

基因工程猪生长激素复性技术的研究^{*}

于瑞嵩 李震^{**} 张平 王英 刘惠莉 张德福

(上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海市农业遗传育种重点实验室 动物遗传工程研究室 上海 201106)

摘要 对基因工程猪生长激素(rpGH)体外复性条件进行研究,提取包涵体用6mol/L 盐酸胍溶解,空气氧化80h后转入复性缓冲液中开始重组蛋白复性,结果表明,采用透析复性法——复性缓冲液III(0.25% Na₂CO₃, 0.2% 乳糖, 0.2% 甘露醇), pH8.5, 透析5~6次,可较好恢复rpGH生物活性。 β -巯基乙醇、谷光甘肽等添加剂对rpGH的体外复性影响不显著。复性后蛋白浓缩液进行去垂体大鼠试验,大鼠增重明显,表明得到了正确折叠的较高生物活性的rpGH。

关键词 rpGH 复性 重折叠

生长激素(growth hormone; somatotropin)调节动物的生长及其体内多种代谢过程。文献报道使用猪生长激素(pGH)可显著加快猪生长速度,提高胴体瘦肉率和饲养的饲料报酬^[1]。因为pGH潜在的巨大经济价值,国内外一些科研机构都研究采用基因工程的方法实现这两种生长激素的产业化生产^[2,3]。研究大都是采用原核表达系统,在大肠杆菌中以包含体的形式得到高效表达,为了获得有活性的蛋白质,必须对包含体进行变性和复性。包含体的复性工作是获得活性蛋白质的重点和难点,影响复性的因素很多,主要与蛋白质本身氨基酸组成、分子结构及疏水特性有关,其次复性液中的离子强度、pH、蛋白浓度也对蛋白的复性效率有一定的影响^[4]。目前用于复性的方法很多,并且对于不同的蛋白质用于复性方法也不尽相同^[5,6],所以必须对复性条件及方法进行探索。本研究参考以往的研究方法,并在程序上进一步简化和改进,为rpGH的大量制备及应用探索了基础工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 盐酸胍、尿素、甘露醇、乳糖、碳酸氢钠购自中国医药(集团)上海化学试剂公司,蛋白低

分子量标准购自上海丽珠东风生物技术有限公司。透析袋购自上海华美生物工程有限公司,其余试剂均为分析纯。

1.1.2 rpGH包涵体 由本研究室制备, -20℃保存备用。

1.1.3 仪器 SDS-PAGE 使用 Bio-Rad Mini Protein II电泳仪。超滤采用 Masterflex MilliPore 及 Sartorius 截留分子量为10 000的超滤仪。电泳结果处理使用天能 GIS 凝胶图象处理系统。溶液蛋白浓度测定利用 Beckman DU640 分光光度计。

1.2 方法

(1) 包含体的变性。称取0.5g湿包含体,用适量去离子水充分悬浮,加入变性溶液中使其终体积为50mL,室温搅拌80h, 17 000g 4℃离心30min,去除不溶物,上清备用。

(2) 复性方法。透析法将上述变性rpGH用BLM溶液(0.25% NaHCO₃, 0.2% α -乳糖, 0.2% 甘露醇, pH9.0, 以上均为重量百分比)稀释2倍,使盐酸胍的浓度为2mol/L,用BLM溶液将盐酸胍复性液透析5~6次;稀释法将上述变性rpGH用复性缓冲液缓慢稀释至变性剂浓度为0.1mol/L后,对1%乳糖透析3次,复性后溶液17,000g 4℃离心30min,去除不溶物,上清备用。比较不同的pH范围、变性剂的种类及浓度及添加物等对基因工程猪生长激素复性效率的影响。

(3) 蛋白质的纯度及含量用SDS-PAGE分析,蛋白质含量测定采用BCA Protein Assay Kit。

(4) 复性rpGH的生物活性检测,去垂体大鼠

收稿日期: 2002-09-13 修回日期: 2003-03-04

^{*} 上海市科技兴农重点攻关项目(农科攻字97第5-01号)和上海市现代生物与新药产业发展基金项目(984319002)

^{**} 通讯作者, 电子信箱: Zhenli60@public3.sta.net.cn

注射实验^[7]。

2 结 果

2.1 复性方法的选择

首先比较了稀释复性和透析复性两种复性方法对 r pGH 复性效果的影响, 将两种方法复性后的蛋白复性溶液, 经离心、超滤浓缩至原来体积, 测其蛋白浓度, 结果表明: 二者复性效果基本相当, 复性率都为 40% 左右, SDS-PAGE 也得到相似的结果

