

猪 IFN- α 在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达

林宝珍¹, 朱艳平², 黄文科², 岑路³, 郭霄峰²

(1 南海出入境检验检疫局, 广东 南海 528200; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 3 广州粤丰动物保健有限公司, 广东 广州 510830)

摘要: 为了获得高效抗病毒活性的猪 α -干扰素蛋白, 采用 PCR 法扩增获得猪 α -干扰素基因完整的开放阅读框 (ORF), 构建重组表达质粒 pPICZ α C-IFN, 电击转化毕赤酵母感受态细胞 X33. 挑阳性菌落诱导表达, 离心取上清, SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析, 可见 1 条相对分子质量约 19 400 的清晰蛋白条带, 与理论值相符, 表明表达产物为猪 α -干扰素. 在 Vero 细胞上检测该干扰素抗 VSV 的活性为 4.04×10^6 IU/L.

关键词: 猪 α -干扰素; 巴斯德毕赤酵母; 分泌表达; 抗病毒活性

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)01-0122-03

The Secretive Expression of Porcine Alpha-Interferon Gene in *Pichia pastoris*

LIN Bao-zhen¹, ZHU Yan-ping², HUANG Wen-ke², CEN Lu³, GUO Xiao-feng²

(1 Nanhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanhai 528200, China;

2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3 Guangzhou EverRich Animal Health Co. Ltd, Guangzhou 510830, China)

Abstract: In order to get alpha-interferon (INF- α) with high level secretive expression and high antiviral activities, the porcine alpha-interferon gene was amplified by PCR, and a DNA fragment of 501 bp, the open reading framework (ORF) was obtained. Then, the target gene and pPICZ α C were digested with *Eco*RI/*Xba*I and were linked. The recombinant plasmid of pPICZ α C-IFN was linearized by *Sac*I and electroporated into *Pichia pastoris* X-33. PCR assay was used to identify colonies. The high copy recombinant strains were screened and induced by regulation of methanol utilization. IFN- α protein was detected by SDS-PAGE and Western-blotting analysis. The result showed the IFN- α protein with a relative molecular mass of 19 400 was expressed in *Pichia pastoris* X-33. The antiviral activity of IFN- α against vesicular stomatitis virus (VSV) was investigated on the Vero cell and the result indicated that IFN- α could inhibit VSV and the activity was 4.04×10^6 IU/L.

Key words: porcine alpha-interferon; *Pichia pastoris*; secrete expression; anti-virus activity

干扰素 (IFN) 是一类高活性多功能糖蛋白^[1-2]. 大量临床研究表明, 干扰素在抗病毒性疾病和增强机体免疫调节能力方面效果显著. 干扰素分为 3 型: I 型干扰素, 除了传统的 IFN- α 、IFN- β 外, 还有 IFN- ω 、新成员 IFN- τ 和非典型的 IFN- δ ; II 型干扰素只有一种: IFN- γ . III 型干扰素包括 IFN- λ 1、IFN- λ 2 和 IFN- λ 3^[3], 即 IL29、IL-28A 和 IL-28B^[4]. 其中 α -干扰素

以其显著的抗病毒作用倍受人们重视. 目前市售的猪干扰素主要通过大肠杆菌表达系统或猪白细胞获得, 需要表达后的变性、复性等复杂工艺, 以至产品价格居高不下, 无法在临床上广泛应用. 毕赤酵母表达系统对外源基因的表达为分泌表达, 无需变性、复性, 因而具备规模化生产、低成本的可能. 本研究利用毕赤酵母表达系统表达猪 IFN- α 蛋白, 并研究该

收稿日期: 2009-06-30

作者简介: 林宝珍 (1978—), 女, 硕士; 通讯作者: 郭霄峰 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: xfguo@scau.edu.cn

基金项目: 广东省动物防疫检疫研究专项经费 [粤财农 2007] 479 号

蛋白的抗病毒活性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 重组质粒 pETIFN- α 由华南农业大学兽医微生物教研室构建,包涵有猪 α -干扰素全基因. pPICZ α C, 毕赤酵母 (*Pichia pastoris* X33), Invitrogen 公司产品.

