

猪 α 干扰素基因经密码子改造在 毕赤酵母菌中的高效分泌表达

刘 健¹, 陈瑞爱^{1,2}, 刘珊珊³, 朱杰仪¹, 唐明森¹, 罗满林^{1,2}

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广东大华农动物保健品股份有限公司,
广东 新兴 527439; 3 莱芜市畜牧办公室 动物疫病与预防控制中心, 山东 莱芜 271100)

摘要:根据毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达系统对于密码子的偏嗜性, 将去除信号肽的猪 α 干扰素 (PoIFN- α) 基因重新设计改造并合成一段新的核苷酸序列, 置于毕赤酵母菌 α 因子分泌信号的 DNA 序列后, 构建成 pPICZ α C-PoIFN- α 分泌型重组表达载体, 电转化进入野生型毕赤酵母菌 X-33 中, 经 ZeocinTM 抗性筛选后获得大量多拷贝重组子, SDS-PAGE 和 Western-blot 分析结果表明, 所获得的重组子能够分泌表达出相对分子质量约为 19 000 的 PoIFN- α 特异蛋白, 其有效蛋白表达量较高达 54. 105 mg/L. 经 Vero-VSV 系统测定, PoIFN- α 效价达到 5.87×10^7 U/L. 试验将 PoIFN- α 成熟肽全基因密码子进行改造, 并实现了其在毕赤酵母菌表达系统中的高效分泌表达.

关键词: α 干扰素; 密码子改造; 毕赤酵母; 分泌表达

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)01-0093-05

High Performance Secreted Expression of Porcine Interferon Alpha Gene in *Pichia pastoris* by Codon Change

LIU Jian¹, CHEN Rui-ai^{1,2}, LIU Shan-shan³, ZHU Jie-yi¹, TANG Ming-sen¹, LUO Man-lin^{1,2}

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

2 Guangdong Dahuanong Animal Health Products Corporation, Xinxing 527439, China;

3 Center for Control and Prevention of Animal Infectious Disease, Laiwu Prologue Office, Laiwu 271100, China)

Abstract: According to the codon metatropism of *Pichia pastoris*, the porcine interferon alpha (PoIFN- α) gene, in which the sequence encoding signal peptide was replaced by that of the α -factor of *Saccharomyces cerevisiae*, was cloned into *P. pastoris* expression vector pPICZ α C. The recombinant plasmid pPICZ α C-PoIFN- α was then transformed into *P. pastoris* X-33 cells by electroporation, and stable multicopy recombinant *P. pastoris* strains were selected by ZeocinTM resistance. A great quantity of multiple-inserted recombinants were obtained. SDS-PAGE and Western-blot assays of culture broth from a methanol-induced expression strain demonstrated that recombinant PoIFN- α , about 19 000 proteins, were secreted into the culture medium at the concentration of 54. 105 mg/L. The potency of PoIFN- α was up to 5.87×10^7 U/L by Vero-VSV systems measurement. This experiment changed the sequence coding of PoIFN- α by the codon metatropism of *P. pastoris* and the results proved that this change was feasible.

Key words: the porcine interferon alpha (PoIFN- α); codon change; *Pichia pastoris*; secreted expression

收稿日期: 2010-05-07

作者简介: 刘 健(1982—), 男, 硕士; 通信作者: 罗满林(1957—), 男, 教授, 博士, E-mail: luoml@scau.edu.cn

基金项目: 广东温氏食品集团有限公司 2008 年度第 8 批科研项目 (C080711)

干扰素 (Interferon, IFN) 是一类具有抗病毒、抗肿瘤和免疫激活功能的细胞因子。IFN- α 主要由单核-吞噬细胞产生,是天然免疫和获得性免疫的桥梁,可以激活 NK 细胞的细胞毒性并促进其增殖,调节机体免疫。IFN- α 主要是通过对淋巴细胞和巨嗜细胞的调节或诱导 MHC I 型分子的表达起免疫调节作用的^[1],因具有显著的抗病毒功能而被广泛应用于人类病毒性疾病的预防和治疗。随着动物保健的迫切需求和生物工程技术的不断发展,各种动物干扰素的研究成为近几年来研究热点。

对猪 α 干扰素 (PoIFN- α) 的表达国内学者进行了多项研究,谢海燕等^[2]克隆了猪 IFN- α 基因,构建了原核表达载体,初步对其进行了原核表达研究。曹瑞兵等^[3]克隆了一种新的猪 IFN- α 基因并在大肠杆菌中进行了其成熟蛋白的单纯表达,杜以军等^[4]利用猪 IFN- α 的成熟蛋白基因构建了重组腺病毒质粒 pAd-PoIFN- α 转染 HEK-293A 细胞;葛丽等^[5]克隆了猪 IFN- α 基因,构建了真核表达载体,初步对其做了毕赤酵母分泌表达研究。

