

# 抑瘤素-M(OSM)在 GST 融合表达系统中的 表达、纯化和活性测定

曹 勇 张兆山\* 文立民 李淑琴

(军事医学科学院生物工程研究所 100071 北京)

**摘 要** 抑瘤素-M 是一种具有多种生物活性的细胞因子,具有重要的研究价值和潜在的应用前景。基于 GST 融合表达载体,构建了一个 OSM 的高效表达系统,诱导表达后融合蛋白占全菌蛋白的 50% 以上,在低温诱导的条件下,可溶性蛋白中融合蛋白的含量可达 15%。在对包涵体形式的融合蛋白变复性的基础上,通过亲和层析一步纯化达到 90% 左右的纯度。对融合蛋白进行了活性测定,结果提示了 N 端的头两个氨基酸对 OSM 的生物活性是重要的。

**关键词** 抑瘤素-M, 高效表达, 活性测定

**分类号** R394.8 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0333-38

抑瘤素-M(Oncostatin M, OSM)是一种 28kD 的细胞因子,它最初是由 PMA 刺激的 U937 细胞培养上清中分离得到<sup>[1]</sup>。OSM 的受体分布广泛,生物活性多样,其可抑制多种肿瘤细胞系的生长,可诱导 IL-6 的表达和应急期蛋白的产生,同时它又是 AIDS-KS 细胞的重要丝裂原和生长因子<sup>[2~4]</sup>。另外,OSM 在机体免疫应答,细胞因子功能协调和信号传导中也起着重要的作用。所以该因子有着重大的研究价值和潜在的应用前景。在国外的相关的报道中 OSM 通过中国仓鼠卵巢细胞(CHO)和非洲绿猴肾细胞(COS)进行了重组表达<sup>[5~7]</sup>,但因其基于真核系统,所以操作比较烦琐,而基于大肠杆菌的表达水平又较低<sup>[8]</sup>,同时国内尚未见同类报道。本实验的目的就是探索建立一种能够高效的表达 OSM 的原核系统,并在此基础上进行纯化的探索,为下一步的研究打下良好的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料:**质粒 pGEX-2T 由崔立斌博士惠赠。质粒 pUC19、菌株 *E. coli* BL-21、DH5 $\alpha$ 、JM101、JM103、JM109、C600 为本室保存。引物由本室合成。含有 OSM 基因的重组质粒 pHZ01 系本研究室构建<sup>[9]</sup>。实验中所使用的限制性内切酶、T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶均购自华美生物技术公司和 New England Biolabs 公司。GST 纯化试剂盒购自 Pharmacia 公司。A375 细胞、GIBCO BRL 1640 培养基购自中国科学院上海细胞研究所细胞库。

**1.1.2 培养基与溶液:**RM 液体培养基为 1 $\times$ M9 盐,酪蛋白水解物 2%,甘油 1%,MgCl<sub>2</sub> 1mmol/L,补加 100 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素。YTA 培养基:蛋白胨 16g/L,酵母提取物 10g/L,

\* 通讯联系作者

收稿日期:1997-08-11,修回日期:1997-12-15

NaCl 5g/L, 固体含 1.5% 琼脂。10×M9 盐:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30g/L, NaCl 5g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10g/L。细胞培养基: RPMI1640 培养基含 10% 小牛血清。细胞维持液: RPMI1640 培养基含 5% 小牛血清。

## 1.2 方法

**1.2.1 PCR 扩增与载体构建:** PCR 系统: 100 $\mu\text{L}$  体系中 10 $\mu\text{L}$  缓冲液, 100ng 模板, 3 单位的 Taq 酶, 引物各 150ng, dNTP 0.2mmol/L。

PCR 条件: 94℃ 变性 5min; 94℃ 1min, 45℃ 1min, 72℃ 1min; 30 个循环。

回收的 PCR 产物和载体 pGEX2T 都由 *Bam*HI、*Eco*RI 双酶切, 再用 T4DNA 连接酶连接, 操作详见《分子克隆》<sup>[10]</sup>

**1.2.2 低温诱导条件:** 37℃ LB 过夜的培养物以 2% 接种到 YTA 培养基中。30℃、200r/min 培养 5h, 使菌密度达到  $A_{600} = 1.0$ , 加入 IPTG 诱导, 终浓度为 0.1mmol/L。继续 30℃ 培养 2h。5000r/min 离心 10min 收集菌体。将菌体重新悬浮于 1/10 体积的 PBS 中, 加入 DTT 使终浓度达到 5mmol/L。超声破碎后, 10000r/min 离心, 20min 收集上清, 准备过柱纯化。

