

重组人 EGF-IL-18 融合蛋白的表达纯化及复性

潘建华 彭颖 郑昭曛 吕建新*

(温州医学院细胞与分子医学研究所, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 融合基因 EGF-IL-18 与表达载体 pET32a (+) 连接构建融合型原核表达质粒 pET32a (+)-EGF-IL-18。该基因在 *E. coli* Rosetta (DE3) 中获得高效表达, SDS-PAGE 分析表明表达产物大部分以包涵体形式存在。以 2 mol/L 尿素和 1% Triton X-100 对包涵体进行反复洗涤后, 利用离子交换柱层析对包涵体进行柱上复性, 结果表明离子交换层析柱上复性不仅能够获得可溶性的 EGF-IL-18 融合蛋白, 而且产物同时得到纯化, 纯度大于 90%。复性的 EGF-IL-18 经分子筛进一步纯化后, 体外实验证明具有促进人外周血单个核细胞 (PBMC) IFN- γ 基因表达的能力。该方法简单、高效, 为进一步开展 EGF-IL-18 的动物实验及其大量纯化制备打下基础。

关键词 EGF-IL-18 融合蛋白; 包涵体; 离子交换柱层析; 柱上复性

在肿瘤的治疗药物中, 以表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 受体 (EGF receptor, EGFR) 为靶向的治疗药物正受到越来越多的关注。EGFR 是跨膜受体酪氨酸激酶, 介导 EGF 等生长因子的生物学效应, 与几乎所有癌细胞关键特征诸如自发性生长、侵袭性、促血管生成和远距离转移等的出现有关。肿瘤细胞学研究进一步发现, 在许多恶性肿瘤如胃癌、前列腺癌、肝癌等癌细胞表面都有 EGFR 的高表达和 EGFR 异常突变体的产生。当前, 针对 EGFR 受体的各类封闭药物的临床试验和应用也都表现出明显的抗肿瘤疗效^[1]。可见, EGFR 是一个的抗肿瘤治疗的重要靶点。我们曾利用杆状病毒表达系统在昆虫细胞 sf9 中成功表达 EGF-IL-18 融合蛋白, 并在体外实验中进一步证实了其双功能特性: 在定向结合肿瘤细胞表面 EGFR 的同时, 又能发挥细胞因子 IL-18 的抗肿瘤等生物学作用^[2,3]。为了制备足够量的目的蛋白进行动物实验, 我们利用原核表达载体在大肠杆菌中高效表达了 EGF-IL-18 融合蛋白, 同时建立了一种简便有效的复性纯化 EGF-IL-18 的方法, 并对纯化产物进行了免疫印迹及初步的生物学活性鉴定, 为进一步开展 EGF-IL-18 的动物实验及其大量纯化制备打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和培养基 质粒: pFUS-EGF-

IL18 含 EGF 干扰序列-连接区-白介素 18 (以下简称 EGF-IL-18) 的基因由本所保存; pET32a (+) 购自 Novagen 公司; pMD18-T simple 购自 TaKaRa 公司。菌株: DH-5 α 、*E. coli* Rosetta (DE3) 本实验室保存。培养基: 细菌培养基 LB 培养基 (10 g/L 胰化蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L 氯化钠, pH 7.0); 细胞培养基 RPMI1640 购自 Sigma 公司, 小牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司。

1.1.2 试剂 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。核酸分子量标准、蛋白质分子量标准购自 BBI。IL-18 标准品、鼠抗人 IL-18 单克隆抗体购自 MBL 公司, ECL 发光试剂盒购自珠海百奥公司。Trizol 购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, 多粘菌素 (PMB) 购自上海恩美科技有限公司。Sephadex G-75 分子筛和 DEAE-52 阴离子交换柱层析填料为 Amersham Pharmacia 产品, 鲎试剂购自福建新北工业有限公司, 其余化学试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 EGF-IL-18 原核表达载体的构建 分别设计上下游引物以扩增 EGF-IL-18 全长基因, 上游引物 P1: 5'-ATGGTACCGACGACGACGACAAGCGCTGCTCCCATG-3' 含 *KpnI* 酶切位点 (划线部分)

