



УДК 577.112.088.3

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ-ЦИТОКИНОВ. II*. ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ, ОЧИСТКИ И РЕНАТУРАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО γ -ИНТЕРФЕРОНА ЧЕЛОВЕКА

© 1997 г. А. Н. Вульфсон[#], Р. В. Тихонов, С. Е. Печенов,
В. Е. Ключниченко, А. И. Мирошников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 12.11.96 г. Принята к печати 06.05.97 г.

Разработан эффективный метод выделения рекомбинантного γ -интерферона человека из биомассы трансформированных клеток *E. coli*, его очистки и ренатурации. Метод включает в себя экстракцию белка из тел включения, его предочистку и три стадии ионообменной хроматографии с промежуточной ренатурацией. С выходом 30% получен высокоактивный рекомбинантный белок с чистотой до 99% (по данным SDS-электрофореза и ВЭЖХ) и биологической активностью 2×10^7 МЕ/мг.

Ключевые слова: рекомбинантный γ -интерферон человека, тела включения, экстракция, хроматография, ренатурация.

Гамма-интерферон (γ -IFN) – гликопротеин, продуцируемый Т-лимфоцитами и НК-клетками человека. Его образование может быть индуцировано обработкой смешанных культур лимфоцитов антигенами или такими митогенами, как энтеротоксин А стафилококков, фитогемагглютинин или конканавалин А [2].

Интерфероны обладают широким спектром биологического действия: проявляют антивирусную и противоопухолевую активность, ингибируют рост клеток, влияют на их дифференцировку, а также оказывают иммунорегулирующее действие, например активируют макрофаги и индуцируют антигены гистосовместимости II класса [3].

В растворе γ -IFN существует в форме нековалентно связанного димера, что подтверждается поведением белка при гель-фильтрации [4]. Показано, что концевые фрагменты полипептидной цепи белка не участвуют в формировании третичной структуры и не определяют биологическую активность γ -IFN [5, 6], но при отщеплении более 8 N- и 23 C-концевых аминокислотных остатков γ -IFN теряет свою активность.

Цель настоящей работы – поиск эффективного метода выделения, очистки и ренатурации γ -IFN. В качестве его источника использовали полученный в ИБХ РАН штамм *E. coli* МН-1, содержащий рекомбинантную плазмиду pIFN- γ -tr2 с искус-

ственным геном, кодирующим γ -IFN человека, полипептидная цепь которого состоит из 143 а. о. [7].

Биосинтез γ -IFN в клетках *E. coli* МН-1 приводит к накоплению негликозилированного рекомбинантного белка в телах включения. На первой стадии очистки тела включения из суспензии разрушенных ультразвуком клеток отмывали от водорастворимых компонентов буферными растворами (см. “Экспер. часть”) при ультразвуковом ресуспендировании с последующим центрифугированием.

Условия экстракции γ -IFN из тел включения определяют не только схему дальнейшего выделения белка, но и возможность его ренатурации и получения биологически активного препарата. Экстракция может сопровождаться образованием агрегатов γ -IFN, в которых необратимо нарушена структура белка. Растворить такие агрегаты можно только щелочью или SDS при нагревании, после чего белок необратимо теряет способность к ренатурации. Нами найдены условия экстракции, при которых достигается достаточная растворимость белка и способность агрегатов к диссоциации при дальнейшем выделении. Основные условия, обеспечивающие удовлетворительный результат экстракции, – концентрация денатурирующего агента (мочевина) не менее 8 М, концентрация буферного компонента (фосфата натрия) – 30–50 мМ и pH 9.0–9.6. При pH выше изоэлектрической точки γ -IFN (рI 5.6) суммарный заряд белка отрицательный, что снижает устойчивость агрегата белка с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами.

*Сообщение I см. [1].

Сокращения: офВЭЖХ и эВЭЖХ – обращенно-фазовая и эксклюзионная ВЭЖХ, γ -IFN – γ -интерферон, PMSF – фенилметансульфонилфторид.

[#] Автор для переписки.