**1.2.3 高效表达诱导条件:** 经 LB 37℃ 过夜活化的培养物以 1% 接种到 RM 培养基中。37℃、200r/min 培养 4h, 使菌密度达到  $A_{600} = 0.4 \sim 0.6$ , 加入 IPTG, 终浓度 0.5mmol/L, 37℃ 培养 4h。5000r/min 离心, 10min 收集菌体。以备包涵体复性研究。

**1.2.4 5L 罐的培养诱导条件:** 使用 B. Brum 公司生产的 B-5L 罐, 接种过夜培养物 2%, 保持 30% 的溶氧, 37℃ 培养 3h, 以 0.5mol/L 的 IPTG 诱导 4h, 离心收集菌体, 为包涵体复性研究作准备。

**1.2.5 融合蛋白的纯化:** 将收集的菌体悬浮于 1/10 体积的 PBS 中, 加入 1% 的 Triton-100, 进行超声破碎。将破碎的细胞 10000r/min 离心, 20min, 收集包涵体。用 2mol/L 的尿素(溶于 50mmol/L 的 Tris-Cl, pH8.0)洗涤 2~3 次, 离心回收包涵体。用 8mol/L 的尿素溶解包涵体, 可达 1mg/mL 的蛋白浓度。将溶解的包涵体浓度调整到 0.1mg/mL 以下, 并于 2mol/L 的尿素, 50mmol/L Tris-Cl (pH8.8) 中 4℃ 透析一昼夜, 氧化还原体系为 0.9mmol/L 的还原型谷胱甘肽和 0.1mmol/L 的氧化型谷胱甘肽。此后, 再于 1×PBS (pH7.3) 中透析一昼夜, 准备上柱纯化。

**1.2.6 亲和层析柱纯化:** (1) 将 Glutathione Sepharose 4B 填料用 PBS 彻底清洗, 500×g 离心收集, 装柱。用 PBS 以 1mL/min 的流速清洗 30 个柱体积, 以达到平衡。(2) 将 PBS 透析的复性液或低温表达的上清用 0.45 $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 1mL/min, 在 4℃ 上样。(3) 用 PBS 以 1mL/min 的流速清洗 30 个柱体积。(4) 室温下, 以洗脱液(10mmol/L 还原型谷胱甘肽) 0.5mL/min 洗脱, 收集蛋白峰。(5) SDS-PAGE 检测结果。

**1.2.7 A375 细胞的培养和 GST-OSM 的活性 MTT 法测定:** 将洗脱纯化的蛋白在 PBS 中透析过夜。将蛋白在液氮中冷冻, 于冷冻抽干机中冻干 1~2h。蛋白溶于细胞维持液中, 终浓度为 0.2~0.4mg/mL 备用。MTT 法测定 570nm 光吸收。

## 2 结果和讨论

### 2.1 PCR 扩增和载体构建

**2.1.1 PCR 扩增:** 因为在 pGEX2T 载体的蛋白酶切位点之后存在一个 *Bam*HI 酶切位

点,从而使经切割后的目的蛋白会出现两个非天然的氨基酸。为了保证目的蛋白的结构完全天然,实验中设计了两个 N 端的引物,引物 1 保留了信号肽的后 3 个氨基酸,引物 2 截去了 N 端的 2 个氨基酸。引物 3 是依据文献报道截去 C 端的 31 个氨基酸,从而提高 OSM 对肿瘤细胞的抑制活性。

引物 1:5'—CGGGATCCGCGGCTATAGGCAGCTGC—3' 上游  
引物 2:5'—CGGGATCCTGCTCGAAAAGATAC—3' 上游  
引物 3:5'—CGGAATTCTATCTCCGGCTCCGGTTCGG—3'下游

2.1.2 载体构建:通过 PCR 扩增,用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切载体和回收的扩增片段,经 T4DNA 连接酶连接,构建了表达载体 pCZ01(引物 1、3)和 pCZ02(引物 2、3)(图 1、2)

