



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101003812 B

(45) 授权公告日 2011. 01. 05

(21) 申请号 200610006574. 5

(22) 申请日 2006. 01. 17

(73) 专利权人 温州医学院

地址 325035 浙江省温州市茶山高教园区温州医学院

(72) 发明人 吕建新

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 黄挺

浦宇等. 蛋白质层析用离子交换和疏水作用层析介质的的发展概况. 生物工程学报. 2004, 20(6), 全文.

吕建新等. 突变型人 IL-18 的肿瘤靶向性改造及真核表达. 遗传. 2005, 27(4), 第 558 页第 1 段及第 559 页左栏结果部分第 2. 1.

吕建新等. 突变型人 IL-18 的肿瘤靶向性改造及真核表达. 遗传. 2005, 27(4), 第 558 页第 1 段及第 559 页左栏结果部分第 2. 1.

审查员 黄丽君

(51) Int. Cl.

C12N 15/62(2006. 01)

C12N 15/14(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C07K 19/00(2006. 01)

C07K 1/14(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1267307 A, 2000. 09. 20,

US 2002002276 A1, 2002. 01. 03,

王军志. 第 2 章基因工程药物的上游及中试研究. 生物技术药物研究开发和质量控制. 2002, 79.

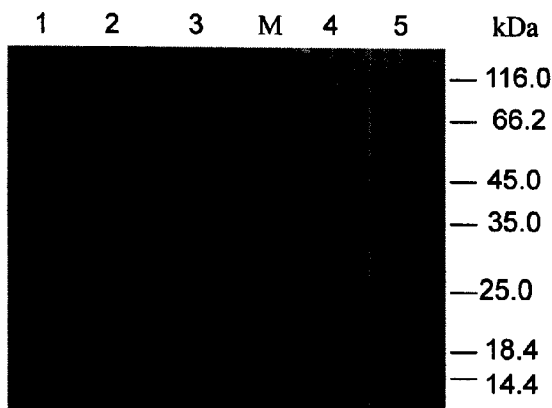
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种用于制备重组人 EGF-IL18 融合蛋白的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于制备重组人 EGF-IL18 融合蛋白的方法。本发明还涉及包含所述融合基因的表达重组体、包含所述表达重组体的工程菌、由此工程菌表达和分离纯化的靶向融合蛋白 - 重组人 EGF-IL18 融合蛋白以及此融合蛋白用于治疗 EGFR 高表达肿瘤用途。



1. 一种用于制备重组人 EGF-IL18 融合蛋白的方法,其特征在于采用下列步骤:

(1) 用 PCR 扩增 EGF 第三环片段和 IL18 成熟肽突变体基因片段,并利用 15 个接肽 GGGSGGGSGGGGS 的编码基因将其连接成融合蛋白编码基因;

(2) 在原核表达载体 pET32a 中克隆步骤 (1) 中所述的融合蛋白编码基因;

(3) 用重组载体转化大肠杆菌 Rosetta™DE3;

(4) 发酵培养工程菌,制备与纯化融合蛋白,其中所述的纯化重组融合蛋白是工程菌发酵后经离子交换柱上复性并同时纯化、凝胶过滤二步法,其特征为:将初步纯化的重组人 EGF-IL18 融合蛋白上经 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡的 DEAE-52 柱,洗涤 3-5 个柱床体积,所述 Tris-HCl 缓冲液的 pH 为 8.0,含 8mol/L 尿素和 10mmol/L NaCl;然后以 3-5 个柱床体积的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液按线性梯度降低尿素浓度 2M 使重组人 EGF-IL18 融合蛋白在柱上复性,所述 Tris-HCl 缓冲液的 pH 为 8.0,含 8mol/L 尿素、10mmol/L NaCl、0.1mmol/L PMSF、1mM GSH、0.2mM GSSH;最后以 NaCl 线性梯度洗脱已复性的蛋白,分部收集得到的目的蛋白;进一步将离子交换柱上复性并同时纯化得到的重组人 EGF-IL18 融合蛋白上样于用 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sephadex G-75 柱,所述 Tris-HCl 缓冲液的 pH 为 8.0,含 150mmol/L NaCl;分部收集得到重组人 EGF-IL18 融合蛋白;所述的重组人 EGF-IL18 融合蛋白的氨基酸序列为 MRCSHGYTGI RCQAVVLGGG GSGGGGSGGG GSYFGKLESK LSVIRNLNNQ VLFIDQGNRP LFEDMTSDC RDNAPRTIFI ISMYKDSQPR GMAVTISVKC EKISTLSCEN KIISFKEVNP PDNIKDTKSD IIFFQRSVPG HDNKMVFESS SYEGYFLTCE KERDLFKLIL KKEDELGDRS IMFTVQNED。

