

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03137202.3

C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/27 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年8月9日

[11] 授权公告号 CN 1268751C

[51] Int. Cl. (续)

C07K 14/535 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C12R 1/84 (2006.01)

[22] 申请日 2003.5.26 [21] 申请号 03137202.3

[71] 专利权人 海南国栋药物研究所有限公司

地址 570216 海南省海口市金盘工业区金盘路17号嘉海大厦三楼

[72] 发明人 梁国栋 周鹏 夏中宁 蒲广西
陈海宁

审查员 颜丛

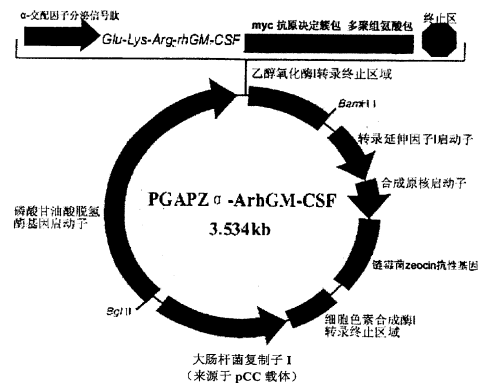
权利要求书1页 说明书9页 附图6页

[54] 发明名称

表达人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的酵母重组株及 rhGM - CSF 的纯化方法

[57] 摘要

本发明公开了一种重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM - CSF) 的分泌型表达载体和一种简易纯化方法, 用该分泌型表达载体转化的宿主细胞, 以及用上述表达载体的毕赤氏酵母重组工程菌株发酵表达 rhGM - CSF 的方法。本发明采用酵母分泌表达系统取代大肠杆菌包涵体表达系统, 目标蛋白 rhGM - CSF 不需要复性, 其生物比活性可达到 3.4×10^7 单位/毫克蛋白, 低毒副作用; 因此, 本发明的方法制得的 rhGM - CSF 不仅产率高, 而且纯化工艺简便、成本低、产品毒副作用低。



1、一种表达重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的分泌型表达载体，其特征在于，该载体含有：重组的 rhGM-CSF 序列，其被插入 pGAPZ α -A 之 GAP 启动子/ α -factor 信号肽下游位点 XhoI/XbaI，同时删除 Kex2 位点之后的 Glu-Ala-Glu-Ala 编码序列和起始密码子 ATG，构建成 rhGM-CSF 分泌型表达载体。

2、一种酵母重组菌株，其特征在于被权利要求 1 所述的表达载体转化 GS115 获得的阳性表达菌株。

3、根据权利要求 2 所述的酵母重组菌株，其特征在于所述的阳性表达菌株为 rhGM-CSF/pGAPZ α -A/GS115，一种分泌型 rhGM-CSF 酵母重组工程菌株。

4、一种 rhGM-CSF 的生产方法，其特征在于发酵权利要求 3 所述的酵母重组菌株，收集其分泌产物。

5、一种 rhGM-CSF 的纯化方法，其特征在于利用权利要求 3 之酵母重组工程菌株接种发酵，再从发酵液中分离纯化 rhGM-CSF：离心收集发酵上清液，加硫酸铵，过 Phenyl Sepharose 柱层析，收集目标洗脱峰，过 DEAE Sepharose 柱层析，收集目标洗脱峰，过 Sephacryl S-200 柱层析，收集目标峰，得到 rhGM-CSF 原液。

表达人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的酵母重组株及 rhGM-CSF 的纯化方法

[技术领域]

本发明涉及利用重组 DNA 技术生产医用蛋白质或多肽药物的领域，更具体地说，本发明涉及分泌型表达人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子重组载体、酵母重组工程菌株及 rhGM-CSF 的纯化方法。

[背景技术]

目前，国内生产的 rhGM-CSF，多为大肠杆菌表达产物，存在主要工艺缺点是：大肠杆菌的表达系统为包含体型，生产过程中需要复性，复性率低，最高不超过 40%，其中 60% 为非复性物，不能去除，因而比活性低（最高只有 1.0×10^7 单位/毫克蛋白），副作用大；酿酒酵母工程菌株的表达属非整合型表达，存在表达不稳定、产物表达量较低和基因易丢失等缺陷。

[发明内容]

为了克服上述缺陷，本发明的目的是采用酵母分泌表达系统取代大肠杆菌包涵体型表达系统，目标蛋白 rhGM-CSF 不需要复性，大幅提高其生物比活性，减少副作用，降低生产成本。

分泌表达 rhGM-CSF 的酵母重组株的构建方法为：将克隆修饰的 rhGM-CSF 基因插入 pGAPZ α -A 之 GAP 启动子/ α -factor 信号肽下游位点，删除 Kex2 (Lys-Arg) 位点之后的 Ste13 位点 (Glu-Ala-Glu-Ala) 和起始密码子 ATG，构建成 rhGM-CSF 分泌型表达载体；利用澳大利亚 Invitrogen 公司的 *Pichia EasyComp Transformation Kit* 的方法作改进，将 rhGM-CSF 分泌型表达载体转化毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 的菌株 GS115，构建成分泌型表达 rhGM-CSF 的酵母重组工程菌株-rhGM-CSF/pGAPZ α -A/GS115；通过抗生素筛选、SDS-PAGE 分析及生物比活性测定，获得目标酵母重组工程菌株。

