

## 鸡 $\gamma$ 干扰素基因在毕赤酵母中的分泌表达

周庆丰, 毕英佐, 马静云, 陈 峰, 曹永长

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**为了获得高效分泌表达 ChIFN $\gamma$  的重组毕赤酵母菌株,利用基因工程技术,将 435 bp 的 ChIFN $\gamma$  成熟肽编码基因亚克隆到巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达载体 pPICZ $\alpha$ C 中,将该重组质粒用 *Bst*X I 线性化并通过电击法转化毕赤酵母 X-33 菌株,用 500  $\mu$ g/mL 抗生素 Zeocin 筛选高拷贝阳性重组菌. 甲醇诱导表达的重组 ChIFN $\gamma$  经 SDS-PAGE 电泳,可在相对分子质量约  $2.0 \times 10^4$  处检测到目的蛋白带,目的蛋白占酵母表达上清液总蛋白质的 35%. 微量细胞病变抑制法检测表达产物的生物学活性,检测结果表明,巴斯德毕赤酵母表达的重组 ChIFN $\gamma$  的抗病毒效价为 6 400 U/mL.

**关键词:**鸡  $\gamma$  干扰素; 毕赤酵母; 基因表达; 抗病毒活性

中图分类号:Q78; S 831

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)03-0105-04

### Secretive expression of chicken interferon- $\gamma$ gene in *Pichia pastoris*

ZHOU Qing-feng, BI Ying-zuo, MA Jing-yun, CHEN Feng, CAO Yong-chang

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:**The 435 bp chicken interferon- $\gamma$  gene cDNA encoding mature peptide was cloned into the vector pPICZ $\alpha$ C, the recombinant vector linearized by *Bst*X I and transformed into *Pichia pastoris* X-33. After the PCR analysis of the *Pichia* transformants, ChIFN $\gamma$  gene was expressed in *Pichia pastoris*. SDS-PAGE analysis of the culture supernatants showed that ChIFN $\gamma$  gene could be expressed as a  $2.0 \times 10^4$  protein. Density scanning of the SDS-PAGE revealed that the targeted protein accounted for 35% of the total protein in the supernatants. The titer of the antiviral activity in culture supernatant of *Pichia pastoris* was about 6 400 U/mL.

**Key words:**chicken interferon- $\gamma$ ; *Pichia pastoris*; gene expression; antiviral activity

鸡干扰素(chicken interferon)是 1957 年 Isaacs 和 Lindenmann 利用鸡胚绒毛尿囊膜研究流感干扰现象时发现的. 尽管鸡干扰素是最先发现的干扰素,但对其研究远远落后于对哺乳动物和人类干扰素的研究,直到 1994 年, Sekellick<sup>[1]</sup>才首先克隆到鸡的  $\alpha$  干扰素基因,1995 年, Digby<sup>[2]</sup>首次克隆到鸡的  $\gamma$  干扰素基因. 最近的研究表明, ChIFN $\gamma$  的初始翻译产物含 164 个氨基酸,氨基端 19 个氨基酸为信号肽,成熟的蛋白质为 2 条含 145 个氨基酸的多肽链组成的同源二聚体<sup>[3,4]</sup>, ChIFN $\gamma$  具有抗病毒、免疫调节等多方面的生物学活性<sup>[5,6]</sup>. 我国是养禽业大国,研制具有抗

病毒活性和免疫调节活性的基因工程鸡  $\gamma$  干扰素无疑在禽病防治上具有十分重要的意义. 巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 是近年发展起来的一种真核表达系统. 它既具有原核表达系统易于遗传操作和培养的优点,又具有能正确进行翻译后的加工修饰等特点,而且毕赤酵母自身分泌的蛋白质较少,有利于外源蛋白的分离纯化<sup>[7]</sup>. 为了研究和开发鸡基因工程干扰素制剂来控制鸡的病毒性传染病,本研究亚克隆了我国广东地方鸡种石岐杂鸡 ChIFN $\gamma$  成熟肽基因 cDNA、构建了毕赤酵母分泌表达 ChIFN $\gamma$  系统,并且对表达产物的抗病毒活性进行了初步研究.