## 一种用于制备重组人 EGF-IL18 融合蛋白的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于制备重组人 EGF-IL18 融合蛋白的方法。本发明还涉及包含所述融合基因的表达型重组体、包含所述表达型重组体的工程菌、由此工程菌表达和分离纯化的靶向融合蛋白 - 人 EGF-IL18 以及此融合蛋白用于治疗 EGFR 高表达肿瘤用途。

### 背景技术

[0002] 恶性肿瘤是威胁人类的常见病。近年,针对某些受体、基因或关键物质的靶向治疗药物成为药物研制的重要方向。这类药物主要靶向作用于相关的肿瘤细胞上,它在提高对肿瘤细胞的杀伤力同时可减少正常组织细胞的不良作用,被认为是未来癌症治疗中最具前景的研究方向。

[0003] 白细胞介素 18(Interleukin18, IL18) 于 1996 年由 Ushio 等克隆,其主要生物学活性是诱导 T 细胞产生 IFN $\gamma$ ,促进 T 细胞和 NK 细胞增殖活化以及促进 Fas 配体表达,抑制血管生成等。动物实验表明,IL18 具有明显的抗肿瘤作用,这一作用通过诱导小鼠体内的 NK 细胞和 CD4<sup>+</sup> 细胞毒活性而间接发挥。因此,IL18 在肿瘤生物治疗方面具有潜在的应用前景。但由于 IL-18 的效应细胞 -H1 和 NK 细胞广泛分布于人体各部位,容易激发炎症反应,产生副作用。因此,需要一种导向序列来加强 IL-18 对肿瘤细胞的靶向性,即如何使细胞因子在体内定向地作用于肿瘤细胞。另一方面,表皮生长因子受体 (EGFR) 在很多肿瘤细胞表面特异性高表达,可达正常细胞的 100 倍,其配体 EGF 含有三个保守的环状结构,其中第三环是与 EGF 受体结合的部位,又称为 EGF 受体干扰序列。

[0004] 因此,我们构建了人 EGF-loop3-IL18(以下简称:重组人 EGF-IL18) 融合基因,在大肠杆菌中表达重组人 EGF-IL18 融合蛋白。此融合蛋白能以 EGF 受体干扰序列作为导向序列,既可增强细胞因子对肿瘤细胞的亲和性,又可干扰 EGF 对肿瘤细胞的刺激效应,同时又用来加强 IL18 的肿瘤细胞靶向性的序列,更大程度上地发挥了 IL18 的生物学作用。所以本发明内容为治疗 EGFR 高表达的肿瘤提供了一种低毒高效的靶向性药物。

[0005] 我们曾利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在 Sf9 昆虫细胞株中成功表达重组人 EGF-IL18 融合基因,得到纯化后的重组人 EGF-IL18 融合蛋白,并在体外初步评价了此融合蛋白的生物活性(吕建新,彭颖,孟哲峰《突变型人 IL-18 的肿瘤靶向性改造及真核表达》遗传,2005,27(4))。但是由于当时使用的是杆状病毒表达系统,存在着表达量不高、操作复杂和生产成本高的缺点,因此不可能用于大规模的生产。而在本发明中我们使用经典的原核表达系统 - 大肠杆菌作为重组人 EGF-IL18 融合蛋白的表达宿主,可以非常简便,低成本的,快速大规模的发酵生产,迅速得到大量的目的蛋白,为重组人 EGF-IL18 融合蛋白规模化生产奠定了基础。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种具有结合 EGF 受体,并能干扰 EGF 对肿瘤细胞的刺激效应,同时又具有 IL18 活性的双功能融合蛋白,为治疗 EGFR 高表达的肿瘤提供一种新的低毒