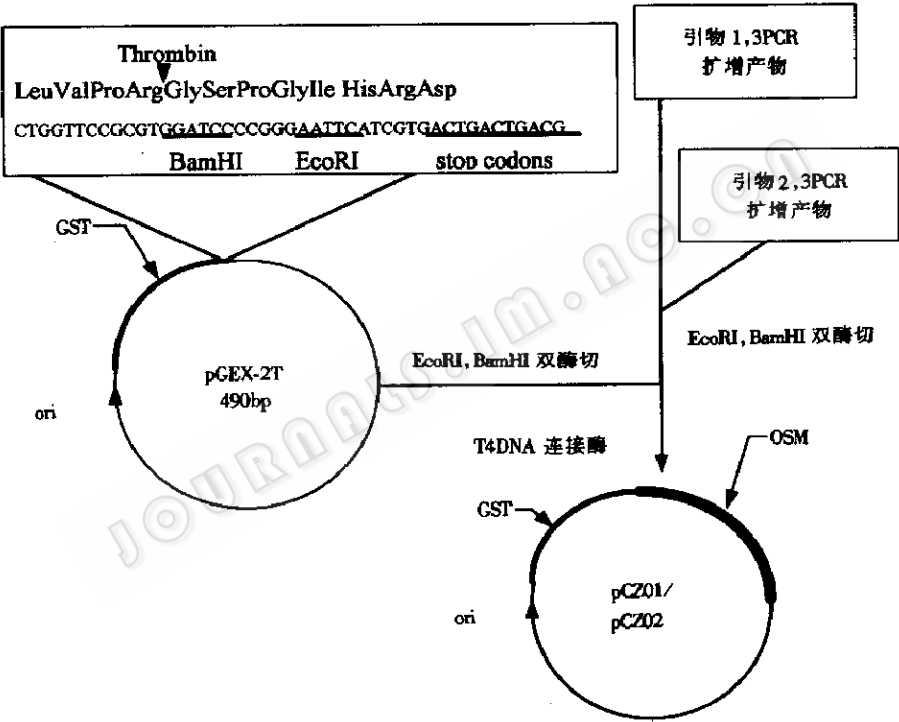


图 1 质粒 pCZ01 和 pCZ02 构建图

Fig.1 Construction map of recombinant plasmid pCZ01 and pCZ02

2.2 序列测定

将克隆进表达载体的片段进一步克隆至 pUC19 中,用 QIGENE 柱提纯质粒,用 PE 公司 373A 测序仪自动测序,结果证明序列完全正确。

2.3 诱导表达及条件优化

通过 IPTG 诱导,获得了占全菌蛋白 30% 以上的融合表达。通过进一步的优化,确定在以酪蛋白水解物为氮源,以 JM109 为宿主的条件下,表达水平达到 45% 以上。而在 5L 罐的发酵中,因为条件控制更加精确,表达水平可以达到 50% 以上(图 3)。通过低温诱导,使融合蛋白在菌体可溶蛋白中占 15%(图 4)。

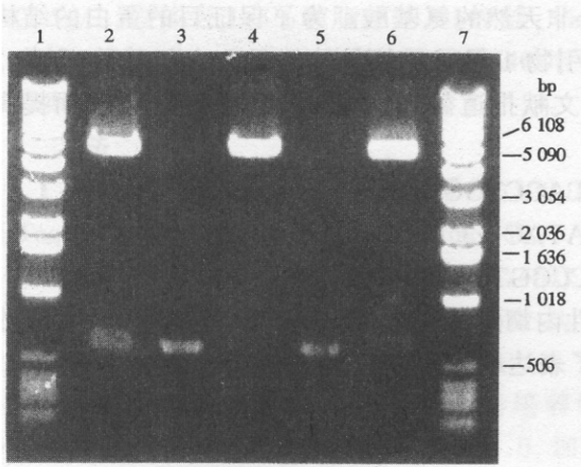


图 2 质粒 pCZ01, pCZ02 酶切鉴定图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of restriction fragment of pCZ01, pCZ02

1/7. GIBCO 1kb ladder; 2. pCZ01/*Bam*HI + *Eco*RI; 3. PCR production of primer 1, 3; 4. pGEX-2T/*Bam*HI + *Eco*RI; 5. PCR production of primer 2, 3; 6. pCZ02/*Bam*HI + *Eco*RI.