Таблица 1. Выделение и очистка γ -IFN. (Условия см. "Экспер. часть")

Стадия	Суммарный белок, мг	Содержание γ -IFN, по данным SDS-электрофореза		Выход, % от исходного γ -IFN
		%	мг	
Дезинтеграция	350	45	158	100
Отмывка тел включения	163	85	139	88
Экстракция	160	85	136	86
Очистка на QAE- γ -геле	157	86	135	86
Хроматография на CM-целлюлозе и ренатурация	54	93	50	32
Хроматография ренатурированного γ -IFN на CM-целлюлозе	48	99	48	30

Таблица 2. Ренатурация γ -IFN

Условия ренатурации	$C_{\gamma\text{-IFN}}$, мг/мл	Удельная активность, % от максимальной
Разбавление экстракта тел включения до концентрации мочевины 1 М	0.02*	0.03
Разбавление элюата γ -IFN после хроматографии на QAE- γ -геле (рис. 1) до концентрации мочевины 1 М	0.12	2
Разбавление 0.1 М фосфатом натрия (pH 6.9) фракции γ -IFN после хроматографии на CM-целлюлозе до концентрации мочевины 0.9 М	0.12	9
То же, 0.1 М ацетатом аммония (pH 6.9) до концентрации мочевины 0.9 М	0.12	14
То же, водой до концентрации мочевины 0.8 М и ацетата аммония 0.02 М (pH 6.9) (см. "Экспер. часть")	0.12	100
Диализ фракции γ -IFN после хроматографии на CM-целлюлозе против 0.05 М аммоний-ацетатного буферного раствора (pH 6.9)	0.05	10
То же, против 0.05 М натрий-фосфатного буферного раствора (pH 6.9)	0.05	2

* При разбавлении произошло выпадение белка в осадок.

Вместе с тем нами замечено, что при проведении экстракции при pH > 10 образуются в значительных количествах укороченные аналоги γ -IFN.

Экстракцию γ -IFN из отмывых тел включения проводили буферным раствором, содержащим 8 М

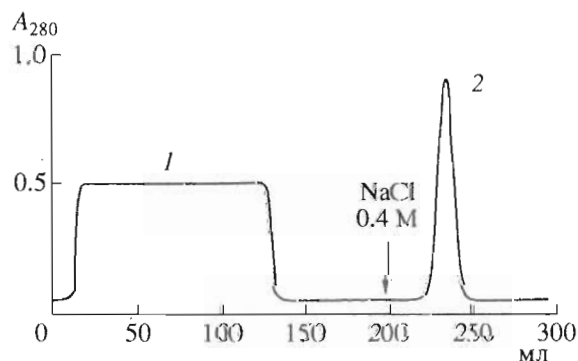


Рис. 1. Хроматограмма очистки γ -IFN на QAE- γ -геле: 1 - несорбируемые компоненты, содержащие γ -IFN, 2 - нуклеиновые кислоты и примесные белки. Условия см. "Экспер. часть".

мочевину, 40 mM фосфат натрия, 0.001% PMSF (pH 9.4), в течение 30 мин. В полученном экстракте содержание γ -IFN составило более 80% от суммарного белка (по данным SDS-электрофореза), степень извлечения - 86% (табл. 1).

Непосредственно после экстракции γ -IFN не способен к ренатурации, вероятно, из-за присутствия нуклеиновых кислот (табл. 2).

Эффективная очистка от нуклеиновых кислот достигается анионообменной хроматографией на QAE- γ -геле. Однако предварительно необходимо освободить экстракт от гидрофобных примесей небелковой природы, загрязняющих ионообменную колонку и снижающих ее емкость. С этой целью использовали предколонку с носителем H- γ -гелем, инертным по отношению к гидрофильным соединениям, но удерживающим гидрофобные примеси.

Очищенный таким образом экстракт хроматографировали при 4°C на колонке с QAE- γ -гелем при pH 7.2 (ниже значения изоэлектрической точки γ -IFN) (рис. 1). При этом γ -IFN не удерживается на колонке, а нуклеиновые кислоты, кислые и

нейтральные белки сорбируются. Очистку препарата от нуклеиновых кислот контролировали по соотношению $A_{254}/A_{280} < 0.5$, а от сопутствующих белков – с помощью SDS-электрофореза. Чистота γ -IFN в элюате (по данным SDS-электрофореза) составила 85%.