高效的靶向性药物。

[0007] 本发明还提供了包含人 EGF-IL18 融合基因重组体的构建,以及含该基因的表达型重组体的工程菌发酵培养,更重要的是还提供了重组人 EGF-IL18 融合蛋白的大规模制备、纯化和复性蛋白的技术路线。

[0008] 本发明的重组人 EGF-IL18 融合蛋白可在大肠杆菌中发酵生产,通过用离子交换柱上复性并同时纯化和凝胶过滤二步法,可以非常简便,低成本的,快速大规模的得到目的蛋白,为重组人 EGF-IL18 融合蛋白规模化生产奠定了基础。

[0009] 本发明的技术方案通过下述方法和步骤实现:

[0010] 1、用 RT-PCR 扩增突变型 IL18 编码序列

[0011] 从健康献血者的外周血单个核细胞 (PBMC) 中提取 mRNA,根据发表的 hIL-18cDNA 序列设计引物,上游引物 P1: ' GACCTCCAGATCGCTTCC 3' ;下游引物 P2: 5' GCTAGTCTTCGTTTTGAACAG 3' ,经过 PCR 反应扩增获得突变型 IL18 基因片段,并将它克隆到 pUC-mT 载体 (记为 pUC-mT18)。

[0012] 2、构建人 EGF-IL18 融合基因

[0013] 设计 3 条引物,即 FUS I、FUS II 和 P182。采用引物搭桥法和两步 PCR 法构建融合基因,并将人 EGF-IL18 融合基因与 pMD18-T 载体连接构建 pFUS-EGF-IL18 质粒 (记为 pFUS)。

[0014] 3、构建包含人 EGF-IL18 融合基因的重组体

[0015] 分别设计上下游引物扩增人 EGF-IL18 融合基因,经双酶切回收产物片段后插入到经同样两个酶酶切的表达载体中。构建包含人 EGF-IL18 融合基因的重组体经内切酶谱分析和 DNA 序列分析证实序列正确。

[0016] 4、重组体转化大肠杆菌 Rosetta™(DE3),用 IPTG 诱导重组人 EGF-IL18 融合蛋白表达。融合蛋白以包含体形式存在于工程菌内,表达水平达 30 ~ 45%。SDS-PAGE、westernblot, IFN- $\gamma$  诱导实验, A431 细胞表面 EGFR 竞争结合实验等分析表明,表达产物具有诱导人外周血单个核细胞产生 IFN- $\gamma$  的能力,且能与细胞表面的 EGFR 特异结合。

[0017] 5、通过发酵技术扩增工程菌,发酵后破碎细菌,离心收集包涵体、经缓冲溶液洗涤后,用尿素溶解包涵体,离子交换柱上复性并同时纯化融合蛋白,分子筛进一步纯化融合蛋白。

## 附图说明

[0018] 图 1 :pET32a(+)-EGF-IL18 表达载体的双酶切鉴定, M :1Kb 的 DNA 分子量 Marker ; 1 :重组表达载体 pET32a(+)-EGF-IL18 以 Kpn I 和 Xho I 双酶切的图谱 ;2 :重组表达载体 pET32a(+)-EGF-IL18 酶切前的图谱

[0019] 图 2 :大肠杆菌中表达的重组人 EGF-IL18 融合蛋白的 SDS-PAGE, 1 :工程菌 pET32a(+)-EGF-IL18/Rosetta™(DE3) 在 IPTG 诱导前的全菌电泳图谱 ;2 :工程菌 pET32a(+)-EGF-IL18/Rosetta™(DE3) 在 IPTG 37℃ 诱导 4 小时后的全菌电泳图谱 ;3 :工程菌 pET32a(+)-EGF-IL18/Rosetta™(DE3) 在 IPTG 37℃ 诱导 4 小时后的超声上清电泳图谱 ; 4 :工程菌 pET32a(+)-EGF-IL18/Rosetta™(DE3) 在 IPTG 37℃ 诱导 4 小时后的超声沉淀电泳图谱 ;M :蛋白分子量 Marker。