上述的酵母重组工程菌株目标蛋白 rhGM-CSF 的表达量约占分泌总蛋白的 50%，比活性为 3.4×10^7 单位/毫克蛋白左右；目标蛋白 rhGM-CSF 具有与天然 rhGM-CSF 相同的免疫原性。本工程菌株接受外源基因是以整合于基因组形式，这与大肠杆菌、酿酒酵母的独立染色体组外质粒表达体系有

显著差别，故本工程菌株较大肠杆菌、酿酒酵母稳定，不易发生外源基因丢失现象，以工程菌作为样品模板，通过 PCR、分子杂交等技术鉴定选择出来的阳性菌株其准确率达 100%，且其目标表达产物 rhGM-CSF 直接表达分泌在培养液中，因此检测其蛋白表达量及目标产物的生物活性非常简易，这较大肠杆菌表达体系表达产物需复性优越得多；另外，酵母是一种简单的真核生物，其表达后加工模式类似高等真核生物，故用它表达的基因产物不仅具有天然产物相同的生物活性，而且副作用低，产品成本低，适用性广。

rhGM-CSF 的纯化方法为：利用获得的高产物表达量、高产物活性的酵母重组株进行发酵，离心收集上清液，加硫酸铵，过 Phenyl Sepharose 柱层析，收集目标洗脱峰，过 DEAE Sepharose 柱层析，收集目标洗脱峰，过 Sephacryl S-200 柱层析，收集目标峰，得到 rhGM-CSF 原液，纯度大于 95%，比活性大于 3.4×10^7 单位/毫克蛋白。

本发明提供的 rhGM-CSF 的纯化方法，提高了 GM-CSF 蛋白质的比活性，减少了分离纯化步骤，降低了生产成本，减少了临床副作用，在工业生产中应用将取得良好的经济效益。

[附图说明]

图 1 为 rhGM-CSF 酵母表达载体构建图谱。

pGAPZ α -A/rhGM-CSF 表达载体分子大小为 3.534kb。其中 pGAPZ α -A 为 3.147kb，rhGM-CSF 为 387bp（包含终止密码子 3bp）；rhGM-CSF 插入于载体 pGAPZ α -A 第 747bp (XhoI 位点) 与第 824bp (XbaI 位点) 之间。

pGAPZ α -A 载体结构为：

GAP 启动子区域：第 1-483bp

pGAP 引物位点：第 455-476bp

α -factor 肽信号序列：第 493-759bp

α -factor 引物位点：第 696-716bp

载体多克隆位点：第 760-828bp

myc 抗原决定簇包：第 827-856bp

多聚组氨酸包：第 872-889bp

3' -*AOX1* 引物位点：第 974-994bp

AOX1 转录终止区域：第 893-1233bp

TEF1 启动子区域：第 1234-1644bp

EM7 启动子: 第 1645-1712bp

Sh ble 阅读框: 第 1713-2087bp(编码 zeocin 抗性)

CYC1 转录终止区域: 第 2088-2405bp

ColE1 复制点(来源于 pUC 载体): 第 2416-3089bp

图 2 是 GM-CSF 的纯化各步骤的 SDS-PAGE 电泳分析图。图中从左至右依次为泳道 1-7, 其中泳道 1 为发酵液表达量图谱; 泳道 2 为 Phenyl Sepharose 柱层析纯化图谱; 泳道 3 为 DEAE Sepharose 柱层析纯化图谱; 泳道 4、5、7 为 Sephacryl S-200 柱层析纯化图谱; 泳道 6 为分子量标记物图谱。

图 3 是 GM-CSF 原液纯度鉴定图谱。图中从左至右依次为泳道 1-7, 其中泳道 1 为分子量标记物图谱; 泳道 2、4、6 为 GM-CSF 原液还原电泳图谱; 泳道为 3、5、7 为 GM-CSF 非还原电泳图谱。

图 4 是 GM-CSF 原液纯度鉴定图谱, 图中从左至右依次为泳道 1-10, 其中泳道 1、2、3、8、9、10 为 GM-CSF 原液非还原电泳图谱; 泳道 4、5、6 为 GM-CSF 原液还原电泳图谱; 泳道 7 为分子量标记物图谱。

图 5 是 rhGM-CSF 曲线图: 以 OD 值为 Y 轴, 以板上稀释梯度对数为 X 轴, 作标准品曲线和待检品的量效关系图, 其结果: 比活性 = 3.77×10^7 u/mg。

图 6 是 rhGM-CSF 曲线图: 以 OD 值为 Y 轴, 以板上稀释梯度对数为 X 轴, 作标准品曲线和待检品的量效关系图, 其结果: 比活性 = 3.81×10^7 u/mg。

图 7 是 rhGM-CSF 曲线图: 以 OD 值为 Y 轴, 以板上稀释梯度对数为 X 轴, 作标准品曲线和待检品的量效关系图, 其结果: 比活性 = 3.66×10^7 u/mg。

[具体实施方式]

下面结合实施例详细介绍本发明在 rhGM-CSF 重组酵母工程菌株的构建和 rhGM-CSF 纯化工艺中的具体应用。

实施例 1

一、rhGM-CSF 酵母工程菌的构建

(一) 材料:

1. rhGM-CSF 基因

2. pGAPZ α -A、*P. pastoris* Strain GS115 (*his4*) 购自澳大利亚 Invitrogen 公司。

(二) 方法:

1. 基因 PCR 扩增:

(1) 引物设计: 在 5' 端引物中删除 Kex2(Lys-Arg) 位点之后的 Ste13 位点(Glu-Ala-Glu-Ala) 和起始密码子 ATG。

P1-5' GCTCGAGAAAAGAAATGGCTCCAGCCCGT3' (“ATG” 被删除)

XhoI Lys-Arg(Kex2 位点)

P2-5' GTCTAGA TTACTCCTGGACTGGCTC3'

XbaI

(2) 热循环: 95°C, 5' ; 95°C, 30' ' →43°C, 30' ' →72°C, 40' ' ; 72°C, 10' ; 扩增 30 个循环。

2. PCR 扩增产物回收与克隆:

(1) rhGM-CSF 基因经扩增电泳后获得约 400bp 的 DNA 带;

(2) 用德国宝灵曼公司生产的 PCR 产物高纯度试剂盒回收目标片段并进行 T-Vector 克隆。

3. 基因序列分析: 采用美国 PE 公司生产的 ABI 377A DNA 自动测序仪进行 DNA 序列分析。

4. 酵母分泌型表达载体构建: 采用基因克隆技术将 rhGM-CSF 基因通过 XhoI/XbaI 插入 pGAPZ α -A 之 GAP 启动子/ α -factor 信号肽下游的 Xho I/Xba I 位点, 构建成含 α -factor 信号肽的分泌型酵母表达载体; 表达载体转化 GS115(*his4*): 利用澳大利亚 Invitrogen 公司生产的 *Pichia* EasyComp Transformation Kit (Cat. No. K1730-01) 经稍作改进的方法进行。具体操作如下: (1) 挑取毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 单菌落, 在 30°C, 300 转/分钟条件下以 YPD+Zeocin100 毫克/升培养基振荡培养至 OD600=1.3-1.5; 取 0.2-0.3 毫升菌液至 20 毫升同样培养基中振荡培养至 OD600=6-8, 取 10ml 培养液, 以 5000 转/分钟、室温离心 5 分钟, 去上清, 用 10 毫升溶液 I 重悬, 离心去上清, 再用 2 毫升溶液 I 重悬, 即制成感受态细胞; (2) 取 50 微升感受态, 加入 5 微升线性化的 rhGM-CSF 重组表达载体, 再加 1000 毫升溶液 II, 混匀后 30°C 培养 1 小时, 期间每隔 15 分钟作一次振动混和处理; (3) 42°C 热激处理 10 分钟; (4) 将培养物以 5000 转/分钟、室温离心 15 分钟, 去上清, 用 500 毫升溶液 III 重悬, 离心去上清, 再用 150-200 毫升溶液 III 重悬, 涂布于 YPD+Zeocin100 毫克/升平板, 30 °C 培养 3-5 天, 直至产生单菌落。

5. 高表达酵母工程菌株的筛选：用 Zeocin 抗生素筛选获得阳性菌株后，提取工程菌基因组 DNA，进一步以引物 P1/P2 作 PCR 分析和以德国宝灵公司生产的 DiG Labelling and Detection Kit 标记 rhGM-CSF 基因之 400bp DNA 片段作为杂交探针，进行 Southern blotting 等技术鉴定筛选出阳性菌株，再用 SDS-PAGE 银染色电泳筛选高表达目标蛋白的 rhGM-CSF/pGAPZ α -A/GS115 工程菌株。

实施例 2

rhGM-CSF 的纯化方法：

1. 菌种保存

构建高效表达 rhGM-CSF 酵母工程菌 (rhGM-CSF/pGAPZ α -A/GS115) 后，-80℃ 保存菌种，或者脱脂奶冷冻干燥后密封保存。

2. 菌种活化

平板培养基配方 (%)：

酵母粉 1.0 蛋白胨 2.0 葡萄糖 2.0 琼脂 2.0

取一支菌种，挑菌液划平板，然后 30℃ 培养 24 小时

3. 一级种子液

YPD 培养基配方 (%)：

酵母粉 1.0 蛋白胨 2.0 葡萄糖 2.0

在 YPD 培养基中加 100mg/Lzeocin，然后取活化菌液按接种量 1% 接种，30℃ 培养 12 小时。

4. 二级种子液

YPD 培养基配方 (%)：

酵母粉 1.0 蛋白胨 2.0 葡萄糖 2.0

按接种量 1% 接种，30℃ 培养 12 小时。

5. 发酵

发酵培养基配方 (%)：

酵母粉 1.0 蛋白胨 2.0 0.1N 磷酸钾冲液 PH6.0
YNB1.34 生物素 4×10^{-5} 甘油 3.0

其中 YNB，生物素过滤除菌，发酵接种时加入发酵罐内，其余培养基成分于发酵罐中 121℃，20 分钟灭菌。

接种量：8-10%

培养条件：30℃，PH6.0，DO>30%，NBS 发酵罐

培养时间：72 小时

PH 调节：5N NaOH 调节 PH6.0

补料：50%的甘油

5. 分离纯化

离心收集发酵上清液，按终浓度加 20%硫酸铵，上 Phenyl Sepharose 柱，收集 5%硫酸铵洗脱峰；经三次 25mM Tris-HCl 缓冲液搅拌透析，每次 6h，然后，上 DEAE Sepharose 柱，收集 0.4M NaCl 洗脱峰；接着用截留分子量 3000 Dalton 的超滤器超滤浓缩，浓缩液蛋白浓度大于 5mg/ml (lowry 法)，过 Sephacryl S-200 柱层析，收集目标蛋白峰，得到纯度大于 95%的 rhGM-CSF 原液，蛋白浓度大于 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，蛋白回收率为 30%。