(未显示)。由于稀释法复性后溶液体积过大, 需要大幅度的超滤浓缩才能达到使用的浓度, 而且也是不经济的, 以后均采用透析法复性。

2.2 pH 对 r pGH 复性的影响

我们根据不同缓冲液的有效缓冲范围, 选择合适的缓冲液配制变性液和复性液, 比较了不同 pH 条件对 r pGH 复性的影响, BCA Protein Assay Kit 测定复性液中蛋白质的浓度结果如表 1 所示。

从表 1 可以看出: 随着 pH 的升高, 复性液中蛋

表 1 pH 对复性率的影响

pH	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5
蛋白浓度(μg/ml)	136.4	158.8	177.7	168.6	226.7	230.8	238.3	241.0
复性率(%)	25.5	29.7	33.2	31.4	42.3	43.1	44.5	45.0

白质的浓度不断增大, 复性率随之升高, 复性宜采用较高的 pH; SDS-PAGE 分析也得到相同的结果(结果未显示)。但是, 复性缓冲液的 pH 过度偏离蛋白的等电点将影响蛋白的生物活性, 而且复性缓冲液的 pH 大于 9.0 以后, 复性率提高幅度较小。综合考虑各种因素, 选择复性缓冲液的 pH 为 9.0。

2.3 变性剂种类和浓度对 r pGH 复性的影响

分别选用 8mol/L 尿素和 6mol/L 盐酸胍作为变性剂, 观察包涵体的溶解情况。结果表明: 4h 后 6mol/L 盐酸胍溶液变得澄清透明, 而 8mol/L 尿素溶液仍然浑浊, 有颗粒状包涵体悬浮, 加入 50ml 8mol/L 尿素缓冲液后继续搅拌 4h, 溶液仍不澄清。17000g, 4℃离心 20min, 结果表明: 8mol/L 尿素溶液中未溶解包涵体较多, 而 6mol/L 盐酸胍缓冲液中仅有少量不溶物。SDS-PAGE 结果如图 1 所示。

由图 1 可见, 盐酸胍溶解包涵体的效果较好, 因为盐酸胍溶解包涵体离心后上清中蛋白的浓度高。对两种变性液分别透析复性后, 测定复性液蛋白浓度并计算复性率, 结果表明: 两者的复性率皆为 40% 左右, 但由于尿素溶解的目的蛋白的量较少所以复性液中目的蛋白的浓度较低。所以研究中选用盐酸胍作为变性剂。

为了得到经济有效的目的蛋白的变性条件, 比较 4mol/L、5mol/L、6mol/L、7mol/L 盐酸胍浓度对 r pGH 复性效果的影响, SDS-PAGE 结果如图 2 所示: 从图 2 可以看出: 复性沉淀中杂蛋白较多, 而上清中目的蛋白较纯; 相对而言, 6mol/L 盐酸胍变性后上清中目的蛋白条带较深, 说明其复性效果较好, 但 BCA Protein Assay Kit 测定复性液中蛋白浓度表明, 5mol/L、6mol/L 盐酸胍变性后上清中目的蛋白的蛋白浓度基本相同, 都比 4mol/L、7mol/L 盐酸胍变性后的复性效果好(未显示)。

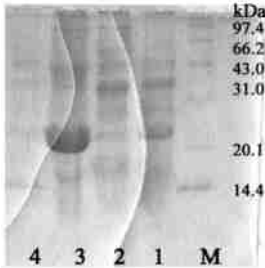


图 1 盐酸胍和脲溶解包涵体能力的比较

M 蛋白标准

- 1: 盐酸胍溶解包涵体离心后沉淀
- 2: 盐酸胍溶解包涵体离心后上清
- 3: 脲溶解包涵体离心后沉淀
- 4: 脲溶解包涵体离心后上清

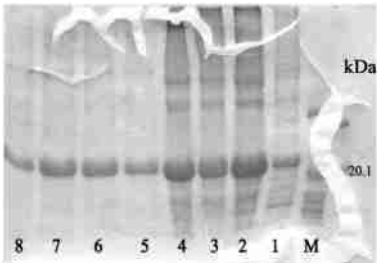


图 2 盐酸胍浓度对复性效果的影响

M 蛋白标准

- 1~4 分别为 7mol/L、6mol/L、5mol/L、4mol/L 盐酸胍溶解包涵体离心后沉淀, 5~8 分别为 7mol/L、6mol/L、5mol/L、4mol/L 盐酸胍溶解包涵体离心后上清