[0020] 图3:大肠杆菌中表达的重组人 EGF-IL18 融合蛋白的免疫印迹分析;1:工程菌 pET32a(+)-EGF-IL18/Rosetta™(DE3) 在 IPTG 37℃ 诱导 4 小时后的全菌;2:工程菌 pET32a(+)-EGF-IL18/Rosetta™(DE3) 诱导前的全菌;M:蛋白分子量 Marker。

[0021] 图4:重组 EGF-IL-18 融合蛋白 DEAE-52 和 Sephadex G-75 分子筛纯化后 SDS-PAGE;1:Sephadex G-75 分子筛纯化后电泳图谱;2:包涵体的反复洗涤后电泳图谱;3, 4, 5:为 DEAE-52 柱上复性和同时纯化电泳图谱;M:蛋白分子量 Marker。

#### 具体实施方式:

[0022] 以下通过实施例进一步描述本发明,而非限制本发明。

[0023] 实施例1:编码重组靶向融合蛋白的基因人 EGF-IL18 的获得

[0024] (1) 突变型 IL18 的获得

[0025] 健康献血者静脉血 5mL,等量生理盐水稀释后,用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心,收集单个核细胞。利用异硫氰酸胍-酚氯仿一步法提取细胞总 RNA。RT 反应体系 20 μL,取 1 μg 总 RNA 为模板,用 OligdT 作引物,按常规方法进行。根据发表的 hIL-18cDNA 序列,利用 Primer5.0 软件设计 PCR 引物。上游引物 P1:5' GACCTTCCAGATCGCTTCC 3' 下游引物 P2:5' GCTAGTCTTCGTTTTGAACAG 3' 其扩增片段包含完整 hIL-18cDNA 的编码区。PCR 反应条件为:95℃ 5min 预变性;80℃ 2min 热启动;94℃ 1min、57℃ 1min、72℃ 1min,共 25 个循环;72℃ 10min 延伸,反应体系为 50 μL,各成份按常规配置,使用的扩增酶是高保真 Pfu。以 1.0% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物中的目的片段,得到 635bp 左右的 DNA 片段。RT-PCR 产物经冻融法回收纯化后,用 T4DNA 连接酶与 pUCmT 载体连接,得到包含突变型 IL18 的质粒 pUC-mT18。

[0026] (2) 融合基因 EGF-IL18 的获得

[0027] 设计了 3 条引物,即 FUS I、FUS II 和 P182。引物均由上海 Sangon 公司合成。上游引物 FUS I 为:

[0028] 5' GGTGGCGGTGGTCCGGCGGTGGTGGCTCTGGTGGCGGCGGATCTTACTTTGGCAAGC 3'

[0029] 上游引物 FUS II 为:

[0030] 5' ATGCGCTGCTCCCATGGCTACACTGGTATTCGTTGCCAAGCAGTAGTTCTCGGTGGCGGTGGTTCC 3'

[0031] 下游引物 P182 为:5' GCTAGTCTTCGTTTTGAACAG 3'。采用两步 PCR 法构建融合基因。首先以 pUC-mT18 质粒为模板,以 FUS I、P182 为引物,按常规方法进行 PCR 扩增 520bp 基因序列;然后以该基因序列为模板,以 FUS II、P182 为引物,用 Ex Taq PCR 试剂盒再次进行 PCR 扩增,得到 571bp 的 EGF-IL18 融合基因(Genebank 登录号:AF454397)。将第二次 PCR 产物经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳回收纯化后,与 pMD18-T 载体连接构建 pFUS-EGF-IL18 质粒。

[0032] 人 EGF-IL18 融合基因的 DNA 序列为:

[0033] 1 atgcgctgct cccatggcta cactggattt cgttgccaag cagtagttct cgggtggcggt

[0034] 61 ggttccggcg gtggtggctc tggtggcggc ggatcttact ttggcaagct tgaatctaaa

[0035] 121 ttatcagtea taagaaatgt gaataaccaa gttctcttca ttgaccaagg aaatcggect

[0036] 181 ctattttgaag atatgactga ttctgactgt agagataatg caccgccggac catattttatt

[0037] 241 ataagtatgt ataaagatag ccagcctaga ggtatggctg taactatctc tgtgaagtgt  
[0038] 301 gagaaaattt caactctctc ctgtgagaac aaaattattt cctttaagga agtgaatcct  
[0039] 361 cctgataaca tcaaggatac aaagagtac atcatattct ttcagagaag tgtcccagga  
[0040] 421 catgataata agatgcaatt tgaatcttca tcatacgaag gatactttct aacttgtgaa  
[0041] 481 aaagagagag acctttttaa actcattttg aaaaaagagg atgaattggg ggatagatct  
[0042] 541 ataatgttca ctgttcaaaa cgaagactag c

[0043] 人 EGF-IL18 融合基因编码的氨基酸序列为：

[0044] 1 MRCSHGYTGI RCQAVVLGGG GSGGGSGGG GSYFGKLESK LSVIRNLNNQ VLFIDQGNRP  
[0045] 61 LFEDMTSDSD RDNAPRTIFI ISMYKDSQPR GMAVTISVKC EKISTLSCEN KIISFKEVNP  
[0046] 121 PDNIKDTKSD IIFFQRSVPG HDNKMVFESS SYEGYFLTCE KERDLFKLIL KKEDELGDRS  
[0047] 181 IMFTVQNED

[0048] 实施例 2 :融合基因人 EGF-IL18 表达型重组体 pET32a(+)-EGF-IL18 的构建

[0049] 分别设计上下游引物以扩增 EGF-IL-18 全长基因 :p1 :5' atggtacc gacgacgacgacaagcgctgctcccatg 3' ;p2 :5' cgc ctcgag ctagtcttcg tttttaa cagtga 3' ,引物 p1 在 5' 端引入 Kpn I 酶切位点和肠激酶识别位点,引物 p2 在 3' 端引入 Xho I 酶切位点,以 pFUS-EGF-IL18 为模板,PCR 扩增出 EGF-IL18 片段,经胶回收后克隆入 pMD18-T simple,测序正确后,分别以 Kpn I 和 Xho I 双酶切,回收产物片段连接到 pET32a(+),构建为重组表达载体 pET32a(+)-EGF-IL18,其酶切图谱(见图 1)。

[0050] 实施例 3 :重组人 EGF-IL18 融合蛋白在大肠杆菌中的表达与鉴定

[0051] 将 pET32a(+)-EGF-IL18 转化 Rosetta™(DE3),然后接种于 5ml LB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 34 μg/mL 氯霉素),37℃ 振荡培养过夜,按 1% 接种量重新接种一管 5ml 同样培养液。在 37℃ 下振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6 时,取出一毫升放入试管 1,其余加入终浓度为 0.4mmol/L IPTG 于 37℃ 诱导 4h 后,各取出一毫升放入试管 2 和 3,12000g,离心 5min 后,弃上清,每管加入 200 μL 的 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),混匀。试管 3 的菌体进行超声破碎(超声时间 3 秒,间隔时间 5 秒,功率为 400W,共 5-10 次,视菌体浓度而定),至菌体清亮为止,然后 12000g×5 分钟离心收集上清和沉淀,沉淀加入 200 μL 的 20mmol/L Tris-HCl (pH8.0),混匀。以上各管提取的全菌、上清和沉淀,分别加入上样缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 100mmol/L DTT, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油),混匀,置于 100℃ 沸水浴保持 5min, 10000g, 离心 3min, 取上清进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。目的蛋白质表达量通过考马斯亮蓝 R-250 染色后,扫描后用 Bandscaand 软件计算表达量。重组人 EGF-IL18 融合蛋白在大肠杆菌中的表达情况,其 SDS-PAGE 电泳(见图 2)。

[0052] 免疫印迹分析:样品以 12% SDS-PAGE 进行电泳,然后以 380 毫安转移 30 分钟,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,膜以封闭液(PBS, pH 7.5, 含 5% 脱脂奶粉和 0.5% Tween-20)于 4℃ 封闭过夜后,加入以封闭液稀释(1 : 1000)的鼠抗人 IL-18 单抗,于室温温育 2h,洗膜后加稀释(1 : 1000)的 HRP-羊抗鼠 IgG 于室温温育 2h,洗去二抗后以 ECL 发光试剂盒进行显色,X 光片曝光后进行显影、定影,其 westernblot 结果(见图 3)。