收稿日期:2003-09-18

作者简介:周庆丰(1974-),男,博士研究生. 通讯作者:毕英佐(1944-),男,研究员.

基金项目:广东省重点科技攻关项目(99M04205 G)

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌种、病毒和常用试剂

含有石岐杂鸡 ChIFN $\gamma$  全长基因 cDNA 的质粒 pGEMT-chIFN $\gamma$  由华南农业大学动物基因工程实验室保存<sup>[6]</sup>。质粒 pPICZ $\alpha$ C 和巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 野生株 X-33 为 Invitrogen 公司产品。水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 购自中国预防医学科学院病毒研究所中国医学菌种保存中心。限制性内切酶 *Cla*I、*Xba*I 和 *Bst*X I, *Taq* DNA 聚合酶, dNTPs, CIAP 以及 T<sub>4</sub> DNA 连接酶均为大连 Takara 公司产品。酵母 DNA 抽提试剂盒 PUREGENE DNA Isolation Kit 购自深圳晶美生物工程公司。酵母氮碱 YNB (yeast nitrogen base without ammonium sulfate without amino acids) 和抗生素 Zeocin 购自 Invitrogen 公司。胰蛋白酶、199 细胞培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司, SPF 鸡胚购自山东省家禽研究所, 鸡胚成纤维细胞从 10 日龄鸡胚制备。酵母培养基 YPD、BMGY 和 BMMY 等的配制参照 Invitrogen 公司 Easy Select *Pichia* Expression Kit 的方法进行。

### 1.2 鸡 $\gamma$ 干扰素基因的亚克隆

根据华南农业大学动物基因工程实验室 2002 年报道的 ChIFN $\gamma$  基因序列<sup>[6]</sup>, 在其成熟肽编码基因两端合成 1 对引物。上游引物 IFN $\gamma$ -S 序列为 5'-CG-GATCGATCCATACTGCAAGTAGTC-3', 下游引物 IFN $\gamma$ -A 序列为 5'-ACCTCTAGACAATTGCATCTCCTC-3'。以含 ChIFN $\gamma$  基因 cDNA 的质粒 pGEMT-chIFN $\gamma$  为模板进行 PCR 扩增。

### 1.3 毕赤酵母表达质粒的构建

PCR 产物用酒精沉淀后, 用 *Cla*I 和 *Xba*I 双酶切, 电泳回收约 435 bp 大小的 DNA 片段, 并通过 DNA 连接酶将其插入到经 *Cla*I 和 *Xba*I 双酶切后的毕赤酵母分泌表达质粒 pPICZ $\alpha$ C, 构建了重组质粒 pPICZ-chIFN $\gamma$  (图 1), 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 用 25  $\mu$ g/mL 的抗生素 Zeocin 筛选重组大肠杆菌, 提取质粒, 用限制性内切酶 *Cla*I 和 *Xba*I 进行双酶切鉴定, 并送上海博亚生物工程公司进行序列测定。

### 1.4 毕赤酵母的转化与鉴定

取 5~10  $\mu$ g 重组表达质粒 pPICZ-chIFN $\gamma$ , 经限制性内切酶 *Bst*X I 酶切线性化后, 乙醇沉淀回收, 电击转化毕赤酵母 X-33, 在 500  $\mu$ g/mL Zeocin YPDS 平板上筛选高拷贝转化子, 30  $^{\circ}$ C 孵化平板 2~3 d 至出现乳白色的酵母转化菌落。电脉冲参数为电压 1 500 V, 电容 25  $\mu$ F, 电阻 200  $\Omega$ 。用试剂盒 PUREGENE

DNA Isolation Kit 抽提毕赤酵母转化子染色体 DNA, 以抽提的 DNA 为模板进行 PCR 鉴定, PCR 引物为 IFN $\gamma$ -S/IFN $\gamma$ -A。阳性转化子用引物 IFN $\gamma$ -S/IFN $\gamma$ -A 进行 PCR 扩增后, 应得到约 435 bp 大小的 DNA 条带。