2.4 添加 β-巯基乙醇对 r pGH 复性的影响

仅在变性液或复性液加入 β-巯基乙醇或在变性液和复性液中同时加入 β-巯基乙醇使之达到 1μg/ml 蛋白质, 观察其对 r pGH 复性效率的影响, 结果表明: 由于复性液中蛋白质的浓度较低, SDS-PAGE 分析不能显示目的蛋白条带。BCA Protein Assay Kit 分析表明, 无论 β-巯基乙醇添加与否, 复性液中蛋白质的浓度都在 100μg/ml 左右, 复性率约为 40%。可见, β-巯基乙醇的添加对 r pGH 的复性影响不明显, 在逐渐加入复性液的过程中, 蛋白聚集出现时间反而较不添加时提前, 其原因可能是在纯化和溶解过程中, r pGH 可通过空气氧化而复性, β-巯基乙醇的添加反而不利于 r pGH 二硫键的形成。

2.5 复性缓冲液的种类对 r pGH 复性效果

比较复性缓冲液 I (60mmol/L 乙醇胺, 10% 蔗糖, 0.1 mmol/L GSH, 0.01mmol/L GSSH)、复性缓冲液 II (复性缓冲液 I + 0.05% 吐温)、复性缓冲液 III (0.25% NaCO₃, 0.2% 乳糖, 0.2% 甘露醇)、复性缓冲液 IV (复性缓冲液 III+ 0.05% 吐温)、复性缓冲液 V (0.25% NaCO₃, 25% 蔗糖, 0.05% 吐温)、复性缓冲液 VI (0.25%NaCO₃, 10% 蔗糖, 0.05% 吐温) 对稀释复性法复性效果的影响, SDS-PAGE 分析结果如图 3、4 所示。

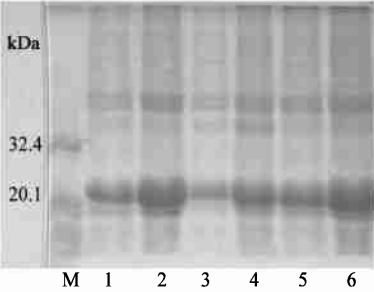


图 3 复性缓冲液的种类对 r pGH 复性的影响
M 蛋白标准
1~ 6 分别为复性缓冲液 II、I、III、IV、VI、V 复性 r pGH 后离心沉淀

从图 3、4 可以看出, 添加 0.05% 吐温可明显提高复性缓冲液 I、V 复性 r pGH 后目的蛋白的得率, 对复性缓冲液 II 影响不显著, 而对 6 种复性缓冲液而言, 谷光甘肽对 r pGH 的复性影响不显著。而且复性缓冲液 II、III、IV、VI 彼此之间差异不明显; BCA Protein Assay Kit 分析结果也得到相同的结论, 复性缓冲液复性缓冲液 II、III、IV、VI 复性

r pGH 复性率都约为 45%。综合考虑复性后目的蛋白的活性和生产成本, 选择缓冲液复性缓冲液 II 作为 r pGH 的复性缓冲液。

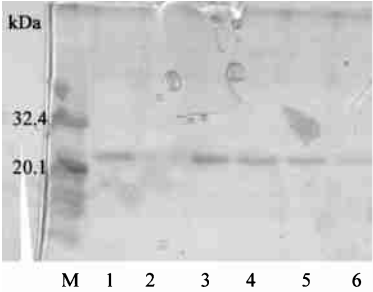


图 4 复性缓冲液的种类对 r pGH 复性的影响
M 蛋白标准
1~ 6 分别为复性缓冲液 II、I、III、IV、VI、V 复性 r pGH 后离心上清

2.6 复性 r pGH 生物活性的检测^[8]

为检测得到的复性产物的生物学活性, 取复性后浓缩产物进行去垂体大鼠的注射实验。实验证明复性后得到具有较高生物活性的重组 r pGH。表 2 显示去垂体大鼠注射实验的结果。