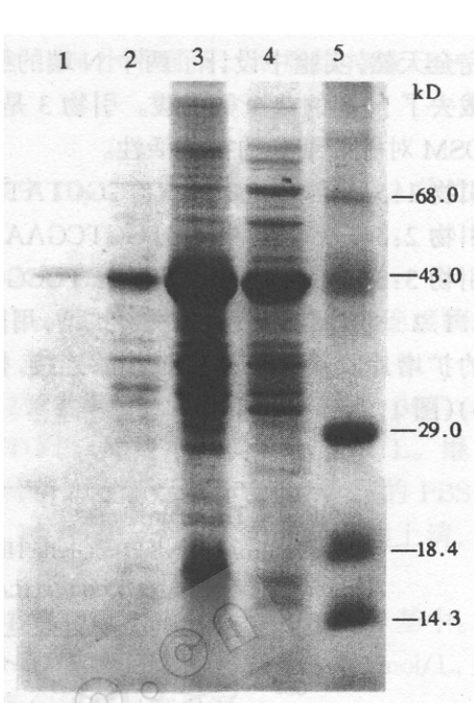


图 3 GST-OSM1 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 15% SDS-PAGE analysis of expression level of the GST-OSM1

1. GST-OSM1 purified with affinity chromatography; 2. Inclusion body renatured in 2mol/L urea; 3. Inclusion body solute in 8mol/L urea; 4. JM109 (pCZ01) induced with IPTG (0.5mmol/L); 5. Molecular weight marker (GIBCO High range).



图 4 GST-OSM2 可溶部分 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 15% SDS-PAGE analysis of soluble GST-OSM2

1. Molecular weight marker (GIBCO High range); 2. GST-OSM2 purified with affinity chromatography; 3. Soluble protein; 4. Insoluble protein; 5. JM109 (pCZ02) induced with IPTG in low temperature.

2.4 包涵体和可溶部分的纯化

通过对包涵体部分进行变复性, 经过一步亲和层析纯化, 可达到纯度 90% 以上的融合蛋白(图 3)。而对于可溶部分的蛋白, 直接过亲和层析柱, 亦可达到以上纯度, 并在方法上更加简化(图 4)。

2.5 活性测定

通过国际标准测活株黑色素瘤 A375 细胞, 对 GST-OSM1 和 GST-OSM2 分别进行了抑制活性测定, 可以证明两种融合蛋白

都有明显的抑制活性(图 5)通过 MTT 法对两种蛋白的活性进行了比较, 结果暗示 OSM 的 N 端头两个氨基酸残基对 OSM 的活性较为重要(图 6)。

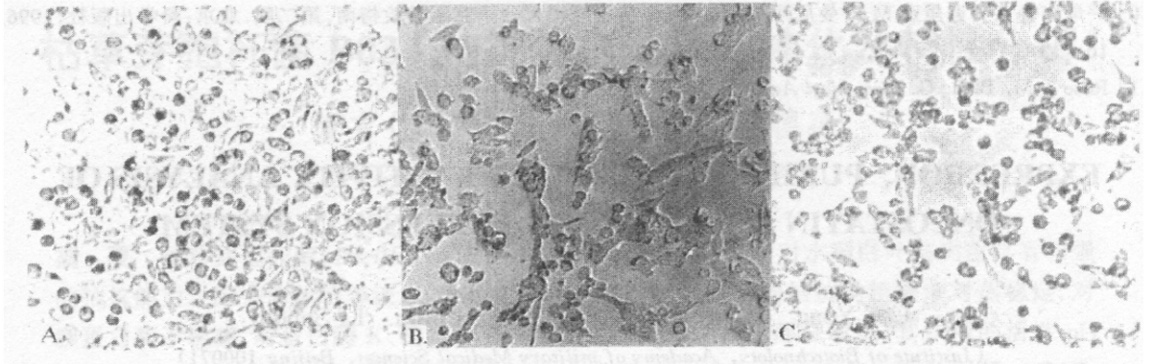


图 5 用 A375 细胞测定 GST-OSM1, GST-OSM2 抑制活性

Fig. 5 Determination of biological activity of GST-OSM1, GST-OSM2b with cell-line A375