[0053] 实施例 4 :工程菌的发酵试验与重组人 EGF-IL18 融合蛋白的纯化

[0054] (1) 发酵试验

[0055] 工程菌 pET32a(+)-EGF-IL18/Rosetta™(DE3) 接种于 5.0ml LB 培养基(含

100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素和 34  $\mu$ g/mL 氯霉素), 37°C 振摇培养过夜, 按 2% 接种量重新接种于同样培养液的 500ml 三角瓶中, 在 37°C 下振摇培养至  $OD_{600}$  约为 1.0 ~ 3.0 时, 按 3 ~ 5% 接种量再接种于同样培养液的 10 升发酵罐进行发酵。发酵参数为: 温度 30°C, 氧容量控制在  $35 \pm 5\%$ , pH = 6.86, 搅拌速度与 D0 连动。

#### [0056] (2) 包涵体的制备

[0057] 洗涤细菌: 8000g  $\times$  15 分钟离心收集细菌, 称重湿菌体。用 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 洗涤菌体, 搅拌器上搅匀 30 分钟, 8000g, 离心 15 分钟收集菌体。缓冲液用量比例为 10ml ~ 50ml 缓冲液 /g 湿菌体。

[0058] 破碎细菌: 以 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 1.0mmol/L 蛋白酶抑制剂 PMSF 及 10mmol/L NaCl) 重悬菌体, 混匀后加入溶菌酶至终浓度为 0.2mg/ml, 室温搅拌 30 分钟后加入 Triton X-100 至终浓度为 0.5%, 冰浴放置 15 分钟至溶液变得粘稠。

[0059] 超声处理: 超声破碎菌体 (超声时间 3 秒, 间隔时间 5 秒, 功率为 400W, 共 30 分钟, 视菌体浓度而定), 至菌体不再粘稠为止。然后 8000g  $\times$  15 分钟离心收集沉淀。上述操作应在冰水中进行, 为防止炭化, 超声功率不宜过大, 在玻璃烧杯中进行较好, 超声波探头深入液面大于 3 厘米, 距杯底 2 厘米位好。

#### [0060] (3) 包涵体的初步纯化

[0061] 将 (2) 步骤中的超声沉淀以 10 倍体积的 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 1% Triton X-100、2mol/L 尿素和 0.5mol/L NaCl) 洗涤, 室温搅动 15min 后, 2000g, 离心 10min, 沉淀再以相同方法洗涤 1 次, 最后用 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗涤 1 次。

#### [0062] (4) 包涵体的溶解:

[0063] 将 (3) 步骤中所得沉淀以 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 1.0mmol/L PMSF、8mol/L 尿素、10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇和 10mmol/L NaCl) 室温搅拌溶解 2h, 离心收集上清, 得到初步纯化的包涵体人 EGF-IL-18。

#### [0064] (5) 目的蛋白的柱上复性和同时纯化

[0065] 目的蛋白 DEAE-52 柱上复性和同时纯化: 将初步纯化的包涵体人 EGF-IL-18 经 0.45  $\mu$ m 滤器过滤后, 样品上经 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 8mol/L 尿素和 10mmol/L NaCl) 缓冲液平衡的 DEAE-52 柱 (2.6\*60mm), 洗涤 5 个柱床体积, 然后以 5 个柱床体积的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0 含 8mol/L 尿素、10mmol/L NaCl、0.1mmol/L PMSF、1mM GSH、0.2mM GSSH) 按线性梯度降低尿素浓度 2M (流速 0.5mL/min, 总体积 300mL) 使人 EGF-IL-18 在柱上复性, 最后以 10mmol/L ~ 1.0mmol/L NaCl 线性梯度洗脱已复性的蛋白。分部收集洗脱峰, SDS-PAGE 分析复性产物, 收集目的蛋白。