1.1.2 细胞、病毒与抗体 Vero 细胞和水泡性口膜炎病毒 (VSV) 由华南农业大学兽医学院微生物教研室保存. 小鼠抗猪 IFN- α_1 抗体、Goat-Anti-Mouse-IgG-HRP 和 DAB 为美国 PBL 生物医学实验室产品.

1.1.3 临床用药 复方穿心莲注射液、头孢噻唑钠、10% 氟苯尼考、利多金粉 (8% 黄脂多糖和 5% 盐酸左旋咪唑可溶性粉) 由广州粤丰动物保健有限公司生产提供.

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的构建 根据猪 IFN- α 的核苷酸序列^[5] 设计合成引物,以 pETIFN- α 质粒为模板,PCR 扩增目的片段. 目的片段与 pMD18-T 连接,转化大肠杆菌 DH5 α . 获得重组质粒 pMDIFN- α . EcoR I 和 Xba I 双酶切 pMDIFN- α 和表达载体 pPICZ α C,连接后转化 DH5 α ,获表达质粒 pPICZ α C-IFN.

1.2.2 干扰素的诱导表达 用 SacI 线性化 pPICZ α C-IFN,电击转化毕赤酵母 X33. 从 YPDS 平板上挑取具有 Zeocin (100 μ g/mL) 抗性的单菌落,28 ~ 30 $^{\circ}$ C 诱导表达 96 h. 取上清作 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析^[6].

1.2.3 IFN 生物学活性测定 以 Reed-Muench 法测定 VSV 的 TCID₅₀^[7]. 表达上清经青、氯霉素室温处理 30 min,无菌检验合格,用细胞维持液作连续 4 倍梯度稀释,在长成单层的 Vero 细胞 96 孔细胞培养板上,检测猪 IFN- α 抗 VSV 的活性,每个稀释 6 个重复,同时设置干扰素对照、细胞对照和病毒对照. 待病毒对照孔出现完全细胞病变,判断结果.

1.2.4 IFN 治疗 PRRS 的临床效果观察 表达产物以体积分数为 0.4% 甲醛灭活 24 h. 将临床上和实验室确诊为繁殖与呼吸障碍综合症 (PRRS) 的病猪随机分成 3 组. 对照组 8 头,不用干扰素. 试验 I 组 10 头,颈部肌注干扰素 1.5 mL $\cdot$ 头⁻¹ $\cdot$ d⁻¹,连用 6 d. 试验 II 组 10 头,颈部肌注干扰素 2.0 mL $\cdot$ 头⁻¹ $\cdot$ d⁻¹,连用 6 d. 对照组与试验组再颈部肌肉注射复方穿心莲注射液 5.0 mL $\cdot$ 头⁻¹ $\cdot$ d⁻¹、头孢噻唑钠 2 g $\cdot$ 头⁻¹ $\cdot$ d⁻¹; 10% 氟苯尼考每 100 g 拌料 100 kg/d、利多金粉每

100 g 拌料 100 kg/d,连用 6 d. 注射 IFN 后,每天测体温,观察食欲、饮水等.

