

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02814814.2

[51] Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)
C12N 15/20 (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01)
C12N 15/27 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 10 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 100427506C

[22] 申请日 2002.7.26 [21] 申请号 02814814.2

[30] 优先权

[32] 2001. 7. 26 [33] KR [31] 2001 - 45229

[32] 2002. 7. 25 [33] KR [31] 2002 - 43968

[86] 国际申请 PCT/KR2002/001416 2002. 7. 26

[87] 国际公布 WO2003/010204 英 2003. 2. 6

[85] 进入国家阶段日期 2004. 1. 29

[73] 专利权人 高级蛋白质技术公司

地址 韩国京畿道水原市

[72] 发明人 李愚钟 朴兴福 赵泰勋 金正旻
朴然成

[56] 参考文献

US5196321A 1993. 3. 23

US6068994A 2000. 5. 30

WO9423040A1 1994. 10. 13

US5914254A 1999. 6. 22

审查员 于 群

[74] 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理有限公司

代理人 张金海

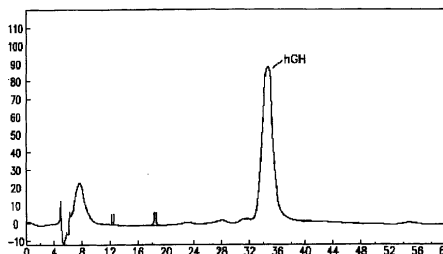
权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图 9 页

[54] 发明名称

从融合多肽制备感兴趣的多肽的方法

[57] 摘要

本发明涉及分离感兴趣的蛋白质的方法，包括与融合的伴体一起表达感兴趣的蛋白质、在基质上选择性地吸附、及对吸附在基质上或从基质分离的融合蛋白质进行高效的切割和回收感兴趣的蛋白质。此外，本发明提供了包括感兴趣的蛋白质和融合的伴体的融合蛋白质，其中融合伴体包含可以被泛素蛋白酶在其 C - 端进行切割的氨基酸序列，并具有一个或多个不同于感兴趣的蛋白质的等电点。按照本发明，可以高回收率和高纯度地纯化感兴趣的蛋白质。另外，可以不使用生产重组蛋白质所需的复杂的分离过程从而降低生产成本。



1、一种融合蛋白质，由感兴趣的蛋白质和融合伴侣组成，其中该融合伴侣为通过以选自由组氨酸、赖氨酸、精氨酸、谷氨酸和天冬氨酸组成的组中的至少一种氨基酸替换融合伴侣的选自由 Glu 16, Glu18 和 Glu64 组成的组中的至少一个氨基酸的修饰的泛素，或通过使由 2-30 个选自由组氨酸、赖氨酸、精氨酸、谷氨酸和天冬氨酸组成的组中的至少一种氨基酸组成的、具有与感兴趣的蛋白质不同的电荷的氨基酸序列与融合伴侣的 N-末端结合而修饰的泛素，以使融合伴侣和感兴趣的蛋白质之间的等电点 pI 差异至少为 1。

2、如权利要求 1 所述的融合蛋白质，其中所说的融合伴侣是通过在其 N 末端融合 6 个赖氨酸尾而使电荷发生改变的肽。

3、如权利要求 1 所述的融合蛋白质，其中所说的融合伴侣是在 Glu16 被 Arg 替换、Glu18 被 Lys 替换及 Glu64 被 Arg 替换的修饰的泛素。

4、如权利要求 1 所述的融合蛋白质，其中，所述感兴趣的蛋白质选自由生长激素、干扰素、白介素、粒细胞集落刺激因子、促红细胞生成素和胰岛素组成的组。

5、一种从融合蛋白质中分离感兴趣的蛋白质的方法，包括：

a) 在宿主细胞中表达包含感兴趣的蛋白质和如权利要求 1 所述的融合伴侣的融合蛋白质；

b) 在融合伴侣可以吸附的基质上加载融合蛋白质；

c) 用泛素蛋白酶处理吸附的基质；及

d) 从基质上洗脱感兴趣的蛋白质。

6、如权利要求 5 所述的方法，其中所说的融合蛋白质是在权利要求 2-4 中任一项权利要求所确定的融合蛋白质。

7、一种从融合蛋白质中分离感兴趣的蛋白质的方法，包括：

a) 在宿主细胞中表达包含感兴趣的蛋白质和如权利要求 1 所述的融合伴侣的融合蛋白质；

b) 在融合伴侣可以吸附的基质上加载融合蛋白质；

c) 从基质上回收融合蛋白质；

d) 用泛素蛋白酶处理回收的融合蛋白质；及

e) 利用对基质的吸附性差异将感兴趣的蛋白质与融合伴侣分离。

8、如权利要求 7 所述的方法，其中所说的融合蛋白质是在权利要求 2-4 中任一项权利要求所确定的融合蛋白质。

9、如权利要求 5 或 7 所述的方法，其中所说的步骤 b) 中在基质上加载融合蛋白质的步骤是 i) 通过在融合伴侣可以吸附的基质上直接加载包含融合蛋白质的细胞抽提物进行，或 ii) 通过在感兴趣的蛋白质可以吸附的基质上加载包含融合蛋白质的细胞抽提物，从基质上回收融合蛋白质，再将回收的融合蛋白质加载到融合伴侣可以吸附的基质上进行。

10、如权利要求 5 或 7 所述的方法，其中所说的基质是离子交换树脂或带电的薄膜。

11、如权利要求 5 或 7 所述的方法，其中所说的感兴趣的蛋白质具有 7.0 或更低的 pI 值。

12、如权利要求 5 或 7 所述的方法，其中所说的感兴趣的蛋白质具有 7.0 或更高的 pI 值。

从融合多肽制备感兴趣的多肽的方法

技术领域

本发明涉及从包含感兴趣的蛋白质和融合伴侣的融合蛋白质分离感兴趣的蛋白质的方法，及可用于该方法的融合蛋白质。

背景技术

随着基因重组技术的发展，难于天然获得的蛋白质可以通过利用基因工程化有机体大规模地生产，因而有助于人类的健康。用于重组技术的宿主包括 E.coli、酵母、动物细胞等等。特别是在蛋白质生产中 E.coli 具有基因易于操作、高产出率和允许使用便宜的培养基的优点。

当感兴趣的蛋白质使用重组 E.coli 生产时，蛋白质可以根据其特性表达为可溶解的形式或不溶的包含体。以可溶解的形式表达的蛋白质由于精确的蛋白质折叠而具有天然性质，在形成三级结构之前可以凝结在一起而不溶的蛋白质不显示其天然特性。因此，不溶蛋白质的包含体必须按照各种方法溶解，然后重新折叠。在后一种情况中，重折叠过程的回收率和产率较低。另外，在不溶解的蛋白质中的许多二硫键给精确的重折叠造成了困难，因此，有利的是产生可溶解形式的感兴趣的蛋白质。

当感兴趣的蛋白质以可溶解的形式表达时，大量地减少显著降低蛋白质的回收率和产率的早期分离步骤如离心和使用膨胀床吸附(EBA)的过滤是可能的。为了以可溶解的形式表达感兴趣的蛋白质，可以将能够以可溶解的形式很好地表达的融合伴侣与感兴趣的蛋白质融合在

一起。融合伴体的例子包括 GST、麦芽糖结合蛋白、硫氧还蛋白、泛素等。泛素是由 76 个氨基酸组成的小多肽。当感兴趣的蛋白质在与泛素的融合肽中表达时，泛素使得该蛋白质以可溶解的形式很好地表达，还提高了其表达率，因而使该蛋白质处于活性形式。

另一方面，当感兴趣的蛋白质以可溶解的形式表达时难于回收纯的蛋白质，而当感兴趣的蛋白质以不溶解的包含体的形式表达时，容易在纯化的早期阶段将包含体与从 E.coli 获得的可溶解物质如宿主细胞蛋白质、DNA、多糖分离开。但是，分离可溶解的感兴趣的蛋白质是非常困难的，因为它与可溶解的污染物如宿主细胞的蛋白质、DNA、多糖混合在一起。包含体可以在破坏细胞以用 EBA 纯化包含体之前通过加入去垢剂如尿素得到溶解，这丧失了如上所述的将不溶解的包含体与从 E.coli 获得的可溶解的物质分离的有利条件。总之，当感兴趣的蛋白质以可溶解的形式表达时，或者要应用到 EBA 过程时，与 DNA、多糖混合的感兴趣的蛋白质进入随后的纯化步骤。因此，仍然需要高效的纯化过程。

在典型的纯化过程中，可以利用电荷、溶解性、大小、疏水性等的不同从细胞内蛋白质中回收感兴趣的蛋白质。这些纯化过程采用了便宜的材料，但具有较低的选择性。因此，为达到理想的纯度，需要包括各种方法的许多步骤，而且通过这些纯化步骤纯化回收率大幅降低。另外，这些方法还存在着纯化步骤必须进行优化以满足各特定的感兴趣的蛋白质的特性的问题。为增加对感兴趣的蛋白质的选择性，通常可以使用亲和色谱法，其中识别该蛋白质的独特的结构的抗体被固定在树脂上，或者对特异的载体具有亲合力的尾可以被用作融合伴体。用于增加选择性的例子包括 GST、多聚组氨酸等(美国专利 5108919