对于密码子的改变能够影响蛋白表达的研究,曹瑞兵等^[6]对猪 IFN- α 1 基因进行了改造,在保留编码蛋白序列的同时,使用了大肠埃希菌的偏爱密码子,将合成的猪 IFN- α 1 成熟蛋白编码基因插入原核单纯表达载体 pRLC 中,实现了猪 IFN- α 1 在大肠埃希菌中的高效表达。毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达系统同样对于密码子具有偏嗜性^[7],赵翔等^[8]首次确定出毕赤酵母的 19 个高表达优越密码子。本研究基于以上毕赤酵母表达系统对于密码子具有偏嗜性的理论,使 PoIFN- α 成熟蛋白氨基酸序列不变,通过密码子的改变,进行全序列核苷酸改造,重新合成 1 条新的碱基序列,使 PoIFN- α 成熟肽能够在毕赤酵母菌表达系统中高效表达。

1 材料与方 法

1.1 材料

T4 DNA ligase、*EcoR* I、*Kpn* I、*Sac* I、dNTP、DNA Marker、pMD18-T 载体质粒系统为宝生物工程 (大连) 有限公司产品。pPICZ α C 表达载体、毕赤酵母 (X-33)、ZeocinTM 抗性为 Invitrogen 公司产品。*Escherichia coli* DH5 α 由华南农业大学兽医学院传染病教研室保存,小鼠抗 PoIFN- α 单克隆抗体为美国 SANTA CRUZ 生物公司产品。山羊抗小鼠 - IgG-HRP 为广州美津公司产品。

1.2 核苷酸序列及引物的设计合成

应用 DNASTar (Version 7.0) 基因分析软件,参照

NCBI GenBank 上登载的 PoIFN- α 基因成熟肽核苷酸序列 (AY331298),选择高表达密码子重新设计序列,由宝生物工程 (大连) 公司重新合成序列,序列全长 501 bp。将合成的序列连接到 pMD-18Tsimple 载体,转化进入 JM109 中,穿刺菌保存。引物由上海英骏生物工程公司合成,其序列为 P1: CGGAATTC CTGTGACTTGCCACAAACCCACT (下划线处为 *EcoR* I 酶切位点), P2: GGGGTACCTTACTCCTTCTTTCTCAATCTG (下划线处为 *Kpn* I 酶切位点)。同时参照 Invitrogen 公司试验手册^[9]合成 1 对表达载体引物: P3: GACTGGTTAATTGACAAGC 与 P4: GCAAATGGCATTCTGACATCC。

1.3 重组表达载体 pPICZ α C-PoIFN- α 的构建

将穿刺菌在新鲜配制的 LB (Amp⁺ 100 μ g/mL) 平板进行划线,以 LB (Amp⁺ 100 μ g/mL) 液体培养的连接转化的 JM109 菌液为模板,将菌液煮沸处理, P1、P2 为引物进行 PCR 扩增,将经过 PCR 鉴定为阳性的菌株用 OMIGA 公司的小质粒抽提试剂盒抽提质粒,然后将抽提到的质粒用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 进行双酶切,同时 pPICZ α C 也用以上 2 种内切酶进行双酶切,上述 2 种酶切产物经 T4 噬菌体 DNA 连接酶连接后,转化到大肠杆菌菌株 DH5 α 中,小量抽提质粒,经 PCR 和双酶切鉴定后送上海博尚生物技术公司进行 DNA 序列测定。

1.4 重组表达载体导入到宿主表达菌 X-33 中

重组表达载体 pPICZ α C-PoIFN- α 经 *Sca* I 酶线性化后,采用电转化方法导入到毕赤酵母菌 X-33 中。电转化操作过程参考 Invitrogen 公司的 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 进行。将电转化之后的转化菌迅速涂布于 YPDS (添加 ZeocinTM 抗性 100 μ g/mL) 平板,倒置,酵母摇床 30 $^{\circ}$ C 静置培养 3 ~ 5 d。

1.5 多拷贝插入高抗性整合子的筛选

经 YPDS (添加 ZeocinTM 抗性 100 μ g/mL) 的平板筛选含目的基因多拷贝插入的重组子,具体操作步骤参照 Invitrogen 公司的 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 进行。

