

· 论著 ·

重组人骨靶向干扰素 γ -1b 在大肠杆菌中的表达*

1. 山东省医药生物技术研究中心, 山东第一医科大学 (山东省医学科学院) (山东 济南 250062)

2. 国家卫生健康委生物技术药物重点实验室 (山东 济南 250062)

3. 山东省罕见病重点实验室 (山东 济南 250062)

王志宇^{1,2,3} 曹广祥^{1,2,3} 付加芳^{1,2,3} 宗工理^{1,2,3} 李俊玲^{1,2,3} 王世立^{1,2,3}

【摘要】目的 建立人骨靶向干扰素 γ -1b 的高效原核表达体系。**方法** 从Drug Bank数据库下载人干扰素 γ -1b 氨基酸序列, 在羧基端加上10个天冬氨酸标签作为骨靶向分子。采用大肠杆菌偏爱密码子, DNA Star软件分析获得骨靶向性干扰素 γ -1b 的基因序列。人工合成基因序列并克隆入pET3c质粒表达载体。将上述pET3c-rhIFN γ -1b-D10重组表达载体转入大肠杆菌BL21, 筛选高效表达菌株。分离包涵体, 8mol/L尿素溶解, 利用镍柱亲和层析纯化重组蛋白。Western blot检测目的蛋白的特异性表达。**结果** 测序结果显示所克隆的骨靶向rhIFN γ -1b基因序列正确, 筛选出高效表达菌株。经SDS-PAGE显示在相对分子质量19KD处出现特异的目的蛋白表达带, 表达量约占全菌蛋白的30%。表达产物以包涵体形式存在, 8mol/L尿素变性后经镍柱亲和层析纯化, 纯度大于90%, 浓度为0.8mg/mL。Western检测显示在19KD处出现特异性目的条带。**结论** 成功在大肠杆菌中表达了人骨靶向干扰素 γ -1b, 为研究其生物学活性及用于骨质疏松症的治疗奠定基础。

【关键词】 干扰素 γ -1b; 骨靶向系统; 原核表达; 纯化; 骨质疏松症

【中图分类号】 R34

【文献标识码】 A

【基金项目】 山东省医药卫生科技发展计划项目2017WS074; 山东省医学科学院院级科技计划面上项目2017-36

DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2019.04.018

Expression of Recombinant Human Bone Targeting Interferon Gamma-1b in E.coli*

WANG Zhi-yu, CAO Guang-xiang, FU Jia-fang, et al., Shandong Medicinal and Biotechnological Center, Jinan 250062, Shandong Province, China

[Abstract] Objective To construct a prokaryotic system for high expression of human bone-targeting interferon gamma-1b (rhIFN γ -1b-D10). **Methods** Download amino acid sequence of the human interferon gamma-1b from the Drug Bank database. Tag the C-terminal of IFN γ -1b with an acidic oligopeptide (a ten residue stretch of Asp) as bone-targeting molecules. Obtain gene sequence of bone-targeting interferon gamma-1b with DNA Star analysis software. Synthetic bone-targeting interferon gamma-1b gene sequence and clone it into the pET3c plasmid. Transform the recombinant plasmid into E.coli and screen the bacterial strain in which rhIFN γ -1b-D10 is highly expressed. Separate the expressed protein existing in a form of inclusion body, dissolve with 8 mol/L urea, re-naturalize and purify by Nickel column affinity chromatography and detect for specificity by Western blot. **Results** The cloned rhIFN γ -1b-D10 gene showed a correct sequence, and an E.coli strain for high expression of rhIFN γ -1b-D10 was screened. SDS-PAGE showed a specific protein band with a relative molecular weight of 19KD. The expressed product existed in a form of insoluble inclusion body and contained about 30% of total somatic protein. After purification, the purity of protein reached 90% and the concentration of the targeted protein 0.8mg/mL. **Conclusion** Bone-targeting rhIFN γ -1b-D10 protein was successfully expressed in E.coli. It laid a foundation of study on the biological activity of bone-targeting rhIFN γ -1b-D10 as well as treatment for Osteopetrosis.