Нами было установлено, что время проведения стадий экстракции и предочистки не должно превышать необходимое (см. "Экспер. часть"). В случаях большей длительности начальных стадий выделения γ -IFN либо при проведении хроматографии при комнатной температуре образуются в заметных количествах укороченные с N- и C-концов молекулы γ -IFN, которые удаляются при катионообменной хроматографии на CM-целлюлозе (рис. 2) или COOH- γ -геле. γ -IFN на этих носителях сорбируется, а сопутствующие белки и укороченные фрагменты γ -IFN смываются при низкой ионной силе (рис. 2). γ -IFN элюируется с колонки в линейном градиенте концентрации ацетата аммония. Очищенный таким образом γ -IFN, по данным SDS-электрофореза и ЭВЭЖХ (рис. 2в), имеет чистоту более 92%.

После такой очистки γ -IFN способен самопроизвольно ренатурировать. Нами был проведен ряд опытов по поиску оптимальных условий ренатурации, результаты которых отражены в табл. 2. Самая высокая биологическая активность γ -IFN была получена при разбавлении объединенной фракции γ -IFN до концентрации белка 0.1–0.15 мг/мл, мочевины 0.7–0.9 М, ацетата аммония 0.015–0.025 М при 0–3°C в течение 16 ч. При гель-фильтрации на сефадексе G-50 или G-75 Superfine ренатурированный γ -IFN элюируется в объеме, соответствующем белку с молекулярной массой 34 кДа, т.е. димеру γ -IFN. В результате ренатурации белок приобретает характерную конформацию [8, 9], отличную от конформации денатурированного белка, что подтверждается различием в КД-спектрах образцов (рис. 3).

Окончательную очистку ренатурированного γ -IFN проводили рехроматографией на CM-целлюлозе в градиенте концентрации ацетата аммония (рис. 4), причем для элюции ренатурированного белка не требуется мочевина. Чистота белка после этой стадии очистки, по данным SDS-электрофореза, ЭВЭЖХ и офВЭЖХ (рис. 5), достигает 97–99%. Характерно, что ренатурированный γ -IFN обладает большим сродством к обращенно-фазовым сорбентам и элюируется позже, чем денатурированный γ -IFN.

Полученный препарат разбавляли до концентрации белка около 0.4 мг/мл, стерильно фильтровали и хранили в том же буферном растворе при 4°C. Через 2 мес при указанных условиях хранения изменений биологической активности γ -IFN не наблюдалось.