1.6 高抗性整合子的 PCR 鉴定

以基因组 DNA 为模板,以载体引物 P3、P4 为引物,对挑取的高抗性整合子进行 PCR 鉴定,毕赤酵母基因组 DNA 的提取参照 Invitrogen 公司的 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 进行。

1.7 重组酵母的诱导表达

用灭菌牙签细挑 YPDS 平板上生长的具有 ZeocinTM 抗性的单菌落,接种于 20 mL 的 BMGY 液体培

培养基中进行激活培养,30℃,200 r/min 振荡过夜,至 $D_{600\text{nm}} = 2 \sim 6$,此时细胞处于对数生长期. 1 500 ~ 3 000 r/min 室温离心 5 min,收集沉淀,重悬于 1 mL 的 BMMY 中,继续在 15 mL 的试管中振荡培养. 每间隔 24 h 加入体积分数为 100% 甲醇至终体积分数为 1%,进行诱导培养. 试验同时设转化空载体 pPICZ α C 的酵母菌株为阴性对照.

1.8 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

培养至 96 h 收集样品,室温 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液立即作 SDS-PAGE 分析或置于 -80℃ 保存. SDS-PAGE 和 Western-blot 分析具体操作参照文献[10]进行.

1.9 表达产物的蛋白质含量测定

对诱导表达产物上清液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳后,进行 R-250 染色、脱色,置于薄层扫描仪(UVP 凝胶成像分析系统)进行灰度扫描,通过 Labwork 软件系统来分析,利用牛血清蛋白做定量对照,计算样品总蛋白及总蛋白中 PoIFN- α 的有效含量.

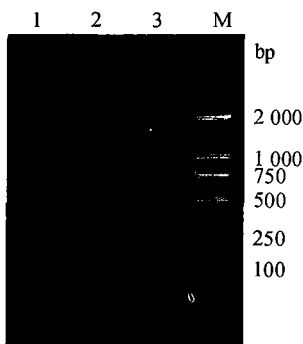
1.10 表达产物的抗病毒活性检测

采用微量细胞病变抑制法测定重组 PoIFN- α 生物学活性,并利用非洲绿猴肾细胞(Vero) - 猪水泡口炎病毒(VSV)系统进行测定. 根据 Reed-Muench 法计算,50% 细胞病变保护的最低稀释度中所含的干扰素量即为 1 个干扰素单位.

2 结果

2.1 pMD-PoIFN- α 重组质粒的 PCR 鉴定和双酶切鉴定

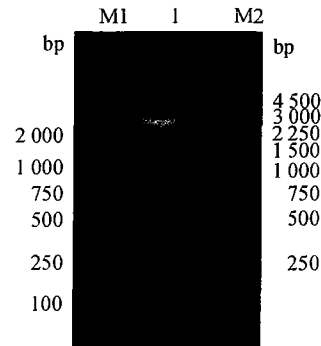
PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,在 500 ~ 750 bp (图 1) 出现特异条带,与理论大小(518 bp)相符. pMD-PoIFN- α 重组质粒经双酶切,在 500 ~ 750 bp 和 2 250 ~ 3 000 bp 的位置出现特异带(图 2),均与理论大小相符.



M:2 000 bp DNA Marker;1,2:穿刺菌液为模板;3:阴性对照.

图 1 重组菌的 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant bacterium by PCR amplification



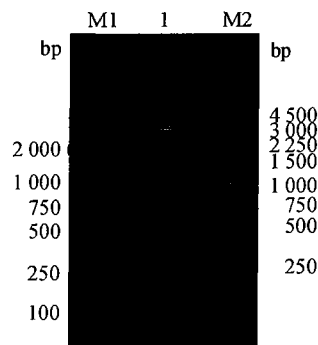
M1:2 000 bp DNA Marker; M2:250 bp Ladder marker; 1:pMD-PoIFN- α 的双酶切产物.

图 2 pMD-PoIFN- α 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMD-PoIFN- α by digestion with *EcoR* I and *Kpn* I

2.2 重组表达载体 pPICZ α C-PoIFN- α 的双酶切鉴定

双酶切产物经过琼脂糖凝胶电泳检测,在 500 和 3 000 ~ 4 500 bp 分别出现特异条带(图 3),大小均与理论值相符. 进一步的测序结果表明,构建的表达载体 pPICZ α C-PoIFN- α 完全正确.



M1:2 000 bp DNA Marker; M2:250 bp Ladder marker; 1:pPICZ α C-PoIFN- α 双酶切产物.