[Key words] Interferon Gamma-1b; Bone-targeting System; Prokaryotic Expression; Purification; Osteopetrosis

骨质疏松症 (Osteopetrosis, OP) 是一类以骨密度增高, 破骨细胞吸收功能障碍为主要特点的罕见遗传性骨病^[1]。2000年美国FDA批准重组人干扰素 γ -1b 上市用于治疗骨质疏松症 (我国目前尚无用于骨质疏松症治疗的药物)。临床资料显示, 大剂量应用rhIFN γ -1b 治疗骨质疏松症, 临床疗效较差并且副作用明显, 产

生流感样症状、骨髓抑制等, 使患者不能耐受^[2]。究其原因, 与rhIFN γ -1b在体内呈现相对平均的组织分布, 未能在骨组织内形成有效的药物浓度有关。研究证实, 天冬氨酸寡肽能够将药物选择性地输送至骨组织, 并且在骨组织内长期保留^[3]。其机制在于天冬氨酸等酸性氨基酸寡肽能够与羟基磷灰石紧密结合, 而

作者简介: 王志宇, 女, 生物化学与分子生物学专业, 助理研究员, 主要研究方向: 罕见病治疗药物及机理研究

通讯作者: 王志宇

后者是骨组织的主要成分。本研究将含有10个天冬氨酸的寡肽连接于干扰素 γ -1b的羧基端,制备骨靶向干扰素 γ -1b融合蛋白(即rhIFN γ -1b-D10),使得干扰素 γ -1b更多分布于骨组织,从而更好的发挥促进破骨细胞骨吸收的作用。

1 材料与方法

1.1 大肠杆菌DH5 α 、BL21、质粒pET3c由本室保存。限制性内切酶、T4DNA连接酶购自Promega;人IFN γ 单克隆抗体购自Santa Cruz;其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 rhIFN γ -1b-D10重组表达载体的构建 从Drug Bank数据库下载人干扰素 γ -1b的氨基酸序列;在其氨基酸序列羧基端加上10个天冬氨酸标签作为骨靶向分子;采用大肠杆菌偏爱密码子,DNA Star软件分析获得骨靶向干扰素 γ -1b的基因序列;委托上海生工生物公司合成上述基因序列,采用pET3c表达载体,将pET3c载体和目的基因分别采用相同限制性内切酶酶切,酶切产物16℃下连接过夜;将连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,氨苄青霉素抗性筛选挑取阳性克隆;提取重组质粒pET3c-rhIFN γ -1b-D10,对上述重组质粒载体进行测序鉴定。

1.3 骨靶向重组人干扰素 γ -1b(rhIFN γ -1b-D10)在大肠杆菌中的表达 将上述鉴定正确的pET3c-rhIFN γ -1b-D10重组表达载体转化大肠杆菌BL-21感受态细胞,氨苄抗性筛选阳性克隆,接种于3ml新鲜的氨苄抗性LB培养液中,37℃振荡过夜。按1:100比例接种于3ml新鲜的氨苄抗性LB培养液中,37℃,200rpm振摇3h,加入IPTG至终浓度为1mmol/L。37℃,200rpm振摇4h。12 000rpm离心1min收集菌体沉淀。经12% SDS-PAGE及Western blot对表达产物进行鉴定。

1.4 目的蛋白的Western blot检测 首先行目的蛋白的SDS-PAGE电泳,半干法转膜,250mA转膜90min。5%脱脂奶粉封闭,37℃缓慢振荡2h。一抗为人IFN γ 小鼠单克隆抗体,购自Santa Cruz,1:2 000稀释,37℃缓慢振荡60min。二抗为过氧化酶标记羊抗鼠抗体,购自上海生工,1:8000稀释,37℃缓慢振荡60min,TMB显色。

1.5 目的蛋白表达形式分析 离心收集菌体,按1:20比例重悬于PBS缓冲液中,冰水浴下超声破菌。1g菌体400W功率下超声时间约为5min(超声2S,暂停6S为一个循环)。12 000rpm离心15min,分别收集上

清和沉淀,行SDS-PAGE电泳观察目的蛋白的存在情况。

1.6 目的蛋白的镍柱亲和层析纯化 取5mL Ni-NTA,用5倍柱床体积的结合缓冲液清洗平衡柱子,流速5mL/min。

上柱,流速为2mL/min,收集穿透液。5倍柱床体积的结合缓冲液清洗柱子,流速5mL/min。清洗缓冲液洗杂,流速5mL/min,收集洗脱液。洗脱缓冲液洗脱,流速2mL/min,收集洗脱液。将收集到的组分进行SDS-PAGE检测。将纯度最好的3组分透析到:50mM Na₂CO₃,300mM NaCl,0.1% SKL,pH9.0,4℃透析过夜,透析结束后PEG2 0000浓缩,非干扰型蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

2 结果

2.1 骨靶向重组人干扰素 γ -1b(rhIFN γ -1b-D10)的表达与鉴定 转化pET3c-rhIFN γ -1b-D10重组表达载体的大肠杆菌经IPTG诱导后,12% SDS-PAGE电泳显示,在相对分子量约19KD处可见诱导后表达条带,见图1。Western blot分析显示该条带在相应位置处可与人IFN γ 单克隆抗体发生特异性结合反应,表明目的蛋白已成功表达,见图2。