收稿日期: 2006-03-08 接受日期: 2006-05-18

浙江省自然科学基金 (No.302769) 和浙江省医药卫生重点科技项目 (No.2001ZD007) 资助

* 通讯作者。Tel: 0577-86689889, E-mail: jx@wz.zj.cn

和肠激酶识别位点(框内部分); 下游引物 P2: 5'-CGCCTCGAGCTAGTCTTCGTTTTGAACAGTGA-3' 含 *Xho*I 酶切位点(划线部分)。引物由上海生工合成。以质粒 pFUS-EGF-IL18 为模板, 用上述引物进行 PCR 扩增出 EGF-IL-18 片段, 经切胶回收将目的片段克隆入 pMD18-T simple, 测序证实目的片段序列无误后, 分别以 *Kpn*I 和 *Xho*I 双酶切克隆载体, 回收产物片段连接到 pET32a (+), 构建为重组表达载体 pET32a (+)-EGF-IL-18 (图 1), 并用 *Kpn*I/*Xho*I 双酶切鉴定和测序验证。

1.2.2 EGF-IL-18 在大肠杆菌中的表达 经双酶切和测序证实的 pET32a (+)-EGF-IL-18 质粒转化感受态 *E. coli* Rosetta (DE3), 挑取单菌落接种于 3 ml LB 液体培养基(含 100 μg/ml 氨苄青霉素和 34 μg/ml 氯霉素)37 °C 振荡培养过夜, 次日将饱和菌液按 1:100 比例稀释继续扩增至菌密度 A_{600} 约为 0.6~0.8 左右, 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 于 37 °C 诱导 4 h, 收集少量菌体, 超声破菌分离上清液与沉淀, 用 SDS-PAGE(12%)及免疫印迹分析外源蛋白表达情况。

1.2.3 EGF-IL-18 包涵体的提取与洗涤 离心收集剩余菌体, 以缓冲液 A (pH 8.0, 含 20 mmol/L Tris-HCl, 1.0 mmol/L 蛋白酶抑制剂 PMSF 及 10

mmol/L 氯化钠) 重悬, 混匀后加入溶菌酶至终浓度为 0.2 mg/ml, 室温搅拌 30 min 后加入 Triton X-100 至终浓度为 0.5%, 冰浴放置 15 min 至溶液变得粘稠, 然后在冰浴中以超声破碎菌体(超声时间 3 s, 间隔时间 5 s, 功率为 400 W), 直至菌液变得不再粘稠, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀。沉淀以 10 倍体积的缓冲液 B (pH 8.0, 含 20 mmol/L Tris-HCl、1% Triton X-100、2 mol/L 尿素和 0.5 mol/L 氯化钠)洗涤, 室温搅动 15 min 后, 12 000 r/min 离心 20 min, 沉淀再以相同方法反复洗涤, 直到洗涤上清液用 0.125 Eu/ml 的鲎试剂检测不产生凝集反应, 最后用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液洗涤 1 次。所得沉淀以缓冲液 C(pH 8.0, 含 20 mmol/L Tris-HCl、1.0 mmol/L PMSF、8 mol/L 尿素、10 mmol/L β- 巯基乙醇和 10 mmol/L 氯化钠)室温搅拌溶解 2 h, 离心收集上清液, 得到初步纯化的包涵体。包涵体参照 Bradford 法进行蛋白质定量^[4], 并经 0.45 μm 滤器过滤后备用。

1.2.4 EGF-IL-18 的柱上复性和纯化 将初步纯化的 EGF-IL-18 包涵体浓度调至 20 mg/ml, 样品上载经 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0, 含 8 mol/L 尿素和 10 mmol/L 氯化钠)缓冲液平衡的 DEAE-52 柱(2.6 cm×20 cm), 洗涤 3~5 个柱床体积, 然后以 3~5 个