号和韩国专利 177304 号)。在亲合色谱的情况下,对融合伴侣或感兴趣的蛋白质具有亲合力的昂贵的树脂限制了其工业应用。

另外,当感兴趣的蛋白质以融合蛋白质的形式表达时,融合伴侣必须在随后的步骤中通过切割除去,特别是,当感兴趣的蛋白质要应用于医药时,融合多肽必须被设计在感兴趣的蛋白质和融合伴侣之间具有适宜的切割位点以在切割后产生精确的 N-端或 C-端,而且在感兴趣的蛋白质内部没有切割位点。切割反应可以用化学试剂如酸和 CNBr,及蛋白酶如凝血酶原激酶和肠激酶进行。尽管酶具有相对高的选择性,它仍可能切割预期的切割位点之外的其它位点,此外,它还具有低效率和高成本。

在本发明之前,已经发展了包含与感兴趣的蛋白质具有不同的等电点的融合伴侣的融合多肽,并用离子交换色谱进行了制备和分离。美国专利 4532207 号提出,精氨酸尾与带负电的 EGF 融合,然后通过阳离子交换色谱纯化以生产 EGF。但是,该方法具有一个缺点,就是直接连接在感兴趣的蛋白质 C-端的一些离子型氨基酸的电荷被大的感兴趣的蛋白质的相反电荷掩盖,因此融合蛋白质不能有效地吸附在基质上。所以该方法的纯化回收率较低。

在美国专利 5179196 和 5322930 号中,融合多肽分别包含与感兴趣的蛋白质具有不同的电性质的融合伴侣、感兴趣的蛋白质及 SNBR 切割位点和 Staph V8 切割位点。但是,这些专利还存在问题,许多具有相似的等电点的蛋白质以及融合蛋白质也可能被吸附到离子交换色谱上,而且切割方法选择性较差。因此,其它的被吸附到色谱上的蛋白质被切割并与感兴趣的蛋白质一起溶解。

发明内容

本发明提供了一种方便地以高回收率分离感兴趣的蛋白质的 DNA 构造。

本发明还提供一种包含感兴趣的蛋白质和融合伴侣的融合蛋白质以方便地和高效地以高回收率分离感兴趣的蛋白质。

本发明还提供一种方便地和高效地以高回收率分离感兴趣的蛋白质的方法。

本发明提供了一种通过利用等电点的变化分离感兴趣的蛋白质的方法。

附图说明

图 1 为泛素的三级结构示意图。

图 2 为当按照实施例 3 用阳离子交换色谱法分离融合蛋白质时，以各种盐浓度洗脱的融合蛋白质的 SDS-PAGE 分析片断的照片。

图 3 为按照实施例 5 用泛素切割酶处理后，加载到阳离子交换色谱并以 400mM 的盐浓度洗脱所获得的 SDS-PAGE 分析片断的照片。

图 4 为按照实施例 6 用泛素切割酶处理后，加载到阴离子交换色谱并以 400mM 的盐浓度洗脱所获得的 SDS-PAGE 分析片断的照片。

图 5 为按照实施例 7 用反相 HPLC 分析图 3 中的 3 道片断的色谱图。

图 6 为说明通过加载包括融合蛋白质的细胞溶解产物到阳离子交换树脂上，用低盐浓度的盐溶液洗涤及与吸附在阳离子交换树脂上的

泛素切割酶反应可以制备高纯度的感兴趣的蛋白质的 SDS-PAGE 照片。

图 7 为通过 EBA 在阳离子交换树脂上吸附细胞抽提物、沉淀及与阳离子交换树脂柱中的泛素切割酶反应所获得的 SDS-PAGE 分析片断的照片。

图 8 为按照实施例 11 加载在薄膜上的样品、用 NaCl 溶液洗脱的溶液、脱盐后的 UBP 切割反应溶液和使 UBP 反应溶液通过薄膜获得的片断的 SDS-PAGE 分析的照片。

图 9 为按照实施例 13 加载在薄膜上的样品、用 NaCl 溶液洗脱的溶液、脱盐后的 UBP 切割反应溶液和使 UBP 反应溶液通过薄膜获得的片断的 SDS-PAGE 分析的照片。

具体实施方式

本发明涉及从包含感兴趣的蛋白质和融合伴体的融合蛋白质分离感兴趣的蛋白质的方法、融合伴体及可用于该方法的融合蛋白质。

更具体地说，本发明提供了一种包含感兴趣的蛋白质和融合伴体的融合蛋白质，其中融合伴体包含可以被泛素切割酶在其 C-端进行切割的氨基酸序列，而且其中感兴趣的蛋白质和融合伴体之间的等电点的差异至少为 1。

除了特别指出的外，名词“蛋白质”、“肽”和“多肽”可互换使用。

名词“泛素切割酶”是指切割在蛋白质如真核细胞中的泛素的 C-端与 RGG 相邻的肽键的酶。例如，该酶包括从酿酒酵母中获得的 UBPI

和 UBP2、肌肉细胞中的 UBP41 等。由于泛素切割酶精确地切割相邻于泛素第 76 位氨基酸甘氨酸的肽键，在感兴趣的蛋白质中产生精确的 N-端是可能的(美国专利 5847097 号)。

在本发明中，泛素可以被修饰以包括含 6-10 个选自 His、Lys 和 Arg 的组的氨基酸的尾。例如，修饰后的泛素可以是多聚组氨酸、多聚赖氨酸或多聚精氨酸等。

名词“感兴趣的蛋白质”是指要制备的蛋白质，包括生理活性蛋白质如生长激素、干扰素、白介素、粒细胞集落刺激因子、促红细胞生成素和胰岛素。

这里，名词“融合伴侣”是指包含可被泛素切割酶在其 C-端进行切割的氨基酸序列，例如 RGG，且与感兴趣的蛋白质的等电点相比具有 1 个或更多，优选为 1.5 个或更多，更优选为 2 个或更多的差异的肽。优选的融合伴侣为使感兴趣的蛋白质以可溶解的形式表达的肽，也就是说，融合伴侣可包括 i) 泛素切割位点，氨基酸序列可被泛素切割酶在其 C-端切割，如泛素、泛素的部分和由它们获得的肽，及 ii) 在泛素切割位点的 N-端的使融合蛋白质以可溶解的形式表达的肽或其变体，如谷光甘肽 S 转移酶、麦芽糖结合蛋白或硫氧还蛋白。

在本发明的一种实施方式中，融合伴侣中的至少一个氨基酸可被替换、缺失或插入以使等电点的差异至少为 1。

融合伴侣可包括电荷可以发生变化的肽，电荷的变化可通过包含在融合伴侣的 N-端或内部位点具有与感兴趣的蛋白质不同的电荷的氨基酸序列实现。与感兴趣的蛋白质具有不同的电荷的氨基酸序列可以是包含至少一种选自 His, Lys 和 Arg 的氨基酸的氨基酸序列。优选，该

氨基酸序列可以是由 2-30 个氨基酸组成的肽，如多聚组氨酸、多聚赖氨酸和多聚精氨酸。

或者，与感兴趣的蛋白质具有不同的电荷的氨基酸序列可以是包含至少一种选自谷氨酸和天冬氨酸的氨基酸的氨基酸序列。

优选，该氨基酸序列可以是由 2-30 个氨基酸组成的肽，如多聚谷氨酸、多聚天冬氨酸等。例如，融合伴侣可以包括泛素、泛素的部分或其变体、及包含泛素或泛素切割位点的合成肽，其包括在 N-端或内部位点具有与感兴趣的蛋白质不同的电荷的氨基酸序列。

这里，名词“具有与感兴趣的蛋白质的电荷不同的电荷的氨基酸序列”意思是在融合蛋白质或感兴趣的蛋白质的纯化过程所使用的 pH 条件下具有与感兴趣的蛋白质的电荷不同的电荷的氨基酸序列，因而在感兴趣的蛋白质和融合伴侣之间产生对基质的吸附差异。如果感兴趣的蛋白质的 pH 是已知的，就有可能设计出产生电荷差异的氨基酸序列。

例如，当感兴趣的蛋白质具有 7 或更低的等电点时，可以使用连续连接至少两个带正电荷的氨基酸，如 Lys 和 Arg 的氨基酸序列。当感兴趣的蛋白质具有 7 或更高的等电点时，可以使用连续连接至少两个带负电荷的氨基酸，如谷氨酸和天冬氨酸的氨基酸序列。

具有与感兴趣的蛋白质的电荷不同的电荷的氨基酸序列可以位于融合伴侣的 N-端或内部位点。通过改变融合伴侣的电荷容易地改变融合伴侣和感兴趣的蛋白质对基质，如离子交换树脂的吸附程度是可能的。

尽管大多数用于医疗用途的蛋白质具有 7.0 或更低的等电点, 细胞提取物中的核酸和内毒素也显示出低的等电点分布。因此, 通过感兴趣的蛋白质与高 pI 的融合伴侣的结合将融合蛋白质与来自于细胞的污染物分离是可能的。

例如, 由于泛素具有接近于中性 pI 值的 6.56 的 pI 值, 因此根据等电点的差异使用离子交换树脂或薄膜将弱酸性的感兴趣的蛋白质与污染物质如核酸、内毒素和宿主细胞的蛋白质分离是困难的。在这种情况下, 通过用在泛素的 N-端或内部位点插入的阳离子肽尾修饰泛素以产生包含修饰的泛素和感兴趣的蛋白质的融合蛋白质从而增加融合蛋白质的 pI 是可能的。因此, 可轻易地将融合蛋白质与来自于宿主细胞的污染物质分离。