图 3 pPICZ α C-PoIFN- α 双酶切鉴定

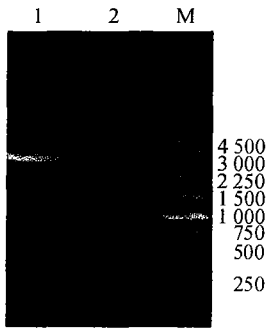
Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pPICZ α C-PoIFN- α by digestion with *EcoR* I and *Kpn* I

2.3 电转化及多拷贝高抗性整合子的筛选

重组表达载体 pPICZ α C-PoIFN- α 经 *Sca* I 酶线性化(图 4),然后通过线性化试剂盒回收,将回收产物电转化导入毕赤酵母菌 X-33 后,通过 YPDS(添加 ZeocinTM 抗性 100 μ g/mL)抗性平板筛选出大量阳性转化子.

2.4 重组酵母菌高抗性整合子的 PCR 鉴定

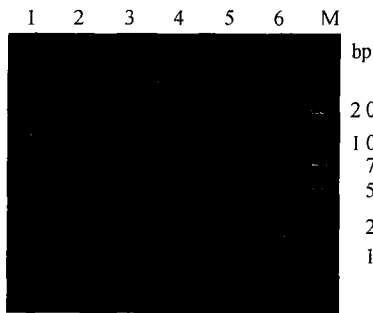
PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,在大于 1 000 bp 处附近出现 1 条特异带(图 5),与理论值(1 069 bp)相符. 而阴性对照没有相应的条带. 结果表明 PoIFN- α 成熟肽基因成功整合到宿主菌的基因组 DNA 中.



M: 250 bp Ladder marker; 1: pPICZ α C-PoIFN- α 重组质粒; 2: pPICZ α C-PoIFN- α 线性化产物.

图4 pPICZ α C-PoIFN- α 线性化

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pPICZ α C-PoIFN- α by digestion with *Sac* I



M: 2 000 bp DNA Marker; 1 ~ 5: 阳性重组酵母菌 PCR 产物; 6: 阴性对照.

图5 重组酵母菌的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of recombinant *Pichia pastoris*

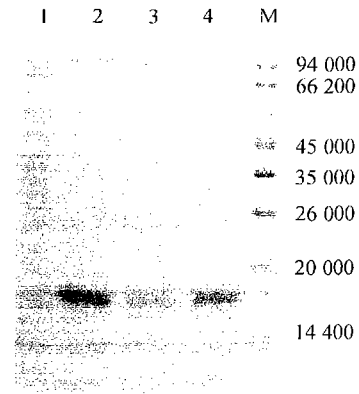
2.5 诱导表达及表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

通过 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 分析, 电泳结果在 19 000 左右处有蛋白条带出现, 而空载体酵母表达产物未出现相应条带(图 6). 而在接下去的 Western-blot 分析显示在 19 000 处均出现与 SDS-PAGE 分析相对应的 PoIFN- α 特异蛋白条带(图 7). 试验表明, 重新人工设计合成 PoIFN- α 基因在毕赤酵母系统中成功实现了表达.

2.6 表达产物的蛋白质含量测定和抗病毒生物活性

采用薄层扫描仪, 通过 Labwork 软件系统来分析, 检测不同诱导时间获得的表达产物电泳结果, 发现诱导 96 h 后的蛋白质量浓度最高, 有效表达量约为 54. 105 mg/L, 约占总蛋白的 69. 67%.

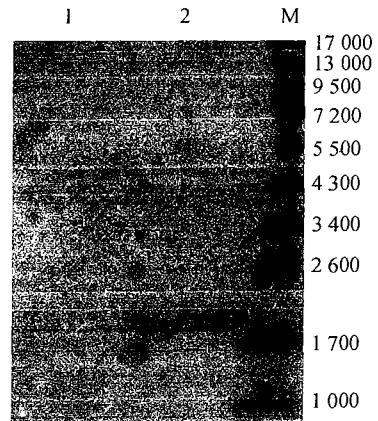
检测诱导 96 h 后的表达产物的抗病毒活性, 达到 $5. 87 \times 10^7$ U/L. 以同样方法检测华南农业大学兽医学院传染病教研室之前保存的未经密码子改造的 PoIFN- α 的抗病毒活性仅为 $1. 817 \times 10^6$ U/L.



M: 蛋白质低相对分子质量标准; 1: 空载体对照; 2 ~ 4: 重组质粒 pPICZ α C-PoIFN- α 转化重组酵母菌表达蛋白.