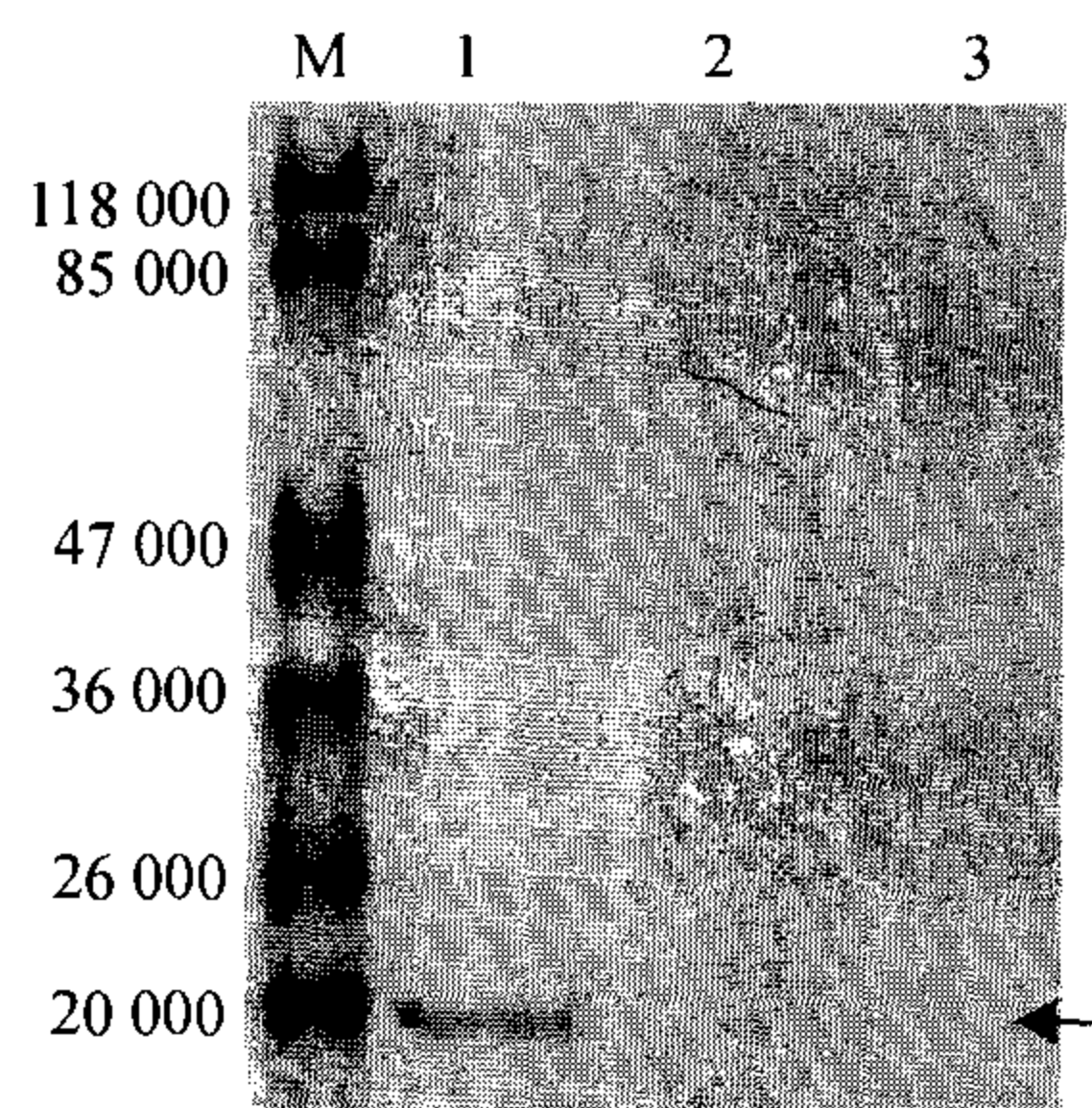
2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的构建及鉴定

以 pETIFN- α 为模板扩增出 1 条 501 bp 的特异 DNA 片段,其大小与试验设计相符. 然后与表达质粒 pPICZ α C 连接. 经酶切、PCR 及测序,显示目的片段已正确插入表达载体 pPICZ α C 中,成功构建 pPICZ α C-IFN 重组质粒.

