DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.033

重组人肿瘤坏死因子的纯化及 N-端氨基酸序列测定

Purification and amino acid sequence determination of the N-ferminal the of recombinant human tumor necrosis factor and

刘 韧* 汪江淮 王 涛 田昆仑 刘 萍 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室)重庆, 630042

提 要 目的:应用现有实验条件制备高纯度的 TNF-α,为进一步的研究工作提供物质保障。方法:发酵后的细菌经破碎、盐析、透析和离子交换层析,制备高纯度的 TNFα。结果:纯化后的 TNF-α其表现分子量(Mr)为 17× 10^3u,纯度大于 95%,比活性为 3.44× 10^7 U/mg 结论:本实验采用的纯化方法是成功的,所制备的 TNFα与 Sigma公司的产品相比,各项指标均达到其公布的参数。

目前,国内有关人 TNF-α基因克隆和表达的工作已获成功[1]。由 *E. coli* 表达的重组人 TNF-α(rhTNF-α)存在于胞浆中。分离纯化 rhTNF-α的方法通常包括破碎细菌、离心、盐析、超滤、凝胶过滤、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和亲和层析等一系列复杂步骤[2]。由于纯化工作步骤多,所需设备昂贵,难度较大。

本研究利用现有实验条件,对克隆后工程菌的高效表达,以及表达后 rhTNF-α的纯化方法进行研究,旨在探索 rhTNF-α的简便有效的纯化条件,制备高纯度的 rhTNF-α,为进一步的研究工作提供物质保障。

1 材料与方法

1.1 材料

表达人 TNF-α的工程菌 DH5α/hTNF由本室提供。L929细胞株由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供。

1.2 主要试剂

重组人 TNF-α(Sigma,美国): 2× 10^7 U/mg,纯度> 95%(SDS-PAGE),临用前用生理盐水配成实验所需浓度。丙烯酰胺(> 98.5%,BDH化学公司,英国)。甲叉双丙烯酰胺(华美生物工程公司)。蛋白质分子量标准(Pharmcia公司,美国)。

1.3 细菌发酵及 TNF-α高效表达

从含氨苄 5μg/ml的 LB平板上挑取 DH5α/hTNF单菌落,接入 10 ml LB液体培养基中(含氨苄 5μg/ml), 150 r/min振荡培养,37℃, 12 h,即得活化的菌液。按 1∶100接种在 LB培养基上,30℃培养至 A_{600}= 0.3~ 0.4,然后升温至 42℃培养 3 h,离心收集菌体。

1.4 细菌破碎及离心

取出冻存于 - 20℃的湿菌体 5 g(为 1000 ml LB培养基,42℃诱导 3 h所得),加入 20 ml预冷的 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.2),均匀悬浮后在冰浴中进行超声波破碎处理。13000 r/min离心 15 min,留取上清液,其中即包括 rhTNF-α和可溶性细菌杂蛋白。- 20℃保存备用。

1.5 硫酸铵盐析

离心上清在 4℃进行 40% 饱和度 $(NH_4)_2SO_4$盐析。加入 $(NH_4)_2SO_4$后于 4℃放置 30 min,13000 r/min离心 20 min,上清液继续进行 60% 饱和度 $(NH_4)_2SO_4$盐析,4℃放置 30 min,13000 r/min离心 20 min,沉淀用菌体破碎液溶解后,对 0.1 mol/L乙酸透析(4℃)48 h - 20℃保存备用。

1.6 DEAE 8HR柱层析

柱规格 2× 30 cm(Waters公司,美国),用 20 mmol/L Tris-HCl(pH8.2)平衡,进样后 5 min以 1 mol/L NaCl梯度洗脱,收集含 rhTNF-α的活性峰。流速 1 ml/min。

1.7 SDS-PAGE

按 Sigma试剂所带说明书推荐的方法。分离胶浓度 15%,沉积胶浓度 4%。

1.8 蛋白质含量测定

按 Bradford之考马斯亮蓝法进行[3],牛血清白蛋白作为标准蛋白。

1.9 TNF-α活性测定[4,5]

TNF-α的活性按 L929靶细胞法测定。待测样品造成 50% L929细胞死亡定为 1个 TNF-α活力单位(u),因此,待测样品 TNF-α活性应为造成 50% 细胞死亡时相应稀释倍数,同时以 TNF-α纯品作为标准,按其造成的 50% L929细胞死亡时相对应的稀释倍数与实际活性对待测样品 rhTNF-α的活性进行校准。