纯度检测法：(1) SDS-PAGE 银染色电泳法，上样量 5 μg ，只有一个显色斑点；(2) HPLC 法，只有单一色谱峰。

生物活性检测：MTT 法，比活性大于 3.4×10^7 单位/毫克蛋白。

rhGM-CSF 活性检测

二、材料：

- 1、1640 液：RPMI1640 (GIBCO 产品) 按说明书配制。
- 2、基本培养液：1640 液添加 10%胎牛血清。
- 3、完全培养液：基本培养液添加 GM-CSF 至终浓度 4ng/ml。
- 4、MTT (噻唑兰)：Fluka 产品，用磷酸盐缓冲液配制成 5.0mg/ml 的溶液，过滤除菌后，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。
- 5、溶解液：二甲基亚砜 (分析纯)
- 6、标准品：暂用美国先灵葆雅公司重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (生百能) 替代。(标示量 50 μg 效价： $0.555 \times 10^6 \mu/\text{ml}$)
- 7、TF-1 细胞：用完全培养液 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下培养，间隔 48-72 小时传代。

三、方法操作：(TF-1 细胞增殖反应/MTT 比色法)

1、TF-1 细胞悬液的制备：

取生长良好的 FT-1 细胞，1000rpm 离心 10min，弃上清，沉淀细胞用培养液洗涤 3 次后，悬浮于基本培养液中，调整细胞数量为 4×10^5 个/ml，

备用。

2、样品的配制:

标准品的稀释: 将标准品用 1640 液稀释成 5×10^3 倍, 作为初始浓度。

待检品的稀释: 将待检品用 1640 液稀释成 2×10^5 倍, 作为初始浓度。

3、活性检测:

A、在 96 孔板上从第一排 A → B 向低浓度制备标准品和待检品倍比稀释梯度, 每个样品 11 个梯度, 每个梯度 2 孔。每孔留 50ml 余液, 第 12 排做空白对照组。

B、每孔加入细胞悬液 $50 \mu\text{l}$, 置 37°C 5% CO_2 培养 45 小时。

C、每孔加入 MTT $20 \mu\text{l}$, 置 37°C , 5% CO_2 培养 4 小时。

D、弃上清, 每孔加入溶解液 $150 \mu\text{l}$, 混匀后比色。设定波长 492nm, 测其 OD 值。

四、结果计算:

1、以 OD 值为 Y 轴, 以板上稀释梯度对数为 X 轴, 作标准品曲线和待检品的量效关系图。

2、按取各样品曲线在半效 OD 值处的稀释梯度对数为该样品值, 用字母 C 表示。

3、公式

待检品效价 = 标准品效价 $\times 2^{C_1 - C_2} \times D_1 / D_2$

其中 C_1 为标准品 C 值

C_2 为待检品 C 值

D_1 为待检样品预稀释倍数

D_2 为标准品预稀释倍数, 结果见附图 5、6、7

核苷酸和/或氨基酸序列表

<110>海南国栋药物研究所

<120>表达人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的酵母重组株及rhGM-CSF的纯化方法

<160>2

<210>1

<211>387

<212>DNA

<213>人血白细胞(human blood white cell)

<220>

<221>CDS

<222>(1) ... (387)

<400>1

```
atggcacctg cccgttctcc gagcccgagc actcagccgt gggagcatgt gaatgccatc 60
caggaggccc ggcgtctcct gaacctgagt agagacactg ctgctgagat gaatgaaaca 120
gtagaagtca ttcagagat gtttgacctc caggagccga cctgcctaca gaccgcctg 180
gagctgtaca agcagggcct gcggggcagc ctcaccaagc tcaagggccc cttgaccatg 240
atggccagcc actacaagca gcactgccct ccaaccccgg aaacttcctg tgcaaccag 300
attatcacct ttgaaagttt caaagagaac ctgaaggact ttctgcttgt catccccttt 360
gactgctggg agccagtcca ggagtaa 387
```

```
Met Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
1 5 10 15
```

```
Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
20 25 30
```

```
Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
35 40 45
```

```
Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
50 55 60
```

```
Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
65 70 75 80
```

```
Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
85 90 95
```

```
Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
100 105 110
```

```
Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125 128
```

<210>2

<211>128

<212>PRT

<213>人血白细胞(human blood white cell)

<400>2

```

Met Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
1          5          10          15
Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
20          25          30
Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
35          40          45
Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
50          55          60
Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
65          70          75          80
Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
85          90          95
Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
100         105         110
Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115         120         125         128