另外, 包括离子型氨基酸的尾可以被连接到泛素的 N-端以产生感兴趣的蛋白质和要被泛素切割酶切割的融合伴侣之间的等电点差异。此外, 泛素可以通过替换至少一个泛素的氨基酸, 或通过向其中插入一个离子型氨基酸进行修饰。

本发明的融合伴侣可以是至少一个位于泛素的三级结构的表面上的氨基酸可被替换而具有不同的电荷的修饰后的泛素。例如, 至少一个位于泛素的三级结构的表面上的氨基酸可以用至少一个选自 His、Lys 和 Arg 的氨基酸, 或至少一个选自 Glu 和 Asp 的氨基酸替换。

参照如图 1 中所示的泛素的三级结构(Vijay-Kumar et al., J Mol Biol, 194: pp. 531(1987)), 可以选择适宜被替换的氨基酸。在融合伴侣中可被替换的氨基酸满足氨基酸的替换改变泛素的表面电荷的要求, 而为了使泛素切割酶在替换后识别融合蛋白质不改变泛素的三级结构。被

替换的氨基酸在二级结构中可以从位于环上但不在 α -螺旋和 β -片的二级结构中，且位于三级结构的表面上的氨基酸选择。

融合伴侣可以选自至少一个选自包含 Glu16、Glu18 和 Glu64 的组中的位点上的氨基酸可被替换的修饰后的泛素。优选在 Glu16、Glu18 和 Glu64 上的氨基酸可分别被 His、Lys 和 Arg 替换。

在本发明中，名词“细胞提取物”包括含有包含感兴趣的蛋白质的融合蛋白质的细胞溶解物和培养物溶液。

本发明提供了一种使用融合蛋白质分离感兴趣的蛋白质的方法。

另外，本发明提供了一种从融合蛋白质中分离感兴趣的蛋白质的方法。包括：

- a) 在宿主细胞中表达包含感兴趣的蛋白质和融合伴侣的融合蛋白质；
- b) 将融合蛋白质加载在融合伴侣可以吸附的基质上；
- c) 用泛素切割酶处理吸附的蛋白质；及
- d) 从基质上洗脱被切割的感兴趣的蛋白质。

本发明还提供一种从融合蛋白质中分离感兴趣的蛋白质的方法，包括：

- a) 在宿主细胞中表达包含感兴趣的蛋白质和融合伴侣的融合蛋白质；
- b) 将融合蛋白质加载在融合伴侣可以吸附的基质上；

c) 从基质上回收融合蛋白质;

d) 用泛素切割酶处理回收的融合蛋白质;

e) 通过利用感兴趣的蛋白质和融合伴侣之间对基质的吸附性差异分离感兴趣的蛋白质和融合伴侣。

在上述分离感兴趣的蛋白质的步骤中, 步骤 b)中在基质上加载融合伴侣的步骤可以 i) 通过在融合伴侣可以吸附的基质上加载包含融合蛋白质的细胞抽提物进行, 或 ii)通过在感兴趣的蛋白质可以吸附的基质上加载包含融合蛋白质的细胞抽提物, 从基质上回收融合蛋白质, 再将回收的融合蛋白质加载到融合伴侣可以吸附的基质上进行。

基质可以是离子交换树脂或带电的薄膜。可在本发明中应用的感兴趣的蛋白质和融合伴侣可以是具有1个或更多, 优选为1.5个或更多, 更优选为2个或更多的等电点差异的肽或蛋白质。例如, 感兴趣的蛋白质可以是具有7.0或更高, 或者7.0或更低的等电点的蛋白质。

在一个方面, 本发明提供了一种分离或纯化感兴趣的蛋白质的高效的方法, 包括:

a) 在宿主细胞中表达包含感兴趣的蛋白质和融合伴侣的融合蛋白质, 其中融合伴侣包含在N-端或内部位点具有不同于感兴趣的蛋白质的电荷的氨基酸序列, 和可以被泛素蛋白酶在其C-端进行切割的氨基酸序列;

b) 在融合蛋白质可以吸附的基质上加载含有融合蛋白质的细胞抽提物;

c) 用泛素蛋白酶处理吸附的基质; 及

d) 从基质上洗脱切割的感兴趣的蛋白质。

在另一个方面，本发明提供了一种分离或纯化感兴趣的蛋白质的高效的方法，包括：

a) 在宿主细胞中表达包含感兴趣的蛋白质和融合伴侣的融合蛋白质，其中融合伴侣包含在 N-端或内部位点具有不同于感兴趣的蛋白质的电荷的氨基酸序列，和可以被泛素蛋白酶在其 C-端进行切割的氨基酸序列；

b) 在融合伴侣可以吸附的基质上加载含有融合蛋白质的细胞抽提物；

c) 从基质上回收融合蛋白质；

d) 用泛素切割酶处理回收的融合蛋白质；及

e) 通过利用感兴趣的蛋白质和融合伴侣之间对基质的吸附性差异分离感兴趣的蛋白质和融合伴侣。

在本发明的实施方式中，本发明提供了制备具有 7.0 或更低的 pI 值的感兴趣的蛋白质的方法。更具体地说，包含感兴趣的蛋白质的融合蛋白质被吸附到基质上，然后被吸附到离子交换树脂或薄膜上的融合蛋白质在不洗脱融合蛋白质的情况下直接用泛素切割酶处理，从而产生高纯度的蛋白质。该方法包括表达包含具有 7.0 或更低的 pI 值的感兴趣的蛋白质和融合伴侣的融合蛋白质的步骤，其中融合伴侣包含被泛素切割酶在其 C-端切割的氨基酸序列，和在 N-端或内部位点至少有两个带正电荷的氨基酸的氨基酸序列，还包括在融合伴侣可以吸附的离子交换树脂或薄膜上加载含有融合蛋白质的细胞抽提物的步骤，

用泛素切割酶处理离子交换树脂的步骤，及从离子交换树脂或薄膜上洗脱感兴趣的蛋白质的步骤。

在用泛素切割酶处理之前，弱吸附于基质的来自于宿主细胞的污染物蛋白质、内毒素和核酸可以通过以低浓度的不能使融合蛋白质脱离的盐溶液洗涤树脂塔而被洗脱，因此增加了最终产物的纯度。在融合蛋白质的酶切割之后，感兴趣的蛋白质可以通过应用低浓度的只能洗脱感兴趣的蛋白质的盐溶液选择性地以高浓度地洗脱。

在另一个方面，本发明提供了一种制备具有 7.0 或更低的 pI 值的感兴趣的蛋白质的方法。更具体地说，该方法包括表达包含具有 7.0 或更低的 pI 值的感兴趣的蛋白质和融合伴侣的融合蛋白质的步骤，其中融合伴侣包含被泛素切割酶在其 C-端切割的氨基酸序列和在 N-端或内部位点至少有两个带正电荷的氨基酸的氨基酸序列，还包括在融合伴侣可以吸附的阳离子交换树脂上加载含有融合蛋白质的细胞抽提物的步骤，从阳离子交换树脂或薄膜上回收融合蛋白质的步骤，用泛素切割酶处理回收的融合蛋白质的步骤，及通过利用融合伴侣和感兴趣的蛋白质之间对离子交换树脂的吸附差异分离感兴趣的蛋白质的步骤。例如，通过利用吸附差异分离感兴趣的蛋白质和融合伴侣的步骤可以通过在阴离子交换树脂上加载以泛素切割酶处理的融合蛋白质以洗脱融合伴侣、然后在吸附融合蛋白质后洗脱吸附的感兴趣的蛋白质，或者通过在阳离子交换树脂上加载以泛素切割酶处理的融合蛋白质以吸附融合伴侣、然后洗脱感兴趣的蛋白质而进行。

在本发明的实施方式中，本发明提供了一种制备具有 7.0 或更高的 pI 值的感兴趣的蛋白质的方法，更具体地说，该方法包括表达包含具有 7.0 或更高的 pI 值的感兴趣的蛋白质和融合伴侣的融合蛋白质的步

骤，其中融合伴侣包含被泛素切割酶在其 C-端切割的氨基酸序列和在 N-端或内部位点至少有两个带负电荷的氨基酸的氨基酸序列，还包括在感兴趣的蛋白质可以被吸附的阳离子交换树脂上加载含有融合蛋白质的细胞抽提物的步骤，从阳离子交换树脂上回收融合蛋白质的步骤，在融合伴侣可以被吸附的阴离子交换树脂上加载融合蛋白质的步骤，从阴离子交换树脂上回收融合蛋白质的步骤，用泛素切割酶处理回收的融合蛋白质的步骤，及通过利用对阴离子交换树脂的吸附差异分离感兴趣的蛋白质的步骤。

特别是，因为大多数细胞内蛋白质具有接近于弱酸性 pH 的等电点，细胞抽提物中的蛋白质、核酸和内毒素在 pH7.0 时带负电荷。按照本发明，融合伴侣可以被修饰以包括带正电荷的氨基酸序列。因此，大多数细胞内蛋白质、核酸和/或内毒素可轻易地通过使含有融合蛋白质的细胞抽提物经过阳离子交换树脂而被消除。