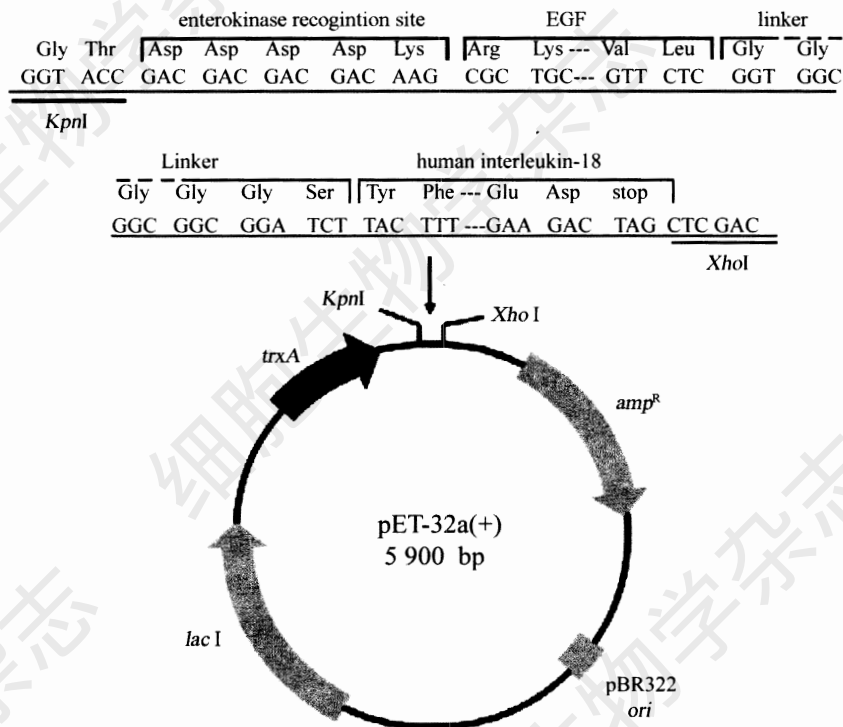


图1 重组表达载体 pET32a(+)-EGF-IL-18 构建示意图

柱床体积的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 含 8 mol/L 尿素、10 mmol/L 氯化钠、0.1 mmol/L PMSF、1.0 mmol/L 还原型谷胱甘肽和 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽)按线性梯度降低尿素浓度至 2 mol/L(流速 0.5 ml/min)使 EGF-IL-18 在柱上复性, 最后以 10~1.0 mol/L 氯化钠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。然后, 再将 DEAE-52 柱上复性纯化所得的目的蛋白上载经 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 150 mmol/L 氯化钠, 10% 甘油)缓冲液平衡的 Sephadex G-75, 分部收集洗脱峰, 得到目的蛋白。最后用 PBS 进行彻底透析, 冷冻干燥浓缩后, 于 -80℃ 分装冻存备用。

1.2.5 SDS-PAGE 和免疫印迹分析 参照 Laemmli^[5]的方法进行, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%, 以考马斯亮蓝染色显示蛋白质条带。免疫印迹分析: 样品以 12% SDS-PAGE 进行电泳, 然后以 380 mA 电流转移 30 min, 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 膜以封闭液(PBS, pH 7.4, 含 5% 脱脂奶粉和 0.5% Tween-20)于 4℃ 封闭过夜, 次日加入以封闭液稀释(1:1 000)的鼠抗人 IL-18 单抗, 于室温温育 2 h, 洗膜后加稀释(1:1 000)的 HRP-羊抗鼠 IgG 于室温温育 2 h, 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。

1.2.6 RT-PCR 检测 EGF-IL-18 诱导 PBMC IFN- γ 基因的表达 HISTOPAQUE-1077 分离液分离健康人 PBMC, RPMI1640 洗 2 次后, 用含 10% FBS、0.5 μ g/ml ConA 的 RPMI 1640 将细胞浓度调整为 3×10^6 个/ml, 96 孔培养板中每孔加入 100 μ l 细胞悬液。实验分 3 组: EGF-IL-18 组(13.58 nmol/L)、标准 IL-18(13.58 nmol/L)和空白对照组, 每组 3 个复孔, 同时每孔中加入终浓度为 20 μ g/ml 多粘菌素, 以排除可能的 LPS 干扰。37℃, 5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 收集细胞, Trizol 提取总 RNA, 以随机引物立即进行逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 引物由上海基康公司设计合成, IFN- γ 扩增产物长度为 496 bp, 上游引物: 5'-GGAGTCAGATGCTGTTTCG-3'; 下游引物: 5'-TGCTATGTTTTCATCAGGGT-3'。参照选用 β 肌动蛋白, 扩增产物长度为 302 bp, 上游引物: 5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3'; 下游引物: 5'-AAAGGGTGTAAACGCAACTAA-3'。PCR 反应参数为: 95℃ 预变性 1 min, 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退