```

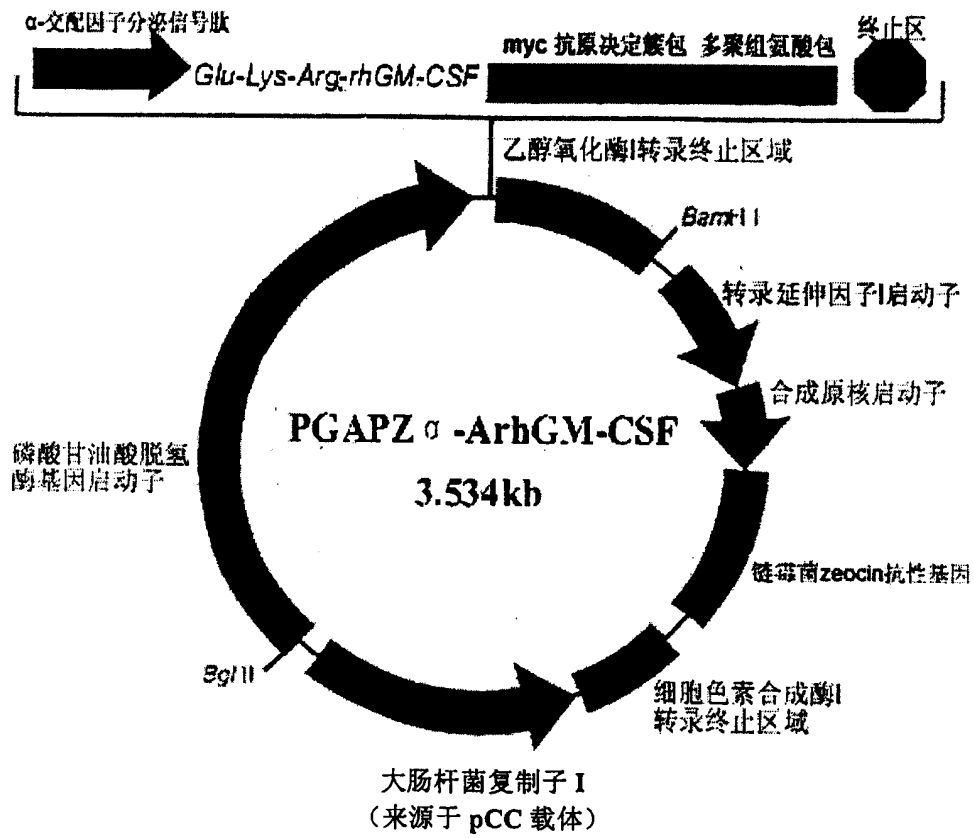


图 1

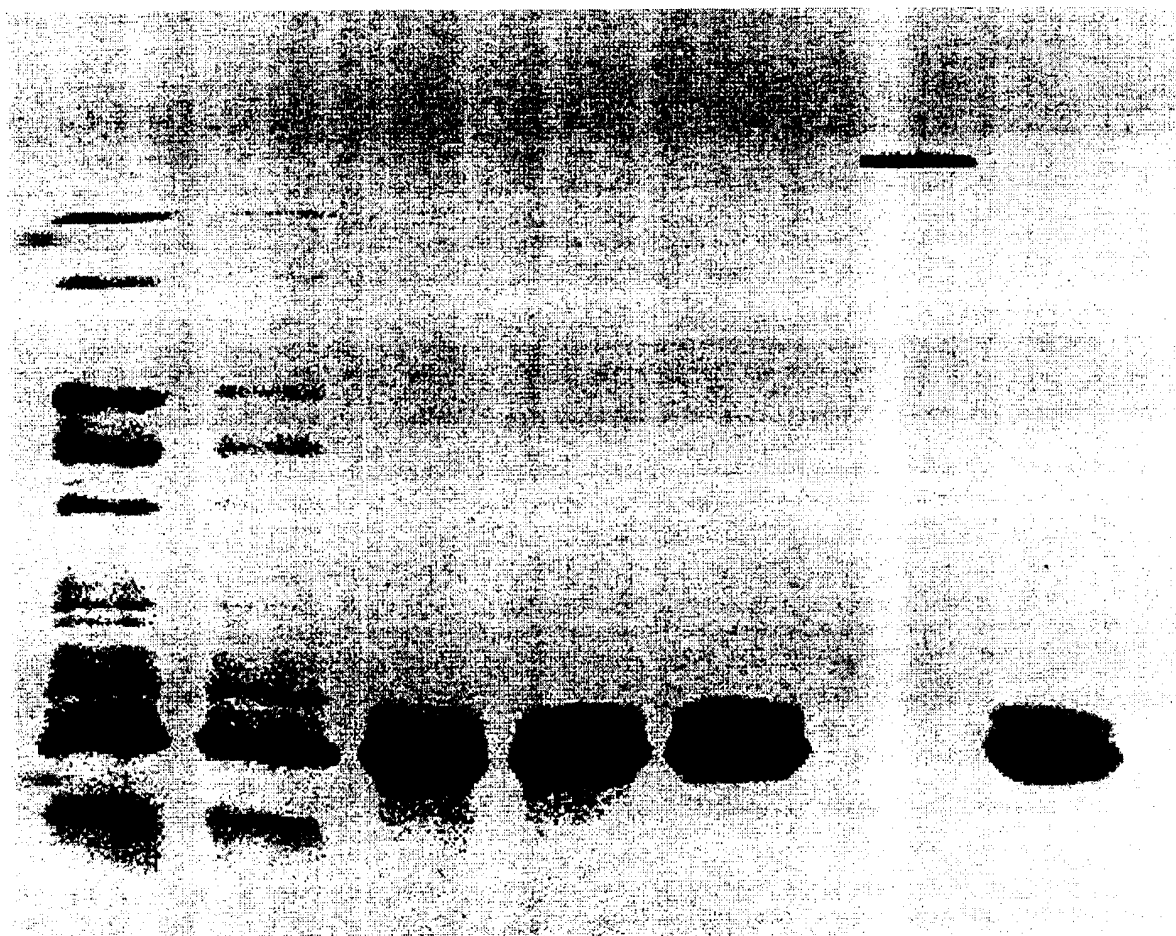