2.2 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析

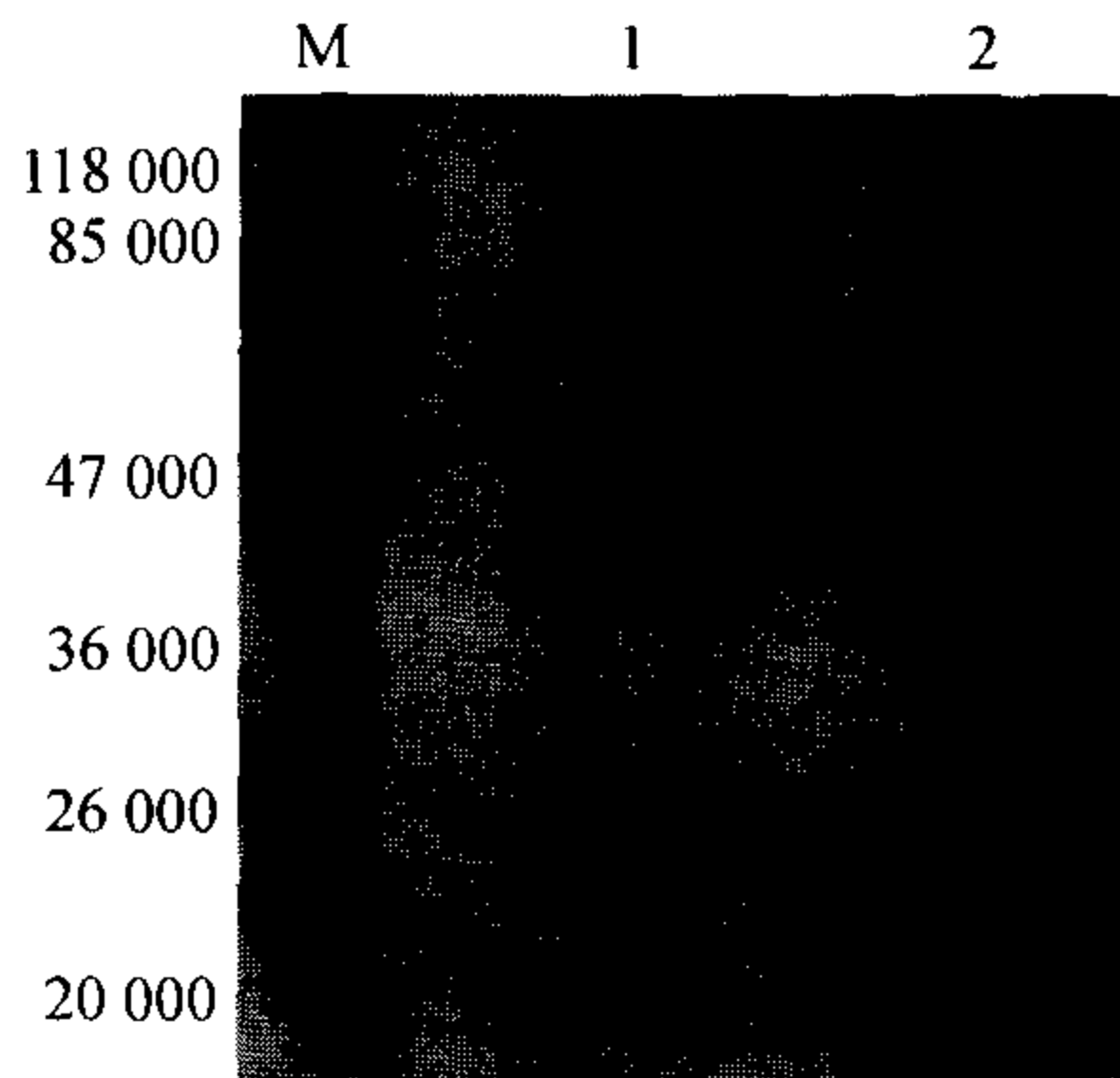
取 20 μ L 表达产物进行 SDS-PAGE,结果显示,在相对分子质量 19 400 处有 1 条蛋白条带 (图 1). 以小鼠抗猪 α_1 -干扰素单克隆抗体为一抗,Goat-anti-Mouse-IgG-HRP 为二抗,进行 Western-blotting 分析,在相对分子质量 19 400 处出现 1 条特异染色条带 (图 2).



M: 预染 Marker; 1: pPICZ α C-IFN 转化的重组酵母; 2: pPICZ α C 转化的酵母; 3: 空白菌株 X33

图 1 重组产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Analysis of expression product of INF- α by SDS-PAGE



M: 预染 Marker; 1: pPICZ α C-IFN 转化的重组酵母; 2: pPICZ α C 转化的酵母

图 2 表达产物的 Western-blotting 分析

Fig. 2 Detection of expression product of INF- α by Western-blotting

2.3 干扰素蛋白的抗 VSV 活性检测

经测定,VSV 的 TCID₅₀ 是 0.1 mL 10^{-2.84}. 将干扰素蛋白接种于 Vero 细胞单层,作用 18 h 后加入 100TCID₅₀ 的 VSV,继续培养 24~36 h,获得猪 α-IFN 抗 VSV 的活性为 4.04 × 10⁶ IU/L.