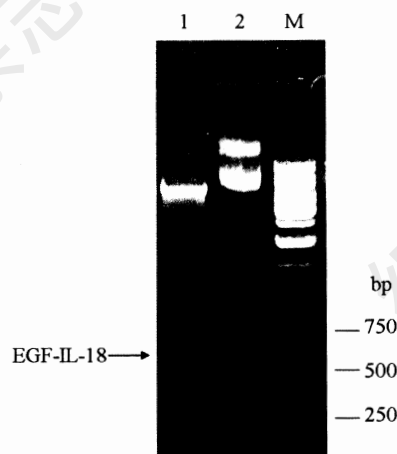


图2 重组表达载体 pET32a(+)-EGF-IL-18 的双酶切鉴定
M: 1 kb DNA marker; 1: pET32a(+)-EGF-IL-18 经 *KpnI* 和 *XhoI* 双酶切; 2: pET32a(+)-EGF-IL-18 质粒。箭头所指为 EGF-IL-18 基因。

火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 30 个循环后 72℃ 维持 5 min。反应产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 使用 GENE GENIUS 凝胶软件分析系统对电泳结果进行光密度分析, 以 IFN- γ 电泳带的光密度值与 β 肌动蛋白电泳带的光密度值的比值指示细胞表达 IFN- γ mRNA 的情况。

2 结果

2.1 EGF-IL-18 原核表达载体的构建与鉴定

通过在上游引物中引入肠激酶识别位点, 可以使重组蛋白表达后经肠激酶切去标签, 得到 N 端没有多余氨基酸的 EGF-IL-18。重组子 pET32a(+)-EGF-IL-18 经限制性内切酶 *KpnI* 和 *XhoI* 双切后, 可见大小约为 586 bp 的 EGF-IL-18 基因片段(图 2)。测序结果进一步证实 DNA 序列与预期一致。

2.2 SDS-PAGE 分析 EGF-IL-18 融合蛋白表达情况

SDS-PAGE 分析表明(图 3), 工程菌在 37℃ 经 IPTG 诱导 4 h 后, 在相对分子量为 37 kDa 处有一条明显的 EGF-IL-18 表达带, 与预期的硫氧还蛋白(TrxA)+EGF-IL18 的理论分子质量一致。凝胶薄层扫描显示表达的外源蛋白约占菌体总蛋白的 45%(图 3 第 2 道), 大部分以包涵体形式表达(图 3 第 4 道), 上清中的重组蛋白质约占总表达量的 20%(图 3 第 3 道)。免疫印迹进一步证实表达产物能够被人 IL-18 的单克隆抗体特异性识别(图 3 第 5 道)。

2.3 EGF-IL-18 融合蛋白包涵体的提取与洗涤

初次抽提的包涵体含有细菌外膜蛋白和核酸等

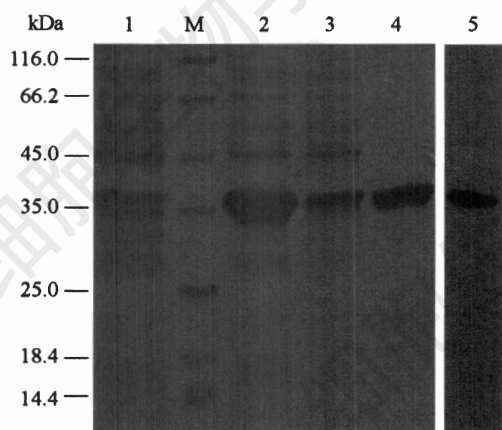


图3 SDS-PAGE分析EGF-IL-18在*E. coli*表达和EGF-IL-18的免疫印迹鉴定

M: 蛋白质分子量 marker; 1: 未诱导的工程菌; 2: 诱导后全菌裂解物; 3: 裂解上清液; 4: 裂解沉淀; 5: 免疫印迹鉴定EGF-IL-18蛋白。箭头所指为TrxA-EGF-IL-18融合蛋白。