可应用于本发明的阳离子交换树脂包括 CM Sepharose、SP Sepharose 等。阴离子交换树脂包括 Q Sepharose、DEAE Sepharose 等。

在本发明中，在产生融合蛋白质之后获得的宿主的细胞抽提物可以使其直接进入膨胀床吸附步骤，从而减少早期分离步骤，如离心和过滤的数目。膨胀床吸附色谱可以从细胞抽提物中除去固体污染物，并在一个步骤中提供需要的蛋白质，从而该色谱可以取代初始分离过程如现有生产方法的离心和过滤。

感兴趣的蛋白质的纯度可以用反相 HPLC 检测。按照本发明的方法，可以降低混合在感兴趣的蛋白质中的 DNA 和内毒素的量。

在本发明，各种蛋白质可以与融合伴侣融合并使用适宜的表达式在适宜的原核细胞和真核细胞中表达。

本发明进一步通过下述的实施例阐明。下述的实施例只是阐述本发明，而不是用于限制如权利要求所述的本发明的范围。

实施例 1: 产生 K6Ub-hGH 的表达载体

编码人生长激素的基因(Genbank Accession No. K02383, 人生长激素合成基因, 完全 CDS)被克隆入 pGNX2 载体(韩国专利公布号 0319529)以产生 pGNX2hGH。使用 pGNX2hGH 作为模板及使用 hGHN 和 hGHCB 作为引物扩增 400bp 的产物, 然后用 BamH1 切割。

通过 PCR 使用 Genbank Accession No. M17524 的基因(合成人泛素基因, 完全 cds) 作为模板及使用正向引物 (5'-GCAGCATATGCAGATTTTCGTC-3'(UBF)) 和反向引物 (5'-CGACGGCGCCACCTCTTAGCC-3 '(UBR))扩增编码泛素的基因, 然后用 Nde1 切割 203bp 的扩增产物。所获得的产物与用 HindIII 切割的 pUC18 连接以产生 pUC18Ubq。为融合 hGH 基因, pUC18Ubq 用 sfo1 和 BamH1 切割, 然后与 400bp 的 PCR 产物融合以产生 pUC18ubhGH。为将 pUC18ubhGH 转移到表达载体, pGNX4(韩国专利公布号 0319529) 和 pUC18ubhGH 用 Nde1 和 BamH1 切割, 然后连接以产生 pGNX4ubhGH。E.coli XL1-Blue MR 用 pGNX4ubhGH 进行转化, 在含有卡那霉素的培养基中进行筛选, 然后在 LB 液体培养基中培养。在 $OD_{600}=0.6$ 的细胞密度下, 通过加入 0.5mM 的 IPTG 诱导在细胞中的人生长激素的表达, 且该表达用 SDS-PAGE 分析进行确认。

为融合 6 赖氨酸尾到融合蛋白质的 N-端, 赖氨酸尾的串、KTT(表 1)被合成并通过 PCR 使用 5'-引物(KTN)和 3'-引物(KTC)进行扩增以获得 45bp 的 PCR 产物。该 PCR 产物用 NdeI(NEB, England)和 AseI(NEB, England)切割, 并与用 NdeI 切割的 pGNX4ubhGH 融合以产生 pGNX46UbhGH。

E.coli XL1-Blue MR 用 pGNX46UbhGH 转化, 在含有卡那霉素的培养基中进行筛选, 然后在 LB 液体培养基中摇瓶培养。通过加入 1mM 的 IPTG 诱导在细胞中的人生长激素的表达, 且该表达用 SDS-PAGE 分析进行确认。表达的质粒 DNA 的序列分析证实 N-端的 6 赖氨酸尾通过 AAG AAA AAA AAG AAA AAG 的密码子进行编码。

实施例 2: K10-UBP 表达载体的产生

为克隆 UBPI 基因, S.cerevisiae ATCC 208275 的基因组被用作模板并通过 PCR 使用 UBPN 和 UBPC 的引物(表 1)进行扩增以产生 2400bp 的 UBPI 基因。UBPI 在 pRSETc 载体的 NdeI 和 BamHI 位点之间克隆。克隆的载体和 pGNX4 载体用 NdeI 和 BamHI 切割并融合以获得 pGNX4UBPI。E.coli XL1-Blue MR 用 pGNX4UBPI 转化, 在含有卡那霉素的培养基中进行筛选, 然后在含有卡那霉素的 LB 液体培养基中培养。在 $OD_{600}=0.6$ 的细胞密度下, 通过加入 0.5mM 的 IPTG 诱导在细胞中的 UBPI 的表达。通过用 UBPI 切割实施例 1 的融合蛋白质确定 UBPI 的活性。

为在保持 UBPI 活性的情况下方便地纯化, 10 赖氨酸被连接到融合肽的 N-端。具有 10 AAG 密码子的寡聚核苷酸的 10K(表 1)被合成, 且 10K 中的 NdeI 和 AseI 位点用限制性内切酶切割, 然后与用 NdeI

和 CIP 切割的 pGNX4UBP1 融合以产生 pGNX410KUBP1。用与 pGNX4UBP1 相同的检测 UBPI 的活性。

在实施例 1 和 2 中的引物序列如下述的表 1 所示。

[表 1]

| 引物 | 核酸序列(5'→3') | SEQ ID 号 |
|-------|---|----------|
| UBF | 5'-GCAGCATATGCAGATTTTCGTC-3' | 1 |
| UBR | 5'-CGACGGCGCCACCTCTTAGCC-3' | 2 |
| hGHN | 5'-TTTCCAACCATCCACTG-3' | 3 |
| hGHCB | 5'-GACTGGATCCTTAAAAACCACAAGAAC C-3' | 4 |
| KTN | 5'-GGGGAATTCCATATG-3' | 5 |
| KTT | 5'-GGGGAATTCCATATGAARAARAARAAR AARAATAATGGATCCCCC-3' | 6 |
| KTC | 5'-GGGGGATCCATTAAT-3' | 7 |
| UBPN | 5'-CTACCGCGGTTTCATATGGCTTTTGTATTAT TGAAAGAAG-3' | 8 |
| UBPC | 5'-ATTGGATCCTTAGTTTACATCTTTACC-3' | 9 |
| 10K | 5'-GGCCATATG(AAG)10ATTAATGGCC-3' | 10 |

注：R 为腺嘌呤或鸟嘌呤

实施例 3：蛋白质的产生和分离

用在实施例 1 中获得的 pGNX4K6UbhGH 表达载体转化 E.coli TG1 以产生转化体群体，该转化体群体接种在含有 50mg/L 的卡那霉素的 5mL 的 LB 培养基，并在 37°C 培养。1mL 的培养的转化体被接种在 100mL 的含有 5g/L 的葡萄糖的 R 培养基中(R 培养基的组成如表 2 所示)并在 30°C 培养。所获得的培养物被接种在 1.4L 的含有 15g/L 葡萄糖的 R 培养基中并按照 fed-batch 培养法进行培养，其中在葡萄糖量为 0g/L 时加入 500g/L 的葡萄糖溶液。当培养物溶液的吸光率达到大约 70 时，通过加入 1mM 的 IPTG 诱导蛋白质的表达。细胞用离心法收获，在 20mM 的磷酸缓冲液(pH7.5)中悬浮，然后用微流化剂裂解。细胞抽

提物以 15000rpm 离心 60 分钟以产生溶解的细胞抽提物的上清液，然后溶解的细胞抽提物用离子交换树脂进行分离。

[表 2]

| 成分 | 加入量 |
|--|----------|
| KH_2PO_4 | 3g/L |
| K_2HPO_4 | 3g/L |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 4 g/L |
| 柠檬酸三钠 | 2.3 g/L |
| 酪蛋白氨基酸 | 2 g/L |
| 葡萄糖 | 5 g/L |
| $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.22ml/L |
| 痕量金属溶液 | 1 ml/L |
| 卡那霉素 | 100 mg/L |
| 硫胺 | 5 mg/L |

Econo-Park 柱(Bio-Rad, USA)被用 2mL 的 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换树脂(Pharmacia, 瑞典)填充, 并在 1mL/min 下操作。磷酸缓冲液(pH7.5)被用作流动相, 且在加载样品之前柱用 15 柱床体积的磷酸缓冲液平衡。柱用上清溶液加载, 用 3 柱床体积的缓冲液溶液冲洗, 并用含有同样的流动相的缓冲物质和各种浓度的 NaCl 的各种溶液洗脱。也就是, 分别使用 6ml 具有 200、400、600、800 和 1000mM 的 NaCl 浓度的缓冲液溶液。在洗脱后用 6 柱床体积的 1M 的 NaCl 缓冲液溶液冲洗柱。通过使用具有各种盐浓度的洗脱溶液获得的部分以 SDS-PAGE 进行分析, 其结果如图 2 所示(SM: 分子量标志, 1: 流过部分, 2: 用缓冲液溶液洗脱的溶液, 3: 用具有 200mM 的 NaCl 的缓冲液溶液洗脱的溶液, 4: 用具有 400mM 的 NaCl 的缓冲液溶液洗脱的溶液, 5: 用具有 600mM 的 NaCl 的缓冲液溶液洗脱的溶液, 6: 用具有 800mM 的 NaCl 的缓冲液溶液洗脱的溶液, 7: 用具有 1M 的 NaCl 的缓冲液溶液洗脱的溶液)。

