

山羊乳腺生物反应器表达人促红细胞生成素的分离纯化*

田阳 苗静 陈光玉 陈辉 成国祥**

(上海转基因研究中心上海杰隆生物工程股份有限公司 上海 201203)

摘要 以离子交换、疏水作用、HPLC和凝胶过滤层析等方法对山羊乳腺生物反应器表达的人促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)进行了分离纯化,初步探讨了其分离工艺,结果得到了纯度达到96%以上的纯品,所纯化的EPO分子质量为32kDa,糖基化程度根据理论分子质量测算为40%。Western blot证明所得纯化产品具有天然EPO免疫原性,N端氨基酸序列测定与文献报道一致,ELISA检测免疫活性为240 000 IU/mg,表明通过4步纯化步骤可以得到高纯度的产品,为今后工艺放大提供了有力的实验依据。

关键词 乳腺 反应器 EPO 纯化

红细胞生成素(erythropoietin, EPO)主要是由成人肾脏和胎儿肝脏分泌的一种重要的糖蛋白激素,在正常的生理条件下它能促进红细胞系列的增殖、分化、成熟,当人的肾功能发生严重损害时,EPO的产生量减少,出现严重的贫血,因此EPO对大部分的肾性贫血均有良好的疗效^[1,2]。在基因重组技术产品出现之前,EPO主要从贫血患者的尿液及绵羊血浆中提取,纯化得率低,而且性质不稳定,无法进行大规模生产^[3,4]。1985年EPO基因克隆和表达成功,使rhEPO大规模生产成为可能。目前市场上使用的EPO主要是通过转染CHO细胞并培养得到。但由于动物细胞培养所需培养基及设备相对来说价格比较昂贵,生产成本较高,因此我们采用转基因山羊乳腺生物反应器表达EPO。现已获得了高表达的个体。

尿液及绵羊血浆中EPO含量很少(1~4 IU/ml)^[4],需浓缩、离子交换、亲和层析、反相层析等多个纯化步骤^[4-6];基因工程细胞培养产品的活性大大提高(3 000~10 000 IU/ml),因此纯化步骤也大为减少,通过离子交换、反相层析、凝胶过滤就可得到纯度为98%以上的产品^[7-9]。

本研究采用离子交换、疏水作用层析、反相层

析、凝胶过滤等方法对转基因山羊乳腺生物反应器表达产物中的EPO进行分离纯化,得到高纯度、高比活的产品,可用于该目的蛋白鉴定及性质研究,为今后生产工艺放大提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

分离设备采用AKTA explore 100,层析介质及预装柱为Amersham Pharmacia Biotech公司生产。

做Western blot用标准品EPO购自沈阳三生公司(商品名为“益比奥”)。

1.2 分离纯化

1.2.1 含rhEPO的转基因山羊羊奶预处理 羊奶10 000 g离心60 min脱脂后置于截留分子质量14kDa的透析袋中,以10 mmol/L磷酸缓冲液pH 7.0充分透析。

1.2.2 离子交换层析 透析后羊奶上样于以10 mmol/L磷酸缓冲液pH 7.0平衡的CM-Sepharose层析柱中,流速8 ml/min,并以平衡缓冲液充分清洗,直至洗脱液的吸光度达到基线。分别以含0.25 mol/L和1 mol/L NaCl的平衡缓冲液洗脱,收集洗脱峰。以Dot-blot检测具有EPO的组分,收集该组分,以截留分子质量为10 kDa超滤膜浓缩10倍,并以10 mmol/L磷酸缓冲液pH 7.0替换。

1.2.3 疏水作用层析介质的分离 将超滤后样品

收稿日期:2003-11-14 修回日期:2004-06-04

* 国家“863”计划资助项目(2002AA206651)

** 通讯作者,电子信箱:chengx@orgenon.com

加入 NaCl, 使得终浓度达到 0.5 mol/L, 上样于以 10 mmol/L 磷酸缓冲液 pH 7.0 并含 0.5 mol/L NaCl 平衡过的 HiPrep 16/10 Phenyl (high sub) 柱中。以流速 4 ml/min 平衡缓冲液充分清洗未结合蛋白后, 以 10 mmol/L 磷酸缓冲液 pH 7.0 洗脱, 再以 dH₂O 和含 4 mol/L 盐酸胍和 20% 甘油的 10 mmol/L NaOH 溶液进行梯度洗脱, 收集各洗脱组分, 以 Dot-blot 检测含 EPO 的组分, 并以 5% 醋酸溶液充分透析。