2.2 rhIFN γ -1b-D10蛋白表达形式的确定 为了确定 rhIFN γ -1b-D10融合蛋白的表达形式,我们将工程菌用超声裂解后,离心分别收集上清和菌体沉淀,行SDS-PAGE电泳,发现该蛋白主要存在于菌体沉淀中,上清中几乎检测不到,说明rhIFN γ -1b-D10蛋白表达形式以包涵体为主,见图3。

2.3 包涵体分离及纯化 超声破菌后包涵体纯度进一步提高,经镍柱亲和层析后,对纯化产物进行12% SDS-PAGE电泳和灰度扫描分析显示目的蛋白的纯度为90%,见图4。采用非干扰型蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,建立标准曲线,相关系数0.992,测定纯化后目的蛋白浓度为0.8mg/mL。

3 讨论

骨质疏松症是一种罕见病,但“罕见病并不罕见”,由于我国人口基数大,许多罕见病在我国也有相当数量的病人存在^[4-5]。骨质疏松症的平均发病率为5/100 000,据此估算,我国骨质疏松症患者约有65万^[6]。重组人干扰素 γ -1b(商品名:Actimmune)是目前唯一用于骨质疏松症治疗的药物。干扰素 γ 能够促进

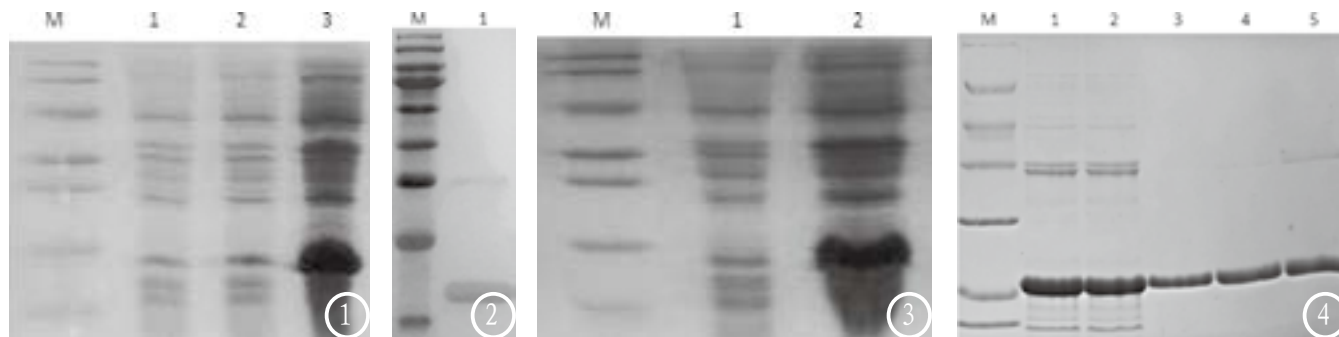


图1 rhIFN γ -1b-D10诱导表达的SDS-PAGE电泳。M: 蛋白分子量标准(116.0KD/66.2KD/45.0KD/35.0KD/25.0KD/18.4KD/14.4KD); 1: 空质粒转化菌诱导后; 2: pET3c-rhIFN γ -1b-D10转化菌诱导前; 3: pET3c-rhIFN γ -1b-D10转化菌诱导后。**图2** rhIFN γ -1b-D10的Western blot检测。M: 蛋白分子量标准(180.0KD/140.0KD/100.0KD/75.0KD/60.0KD/45.0KD/35.0KD/25.0KD/15.0KD); 1: pET3c-rhIFN γ -1b-D10转化菌诱导后。**图3** rhIFN γ -1b-D10表达形式分析的SDS-PAGE电泳。M: 蛋白分子量标准(116.0KD/66.2KD/45.0KD/35.0KD/25.0KD/18.4KD/14.4KD); 1: pET3c-rhIFN γ -1b-D10转化菌超声破菌上清; 2: pET3c-rhIFN γ -1b-D10转化菌超声破菌沉淀。**图4** rhIFN γ -1b-D10镍柱亲和层析纯化的SDS-PAGE电泳。M: 蛋白分子量标准(116.0KD/66.2KD/45.0KD/35.0KD/25.0KD/18.4KD/14.4KD); 1: rhIFN γ -1b-D1待纯化样品; 2: 流出液; 3: 20mM 咪唑洗脱组分; 4: 50mM 咪唑洗脱组分; 5: 500mM 咪唑洗脱组分。