如图 2 中所示, 融合蛋白, K6Ub-hGH 在 400mM 的盐浓度下被洗脱, 因而除去了大部分来自于 E.coli 的污染蛋白质。但是, 融合蛋白质被与各种阳离子蛋白质吸附在一起。

实施例 4: 产生泛素切割酶

用在实施例 2 中产生的表达载体 pGNX410KUBP1 转化 E.coli TG1, 且重组体 E.coli 按照实施例 3 的方法培养以产生与 10 赖氨酸尾 (K10-UBP) 融合的泛素切割酶。按照与实施例 3 基本相同的方法, 获得重组体 E.coli 的细胞抽提物, 且使用阳离子交换色谱法分离酶。在实施例 1 中, K6Ub-hGH 用具有 400mM 盐浓度的缓冲液溶液洗脱 (K6Ub-hGH 400mM 部分), 而在该实施例中, K10-UBP 也出现于在 400mM 盐浓度下获得的部分 (K10-UBP 400mM 部分) 中。因此, 含有两个融合蛋白质的溶液可以被调节到具有相同的离子强度。

实施例 5: 使用泛素切割反应和阳离子交换树脂的分离过程

在实施例 3 中部分地分离的 K6Ub-hGH 400mM 部分和在实施例 4 中部分地分离的 K10-hGH 400mM 部分以 50:1 的比例混合, 在 30℃ 进行 1 小时的切割, 并用 SDS-PAGE (图 3, 2 道) 进行分析。

反应溶液用 20mM 的磷酸缓冲液 (pH7.5) 以 1:1 的比例稀释以降低离子强度, 并被加载到 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换树脂柱上。人生长激素在不被吸附到树脂上的情况下被直接洗脱。其它的蛋白质被吸附到阳离子交换色谱上, 从而以高回收率和高纯度分离人生长激素 (图 3, 道 1: K6Ub-hGH 400mM 洗脱部分, 2: 用 UBP 处理 K6Ub-hGH 400mM 洗脱部分后, 3: 用 UBP 处理后通过洗脱 K6Ub-hGH 400mM 溶液获得的流过溶液, 4: 用缓冲液冲洗的溶液, 5: 用具有 200mM 的

NaCl 的缓冲液冲洗的溶液, 6: 用具有 1M 的 NaCl 的缓冲液冲洗的溶液)。

实施例 6: 通过使用泛素切割反应和阴离子交换树脂的分离过程

在实施例 3 中部分地分离的 K6Ub-hGH 400mM 部分和在实施例 4 中部分地分离的 K10-hGH 400mM 部分以 50:1 的比例混合, 在 30℃ 进行 1 小时的切割, 并用 PD-10 柱(Pharmacia)脱盐以很好地在阴离子交换色谱上吸附人生长激素。脱盐的反应溶液被加载到 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂柱上, 并用 20mM 的磷酸缓冲液冲洗以除去不吸附的蛋白质。人生长激素用 200mM 的盐溶液洗脱(图 4, 道 1: 用 UBP 处理 K6Ub-hGH 400mM 洗脱部分所获得的溶液, 2: 用 UBP 处理后通过加载 K6Ub-hGH 400mM 获得的洗脱溶液, 4: 用具有 50mM 的 NaCl 的缓冲液冲洗的溶液, 5: 用具有 200mM 的 NaCl 的缓冲液冲洗的溶液, 6: 用具有 1M 的 NaCl 的缓冲液冲洗的溶液)。

实施例 7: 反相 HPLC 分析

为确定通过实施例 5 获得的人生长激素的纯度, 进行反相 HPLC。从图 3 的 3 道部分获得的部分被用作样品。柱为 Vydac®C4(300A, 5 μ m, 4.6mm id \times 250mm, USA)。分析条件按照欧洲药典(欧洲药典 1999: 0951)上描述的人生长激素的分析条件设定。柱温保持在 45℃, 且 29%的异丙醇和 71%的 50mM Tris 缓冲液(pH7.5)被用作流动相, 流速为 250 μ l/min。如图 5 中所示, 通过使用两个离子交换树脂的纯化步骤获得了具有 99%或更高纯度的人生长激素。

实施例 8: 树脂柱中的切割反应

按照实施例 3 安装 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱，用磷酸缓冲液(pH7.5)平衡，然后 3mL 的 K6UbhGH 400mM 部分用相同体积的缓冲液稀释以降低离子强度，并注射到柱中。通过 6mL 的缓冲液冲洗除去不吸附的蛋白质，1mL 含有 K10-UBP 400mM 部分的部分用相同体积的缓冲液稀释，并注射到树脂塔中，然后在室温下反应 1 小时。在反应后，切割的人生长激素通过注入 6mL 的具有 200mM 的 NaCl 的缓冲液洗脱，然后残留的吸附蛋白质通过注入 6mL 的具有 1M 的 NaCl 的缓冲液洗脱。从各步骤中获得的部分用 SDS-PAGE 进行分析以在图 6 中显示其结果(SM: 分子量标志, 1: K6UbhGH 400mM 部分, 2: 用缓冲液冲洗的溶液, 3: 加载 K10-UBP 400mM 部分后洗脱的溶液, 4: 用具有 200mM 的 NaCl 的缓冲液冲洗的溶液, 5: 用具有 1M 的 NaCl 的缓冲液冲洗的溶液)。

包含在 K6UbhGH 400mM 部分中的蛋白质很好地吸附在阳离子交换树脂上，因此使用缓冲液的预洗脱步骤(2 道)中不洗脱。与此相似，包含在 K10-UBP 400mM 部分中的蛋白质吸附良好(3 道)。在泛素切割酶的切割反应后，人生长激素被从融合蛋白质中释放出来。在切割反应后，塔用具有 200mM 的 NaCl 的缓冲液灌注，然后切割的人生长激素以高纯度出现在洗脱部分中(4 道)。

实施例 9: 分离过程中应用 EBA

用 100ml STREAMLINE®树脂填充的 STREAMLINE®25 以磷酸缓冲液(pH7.5)平衡，然后用按照实施例 3 获得的含有 K6Ub-hGH 融合蛋白质的细胞抽提物(400ml)从底部向上注入，以使柱床的膨胀率为 2。在样品注入之后，柱用 2 倍树脂体积的磷酸缓冲液冲洗以除去固体物质如细胞残片、DNA 和细胞蛋白质。为从吸附在树脂上的融合蛋白质

切割人生长激素，树脂被沉淀，且 50ml 在实施例 4 中获得的 K10-UBP 溶液用缓冲液稀释，然后被注入柱中。通过用蠕动泵使柱中的溶液循环进行反应，且通过用分光光度计测定吸光率来确定切割反应的进行程度。随着反应的进行，从吸附的融合蛋白质切割的人生长激素释放增加，且在 3 小时后，吸光率不再增加，表明反应的中止。在反应后，释放的人生长激素通过注入具有 100mM 的 NaCl 的缓冲液洗脱，并分别用含有 600mM 和 1M 的 NaCl 的溶液冲洗(图 7，道 1: 分子量标志，2: 细胞溶解物，3: 注入细胞溶解物后冲洗的溶液，4: UBP 处理后洗脱的溶液，5: 用具有 100mM 的 NaCl 的缓冲液冲洗的溶液，6: 用具有 600mM 的 NaCl 的缓冲液冲洗的溶液，7: 用具有 1M 的 NaCl 的缓冲液冲洗的溶液)。

实施例 10: 产生 pGNX4K6UblFNalpha-2b 表达载体

为融合泛素蛋白和干扰素蛋白，进行了两步的 PCR。

在第一步中，泛素基因通过使用包含泛素编码基因(Genbank Accession No. M17524, 合成人泛素基因, 完全 cds)的载体作为模板及 F6KUb(如表 3 中所示包含 Nde I 位点、6 赖氨酸、泛素的 5'-端)和 ORIFN(包含泛素的 3'-端和人干扰素的 5'-端)作为引物以分别产生 250bp 和 500bp 的 PCR 产物。

在第二步中，为融合两个 PCR 产物，作为模板的 PCR 产物用引物 F6KUb(包含 Nde I 位点、6 赖氨酸、泛素的 5'-端)和引物 RIFN(包含人干扰素的 3'-端和 Bam HI 位点)以产生 750bp 的 PCR 产物。所获得的产物和 pGHNX4 用 NdeI 和 Bam HI 切割，并连接以产生

pGNX4K6UblFNalpha-2。载体的核酸序列分析证实，6 赖氨酸尾、泛素和人干扰素表达在蛋白质中。

用 pGNX4K6UblFNalpha-2b 转化 E.coli TG1，且通过加入 0.5mM 的 IPTG 诱导融合肽的表达，并用 SDS-PAGE 进行分析。在实施例中使用的引物序列如表 3 中所示。

[表 3]

| 引物 | 核酸(5'→3') | 注释 | SEQ ID 号 |
|-------|--|-------------------------------|----------|
| F6Kub | 5'-GGGTAAACATATGGAGGATGAG GATGAAGACAAGATTTTCGTCAAG AC-3' | Nde I 位点、 ATG 和 6 赖 氨酸尾 | 11 |
| ORIFN | 5'-AGGGAGATCACAGCCACCTCTT AGCCTTAGCACA-3' | - | 12 |
| OFIFN | 5'-TAAGAGGTGGCTGTGATCTCCC TGAGACCCACA-3' | - | 13 |
| RIFN | 5'-GCGCGGATCCTTATTCCTTCCTC CTTAATCTT-3' | TAG 和 Bam H1 位点 | 14 |