图6 合成 PoIFN- α 基因在毕赤酵母中分泌表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of culture broth of PoIFN- α gene secretively expressed in *Pichia pastoris*



M: 蛋白质低相对分子质量标准; 1: 空载体对照; 2: 重组质粒 pPICZ α C-PoIFN- α 转化重组酵母菌表达蛋白.

图7 合成 PoIFN- α 基因在毕赤酵母中分泌表达的 Western-blot 分析

Fig. 7 Western-blot analysis of culture broth of PoIFN- α gene secretively expressed in *Pichia pastoris*

3 讨论

在不改变氨基酸组成的前提下, 通过修饰密码子序列也可以提高表达水平. 目前公认的观点是: 通过优化基因的密码子序列, 可以适应 tRNA 的同工受体及宿主的反义密码子摇摆位置处被修饰的核苷酸的丰度, 同时也有利于翻译的二级结构的形成. 在酵母中表达较高的基因往往是采用酵母本身所偏爱的密码子, 研究也表明在所有 61 个密码子中有 25 个是酵母偏爱的. 赵翔等^[8]通过对毕赤酵母的 28 个蛋白编码的基因的同义密码子的使用情况的分析, 确定了毕赤酵母的 19 个高表达优先密码子. 本试验在试验设计时, 既充分考虑了优势密码子的使用, 又结

合了酵母表达系统的特性,考虑合成基因序列 A + T 的含量. 因为 A + T 含量高的基因在毕赤酵母中表达时偶尔会造成转录提前终止,这是因为 A + T 丰富区可能存在转录提前终止信号. 因此对 A + T 含量丰富的基因最好是重新设计序列,使其 A + T 含量在 30% ~ 55%, 本试验人工设计合成的 PoIFN- α 基因中 A + T 含量为 40.92%.

在对 PoIFN- α 成熟多肽基因序列未进行人工合成之前,作者曾经做过未经密码子改造的 PoIFN- α 酵母分泌表达,结果很不理想,经过多批次筛选,偶尔能够筛选出表达菌株,但是表达量不高. 而经过人工设计合成新的 PoIFN- α 成熟多肽基因序列,经过一系列操作,在 YPDS 高抗性平板上筛选出的重组菌株,经过 PCR 鉴定,粗略统计 95% 以上为阳性整合子,SDS-PAGE 分析表明,阳性整合子都能表达,使筛选阳性菌株更容易. 分泌表达蛋白经过仪器和软件分析可以得出,所获得的 PoIFN- α 的有效蛋白含量较高,杂蛋白也较少. 抗病毒试验结果表明,该分泌表达蛋白能很好地保护非洲绿猴肾细胞免受猪水泡口炎病毒的感染,干扰素效价也比较高,而试验过程中通过密码子改造前后干扰素效价的比较也可以看出,改造之后,干扰素的效价有了很大的提高.

总之,本试验重新人工设计合成的 PoIFN- α 成熟蛋白基因核苷酸序列在毕赤酵母表达系统中分泌表达出重组的 PoIFN- α 蛋白,并且较之传统的方法更容易筛选阳性表达菌株,表达量也更大,而且表达的 PoIFN- α 有更好的抗病毒能力,为基因工程大规模发酵生产 PoIFN- α 奠定了良好的基础.

参考文献:

- [1] CHINSANGARAM J, PICCONE M E, GRUBMAN M J. Ability of foot and mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon [J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 9891-9898.
- [2] 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*, 2005, 25(4): 86-88.
- [3] 曹瑞兵, 张素芳, 陈溥言, 等. 一种新的猪 α -干扰素基因克隆及其在大肠杆菌中表达 [J]. *农业生物技术学报*, 2004, 26(3): 278-282.
- [4] 杜以军, 姜平, 李玉峰, 等. 猪 α -干扰素重组腺病毒的构建及其抗口蹄疫病毒活性研究 [J]. *中国病毒学*, 2006, 21(4): 390-393.
- [5] 葛丽, 李震, 于瑞嵩, 等. 猪 α 干扰素基因在毕赤酵母中的分泌表达 [J]. *中国兽医学报*, 2005, 25(3): 289-292.
- [6] 曹瑞兵, 徐学清, 陈溥言, 等. 猪 α 1-干扰素的基因改造与高效原核表达 [J]. *生物工程学报*, 2004, 20(2): 291-294.
- [7] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(1): 45-66.
- [8] 赵翔, 霍克克, 李育阳, 等. 毕赤酵母的密码子用法分析 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(3): 308-311.
- [9] Invitrogen Corporation. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris* [M]. San Diego: Invitrogen Corporation, 2005.
- [10] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

【责任编辑 柴 焰】