1.10 N-端氨基酸序列测定

采用 Edman降解法,美国 ABI 473A蛋白序列仪及岛津

* 刘 韧 女,31岁,助理研究员,博士

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

C-R3A积分仪测定。

2 结果

2.1 菌体破碎及硫酸铵盐析

细菌破碎程度与回收率直接相关,采用在冰浴中超声破碎的方法,既可避免局部过热,又可使细菌破碎率 > 90%。离心后,未破碎的细菌、菌体碎片及大分子蛋白在沉淀中被去除,上清中包括 rhTNF-α 及可溶性菌体杂蛋白。通过 40% ~ 60% $(NH_4)_2SO_4$盐析,去除了一部分菌体杂蛋白,使比活性从 3.85×10^6 U/mg提高至 8.88×10^6 U/mg,纯化倍数提高 2.35倍,而回收率达到 76%。

2.2 rhTNF-α 的纯化

硫酸铵盐析后的沉淀重新溶解,经透析脱盐。样品通过 DEAE 8HR阴离子交换柱后,测定 rhTNF-α 活性,发现活性出现在第二峰,见图 1 合并相邻管后,其 rhTNF-α 比活性达到 3.44×10^7 U/mg,纯化倍数提高 9.1倍,回收率为 47.4% 见附表。经 SDS-PAGE并进行凝胶扫描发现,得到的 rhTNF-α 纯度达到 > 95%,Mr 17×10^3u,见图 2

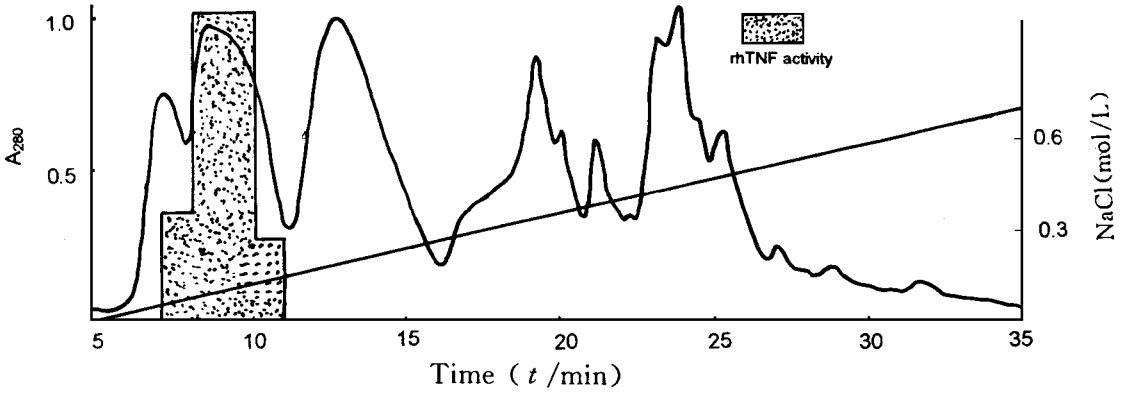


图 1 DEAE-8HR离子交换层析

附表 rhTNF-α 的不同纯化方法的比较

	体积 (ml)	蛋白浓度 (ρ_B μg ml^{-1})	活性 (U/ml)	总活性 (U)	比活性 (U/mg)	纯化倍数	回收率 (%)
菌体破碎	20.0	5058.26	1.92×10^7	3.84×10^8	3.78×10^6	1.00	100.0
离心	19.0	4983.30	1.92×10^7	3.65×10^8	3.85×10^6	1.02	95.1
硫酸铵盐析	7.6	4002.68	3.84×10^7	2.92×10^8	8.88×10^6	2.35	76.0
层析	9.5	558.77	1.92×10^7	1.82×10^8	3.44×10^7	9.10	47.4

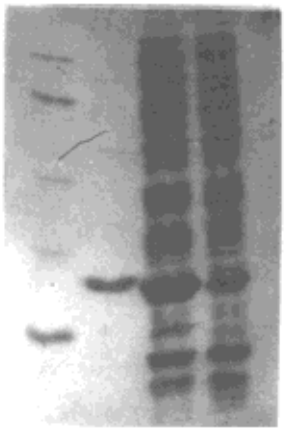


图 2 纯化后 rhTNF-α 的 SDS-PAGE

lane1: 分子量标准; lane2 纯化后的 rhTNF-α; lane3: DH5α/hTNF经 42℃培养 3 h; lane4 DH5α/hTNF经 30℃培养 3 h

2.3 N-端氨基酸序列

经纯化的 rhTNF-α 其 N-端起始的氨基酸序列为:

5 10

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala

15

His Val

3 讨论

人 TNF-α 是一个非糖基化的蛋白质,成熟肽由 157个氨基酸组成,其中只有 2个半胱氨酸残基,形成 1个链内二硫键。*E.coli* 由于本身的特点,其表达基因工程产物的形式多种多样,如细胞内不溶性表达 (包涵体)、胞内可溶性表达、细胞周质表达;极少数情况下也可分泌到细胞外,由于不同表达形式具有不同的表达水平及完全不同的杂质,因此分离纯化的策略有很大差别。蛋白质是两性分子,其带电性质依 pH的变化而

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

变化,以其等电点为界,在酸性条件下带正电荷,在碱性条件下带负电荷。等电点处于极端(pI< 5或 pI> 8)位置的基因工程产物首选离子交换色谱方法,往往一步即可去除几乎全部的杂质。

根据以上理论,我们进行了纯化条件的优化。rhTNF-α以可溶性蛋白的形式存在于胞浆中,故可通过菌体破碎、离心去除不溶性杂质,通过分步盐析去除部分可溶性杂质。由于 rhTNF-α的等电点为 pI= 5.3,本实验采用阴离子交换层析,NaCl梯度洗脱,rhTNF-α的纯度达到 95%以上,回收率也达到了 47.4%,比活性 3.44×10^7 U/mg,并且具有良好的重复性,见附表。与 Sigma公司的产品相比,各项指标均达到其公布的参数(比活性 2×10^7 U/mg,纯度> 95%,Mr 17×10^3u),说明本实验建立的方法是可行的。

本方法中使用的 DEAE-8HR柱,其填料直径为 8μm,有良好的分辨率,并且可以耐受较高的柱压,清洗方便。预实验中我们曾使用直径为 40μm的填料,发现在低分子段(约 Mr 14×10^3u)有一条带,影响了 rhTNF-α的纯度。将 DEAE-8HR柱与 P650蛋白纯化系统一起使用,分离过程时间较短(30 min左右)。

国外报道的 rhTNF-α纯化方法,皆以 HPLC作为一必行的重要步骤[2],此方法要求较高的设备条件和技术条件,且成本高,制备量有限。本实验利用现有的实验条件,将 rhTNF-α的粗制品经盐析、离心、透析、DEAE-HR阴离子交换层析,得到高纯度、高比活、高回收率的 rhTNF-α,Mr 17×10^3u,与文献报道一致[6]。进一步的 N端氨基酸序列分析表明,我们制备的 rhTNF-α其 N-端序列符合天然人 TNF-α的一级结构[7]。

关键词 肺瘤坏死因子;层析;纯化

中图法分类号 R730.3

参考文献

1 吕兆海,王子海,闵永洁等.人α-肿瘤坏死因子基因的高效表达.生物工程学报,1995;11(1):27

2 Kunitani M, Cunico R L. Reversible subunit dissociation of tumor necrosis factor during hydrophobic interaction chromatography. J Chromatography, 1988; 443(1): 205

3 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976; 72(2): 248

4 Flick D A, Gifford G E. Comparison of *in vitro* cytotoxic assays for tumor necrosis factor. J Immunol Methods, 1984; 68(1-3): 167

5 任 园,陈鸿珊,叶应妩.肿瘤坏死因子细胞毒活性测定方法的比较.中华医学检验杂志,1995;18(2):89

6 Marmenout A, Fransen L, Tovernier J *et al*. Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. Eur J Biochem, 1985; 152(4): 515

7 万晓余,吴淑华.肿瘤坏死因子结构研究进展.生物化学与生物物理进展,1993;20(5):351

(收稿: 1996-07-03;修回: 1996-12-30)

(编辑 王 红、沈锡庚)

大鼠皮层神经元膜片钳单通道记录模型

Single channel recording model in rat cortical neurons

王中峰* 薛春生** 肖家思 闫淑枝 万子兵 (第三军医大学基础部生理学教研室)重庆,630038

提 要 目的:介绍我室建立的大鼠大脑皮层神经元膜片钳单通道记录模型。方法:大鼠大脑皮层神经元急性分离和膜片钳单通道记录技术。结果:急性分离的皮层神经元经鉴定成活良好,记录的 L-、N-和 T型钙通道的单通道电活动与文献报道基本一致。结论:我室建立的膜片钳实验方法是可靠的。

细胞的电活动是生命活动的基础,而这些电活动则是通过细胞膜离子通道而实现的,因此,探讨细胞膜离子通道的活动规律,对揭示生命现象本质、探讨疾病的发病机理等具有重要的意义。随着膜片钳实验技术的建立和推广[1],使得我们能够在单个的细胞上观察单个的离子通道电活动,对离子通道的认识向前跨进

* 王中峰,男,33岁,讲师,博士

** 重庆医科大学药理学教研室 重庆,630046

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