1.2.4 制备型 HPLC 分离 配制 Buffer A 为 0.1% 三氟乙酸 (trifluoroacetic, TFA) 的水溶液和 Buffer B 为含 0.1% TFA, 90% 乙腈的溶液流速 5 ml/min。梯度洗脱 Buffer B 从 30% 开始, 维持 30 min, 5 min 升至 33%, 150 min 升至 63%, 5 min 升至 70%, 2 min 升至 100%。收集洗脱峰, 将 Dot-blot 检测到的含 EPO 组分除去乙腈, 以 dH₂O 充分透析, 超滤浓缩, 并以 10 mmol/L 磷酸缓冲液 pH 7.0 并含 0.15 mol/L NaCl 进行替换。

1.2.5 凝胶过滤层析介质的分离 将样品超滤浓缩至 5 ml 左右, 上样于流动相为 10 mmol/L 磷酸缓冲液 pH 7.0 并含 0.15 mol/L NaCl 的 Superdex 75 分离柱中, 流速 3 ml/min 收集流出峰, Dot blot 检测含 EPO 组分。

1.3 SDS-PAGE

分离胶浓度 12% 的不连续 SDS-PAGE 电泳检测纯度。操作步骤参照文献 [10]。

1.4 Western blot 检测

抗体为 Santa Cruze 公司产品, 一抗为鼠抗人的单克隆抗体, 二抗为抗鼠单克隆抗体。操作步骤参照文献 [11]。

1.5 N 端序列分析

N 端前 15 位氨基酸残基序列在北京大学生命科学学院 PROCISE 蛋白质自动测序仪上测定。

1.6 蛋白浓度的测定

采用 Lowry 法估量蛋白质浓度。试剂盒购自 BIO-RAD 公司。

1.7 活性测定

ELISA 法测定免疫活性。采用美国 R&D 公司试剂盒。

2 结果与讨论

2.1 离子交换层析

羊奶中蛋白含量很高, 平均达到 38 mg/ml 以

上, 而表达 EPO 产物在总蛋白中所占比例很小, 因此分离初始步骤应达到富集目标蛋白, 去除大部分杂蛋白的目的。绝大多数乳中蛋白纯化时首先以酸沉淀方法去除乳中含量最多的酪蛋白^[12], 但经实验证明, 体系中表达的 EPO 可与阳离子交换介质相互作用, 而乳中其它蛋白大部分为酸性蛋白, 因此我们选用弱阳离子交换介质 CM-Sepharose FF 对脱脂羊奶直接进行纯化。图 1 为脱脂羊奶离子交换分离得到的层析图谱, 洗脱峰以 Dot-blot 进行检测, 结果 EPO 活性组分均集中于峰 I 中, 大部分杂蛋白集中在平衡缓冲液清洗和以含 1 mol/L NaCl 缓冲液洗脱的组分中, 活性组分中杂蛋白含量大大减少 (如图 3 中泳道 2), 羊乳中含量较多的酪蛋白、乳清蛋白、乳铁蛋白等基本被去除。

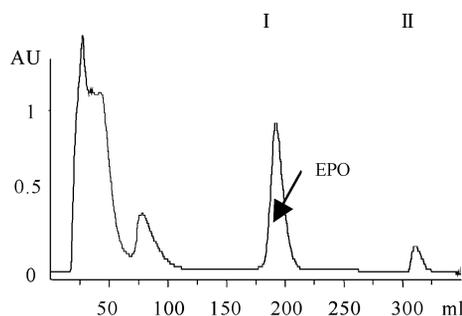


图 1 脱脂羊奶离子交换层析图谱

Fig. 1 Ion exchange chromatography of skim goat milk on a 5.5* 23 cm column of CM Sepharose FF
The peak I and II was eluted with equilibration buffer containing 0.25mol/L and 1mol/L NaCl respectively

2.2 疏水作用层析

据文献报道^[13], EPO 具有较强的疏水性, 因此在目标蛋白得到阳离子交换介质的初步富集之后, 以疏水介质对其进行进一步的分离。实验验证, 缓冲液中加入 0.5 mol/L NaCl 时, EPO 就可以达到足够的疏水吸附, 使绝大多数杂蛋白流穿或被低盐浓度缓冲液洗脱, 只有 EPO 以较强的洗脱条件, 如含有盐酸胍及甘油的溶液才可被洗脱, 如图 2 所示。这表明经乳腺生物反应器表达的 EPO 同天然蛋白具有相同的性质, 具有较强的疏水性。同时我们对其进行了 EPO 体外活性的检测, 证明盐酸胍对 EPO 活性没有影响。从图 3 电泳图 (泳道 3) 可以看到, 经盐酸胍洗脱后, 在 50 kDa 和 18 kDa 左右各存在一杂蛋白, 在 31 kDa 上下有两条分子质量不同的 EPO 条带, 这应该是糖基化作用的结果。经凝胶成