图 2

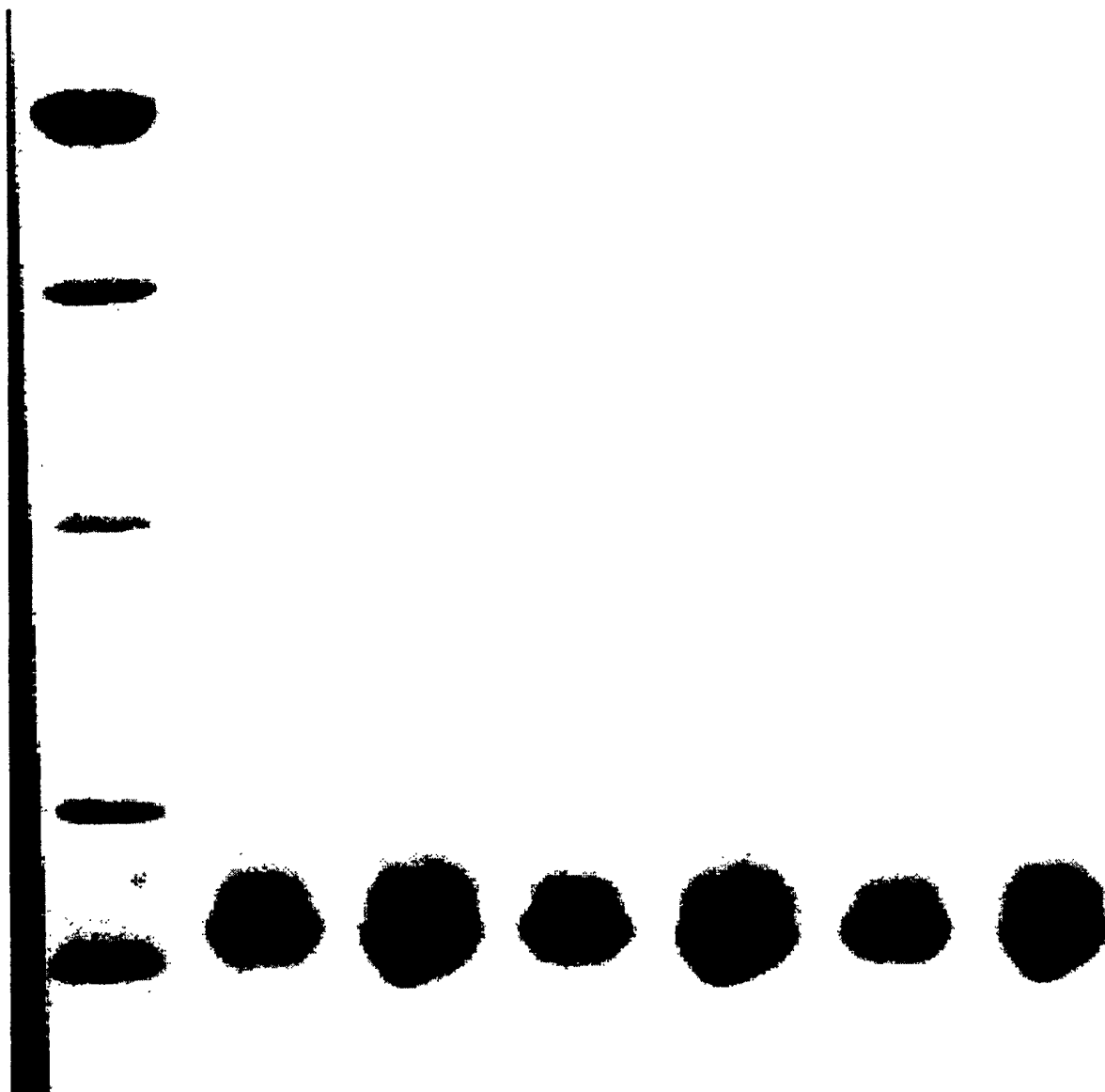


图 3

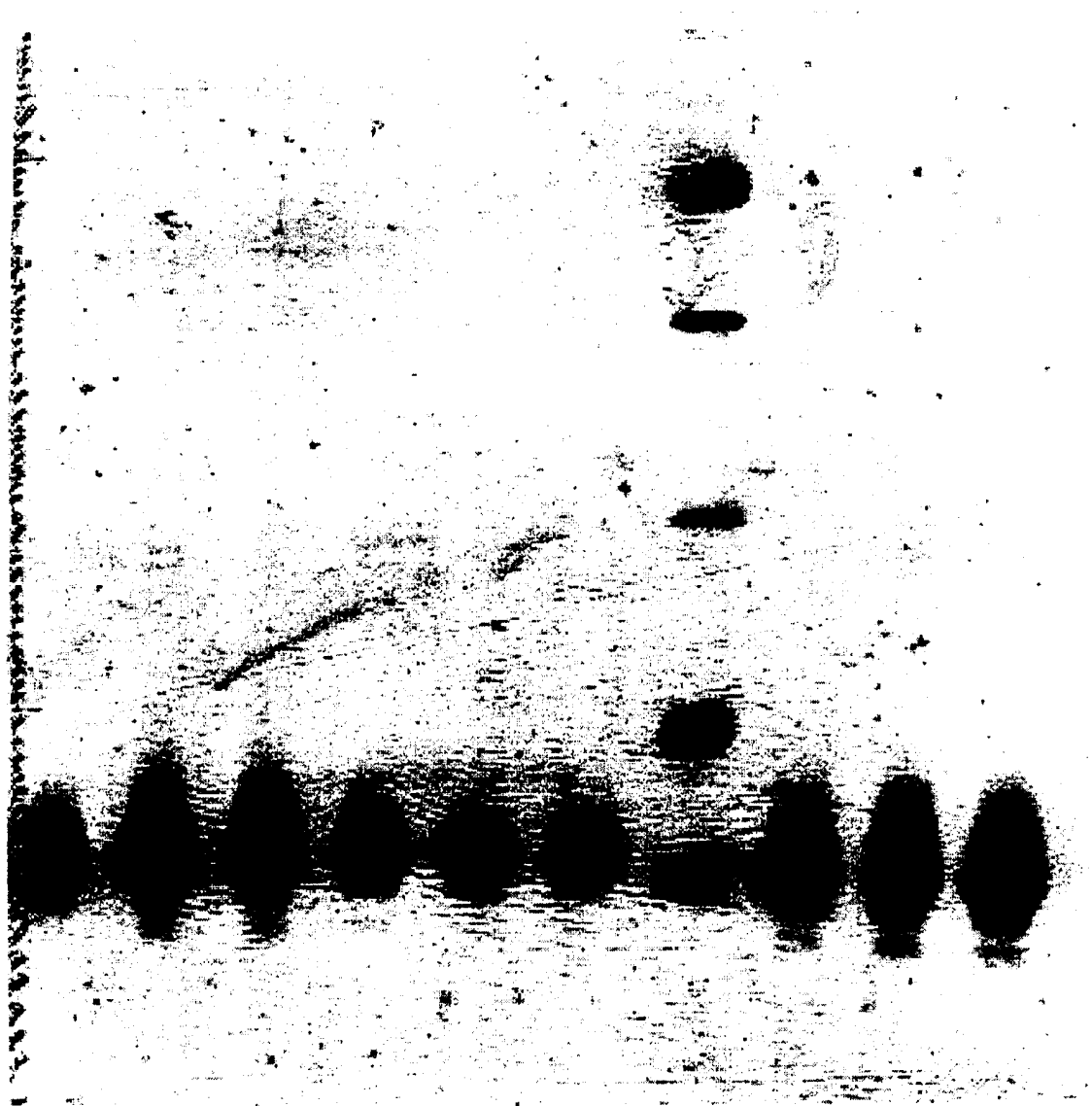