### 1.5 ChIFN $\gamma$ 的诱导表达

将酵母转化子接种于 YPD 液体培养基中培养, 取占总体积 5% 的菌液转接到 10 mL BMGY 培养基中, 30  $^{\circ}$ C 振荡培养约 24 h, 至菌体  $D_{600\text{nm}}$  达到 2~6 时, 离心弃上清, 换 10 mL BMMY 培养基。用甲醇诱导培养 5 d, 在诱导过程中, 每 24 h 取样并同时加入甲醇使其终浓度 (体积分数) 为 0.5%。样品经离心收集上清进行 SDS-PAGE 电泳, 并用凝胶成像系统扫描分析表达产物占诱导表达上清液中总蛋白的百分含量。

### 1.6 表达产物的抗病毒效价检测

表达产物的抗病毒活性测定采用微量细胞病变抑制法<sup>[8]</sup>, 采用鸡胚成纤维细胞和水疱性口炎病毒 (CEF-VSV 系统) 测定表达产物的抗病毒效价。鸡胚成纤维细胞在 96 孔细胞培养板上生长约 24 h, 待细胞长成单层后, 吸出上清, 每孔加入用 199 细胞培养基 2 倍倍比稀释的干扰素样品 100  $\mu$ L, 每个稀释度接 3 孔, 37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 吸出上清, 加入 100  $\mu$ L 100 TCID<sub>50</sub> 的 VSV 病毒进行攻毒, 37  $^{\circ}$ C 培养 24~48 h, 待对照孔细胞全部发生明显的细胞病变时在倒置显微镜下观察结果。将抑制 50% 细胞病变的干扰素的最高稀释度定为 1 个干扰素单位。

## 2 结果

### 2.1 含 ChIFN $\gamma$ 基因的重组质粒的构建与鉴定

毕赤酵母整合质粒 pPICZ-chIFN $\gamma$  的构建如图 1 所示。重组质粒 pPICZ-chIFN $\gamma$  经 *Cla*I 和 *Xba*I 双酶切鉴定的结果见图 2, 在 3.5 kb 和 435 bp 处有 2 条 DNA 带, 与预期相符。重组质粒测序的结果也与预期序列相符 (数据略)。

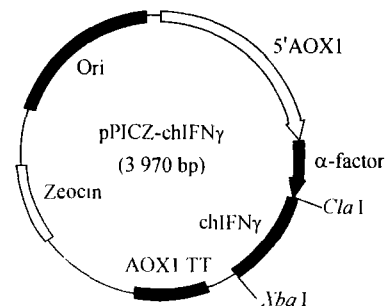
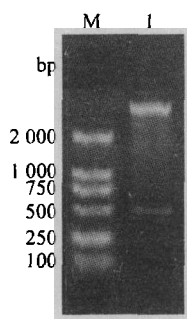


图 1 重组质粒 pPICZ-chIFN $\gamma$  的结构示意图

Fig. 1 Construction map of recombinant plasmid pPICZ-chIFN $\gamma$



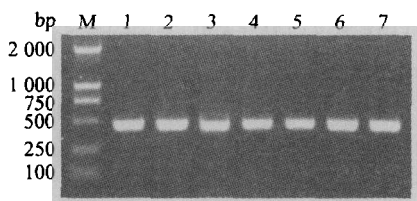
1: DL2000 相对分子质量标准;  
2: *Cla* I 和 *Xba* I 酶切后的 pPICZ-chIFN $\gamma$  质粒  
1: DNA Marker DL2 000;  
2: Plasmid pPICZ-chIFN $\gamma$  digested by *Cla* I and *Xba* I

图 2 质粒 pPICZ-chIFN $\gamma$  的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pPICZ-chIFN $\gamma$  by restriction digestion

### 2.2 酵母的转化与鉴定

通过电击法得到 56 个毕赤酵母转化子, 挑选 7 个转化子并抽提 DNA 作为模板, 用特异性引物 IFN $\gamma$ -S/IFN $\gamma$ -A 对酵母转化子进行 PCR 鉴定, 结果如图 3 所示, 全部转化子都扩增到约 435 bp 大小的 DNA 片段, 表明 ChIFN $\gamma$  成熟肽基因已成功整合到毕赤酵母染色体上。



