

采用 PL 启动子在大肠杆菌中直接表达人 α D 型干扰素

侯云德 周建华 杨新科 张智清 李应霞
吴淑华 段淑敏 胡 钢

(中国预防医学中心病毒学研究所, 北京)

刘新垣 陆长德

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

从 p8218、pUR-222、pBV-114 及 pKC-30 组建杂交质粒 pBV-867, 使人 α D 型干扰素基因在 PL 启动子控制下在大肠杆菌中能够直接表达。每升菌液的干扰素平均产量为 0.8×10^7 单位。

关键词 启动子; 大肠杆菌; 干扰素

人干扰素对某些病毒性疾病及恶性肿瘤有一定的防治效果^[1,2]。但是, 自然干扰素不能大量生产, 价格昂贵。1980 年以来, 人 α 、 β 、 γ 干扰素基因相继克隆成功^[3-6], 为大量生产基因工程干扰素开辟了新的前景。我们于 1982 年建立了人 α D 型干扰素 (IFN- α D) 基因无性繁殖系^[7]。随后, 采用 lac 启动子使 IFN- α D 作为融合蛋白在原核细胞中获得表达^[8]。本文报道, 采用 PL 启动子以及拼接终止密码的方法, 使人 IFN- α D 基因在大肠杆菌中进行直接表达。

材料与 方法

(一) 材料

p8218 系 pBR-322 Pst-1 切点处插入人 IFN- α D 基因为本室建立^[7,9]。pUR-222 带有 lac 启动子, A^R , 2.7Kb^[10], 由加拿大 Calgary 大学汪大建博士惠赠。pKC-30 系 pBR-322 插入 λ 噬菌体 BamHI-HindIII 片段, 带有 PL 启动子以及 N 蛋白编码顺序^[11], 由中国医学科学院基础医学研究所蔡良婉惠赠。大肠杆菌 K12 BMH-71-18 (Δ [lac, pro], F'⁺lac^qZ⁺ Δ M15pro⁺)。N6405 (λ clis857) 系带有温度敏感抑制基因 cl 的 λ 噬菌体的溶原菌。

Hpa-1, BamHI, EcoRI, HaeIII, HindIII, Pst-1, T₄DNA 连接酶均为 Boehringer-Mannheim 公司产品。

(二) 方法

质粒提取, 限制性内切酶水解, 质粒转化, 菌落杂交, 琼脂糖凝胶电泳分子杂交, 杂交质粒的表达测定, 干扰素血清型别的鉴定等方法均按文献^[12]进行。质粒快速鉴定, DNA 片段平端及粘端连接按文献^[12]进行。0.1%SDS-15% PAGE 按常规法进行。

结 果

(一) 杂交质粒 pBV-867 的组建

我们将 p8218 的带有人 IFN- α D 基因的 0.9Kb Pst-1 片段, 插入 pUR-222 的 lac 启动子下游、编码 Z 蛋白第 8 个氨基酸的核苷酸中, 建成 pBV-114。后者在大肠杆菌中可作为融合蛋白进行表达。我们进一步提取 pBV-114 的约 1Kb 的 HaeIII 片段, 它从 IFN- α D 基因的第 58 个核苷酸处切开, 在 3' 端还带有约 0.1 Kb 的 Z 蛋白编码顺序。同时, 将 pKC-30 用 Hpa-1

本文于 1983 年 12 月 15 日收到。

在编码 N 蛋白第 59 个氨基酸的核苷酸后切开。两者经 T₄DNA 连接酶连接后,再用 Hpa-1 水解,以切开环化的 pKC-30。转化 N6405 (或 HB101), 共获得转化菌 250 个。用 [³H] IFN- α DcDNA 为探针进行菌落杂交, 获阳性菌落 47 个。经质粒快速提取, 酶切鉴定, 插入方向正确的有 15 个。该质粒定名为 pBV-867, (图 1, 2)。pBV-867、pKC-30 分别经 EcoRI, HindIII-BamHI 双酶解后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 压印到硝酸纤维膜上, 用 [³²P] IFN- α DcDNA 为探针进行杂交。图 3 可见: pBV-867 经 R1 水解后, 获得 4.8、2.2、0.3Kb 片段, 其中 2.2Kb 片段杂交阳性; 经 BamHI-HindIII 双酶解后获得 3.92、2.48、0.86Kb 三个片段, 其中只有 2.48Kb 片段杂交阳性。这进一步证明, IFN- α D 基因插入方向是正确的。由于 pKC-30 的 Hpa-1