图 4

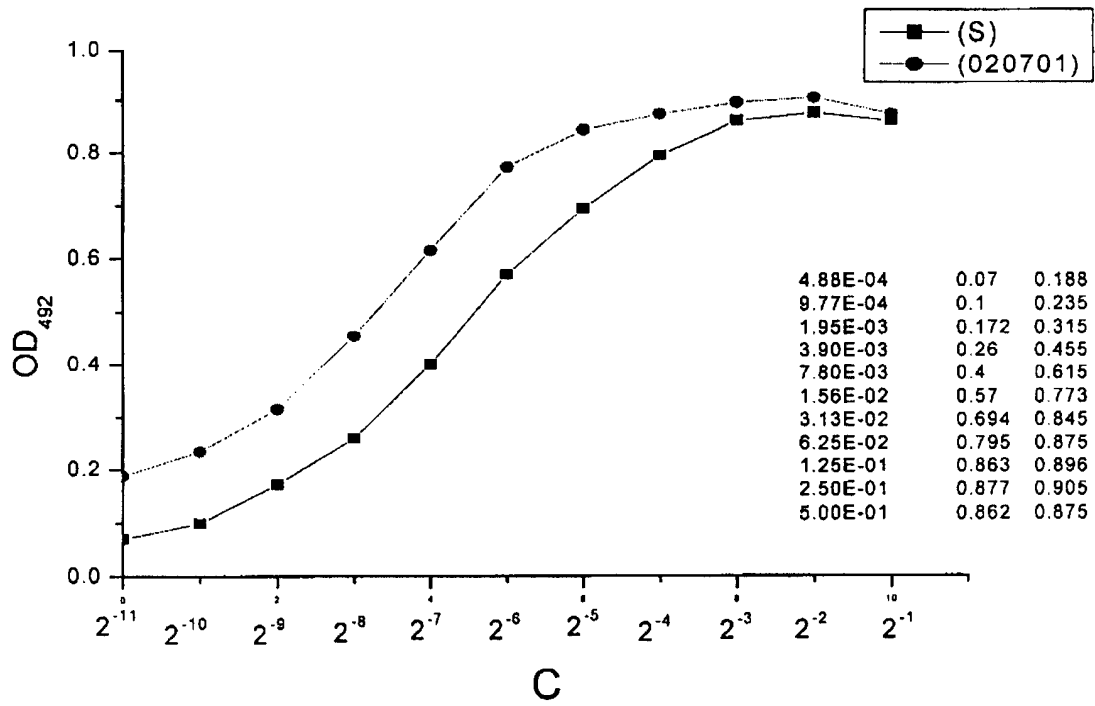


图 5