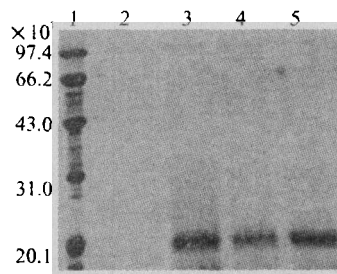
M 为 DL2000 相对分子质量标准; 1-7 分别为 7 个毕赤酵母转化子 DNA 用引物 IFN $\gamma$ -S/IFN $\gamma$ -A 作 PCR 鉴定的结果  
M: DNA Marker DL2000; 1-7: PCR products amplified from 7 yeast clone genome DNA

图 3 ChIFN $\gamma$  酵母转化子的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of the recombinant X-33(pPICZ-ChIFN $\gamma$ )

### 2.3 ChIFN $\gamma$ 基因的诱导表达

3 株阳性酵母菌经甲醇诱导表达 72 h 后的表达上清液经 SDS-PAGE 电泳检测(图 4), ChIFN $\gamma$  转化的毕赤酵母在相对分子质量  $2.0 \times 10^4$  附近检测到目的蛋白条带, 而空质粒 pPICZ $\alpha$ C 转化的毕赤酵母诱导上清在相应位置未出现蛋白条带。电泳凝胶的扫描分析显示, 目的蛋白约占酵母诱导表达上清液中总蛋白的 35% 左右。



1 为蛋白质相对分子质量 Marker, 2 为空质粒 pPICZ $\alpha$ C 转化的酵母诱导表达上清, 3-5 为 3 株不同的酵母转化子 72 h 诱导表达上清

1: Relative molecular mass Marker; 2: Negative yeast clone transformed with plasmid pPICZ $\alpha$ C without inserted ChIFN $\gamma$  gene; 3-5: 3 yeast clone 72 h culture supernatants transformed with plasmid pPICZ-ChIFN $\gamma$

图 4 ChIFN $\gamma$  酵母转化子诱导表达的 SDS-PAGE 结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant yeast culture supernatants

### 2.4 表达产物抗病毒效价的测定

对重组毕赤酵母诱导表达产物进行干扰素抗病毒活性的检测。用 CEF 与表达产物共孵育后, 以水泡性口炎病毒(VSV)攻击, 检测结果表明, 毕赤酵母诱导表达的上清液对 VSV 在 CEF 上表现出较高的抗病毒活性, 能够有效地抑制 VSV 病毒对 CEF 细胞的致病作用。将抑制 50% 细胞病变(CPEI<sub>50</sub>)的干扰素的最高稀释度定为 1 个干扰素单位, 其抗病毒效价约为 6 400 U/mL。

## 3 讨论

干扰素是一类重要的细胞因子, 是由生物体细胞受到病毒或其他诱生剂的作用而产生的分泌性糖蛋白, 具有抗病毒、抗细胞增殖、免疫调节等多种生物学活性<sup>[8]</sup>。动物的干扰素在动物疾病的防治方面具有多种用途。其中鸡干扰素包括 I 型和 II 型 2 类, 它们不仅具有抗病毒、细菌和寄生虫等功能<sup>[9-11]</sup>, 还具有作为免疫增强剂调节免疫反应、促进生长等功能<sup>[12]</sup>。大量的研究表明, 重组禽干扰素可以作为抗病毒药物、免疫调节剂、抗球虫感染、免疫佐剂等应用于养禽生产<sup>[12-14]</sup>。

本研究选择了毕赤酵母表达系统来表达鸡的  $\gamma$  干扰素。本研究选用的毕赤酵母表达载体 pPICZ $\alpha$ C 是一种分泌表达载体, 不仅有利于鸡干扰素的纯化, 而且能够实现干扰素翻译后的糖基化修饰和正确的折叠, 确保表达蛋白的结构和功能, 且有利于鸡干扰素的大规模发酵生产。同时, 由于外源基因是整合在毕赤酵母基因组中, 具有很高的稳定性, 不易发生变异, 因此毕赤酵母在反复传代中外源基因不易丢失,

能够持续稳定表达目的蛋白<sup>[7,15]</sup>。目前毕赤酵母表达鸡 $\gamma$ 干扰素的研究在国内鲜见文献报道,该系统的应用为研究和推广使用重组鸡干扰素治疗禽病毒病奠定了基础。