像系统积分含量大约为 60%, 表明疏水作用层析分离可以使 EPO 得到较好的分离。

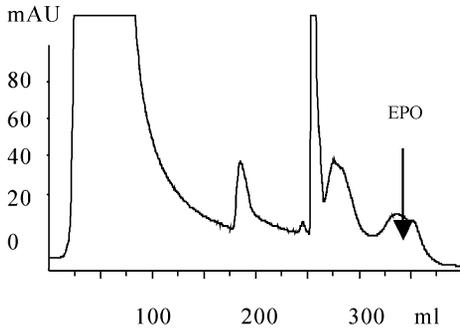


图 2 疏水层析图谱

Fig. 2 Hydrophobic interaction chromatography of the peak 1 on the HiPrep 16/10 Phenyl (high sub)

The buffer was changed to a linear gradient with dH₂O 100% 10 mmol/L NaOH containing 4 mol/L guanidine hydrochloride and 20% glycerol at the arrow

2.3 凝胶过滤层析

将疏水作用层析分离后样品先以 HPLC 分离, 再以凝胶过滤层析介质 Superdex 75 分离, 由于 EPO 分子质量为 30 kDa 左右, 因此得到了很好的纯化结果, 从图 3 可以看到, 以凝胶过滤分离后的目标蛋白分子质量在 32 kDa 左右, 纯度可以达到 96%。

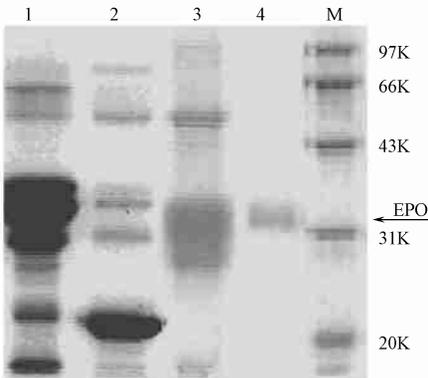


图 13 SDS PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS PAGE of purification of EPO expressed in goat mammary gland bioactor

1: milk protein; 2: CM Sepharose EPO fraction; 3: Phenyl Sepharose EPO fraction; 4: Superdex 75 EPO fraction; M: Marker

2.4 Western blot 检测

Western blot 检测结果显示分离所得纯品具有天然的免疫原性(见图 4), 但分子质量比标准品小一些, 约为 32 kDa, 这可能是由于糖基化程度不同

造成的。EPO 是高度糖基化蛋白, 以不同系统表达的重组 EPO 其糖基化程度不一^[14]。标准品的宿主细胞为 CHO 细胞, 糖链约占分子总量的 50%^[15], 而乳腺生物反应器表达产物糖基化程度根据理论分子质量测算为 40%。ELISA 法检测免疫比活性可以达到 240 000 IU/mg。

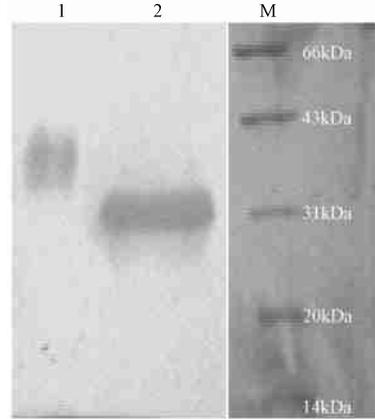


图 4 纯化 rhEPO Western blot 鉴定图

Fig. 4 Western blot detection of purified rhEPO

1: standard sample; 2: purified sample. Marker was stained with amido black

2.5 N 端测序

测得的 N 端前 15 个氨基酸序列为 Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Ser-Arg-Val-Leu-Gln-Arg-Tyr, 与天然 EPO 序列完全相同。

3 结 论

综上所述, 虽然羊奶中含有大量的蛋白质, 但通过离子交换、疏水层析、HPLC 和凝胶过滤 4 步分离, 可以得到纯度为 96% 以上的 rhEPO 纯品。氨基酸序列测定证明其表达正确, Western blot 检测证明纯化蛋白具有天然的免疫原性。本方法简化了乳中蛋白纯化常用的酸沉淀方法, 减少了目标蛋白的损失。