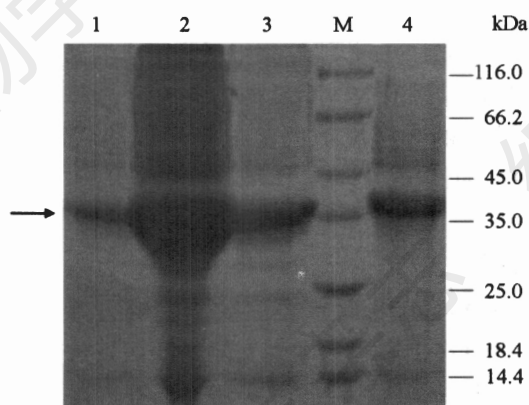


图4 离子交换和分子筛柱层析洗脱峰的SDS-PAGE分析

M: 蛋白质分子量 marker; 1: 分子筛Sephadex G-75纯化后的重组蛋白质; 2: 包涵体经2 mol/L尿素和1% Triton X-100反复洗涤后溶于含8 mol/L尿素的缓冲液; 3, 4: 经离子交换DEAE-52柱上复性和纯化后的重组蛋白质。

杂质, 我们利用2 mol/L尿素和1% Triton X-100对包涵体进行反复洗涤, 不但去掉了细菌内毒素等杂质, 而且减少了后步的纯化压力, 非常有利于后续的包涵体复性^[6]。如图4所示, 通过低浓度的尿素和1% Triton X-100的反复洗涤, 包涵体中EGF-IL-18的纯度达到了70%(图4, 第2道)。

2.4 重组EGF-IL-18柱上复性和纯化

EGF-IL-18融合蛋白的预测等电点为5.7, 我们考虑利用阴离子交换柱DEAE-52分离目的蛋白, 同时尝试以离子交换柱层析柱上复性纯化EGF-IL-18融合蛋白。在变性条件下, EGF-IL-18能与阴离子交换柱有效结合, 而未结合的杂蛋白被大体积的结

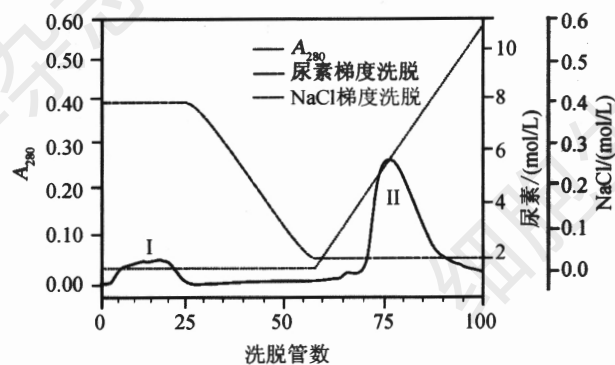


图5 以阴离子交换柱DEAE-52柱上复性和纯化EGF-IL-18的层析图

I峰: 未挂柱的杂蛋白; II峰: 氯化钠梯度洗脱已复性的重组蛋白质。

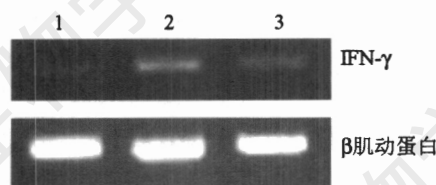


图6 EGF-IL-18诱导PBMC中IFN- γ mRNA的表达

1: 0.5 μ g/ml ConA; 2: 0.5 μ g/ml ConA+IL-18; 3: 0.5 μ g/ml ConA+EGF-IL-18。

合缓冲液洗脱下来, 通过逐渐降低尿素浓度实现对目的蛋白的柱上复性, 然后以10 mmol/L~1.0 mol/L的氯化钠梯度洗脱获得已复性的可溶性EGF-IL-18。典型的柱上复性及氯化钠梯度洗脱结果如图5所示, SDS-PAGE证实第II峰即为可溶性EGF-IL-18融合蛋白, 并且纯度在85%以上(图4, 第3、4道), 这表明离子交换柱上复性一步法就能得到较高纯度的可溶性EGF-IL-18, 得率一般在70%左右。复性后的EGF-IL-18经分子筛Sephadex G-75进一步纯化去除杂蛋白, 纯度达到95%(图4, 第1道)。