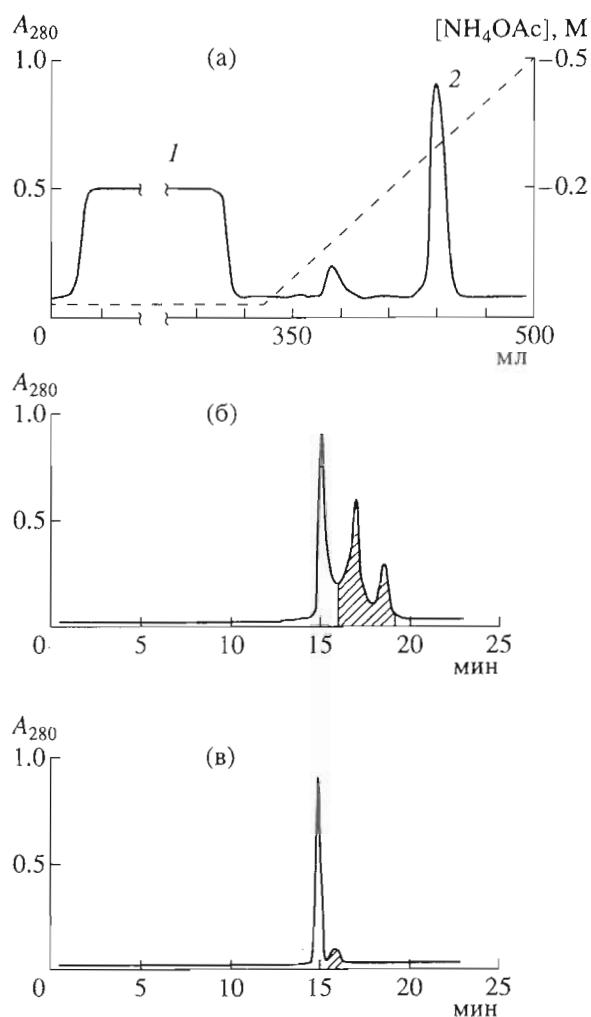


Рис. 2. Хроматограмма разделения γ -IFN (см. рис. 1) на CM-целлюлозе (а) и анализ фракций 1 (б) и 2 (в) методом ЭВЭЖХ. Фракция 1 (б) – несорбируемые примеси и укороченные фрагменты γ -IFN (заштрихованы), фракция 2 (в) – очищенный γ -IFN. Условия хроматографии см. "Экспер. часть".

Результаты очистки γ -IFN приведены в табл. 1. Предлагаемый метод выделения позволяет получать γ -IFN с выходом 30%. По данным SDS-электрофореза, молекулярная масса γ -IFN составляет 17 кДа (вычисленное значение – 16775 Да), молекулярная масса димера – 34 кДа (по данным гель-хроматографии на сефадексе G-50). Результаты 12 шагов N-концевого секвенирования согласуются с известной аминокислотной последовательностью γ -IFN [10]: Gln-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn-Leu-Lys-. Биологическая активность, определенная методом титрования по подавлению действия вируса везикулярного стоматита на человеческие диплоидные фибробласты, составила $(0.5-2) \times 10^7$ МЕ/мг.

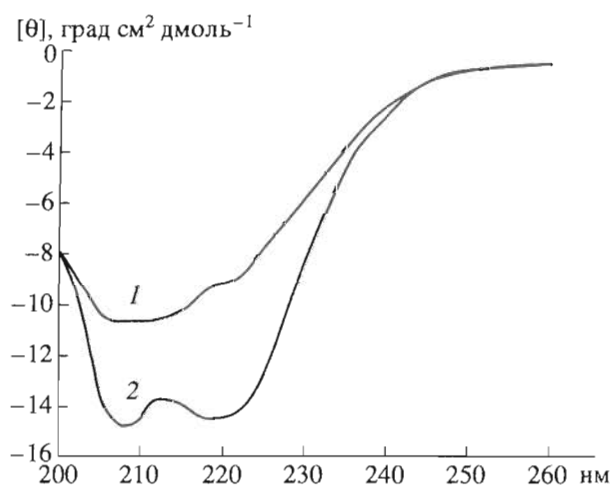


Рис. 3. КД-спектр γ -IFN: 1 – до ренатурации (белок фракции 2 рис. 2, 0.5 мг/мл в растворе, содержащем 0.3 М ацетат аммония, 1 М мочевины, pH 7.0), 2 – после ренатурации (0.65 мг/мл в 0.3 М ацетате аммония, pH 7.0).

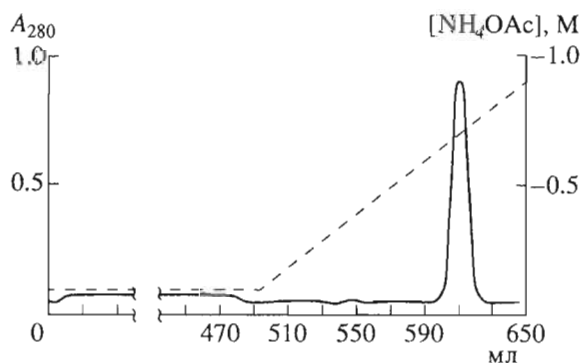


Рис. 4. Хроматограмма очистки ренатурированного γ -IFN на CM-целлюлозе. Условия см. "Экспер. часть".