实施例 11: 用阳离子薄膜分离干扰素

用 pGNX4K6UblFNalpha-2b 转化 E.coli TG1，并选择表达融合蛋白质的克隆。克隆在 5ml 的 LB 培养基培养并接种到 100ml 的 LB 培养基中。在吸光率为 1.5-2 时，通过加入 IPTG 诱导干扰素的表达，并在加入 IPTG 4 小时后收获细胞。细胞通过在 1300rpm 离心 3 分钟进行回收，在 4ml 的 20mM 磷酸缓冲液中悬浮，然后用超声发生器破碎细胞。通过在 1300rpm 离心 30 分钟取得上清液以在下面的分离步骤中使用。

Vivapure S mini H(Vivascience, 德国)阳离子交换薄膜在用 20mM 的磷酸缓冲液平衡后用于纯化干扰素。含有干扰素的上清液被加载到薄膜上，并通过 1200g 的离心吸附。该薄膜用 0.4ml 的磷酸缓冲液清洗

两次，并用具有 1M 的 NaCl 的磷酸缓冲液洗脱。0.1ml 的洗脱部分用具有 3500 的分子分离点的透析设备(Slide-A-Lyzer mini, Pierce, USA)脱盐 1 小时，并用 UBPI 处理。在 2 小时的切割反应之后，反应溶液被加载到用 20mM 的磷酸缓冲液平衡的薄膜上，并在 1200g 离心 5 分钟。不吸附的干扰素以高纯度出现在通过薄膜的部分中(图 8, 道 1: 加载以 1/10 的比例稀释的样品, 2: 用具有 1M 的 NaCl 的缓冲液洗脱的溶液, 3: 脱盐后的 UBP 切割反应溶液, 4: 在切割反应后通过薄膜的部分)。

实施例 12: 修饰泛素

为在保持三级结构以使泛素切割酶能够识别泛素-融合蛋白的情况下改变泛素的表面电荷，考虑到泛素的三级结构，在 16 位、18 位和 64 位上的带负电的谷氨酸被精氨酸或赖氨酸替换以改变等电点。为修饰泛素，进行两步骤 PCR。

在第一步的 PCR 中，使用在目标位点具有不同的 DNA 序列的引物。也就是，引物 FMUB1 被用于修饰在泛素的 16 位和 18 位上的谷氨酸，引物 RMUB1 被用于修饰泛素的 64 位上的谷氨酸。通过使用 FMUB2 的正向引物(包含 ATG 和 Nde I 位点)和 RMUB2 的反向引物(包含 Sfo I 位点)扩增 PCR 产物以产生修饰的泛素基因。修饰的泛素基因被克隆入 pGEM-T 简易载体中以产生 pGEM-Mub 载体。载体的序列分析表明，获得了想要的修饰泛素。

进行第二步 PCR 以融合修饰的泛素基因和人生长激素基因。通过使用 pGEM-Mub 作为模板及引物 FMUB2(包含 Nde I 位点、ATG 和修饰的泛素的 5'-端)和引物 OrhGH(包含修饰的泛素的 3'-端和人生长激素的 5'-端)进行扩增以产生 250bp 的 PCR 产物。

人生长激素基因通过使用包括编码人生长激素的基因(Genbank Accession No. K02382, 人生长激素合成基因, 完全 cds)作为模板, 及引物 OFhGH(包含修饰的泛素的 3'-端和人生长激素的 5'-端)和引物 RhGH(包含人生长激素的 3'-端和 Bam HI 位点)以产生 600bp 的 PCR 产物。为融合该 PCR 产物, 作为模板的 PCR 产物用引物 FMUB2(包含 Nde I 位点和修饰的泛素的 5'-端)和 RhGH(包含人生长激素的 3'-端和 Bam HI 位点)以产生 900bp 的 PCR 产物。融合的 PCR 产物和表达载体 pGNX4 用 Nde I 和 Bam HI 切割, 并连接以产生 pGNX4MubhGH 载体。载体的核酸序列分析证实, 修饰的泛素与人生长激素融合。

实施例 13: 用修饰的泛素分离人生长激素

用 pGNX4MubhGH 载体转化 E.coli, 并选择表达融合蛋白质的克隆。克隆在 5ml 的 LB 培养基中预培养, 且 3%的培养物溶液被接种到 100ml 的 LB 培养基中。当吸光率为 1.5-2 时, 通过加入 IPTG 诱导融合蛋白质的表达, 且在加入 IPTG 4 小时后收获细胞。细胞通过在 13000rpm 离心 3 分钟进行回收, 悬浮在 20mM 的 MES 缓冲液中以使吸光率为 50, 并用超声发生器破碎细胞。通过在 13000rpm 离心 30 分钟取得上清液, 然后在下面的分离步骤中使用。

Vivapure S mini H(Vivascience, 德国)阳离子交换薄膜在用 20mM 的 MES 缓冲液平衡后用于纯化融合蛋白质。含有融合蛋白质的上清液被加载到薄膜上, 并通过 900g 的离心吸附。该薄膜用 0.4ml 的 MES 缓冲液清洗两次, 并用具有 1M 的 NaCl 的 MES 缓冲液洗脱。0.1ml 的洗脱部分用具有 3500 的分子分离点的透析设备(Slide-A-Lyzer mini, Pierce, USA)脱盐 1 小时, 并用 UBP1 处理。在 2 小时的切割反应之后,

反应溶液被加载到用 20mM 的磷酸缓冲液平衡的薄膜上,并在 900g 离心 5 分钟以产生纯化的人生长激素。

与融合到泛素的 N-端的离子型尾相似,通过在泛素的内部位点上替换氨基酸增加等电点,从而使修饰的泛素吸附到阳离子交换树脂上并被泛素切割酶所识别(图 9,道 1: 加载以 1/10 的比例稀释的样品, 2: 用具有 1M 的 NaCl 的缓冲液洗脱的溶液, 3: 脱盐后通过洗脱 UBP 切割反应所获得的部分, 4: 在切割反应后通过薄膜所获得的部分)。引物如表 4 中所示, 其中划线部分的核酸序列表示修饰的部分。

[表 4]

| 引物 | 核酸(5'→3') | 注释 | SEQ ID 号 |
|-------|--|--|----------|
| FMUB1 | 5'-CTT TGA CCG GTA AAA CCA TAA CAT TGC <u>GCG TTA</u> AAT CTT CCC ATA CC-3' | 在 Glu16、Arg16、 Glu18 和 Lys18 修 饰的氨基酸 | 15 |
| FMUB2 | 5'-GGC CGC ATA TGC AGA TTT TCG TCA AGA CTT TGA CCG GTA AAA CC-3' | Nde I 位点、ATG | 16 |
| RMUB1 | 5'-CTC TTA GCC TTA GCA CAA GAT GTA AGG TGG <u>AGC</u> <u>GCT TCT GAA TGT TG-3'</u> | 在 Glu64 和 Arg64 修饰的氨基酸 | 17 |
| RMUB2 | 5'-CGC GGA TCC AGT GGA ATG GTT GGG <u>GCG CCA CCT</u> CTT AGC CTT AGC AC-3' | Sfo I 位点 | 18 |
| OrhGH | 5'-CAG TGG AAT GGT TGG AAA GCC ACC TCT TAG CCT TAG-3' | | 19 |
| OfhGH | 5'-CTA AGG CTA AGA GGT GGC TTT CCA ACC ATT CCA CTG-3' | | 20 |
| RhGH | 5'-GCC GGA TCC TTA AAA ACC ACA AGA ACC-3' | Bam H1 位点 | 21 |