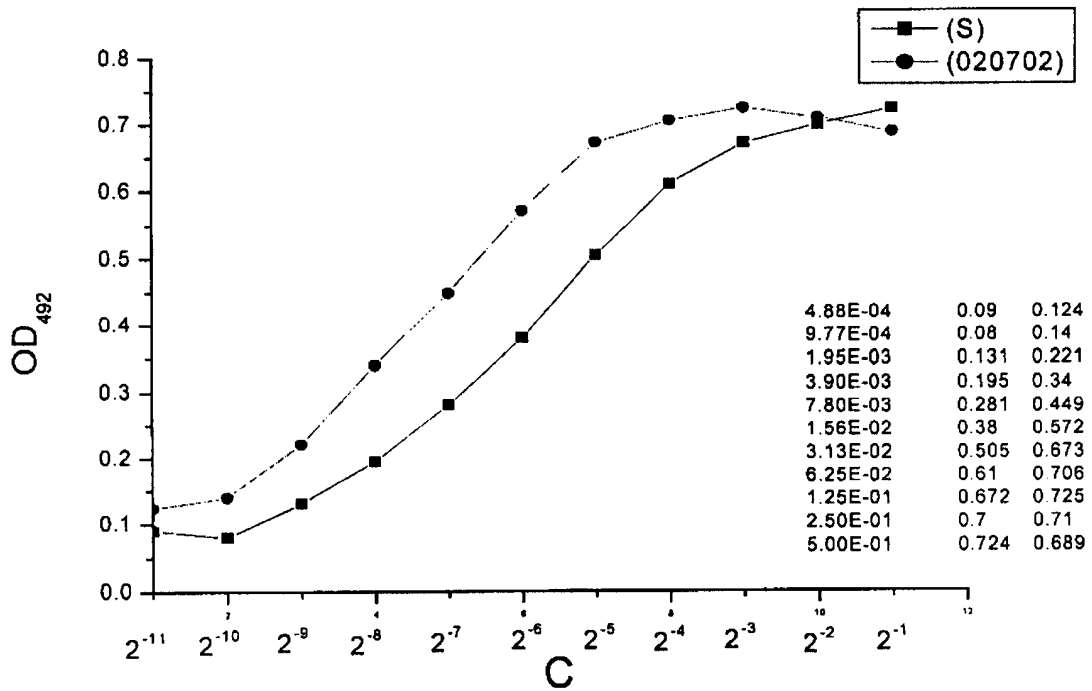


图 6

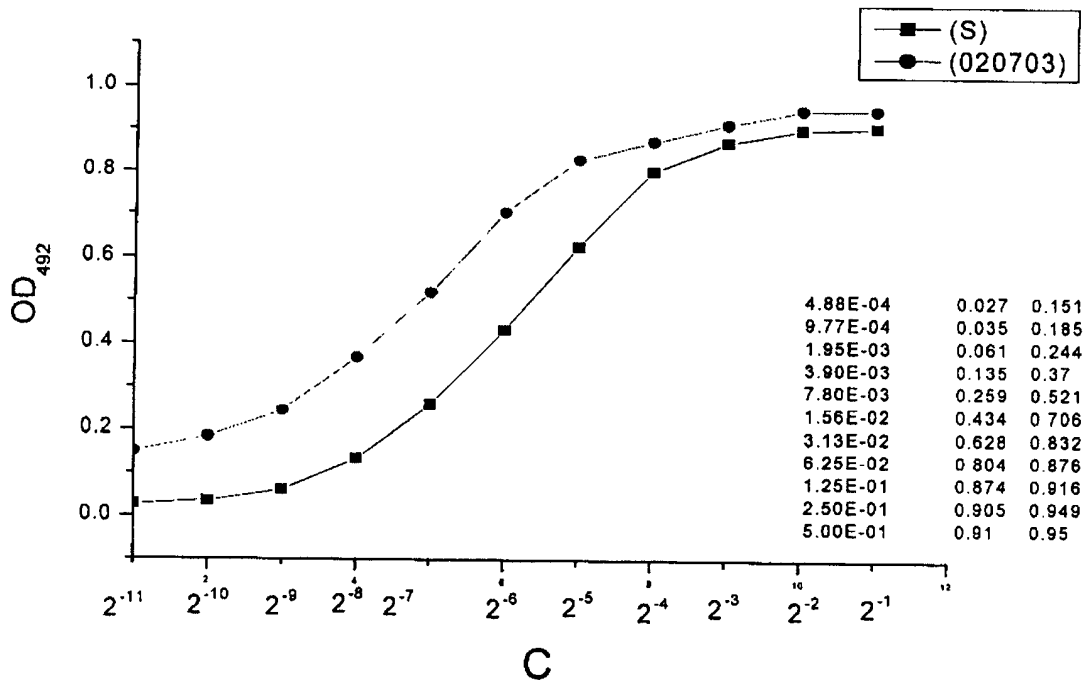


图 7