Таким образом, разработанный нами метод выделения и очистки рекомбинантного γ -IFN из биомассы трансформированных клеток *E. coli* позволяет получать в препаративных количествах высокоочищенный, биологически активный

препарат в течение короткого времени с использованием трех хроматографических стадий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы: аммиак водный (ч. д. а.), ацетат аммония (ос. ч.), мочевины (ос. ч.), гидроксид натрия (ч. д. а.), фосфат натрия двузамещенный (ч. д. а.), хлорид натрия (ч. д. а.), соляная кислота (ч. д. а.), уксусная кислота (ч. д. а.), фосфорная кислота (ч. д. а.), PMSF (Sigma, США), тритон X-100 (Serva, Швеция); набор белковых стандартов для проведения гель-электрофореза и гель-фильтрации (Pharmacia, Швеция), вода, очищенная на установке Milli-Q (Millipore, США), хроматографические сорбенты: Н- γ -гель, QAE- γ -гель, COOH- γ -гель (ГНИИ ОЧБ, г. Санкт-Петербург; совместные разработки с ИБХ РАН), CM-целлюлоза и сефадекс G-50 Superfine (Pharmacia, Швеция). Биомасса штамма *E. coli* МН-1 выращена в группе ферментации КОУ ИБХ.

Для офВЭЖХ использовали колонку (4 × 250 мм) Армсфер-Си-100-С8 PR ("Армхром", Ереван, совместная разработка с ИБХ РАН). Хроматографию проводили на приборе Du Pont 8800 с детектором Du Pont 852001-902 и интегратором Waters 740 (США). Элюцию осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила (25 → 40% за 30 мин) в 0.1% трифторуксусной кислоте. Скорость элюции 0.8 мл/мин.

Для эксклюзионной ВЭЖХ использовали колонку (7.5 × 600 мм) TSK G 3000 SW (ТСОСН, Япония). Хроматографию проводили с помощью насосов Waters 510 с инжектором Waters U6K, спектрофотометром Waters 490, интегратором Waters 740. Элюент – 0.1 М Na-фосфат, 0.1% SDS (pH 7.0). Скорость элюции 1 мл/мин.

Электрофорез выполняли по методу Лэммли [11] в пластинах (6.0 × 8.5 × 0.08 см) 12% ПААГ в присутствии 0.1% SDS с нагрузкой 10 мкг белка на дорожку. Содержание γ -IFN в различных препаратах определяли сканированием гелей, окрашенных

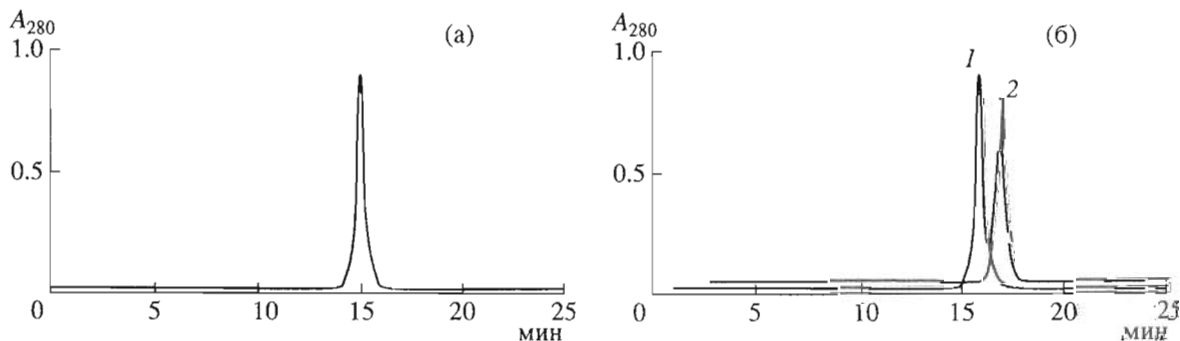


Рис. 5. Хроматографические характеристики γ -IFN: аналитическая эВЭЖХ образца после рехроматографии на CM-целлюлозе (а) и аналитическая офВЭЖХ (б) образцов γ -IFN до ренатурации (1) и после ренатурации и рехроматографии на CM-целлюлозе (2).

кумасси R250, на денситометре Ultrosan XL (Pharmacia, Швеция).

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности выполнен в группе аналитической химии белка ИБХ РАН на автоматическом секвенаторе 940A/470A (Applied Biosystems, США), спектр КД получен в лаборатории спектрального анализа ИБХ РАН на приборе 600С (Jasko, Япония).