转基因乳腺生物反应器生产药用蛋白还属于新兴的技术, 目前我们只是在实验室水平上对乳腺生物反应器表达 EPO 分离纯化方法进行了初步探索, 为分离纯化工艺放大及优化提供可靠的实验依据, 但其中表达产物性质, 如糖基化、等电点等问题将在今后的研究中做进一步的探讨, 以优化分离纯化结果。

参考文献

- [1] Krantz TB. Erythropoietin. *Blood*, 1991, 77:419~ 434
- [2] Koury MJ, Bondurant MC. The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem*, 1992, 210: 649~ 663
- [3] Espada J, Gutnisky A. Purification de eritropoyetina urinaria humana. *Acta Physiol Lat Am*, 1970, 20: 122~ 129
- [4] Spivak JL, Small D, Hollenberg MD. Erythropoietin: Isolation by affinity chromatography with Lectin aganose derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(10): 4633~ 4635
- [5] Sasaki R, Yamagawa S, Chia H. Isolation of Human Erythropoietin with Monoclonal Antibodies. *Methods in Enzymology*, 1987, 147: 328~ 340
- [6] Inoue N, Eada M, Takeuchi N. An improved method for the purification of human erythropoietin with high *in vivo* activity from the urine of anemic patients. *Bio Pharm Bull*, 1994, 17 (2): 180~ 184
- [7] Gokana A, Winchemme JJ, Betr Ghanem A, et al. Chromatographic separation of recombinant human erythropoietin isoforms. *Journal of chromatography A*, 1997, 791: 109~ 118
- [8] 汪东海, 赵志宏, 陈红霞, 等. 重组人促红细胞生成素中试纯化工艺研究. *生物工程进展*. 2000, 20(1): 62~ 65
- [9] 李琳, 邓继先, 卢建申, 等. 用三步法纯化重组人促红细胞生成素. *军事医学科学院院刊*, 1997, 21(1): 43~ 46
- [10] Sambrook J, Russell DW, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 324~ 526
- [11] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4350~ 4354
- [12] Hahn R, Schulz PM, Schupp C, et al. Bovine whey fractionation based on cation exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998, 795: 277~ 287
- [13] Sylvia LH. A new preparative method for isolation of human erythropoietin with hydrophobic interaction chromatography. *Blood*, 1980, 56(4): 620~ 624
- [14] Tsuda E, Goto M, Murakami A, et al. Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. *Biochemistry*, 1988, 27, 5646~ 5654
- [15] 邹钟诚, 孙开来, 娄丹, 等. 反相高效液相色谱法分离重组促红细胞生成素. *色谱*, 1998, 16(3): 263~ 264

Purification of Recombinant Human Erythropoietin from Transgenic Goat

TIAN Yang MIAO Jing CHEN Guang-yu CHEN Hui CHENG Guo-xiang
(Shanghai Transgenic Research Center, Shanghai 201203, China)

Abstract EPO expressed in goat mammary gland bioreactor was purified with IEC, HIC, HPLC and SEC. Finally, the purity of the EPO was reached 96%, which had the same immunogenicity and N-amino acid sequence as the natural product. It also has high specific activity using ELISA detection, so the purification process is very effective and it also provides valuable information for scaling up of industrial production.

Key words Mammary gland Bioreactor EPO Purification

全国医药生物工程 2004 年学术研讨会

中国生物工程学会医药生物技术专业委员会与国家“863”计划医学生物技术专家组定于 2004 年 10 月 14~ 17 日在安徽省黄山市联合举办“全国医药生物工程 2004 年学术研讨会”, 对全国医药生物工程研究和开发的新进展、新成果和发展前景进行交流和研讨, 欢迎从事医学生物工程研究和开发的科技工作者踊跃参加。

本次会议由军事医学科学院生物工程研究所承办, 将在以下领域进行征文: 1、基因诊断; 2、基因疫苗; 3、基因药物; 4、基因治疗; 5、基因组学与蛋白质组学; 6、抗体工程; 7、蛋白质工程; 8、转基因与克隆技术; 9、干细胞与组织工程; 10、生物技术产业中试工艺与新成果。会议详情请联系: 北京市海淀区太平路 27 号军事医学科学院生物工程研究所(100850), 联系人: 张艳红、冯怡, 电话: 010-66931809 或 66931821, 电子邮箱: biotech2002@sohu.com