2.5 RT-PCR检测EGF-IL-18融合蛋白诱导PBMC IFN- γ 基因表达

在ConA存在下, 通过分析复性纯化后的EGF-IL-18融合蛋白促进PBMC IFN- γ 基因表达的能力, 初步评价融合蛋白的生物活性。图6、图7结果表明, 标准IL-18组和EGF-IL-18融合蛋白组有明显的IFN- γ mRNA表达($P < 0.001$), 且与标准IL-18组相比, EGF-IL-18融合蛋白组的相对光密度值达66%, 而阴性对照组则没有检测到IFN- γ mRNA的明显表达。

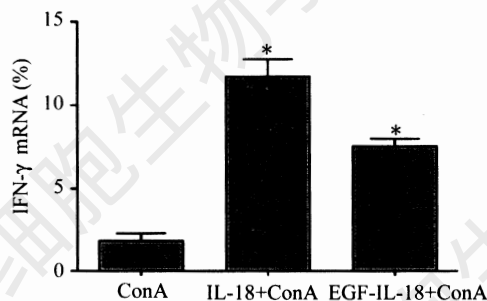


图7 EGF-IL-18 对 PBMC 中 IFN- γ mRNA 表达的影响 (IFN- γ β 肌动蛋白, $\bar{x} \pm s$)
与空白对照组比较, * $P < 0.001$ 。

3 讨论

EGF-IL-18 是一个具有肿瘤治疗前景的基因工程蛋白质药物。运用真核系统表达目的蛋白具有很多优点, 如我们曾应用杆状病毒系统在昆虫细胞 sf9 中表达 EGF-IL-18 融合蛋白, 具有上清液表达易纯化、表达的蛋白质可以进行翻译后修饰和无内毒素污染等优点。但是应用此法 EGF-IL-18 融合蛋白的表达量少, 很难进行大量制备和纯化。本文中, 我们利用大肠杆菌表达 EGF-IL-18 融合蛋白, 不但具有简便、快速和低成本的优点, 而且表达量高, 通过几步纯化就能得到高纯度的目的蛋白。然而, 同大多数外源蛋白在大肠杆菌中的表达一样, EGF-IL-18 以包涵体的形式表达, 需要对包涵体进行复性才能获得有活性的蛋白质。目前常用的包涵体复性方法有 3 类: 稀释复性、透析复性和层析复性。稀释法是小规模包涵体复性最常用的方法, 这种方法操作简单, 适于小规模使用, 但这种方法要在极低的蛋白质浓度下复性, 复性过程中需要较大的复性容器, 并且复性后需要对样品进行浓缩, 不利于大量制备; 透析复性法由于速度慢, 耗时长, 易形成无活性的聚集体, 也不适合规模生产^[7]; 层析复性是近期包涵体复性的研究热点, 它可以通过变性蛋白在层析柱中与层析介质的相互作用抑制蛋白质的聚集, 从而达到提高蛋白质活性回收率的目的, 并且同时还能将蛋白质提纯, 起到一举两得的效果^[7-9]。在本实验中, 我们利用离子交换层析对目的蛋白进行复性, 通过选择 pH 值为 8 的缓冲液, EGF-IL-18 能够有效挂柱, 进而逐渐降低尿素浓度柱上复性目的蛋白, 然后以氯化钠梯度洗脱获得已复性的可溶性 EGF-IL-18, 从而实现一步法复性和纯化得到了 EGF-IL-18 融合蛋白。进一步的免疫印

迹和 IFN- γ 诱导实验证实我们已获得具有初步生物学活性的 EGF-IL-18 融合蛋白, 下一步通过应用肠激酶切掉硫氧还蛋白标签后, 便能得到具有完整 N 端的 EGF-IL-18 双功能分子。

在层析过程中进行复性是一种极具应用前景的复性法。目前常用的层析复性方法有排阻层析 (SEC)、离子交换层析 (IEC)、金属螯合物亲和层析 (IMAC) 和疏水作用层析 (HIC)。我们之所以选用 IEC 进行 EGF-IL-18 融合蛋白的复性主要是考虑到以下两点。第一, 与 SEC 相比, IEC 的柱负荷高, 变性蛋白可与固体相作用使变性蛋白质在填料表面吸附, 减少了由于分子间聚集产生沉淀的趋向较 SEC 强, 最重要的是 IEC 的分离效果要好于 SEC。第二, 与 IMAC 复性法相比, 由于 EGF-IL-18 融合蛋白分子内含有 6 个半胱氨酸, 复性过程中需要氧化还原系统的参与以帮助分子内二硫键的形成, 使用 IMAC 进行复性, 可能会引起 IMAC 上金属离子被还原, 影响目的蛋白的挂柱和纯化。而且 IMAC 缓冲液中的高浓度盐常会增加折叠中间体的疏水作用, 容易引起蛋白质聚集和沉淀, 需要对层析过程中的结合、洗涤和复性条件反复优化, 才能防止蛋白质聚集沉淀。另外, 应用 IMAC 进行复性的先决条件是要求组氨酸标签不能干扰天然蛋白构象的形成和重组蛋白需带有组氨酸标签, 而使用 IEC 复性, 可以应用于普通的非融合表达的重组蛋白质, 其填料成本低且可反复利用, 分离效果满意, 因此是大规模生产应用的理想方法。