Обработка биомассы. Осажденные центрифугированием из 160 мл культуральной жидкости и промытые буферным раствором А (50 мМ фосфат натрия (рН 7.5), 2 мМ EDTA, 0.001% PMSF) клетки биомассы *E. coli* (около 1.7 г) суспендировали в 20 мл того же буферного раствора, охлаждали во льду и дезинтегрировали с помощью ультразвукового дезинтегратора Sonifier 250 (Branson, США) при амплитуде в 60% шкалы прибора 10 раз по 1 мин, не допуская нагрева суспензии выше 10°C. Содержание общего белка в дезинтеграте определяли по методу Брэдфорд [12].

Отмывка тел включения. Дезинтеграт центрифугировали 10 мин при 4500 об/мин. Осадок ресуспендировали с помощью ультразвукового дезинтегратора при 60% мощности в течение 20 с в соответствующем буферном растворе и вновь центрифугировали в тех же условиях. Тела включения отмывали буферным раствором А (2 × 20 мл), затем буферным раствором А с 1% Тритоном X-100 (3 × 20 мл), буферным раствором, содержащим 3 М мочевины, 50 мМ фосфат натрия (рН 7.5), 0.001% PMSF (4 × 20 мл), буферным раствором, содержащим 50 мМ фосфат натрия (рН 9.4), 0.001% PMSF (2 × 20 мл). Осадок замораживали и хранили при -20°C.

Экстракция γ -IFN. Осадок тел включения (примерно 0.4 г) суспендировали в 100–130 мл буферного раствора, содержащего 8 М мочевины, 40 мМ фосфат натрия (рН 9.4), 0.001% PMSF, до концентрации белка 1.2 мг/мл. Экстракцию вели при перемешивании в течение 25–30 мин при 18°C. Дебрис из экстракта удаляли центрифугированием в течение 15 мин при 4500 об/мин. Процесс экстракции контролировали, отбирая аликваты по 0.2 мл и определяя концентрацию белка в супернатанте.

Хроматография экстракта γ -IFN. Через колонку (2.5 × 5 см) с Н- γ -гелем, уравновешенную буферным раствором, содержащим 6 М мочевины, 40 мМ фосфат натрия (рН 9.4), 0.001% PMSF, пропускали экстракт γ -IFN со скоростью 4 мл/мин. Затем колонку промывали тем же буферным раствором (контроль при λ 280 нм) и определяли содержание общего белка в элюате. Добавлением 0.05 М фосфорной кислоты доводили рН элюата до 7.2 и сразу пропускали его через колонку (1.5 × 8 см) с QAE- γ -гелем, уравновешенную буферным раствором (6 М мочевины, 40 мМ фос-

фат натрия (рН 7.2), 0.001% PMSF) и охлажденную до 4°C. Колонку промывали тем же буферным раствором, собирая не сорбируемый в этих условиях γ -IFN. В собранном элюате определяли содержание общего белка и контролировали отсутствие нуклеиновых кислот по соотношению $A_{254}/A_{280} < 0.5$.

Хроматография γ -IFN на СМ-целлюлозе и его ренатурация. Через колонку (1.5 × 7 см) с СМ-целлюлозой, предварительно уравновешенную буферным раствором, содержащим 6 М мочевины, 50 мМ ацетат аммония (рН 7.2), и охлажденную до 4°C, пропускали разбавленный в 2 раза 6 М мочевиной элюат после хроматографии на QAE- γ -геле. Затем колонку промывали тем же буферным раствором (контроль при λ 280 нм) и элюировали γ -IFN в линейном градиенте концентрации ацетата аммония (0.05 → 0.5 М) в 6 М мочевины (рН 7.2) общим объемом 160 мл со скоростью 2 мл/мин. В собранных фракциях определяли содержание общего белка и анализировали его чистоту SDS-электрофорезом. Объединяли фракции, содержащие γ -IFN с чистотой не менее 90% и с концентрацией белка не менее 0.2 мг/мл. Объединенную фракцию разбавляли 6 М мочевиной до концентрации белка 0.9 мг/мл, охлаждали в ледяной бане и для ренатурации белка разбавляли водой на холоду до концентрации белка 0.1–0.15 мг/мл. Выдерживали при 0–3°C в течение 16 ч.