2.4 IFN 治疗 PRRS 的临床效果观察

试验组病猪用药后 2 d 体温下降并开始采食,连续 2 个疗程后,体温降至 39.2 °C,正常采食. 2 个疗程后(6 d)除 6 头死亡外,其余全部治愈,治愈率为 70%. 而对照组在 2 个疗程后死亡 4 头.

3 讨论

巴斯德毕赤酵母可对表达蛋白进行糖基化、脂酰化、磷酸化及蛋白裂解、折叠、二硫键的形成等翻译后加工和修饰,使表达的蛋白具有生物活性;该菌属于单细胞微生物,营养要求简单,生长快,操作方便,易于培养,发酵技术也非常成熟,具有大规模生产基因工程产品的潜力;具有强有力的乙醇氧化酶(AOX1)基因启动子,可严格调控外源蛋白的表达;表达量高,有利于工业放大生产.

高浓度甲醇(占培养基体积超过 0.63%)对细胞有毒害作用^[8],低浓度甲醇启动外源基因转录的效率较低^[9]. 但表达糖化酶时如甲醇体积分数为 0.75%,表达量最高^[10]. 本研究每 24 h 添加甲醇至终体积分数为 1%,蛋白表达量最高. 试验过程中我们采用边培养边浓缩的方法,即在换培养基时缩小体积,变相浓缩表达产物,克服摇瓶发酵无法高密度发酵的缺点,也有利于目的蛋白提取. 诱导表达完成后,我们用体积分数为 0.4% 的甲醛处理上清,以灭活酵母菌. 经动物接种,该体积分数的甲醛对动物无毒性作用,对干扰素的活性也无影响.

利用我们研制的猪 IFN-α 治疗已感染高致病性蓝耳病毒的病猪,取得了预期的效果. 在选治的 20 头病猪中,最后 6 头死亡,14 头治愈,治愈率达 70%. 而未用干扰素的另外 8 头病猪,死亡 4 头,存活 4 头,表明该干扰素对猪高致病性蓝耳病有明显的治疗作用. 但在试验中我们发现,如病猪病情太重(濒临死亡),不配合抗菌药物,干扰素的治疗效果也不太明显. 我们也比较了 3 d 疗程和 6 d 疗程的效果,结果发现使用干扰素后的第 2 d,病猪体温开始

下降,部分病猪开始有食欲,但一个疗程后的第 4 d,部分病猪的体温又回升. 如连用 2 个疗程(6 d),治疗效果明显. 因此,以猪 α-干扰素治疗高致病性蓝耳病的用药时机应在发病的初期,连用 2 周并且配合抗菌药物.

参考文献:

- [1] ISHIDA N, ORITANI K, SHIRAGA M, et al. Differential effects of a novel IFN-ζ/limitin and IFN-α on signals for Daxx induction and Crk phosphorylation that couple with growth control of megakaryocytes[J]. *Experimental Hematology*, 2005, 33(4): 495-503.
- [2] BONJARDIM C A. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses-and viruses counteract IFN action[J]. *Microbes and Infection*, 2005, 7(3): 569-578.
- [3] KOTENKO S V, GALLAGHER G, BAURIN V V, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 69-77.
- [4] SHEPPARD P, KINDSVOGEL W, XU Wen-feng, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 63-68.
- [5] 谢海燕, 郭霄峰. 猪 α-干扰素的原核表达[J]. *华南农业大学学报*, 2004, 25(4): 86-88.
- [6] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯, 著. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬燕, 黎孟枫, 等译. 侯云德等校. 北京: 科学出版社, 1998: 46-162.
- [7] 殷震, 刘景华. 病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 329-331.
- [8] ZHANG Wu, INAN M, MEAGHER M M. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2000, 5: 275-287.
- [9] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24: 45-66.
- [10] FIEROBE H P, MIRGORODSKAYA E, FRANSEN T P, et al. Overexpression and characterization of *Aspergillus awamori* wildtype and mutant glucoamylase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Comparison with wild-type recombinant glucoamylase[J]. *Protein Expression and Purification*, 1997, 9: 159-170.

【责任编辑 柴 焰】