A. Control; B. GST-OSM1; C. GST-OSM2.

OSM 是一种多功能的细胞调节因子, OSM 与 GM-CSF, IL-6, LIF 等在功能上有着一

定的交叉和协调作用。它在三维结构上与 GM-CSF, IL-2, IL-4 有着较大的同源性, 与

LIF 和 IL-6 有着相同的空间折叠形式<sup>[11]</sup>。OSM 与 LIF, IL-6, CNF 等有相

同的受体亚基。鉴于 OSM 多种的生物学特性及相关的多种功能, 对它的研究越来越受到重视。于是, 大量和方便地获得 OSM 成为需要。在国外的相关报道中, Malik<sup>[5]</sup> 使用 COS 细胞达到了 12.5mg/L 的表达水平, 而 Sporeno<sup>[8]</sup> 在大肠杆菌中利用 T7.7 载体纯化得率为 2.3mg/L。目前用于研究的 OSM 仍是从 PMA 刺激的人组织细胞淋巴瘤细胞系 U937 的上清中纯化, 且价格十分昂贵。基于 GST 融合表达系统使得 OSM

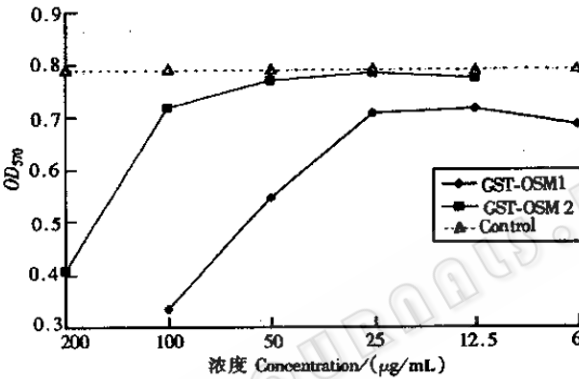


图 6 MTT 法测定 GST-OSM1, GST-OSM2 抑制活性

Fig. 6 MTT analysis of growth-inhibitory of GST-OSM1, GST-OSM2

基于在原核中得到了高效表达, 较文献表达水平有较大的提高, 为下一步的功能研究打下坚实的基础。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Zarling J M, Shoyab M, Marquardt H *et al.* *Proc Acad Sci USA*, 1996, **83**(24): 9739~9743.
- [ 2 ] Brown T J, Lioubin M N, Marquardt H *et al.* *J Immunol*, 1987, **139**: 2977~2983.
- [ 3 ] Nair B C, DeVico A L, Nakamura S *et al.* *Science*, 1992, **255**: 1430~1432.
- [ 4 ] Miles S A, Martinez-Mata O, Rezai A *et al.* *Science*, 1992, **255**: 1432~1434.
- [ 5 ] Malik N, Graves D, Shoyab M *et al.* *DNA and Cell Biol*, 1992, **11**(6): 453~459.
- [ 6 ] Linsley P S, Kallestad J C, Ochs V *et al.* *Mol Cell Biol*, 1990, **10**: 1882~1890.
- [ 7 ] Linsley P S, Hanson M B, Horn D *et al.* *J Biol Chem*, 1989, **264**: 4282~4289.
- [ 8 ] Sporeno E, Barbato G, Graziani R *et al.* *Cytokine* 1994, **6**(3): 255~264
- [ 9 ] 段海清, 张兆山, 董自正等. *生物化学杂志*, 1997, **3**: 259~263.

- [10] 萨母布鲁克 J, 弗里奇 M F, 曼尼阿蒂斯 T 著(金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996, 16~75.
- [11] Rose T M, Bruce G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**:8641~8645.

## EXPRESSION, PURIFICATION AND BIO-ACTIVITY ANALYSIS OF ONCOSTATIN IN GST-FUSION EXPRESSION SYSTEM

Cao Yong Zhang Zhaoshan\* Wen Limin Li Shuqin

(*Institute of Biotechnoloty, Academy of military Medical Sciences, Beijing 100071*)

**Abstract** Oncostatin (OSM) is an important cytokine which has diverse biological activities. It may be useful in basic scientific and clinical studies. OSM was efficiently expressed by cloning the OSM gene into GST fusion expression vector. The level of expression of the fusion protein was about 50% of the total cell protein by SDS-PAGE analysis. The percentage of fusion protein in soluble protein could be 15% when the induction was in low temperature. The purity of purified GST-OSM with an affinity chromatography column was about 90% after the inclusion bodies had denatured and renatured. The result of activity study showed that the first two amino acids in N-terminal of the OSM were important to the biological activity of OSM.

**Key words** Oncostatin-M, Efficient-expression, Activity analysis