破骨细胞分化从而改善骨硬化症患者破骨细胞骨吸收^[7]。然而临床资料表明,干扰素 γ 治疗骨硬化症需要大剂量用药,毒副作用明显,大大限制其临床应用^[2]。因此,有必要发展能够将干扰素 γ 靶向输送至骨组织的药物以改善临床治疗效果。研究证实偶联有氨基酸或谷氨酸等酸性氨基酸寡肽的雌激素、左氧氟沙星、碱性磷酸酶、 β -葡糖苷酸酶等药物能够选择性靶向骨组织,使药物在骨组织内富集^[8-10]。采用酸性氨基酸寡肽的骨靶向系统是否能够应用于重组人干扰素 γ -1b目前尚不清楚。本文将10个天冬氨酸残基连接于人干扰素 γ -1b羧基端,在大肠杆菌内融合表达,为人干扰素 γ -1b的骨靶向研究创造条件。另外,由于本研究研发的新型重组人干扰素 γ -1b具有骨靶向性,可使药物在骨组织内富集,或可用于骨转移癌的治疗(尚需实验证实)。

本实验分别以大肠杆菌BL21和Rosetta为受体菌,结果以BL21为受体菌的目的蛋白表达量最高。可能与BL21缺少ompT外膜蛋白酶基因与lon蛋白酶基因有关,这种低蛋白酶活性致使细菌对外源蛋白的降解能力大大减弱。因此,BL21更适用于重组人骨靶向rhIFN γ -1b-D10在细菌内的高效表达。pET载体是在大肠杆菌中表达外源基因的功能最强大的系统,受噬菌体T7强启动子控制,目的蛋白表达量可以占到总菌体蛋白的30%以上。本实验中重组人骨靶向rhIFN γ -1b-D10主要以包涵体形式表达,表达量占菌体蛋白的30%。通常情况下,宿主菌的种类、生长条件和基因重组蛋白的理化性质决定了包涵体是否形成以及表达量的多少。我们采用DNA Star软件分析显示,组成干扰素的140个氨基酸中,丙氨酸(Ala)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)等疏水性氨基酸占44%。大量存在特别是位于关键位点的疏水性氨基酸是形成包涵体

的原因之一。另外,本文采用梯度复性的方法对纯化后产物进行复性,复性液中加入0.1%十二烷基肌氨酸钠(简称SKL),可有效促进蛋白质的正确折叠。上述骨靶向rhIFN γ -1b-D10原核表达体系的构建成功,为进一步研究其生物学活性及用于骨硬化症治疗研究奠定基础。

参考文献

- [1] Stark Z,Savarirayan R.Osteopetrosis[J].Orphanet J Rare Dis, 2009, 20(4):5.
- [2] Kubo T,Tanaka H,Ono H,et al.Malignant osteopetrosis treated with high doses of 1 α -hydroxyvitamin D3 and interferon gamma[J].J Pediatr,1993,123(2):264-268.
- [3] Kasugai S,Fujisawa R,Waki Y,et al.Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)6 conjugation[J].J Bone Miner Res,2000,15(5):936-943.
- [4] 王成林.请关注罕见病研究[J].罕少疾病杂志,2009,16(2):9-10.
- [5] 韩金祥,崔亚洲,周小艳.罕见疾病研究现状及展望[J].罕少疾病杂志,2011,18(1):1-6.
- [6] Balemans W, Van Wesenbeeck L, Van Hul W. A clinical and molecular overview of the human osteopetroses[J]. Calcif Tissue Int, 2005, 77: 263-274.
- [7] Madyastha PR, Yang S, Ries WL, et al. IFN- γ enhances osteoclast generation in cultures of peripheral blood from osteopetrotic patients and normalizes superoxide production[J]. Interferon Cytokine Res, 2000, 20(7): 645-652.
- [8] Yokogawa K, Miya K, Sekido T, et al. Selective delivery of estradiol to bone by aspartic acid oligopeptide and its effects on ovariectomized mice[J]. Endocrinology, 2001, 142(3): 1228-1233.
- [9] Nishioka T, Tomatsu S, Gutierrez MA, et al. Enhancement of drug delivery to bone: characterization of human tissue-nonspecific alkaline phosphatase tagged with an acidic oligopeptide[J]. Mol Genet Metab, 2006, 88(3): 244-255.
- [10] Takahashi T. Improved therapeutic efficacy in bone and joint disorders by targeted drug delivery to bone[J]. Yakugaku Zasshi, 2016, 136(11): 1501-1508.

【收稿日期】2018-04-02