表 2 去垂体大鼠注射实验结果 ¹⁾				
Items Sample	Number of animals	Mean of increased BW(g)	Standard error	Significance of difference (with control)
1	9	11.0	1.49	0.000
2	9	8.89	0.98	0.000
control	9	-0.17	0.66	0.005

1) 实验组每只大鼠每日注射 r pGH 30~ 50μg, 对照组注射 BLM 溶液, 连续注射 7 天。样品 1 中尚残留部分复性沉淀, 样品 2 的复性沉淀已被完全离心去除。样品 1、2 去垂体大鼠的注射实验结果经统计分析差异不显著 ($P> 0.05$)。样品 1、2, 去垂体大鼠的注射实验效果与对照组比较差异极显著 ($P\leq 0.01$)

3 讨论

目前, 人们还无法明确解释蛋白质如何从伸展态转变为具有生理活性的天然结构。然而, 一般认为分子间疏水作用是导致蛋白质聚集的重要因素。本文的研究表明, 几种复性添加剂 β-巯基乙醇、谷光甘肽对 r pGH 的复性影响不显著, 其原因可能是 r pGH 复性比较简单, 其活性蛋白中仅有两个二硫键, 空气氧化系统足以使其形成正确的二硫键。这也许是稀释复性和透析复性具有相同效果的原因。包涵体的溶解需要打断包涵体蛋白质分子内和分子间的各种化学键, 使多肽链伸展, 一般来讲, 盐酸胍优于脲, 因为盐酸胍是较脲强的变性剂, 而且脲中常含有的异氰酸胍或酯会不可逆的修饰蛋白质

的氨基或巯基。但对 r pGH 的复性而言, 二者具有几乎相同的效果, 从产业化的角度分析, 豚具有价格低廉的优势, 应用前景更广阔。基于时间的限制, 本研究没有更加深入地进行, 今后仍需在提高复性收率方面进行研究, 特别是加强复性色谱的研究和加快工业化生产应用的进程。

参考文献

- [1] Hagen D R, Mills E W, Bryan K A, et al. Effect of Exogenous porcine growth hormone (PGH) on growth, carcass traits, reproductive characteristics, and meat sensory attributes of young boars. J Anim Sci, 1991, 69: 2472~ 2479
- [2] 余序平, 齐顺章. 温度诱导表达猪生长激素. 生物工程学报, 1991, 7(4): 307~ 311
- [3] Puri N K. Refolding of recombinant porcine growth hormone in a reducing environment limits *in vitro* aggregate formation. FEBS Lett, 1991, 292: 187~ 190
- [4] Fischer B E. Renaturation of recombinant proteins produced as inclusion bodies. Biotech Adv, 1994, 12: 89~ 101
- [5] 冯小黎. 重组包涵体蛋白质的折叠复性. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(4): 482~ 485
- [6] Fischer B, Sumner L, Goodenough P. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. Biotechnology and bioengineering, 1993, 41: 3~ 13
- [7] 李震, 王英, 于瑞嵩, 等. 改良法咽旁手术制备去垂体大鼠. 上海实验动物科学, 2000, 20(4): 243
- [8] 李震, 于瑞嵩, 张平, 等. 基因工程猪生长激素的分离提纯及变复性技术的研究. 生物工程学报, 2001, 17(6): 703~ 705

Renaturation of Recombinant-DNA-Derived Porcine Somatotropin

Yu Ruison¹ Li Zhen¹ Zhang Ping Wang Ying Liu Huili Zhang Defu

(Animal Husbandry and Veterinary Research Institute Shanghai Academy of Agricultural Sciences

Division of Animal Genetic Engineering Shanghai Municipal Key Laboratory of Agrar Genetics and
Breeding Shanghai 201106)

Abstract The conditions for the *in vitro* renaturation of r pGH have been studied. The inclusion bodies extracted from host cells were dissolved using 6mol/L guanidine/HCl and air oxidation was carried out in the presence of guanidine/HCl. The guanidine/HCl protein mixture was then diluted by renaturation solution. Guanidine/HCl were removed by dialysis against renaturation solution III(0. 25% Na₂CO₃, 0. 2% lactose, 0. 2% mannitol, pH8. 5) for 5 to 6 times and correctly refolded, oxidized r pGH were obtained. Injection experiment of hypophysectomized rats proved r pGH with high native bioactivity was obtained.

Key words r pGH Renaturation Refolding