内磷的利用增加，血浆中磷大量向细胞内转移，造成短时内 IP 的大量消耗，导致血磷严重下降[2]。另外大量预充液对血液的稀释及预充液中不含 IP 亦可能是血磷下降非常重要的因素。提示我们应特别注意糖尿病患者手术中及术后的血磷含量，太低的报告要密切与临床联系，找出原因，协助临床及时正确诊断治疗。

关键词　血清无机磷(IP)；糖尿病
中图法分类号　R542.5；R587.1　　文献标识码: B

参考文献

[1] 庾艳春, 蔡　宇. 脂肪剂对术后禁食患者血磷变化的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1996, 8(3): 152－153.

[2] 赵春华, 朱　倩, 李铁屯, 等. 腹部外科患者 TPN 治疗中低血磷症及其防治[J]. 中国实用外科杂志, 1996, 16(7): 410－411.

（编辑　冷怀明）

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