毕赤酵母能对外源蛋白进行糖基化修饰,可通过天冬酰胺的氨基形成N-糖基化位点或丝氨酸、苏氨酸的羟基形成O-糖基化位点,将糖基以共价键的方式连接到蛋白质上。本研究发现毕赤酵母所表达的rChIFN $\gamma$ 的相对分子质量约为 $2.0 \times 10^4$ ,比理论预期的相对分子质量偏大,这可能是由于ChIFN $\gamma$ 每条多肽链分子含有2个N糖基化位点<sup>[6]</sup>,糖基化作用使得ChIFN $\gamma$ 在SDS-PAGE上的表观相对分子质量大于理论预期的相对分子质量。

#### 参考文献:

- [1] SEKELICK M J, FERRANDINO A F, HOPKINS D A, et al. Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis [J]. J Interferon Cytokine Res, 1994, 14: 71 - 79.
- [2] DIGBY M R, LOWENTHAL J W. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene [J]. J Interferon Cytokine Res, 1995, 15 (11): 939 - 945.
- [3] SCHULTZ U, KASPERS B, RINDERLE C, et al. Recombinant chicken interferon: a potent antiviral agent that lacks intrinsic macrophage activating factor activity [J]. Eur J Immunol, 1995, 25: 847 - 851.
- [4] SCHULTZ U, RINDERLE C, SEKELICK M J, et al. Recombinant chicken interferon from *Escherichia coli* and transfected COS cells is biologically active [J]. Eur J Biochem, 1995, 229: 73 - 76.
- [5] SEKELICK M J, LOWENTHAL J W, O'NEIL T E, et al. Chicken interferons type I and II enhance synergistically the antiviral state and nitric oxide secretion [J]. J Interferon Cytokine Res, 1998, 18: 407 - 414.
- [6] 吕英姿, 毕英佐, 曹永长. 石歧杂鸡 $\gamma$ -干扰素基因的克隆与序列分析 [J]. 华南农业大学学报, 2002, 23(4): 61 - 63.
- [7] 柴清, 黄秉仁. 甲醇酵母表达系统 [J]. 生命的化学, 1997, 17: 36 - 39.
- [8] 杜平. 医用干扰素学 [M]. 北京: 解放军出版社, 1985. 1 - 268.
- [9] LOWENTHAL J W, O'NEIL T E, DAVID A. Cytokine therapy: a natural alternative for disease control [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1999, 72 (1/2): 183 - 188.
- [10] MO C W, CAO Y C, LIM B L. The *in vivo* and *in vitro* effects of chicken interferon alpha on infectious bursal disease virus and newcastle disease virus infection [J]. Avian Dis, 2001, 45 (2): 389 - 399.
- [11] LOWENTHAL J W, O'NEIL T E, BROADWAY M, et al. Coadministration of IFN-gamma enhances antibody responses in chickens [J]. J Interferon Cytokine Res, 1998, 18: 617 - 622.
- [12] DIMIER I H, QUERE P, NACIRI M, et al. Inhibition of *Eimeria tenella* development *in vitro* mediated by chicken macrophages and fibroblasts treated with chicken cell supernatants with IFN-gamma activity [J]. Avian Dis, 1998, 42: 239 - 247.
- [13] DIMIER POISSON I H, SOUNDOUSS Z, NACIRI M. Mechanisms of the *Eimeria tenella* growth inhibitory activity induced by concanavalin A and reticuloendotheliosis virus supernatants with interferon gamma activity in chicken macrophages and fibroblasts [J]. Avian Dis, 1999, 43 (1): 65 - 74.
- [14] LILLEHOJ H S, CHOI K D. Recombination chicken interferon gamma mediated inhibition of *Eimeria tenella* development *in vitro* and reduction of oocyst production and body weight loss following eimeria acervulina challenge infection [J]. Avian Dis, 1998, 42(2): 307 - 314.
- [15] CREGG J M, CEREGHINO J L, SHI J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. Mol Biotechnol, 2000, 16(1): 23 - 53.

【责任编辑 柴焯】