本文中, 我们通过初步摸索, 发现在蛋白质上样浓度为 20 mg/ml, 流动相含有 2 mol/L 尿素和一定浓度的氧化还原对, 流速为 0.5 ml/min 时, EGF-IL-18 的质量回收率到达了 70%。PBMC 的 IFN- γ 诱导实验表明 EGF-IL-18 融合蛋白的活性较标准 IL-18 低, 其原因可能是由于我们在其 N 端融合了 EGF 干扰序列和 15 个氨基酸的连接区。Kirkpatrick 等^[10]研究表明保持 IL-18 分子 N 端氨基酸的天然性对其生物学活性有一定作用。此处, EGF-IL-18 融合蛋白中 IL-18 活性的降低可由其 N 端部分的肿瘤细胞靶向性弥补, 因此相对而言可以暂不考虑。总之, 我们构建的原核表达载体在大肠杆菌中高效表达了 EGF-IL-18 融合蛋白, 并利用离子交换层析实现了对变性 EGF-IL-18 融合蛋白的重折叠, 获得了高纯度具有 IFN- γ 诱导活性的目的蛋白, 为进一步开展 EGF-IL-18 的体内研究及其大量纯化制备打下基础。

参考文献 (References)

- [1] Jimeno A *et al.* *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, **53**: 179
[2] 吕建新等. *遗传*, 2005, **27**: 557
[3] Lu JX *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **334**: 157
[4] Bradford MM *et al.* *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248
[5] Laemmli UK. *Nature*, 1970, **227**: 680
[6] Clark EDB. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9**: 157
[7] Clark ED. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, **12**: 202
[8] Li M *et al.* *Protein Expr Purif*, 2004, **33**: 1
[9] Jungbauer A *et al.* *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**: 487
[10] Kirkpatrick RB *et al.* *Protein Expr Purif*, 2003, **27**: 279

Expression, Purification, and Refolding of Recombinant Human EGF-IL-18 Fusion Protein in *E. coli*

Jian-Hua Pan, Ying Peng, Zhao-Jing Zheng, Jian-Xin Lu*

(*Institute of Cellular and Molecular Medicine, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China*)

Abstract EGF-IL-18 fusion gene was amplified from pFUS-EGF-IL18 by PCR, and then was inserted into pET32a(+) to construct a prokaryotic expression vector pET32a(+)-EGF-IL-18. The target protein was highly expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) and was mainly present in inclusion body observed by SDS-PAGE. After EGF-IL-18 inclusion body was repeatedly washed by 2 mol/L urea and 1% Triton X-100, the denatured EGF-IL-18 was refolded by ion-exchange chromatography using the urea linear gradient strategy. It showed that ion-exchange chromatography not only facilitated the refolding of EGF-IL-18, but also the target protein was purified at the same time. After being further purified with size-exclusion chromatography, EGF-IL-18 could effectively induce expression of interferon- γ mRNA in PBMC in the presence of 0.5 μ g/ml ConA *in vitro*. This simple, effective method may be applied in the future to mass production of EGF-IL-18 and lay a solid base for detailed evaluation of bioactivities of EGF-IL-18 *in vitro* and *in vivo*.

Key words EGF-IL-18 fusion protein; inclusion body; ion-exchange chromatography; on-column refolding

Received: March 8, 2006 Accepted: May 18, 2006

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.302769) and the Major Program of Zhejiang Medical Science (No.2001ZD007)

Corresponding author. Tel: 86-577-86689889, E-mail: jx@wz.zj.cn