Хроматография ренатурированного γ -IFN на СМ-целлюлозе. Через колонку (1.0 × 6 см) с СМ-целлюлозой, предварительно уравновешенную буферным раствором, содержащим 0.1 М ацетат аммония (рН 7.2), при 4°C пропускали раствор ренатурированного γ -IFN. Колонку промывали тем же буферным раствором (контроль при λ 280 нм). Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации ацетата аммония (0.1 → 0.9 М, рН 7.2) общим объемом 160 мл со скоростью 1.7 мл/мин. Фракции, содержащие γ -IFN чистотой не менее 98%, по данным SDS-электрофореза, объединяли и разбавляли до концентрации белка около 0.4 мг/мл. Полученный раствор γ -IFN фильтровали в стерильных условиях через фильтр FP 030/3 (Schleicher und Schuell, Германия) с диаметром пор 0.2 мкм и хранили при 4–5°C.

Авторы выражают благодарность Т.И. Костроминой за наработку биомассы *E. coli*, Я.В. Сягайло, И.П. Юнда и С.Н. Колбаеву за участие в экспериментах, С.А. Якимову и А.Б. Романчикову за проведение спектров КД, И.А. Куделиной за получение спектров КД, И.В. Назимову за определение N-концевой аминокислотной последовательности γ -IFN, а также Д.Л. Беляеву (лаборатория интерферонов ИЭМ им. Гамалеи) за определение биологической активности γ -IFN.

Работа проведена в рамках Государственной научно-технической программы России "Новейшие методы биотехнологии" по направлению "Технология получения продуктов генной, клеточной инженерии и синтетических пептидных препаратов".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тихонов Р.В., Якимов С.А., Коробко В.Г., Вульфсон А.Н. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 163–167.
2. Menge U., Kula M.R. // Enzyme Microb. Technol. 1984. V. 6. P. 101–112.
3. Langer J.A., Pestka S. // Immunol. Today. 1988. V. 9. P. 393–400.
4. Hsu Y.R., Arakawa T. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 7959–7963.
5. Hogrefe H.H., McPhie P., Bekisz J.B., Enterline J.C., Dyer D., Webb D.S.A., Gerrard T.L., Zoon K.C. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 12179–12186.
6. Sakaguchi M., Honda S., Ozawa M., Nishimura O. // FEBS Lett. 1988. V. 230. P. 201–204.
7. Овчинников Ю.А., Свердлов Е.Д., Царев С.А., Арсенян С.Г., Монастырская Г.С., Крыкбаев Р.А., Ростопшинов В.М., Честухин А.В., Мелков А.М., Виноградова Т.В., Чернов И.П., Кузнецов В.П., Новохватский А.С., Ершов Ф.И., Аспетов Р.Д. Рекombинантная плазмидная ДНК, кодирующая синтез человеческого иммунного интерферона: А. с. 1433019 СССР // Б. И. 1990. № 34. С. 276.
8. Arakawa T., Hsu Y.-R., Yphantis D.A. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 5428–5432.
9. Waschutz G., Li V., Schafer T., Schomburg D., Villmann C., Zakaria H., Otto B. // Protein Eng. 1996. V. 9. P. 905–912.
10. Gray P.W., Leung D.M., Pennica D., Yelverton E., Najarian R., Simonsen C.C., Derynck R., Sherwood P.J., Wallse D.M., Berger S.L., Levinson A.P., Goeddel D.V. // Nature. 1982. V. 295. P. 503–508.
11. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–684.
12. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

Methods of Preparation of Recombinant Cytokine Proteins. II. An Efficient Method for Isolation, Purification, and Renaturation of Human Recombinant γ -Interferon

A. N. Wulfson, R. V. Tikhonov, S. E. Pechenov, V. E. Klyushnichenko, and A. I. Miroshnikov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Abstract—An efficient method for the isolation, purification, and renaturation of human recombinant γ -interferon from biomass of transformed *E. coli* cells was developed. It involves the extraction of the protein from the inclusion bodies, preliminary purification of the protein, and three stages of ion-exchange chromatography with an intermediate renaturation between the second and the third stages. A highly active (2×10^7 U/mg) recombinant protein of up to 99% purity (according to SDS-PAGE and HPLC) was obtained with a 30% overall yield.

Key words: human recombinant γ -interferon, inclusion bodies, solubilization (extraction), chromatography, renaturation.