按照本发明，感兴趣的蛋白质可以轻易和经济地得到分离。

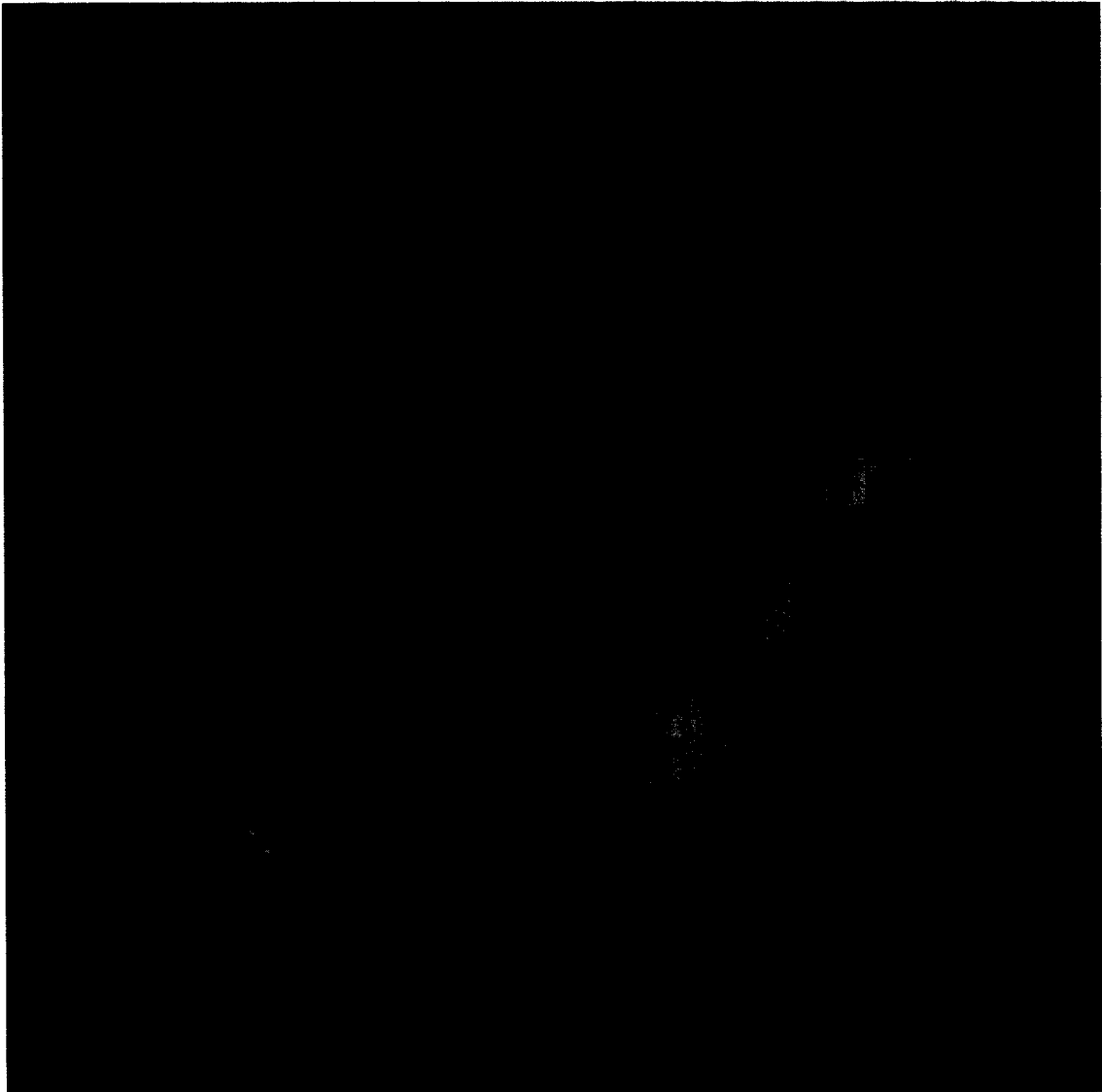


图 1

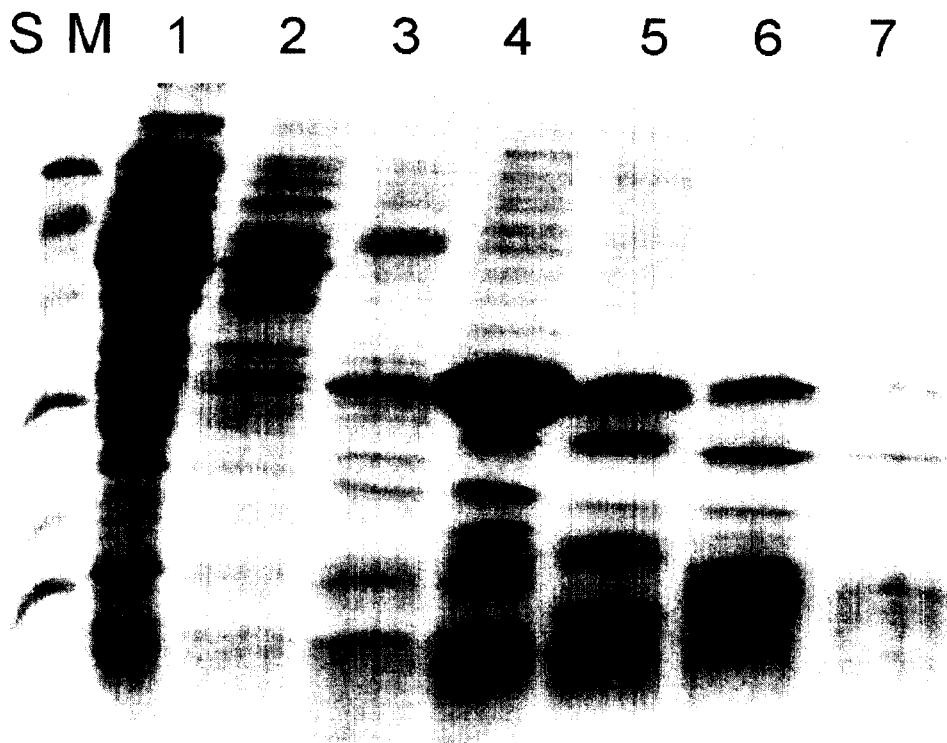


图 2

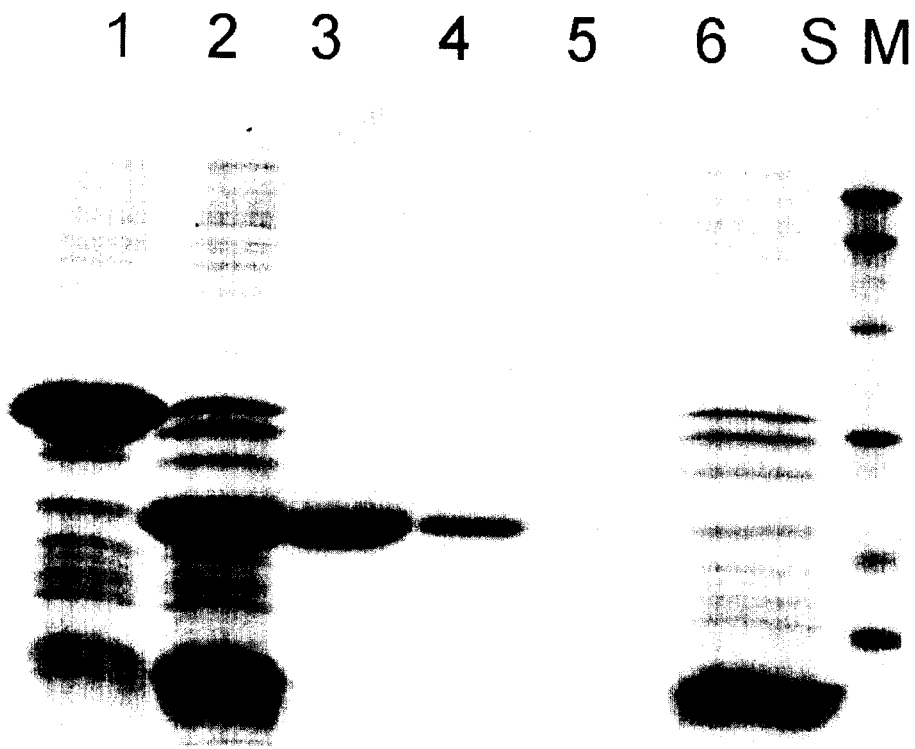


图 3

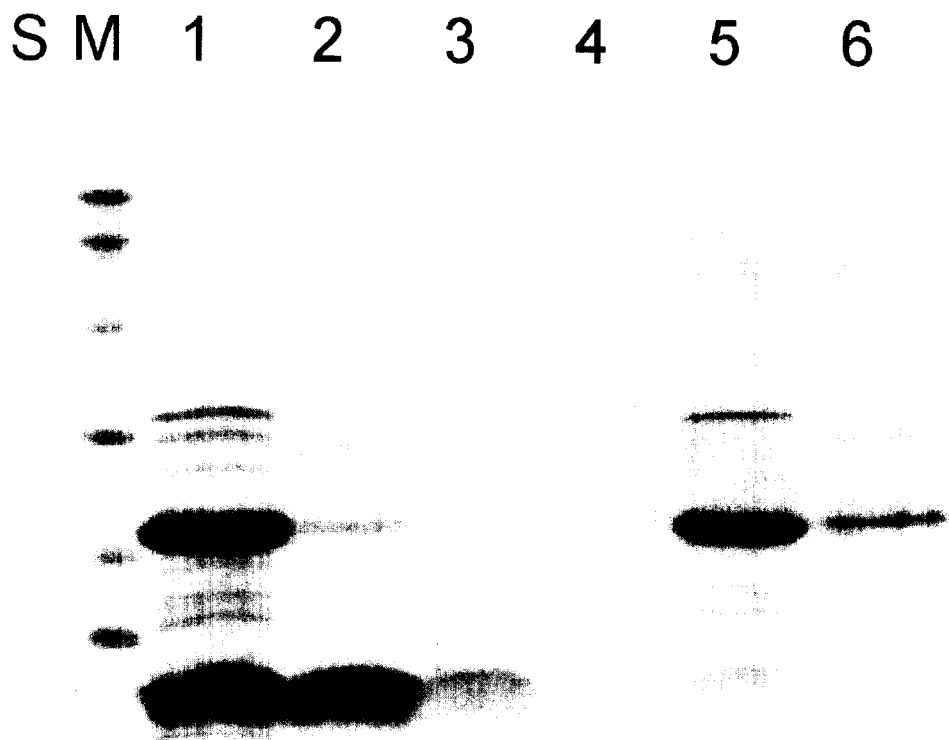


图 4