[0066] Sephadex G-75 进一步纯化目的蛋白: 将 DEAE-52 柱上复性纯化所得的目的蛋白上经 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 150mmol/L NaCl) 缓冲液平衡的 Sephadex G-75, 分部收集洗脱峰, 得到目的蛋白。

[0067] 重组人 EGF-IL18 融合蛋白经过包涵体的反复洗涤、DEAE-52 柱上复性和同时纯化、Sephadex G-75 分子筛三步法纯化, 其 SDS-PAGE 电泳 (见图 4)。

#### [0068] (6) 酶切标签蛋白

[0069] 将 (5) 步骤中所得的目的蛋白加入 Enterokinase, 使之切割硫氧还蛋白和组氨酸标签。酶切产物上样用 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 150mmol/L NaCl) 缓冲液平衡的

Sephadex G-75 柱, 流速 0.5mL/min 洗脱目的蛋白, 分部收集得到有活性的重组人 EGF-IL18 融合蛋白。



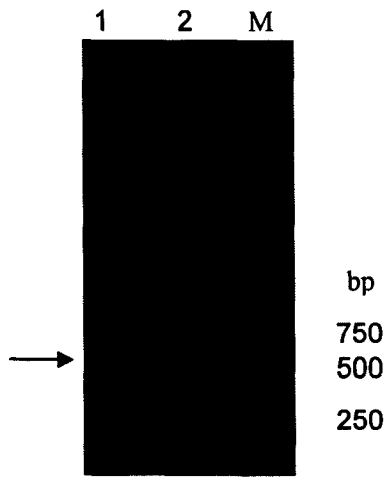


图 1

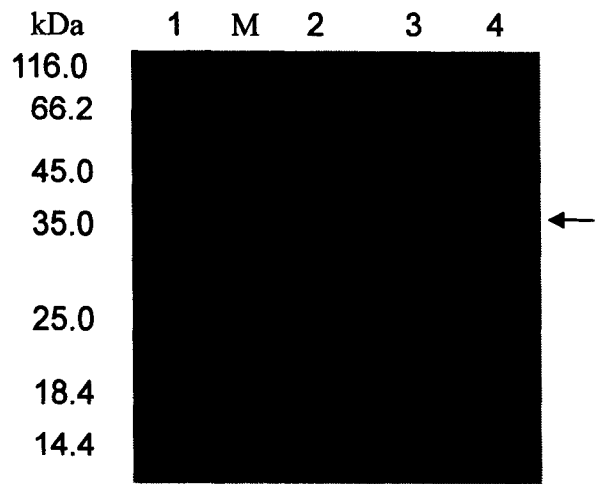


图 2

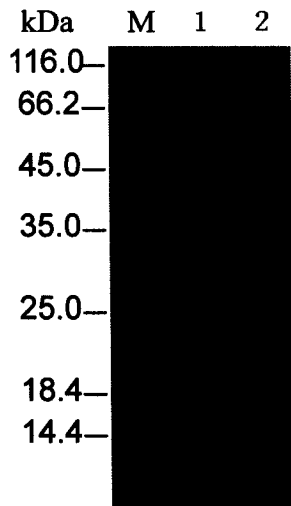


图 3

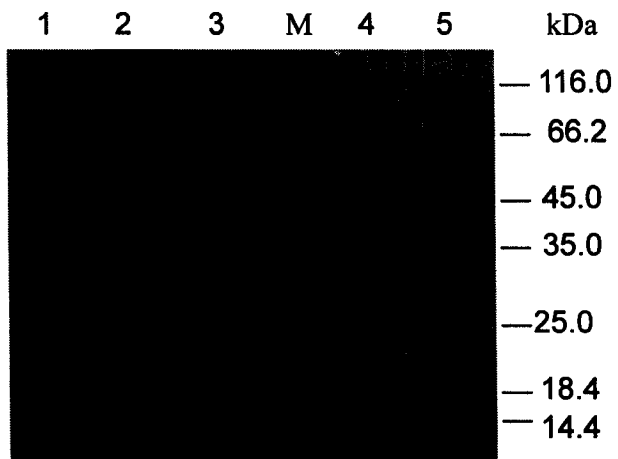


图 4