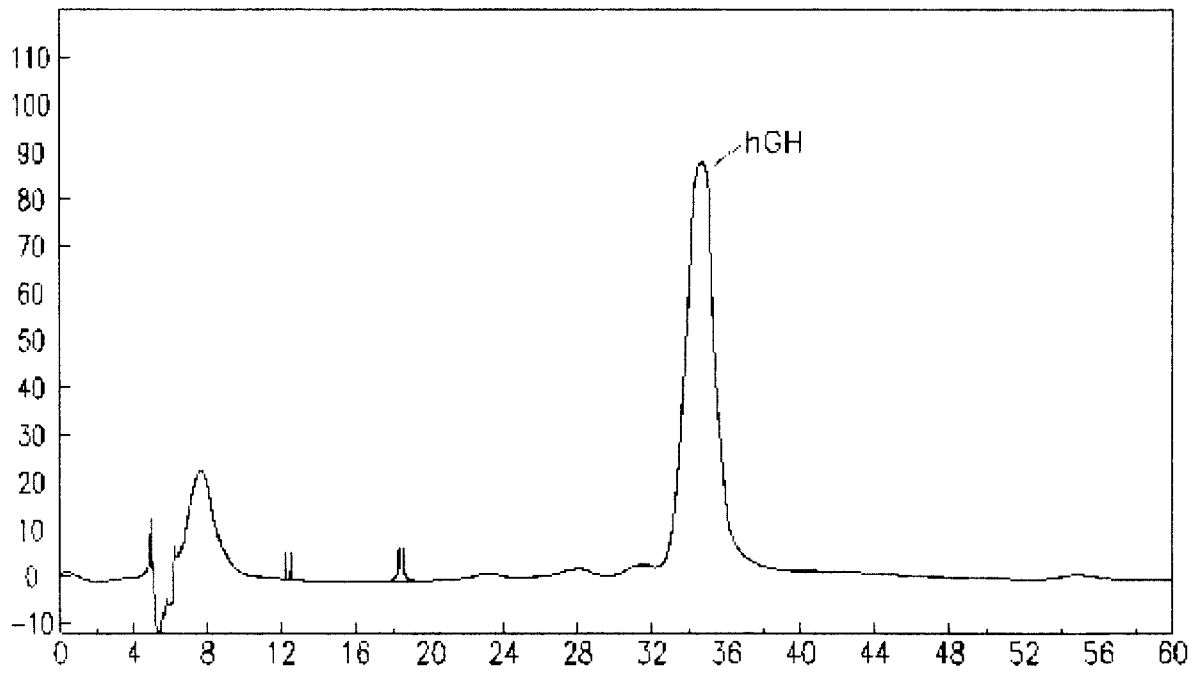


图 5

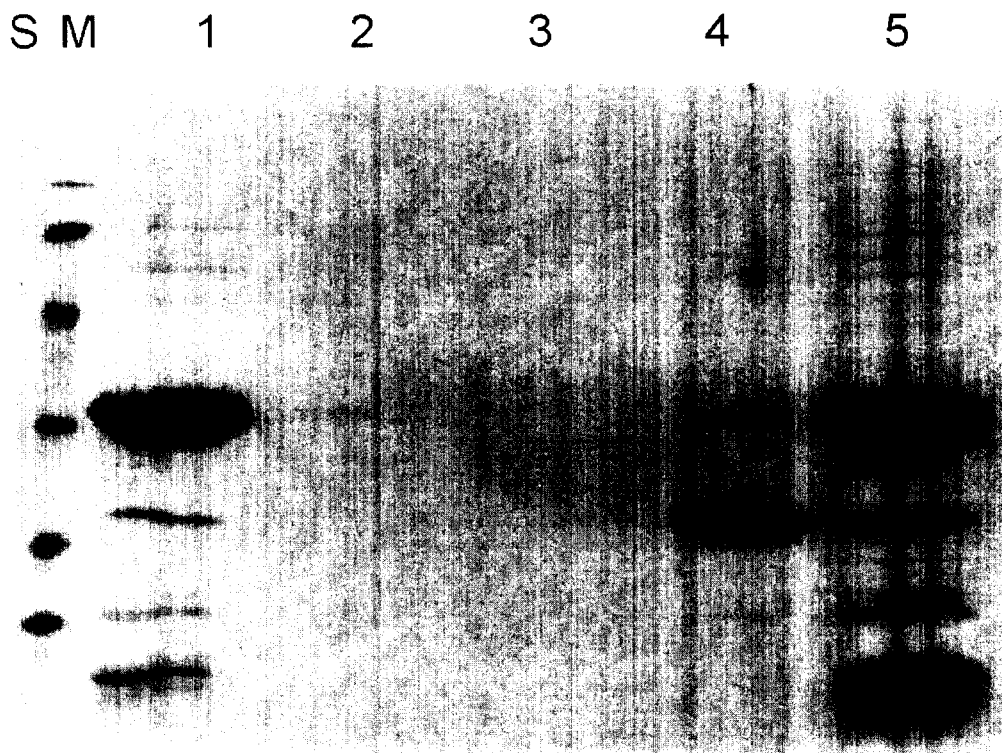


图 6

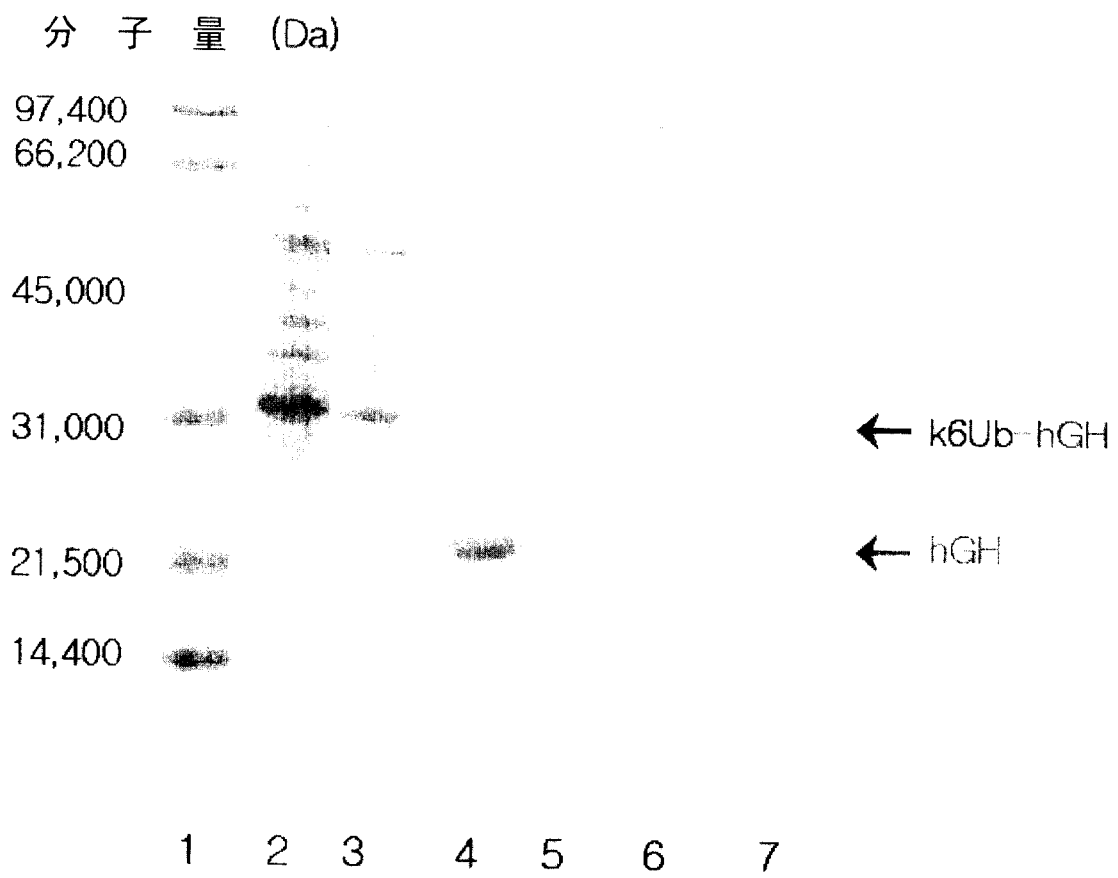


图 7

SM 1 2 3 4

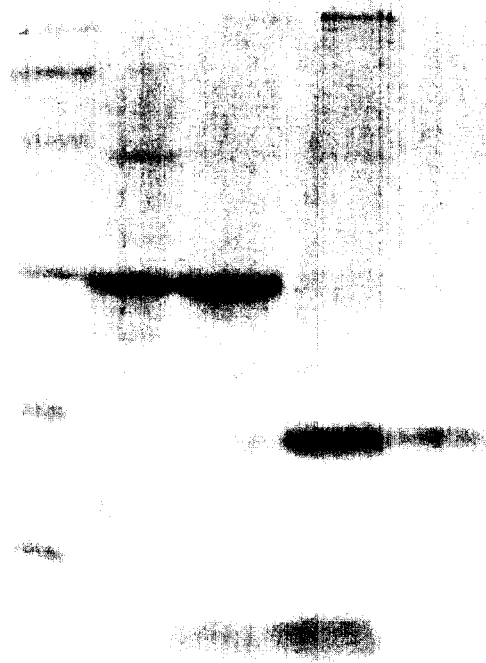


图 8

S M 1 2 3 4



图 9