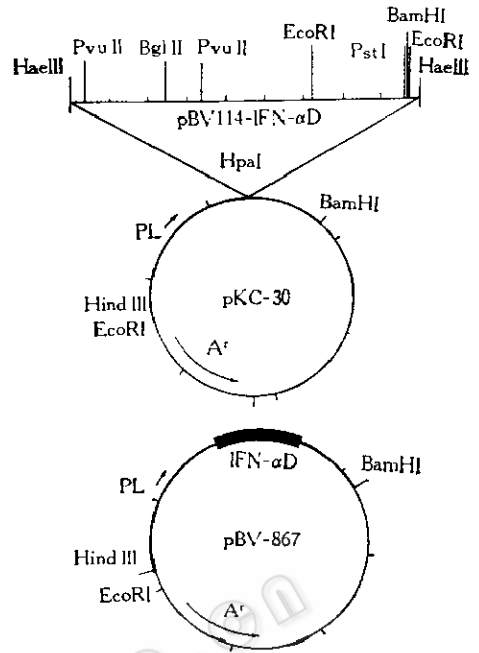


图 1 pBV-867 的重新组建
Fig. 1 Reconstruction of pBV-867

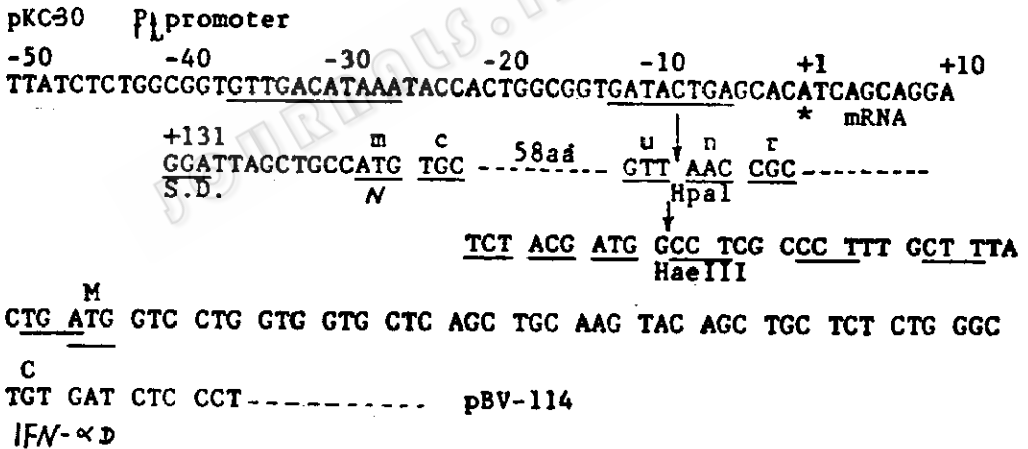


图 2 pBV-867 重新组建
Fig. 2 Reconstruction of pBV-867

切点刚好在编码 N 蛋白第 59 个氨基酸的核苷酸后, 而 pBV-114 的 HaeIII 切点却位于编码 IFN- α D 信号多肽的第二个氨基酸的第一个核苷酸后, 这样的连接使 IFN- α D 基因由原来正确的第一种读码位相改为第二种读码位相, 因此, 在第八个信

号多肽处就遇到终止密码, 但是, TGATG 顺序在终止后, 又可重新开始, 恢复原来的第一种正确读法。这样, pBV-867 编码的 IFN- α D 少 8 个信号多肽, 但却是完全的人干扰素多肽, 去除了 N 蛋白的融合部分 (图 2)。

(二) pBV-867 在大肠杆菌中表达的干扰素产量

由表 1 可见, 12 个插入方向正确的杂质粒转化大肠杆菌 N6405 后, 在 36℃ 均能表达, 平均每升菌液可达 4.74×10^6 单位。鉴于 N6405 带有 cIts 基因, 32℃ 时 cIts 基因正常表达, 其产物可阻断 PL 的转录; 在 42℃ 时 cIts 基因不能正常表达, PL 启动子在 4 小时内使干扰素基因迅速转录。平均干扰素产量可达 0.8×10^7 单位/升菌液。(表 2)。表达的干扰素经 IFN- α 、 β 抗血清鉴定仍属 α 干扰素。

表 1 pBV-867 转化大肠杆菌菌液的抗病毒活性

Table 1 Antiviral activities of extracts of *E. coli* transformed with pBV-867

转化菌 Transformant	抗病毒活性[单位/升菌液 $\times 10^6$] Antiviral activity (unit per liter culture $\times 10^6$)
855	1.01
822	1.64
867	1.64, 30.07, 24.09, 11.88
869	1.64
913	1.64
923	1.64, 1.10, 2.01, 1.03
938	1.37
939	1.64
970	1.64
954	1.64
1005	1.31
1006	1.31
905	1.64
N = 19	$\bar{x} = 4.74 \pm 1.9$

抗病毒活性在 WISH 细胞上测定, 用滤泡性口腔炎病毒感染

Antiviral activity was determined in WISH cell culture challenged with vesicular stomatitis virus

(三) pBV-867-干扰素多肽的鉴定

pBV-867 转化的大肠杆菌, 在 $A_{650} = 0.9$ 时, 收集细胞, 裂解后沉淀, 取上清液, 经 85% 饱和硫酸铵沉淀, pH 2 沉淀, CM-22 离子交换层析, 以 0.005M 醋酸缓冲液 pH 4.4 装柱, 0.1M 醋酸缓冲液 pH 5.0 洗

表 2 pBV-867 转化大肠杆菌在 32℃ 及 42℃ 培养时浸出液抗病毒活性的比较

Table 2 Comparison of the antiviral activities of extracts of *E. coli* transformed with pBV-867 cultured in 32℃ and 42℃

抗病毒活性(单位/升菌液) Antiviral activities (unit/per litre culture $\times 10^7$)	
32℃	42℃
1.10	12.33
1.32	7.49
0.71	8.00
0.54	4.29
$\times 0.99$	8.03

抗病毒活性在 WISH 细胞上测定, 用滤泡性口腔炎病毒感染

Antiviral activity was determined in WISH cell culture challenged with vesicular stomatitis virus

脱去杂蛋白, 收集 0.5M 醋酸缓冲液 pH 5.0 洗脱峰, 干扰素可获得部分纯化, 比活性可达 10^6 单位/毫克蛋白。部分纯化的 pBV-867 干扰素与用同法制备的 pKC-30 转化菌蛋白同时进行 0.1% SDS-15% PAGE, 结果发现在 18—20K 分子量处出现对照样品没有的区带。电泳后, 连续切成 1mm 大小的凝胶, 在 Eagle 溶液中 37℃ 浸泡过夜, 测定干扰素活性, 证明干扰素活性集中在 18—19K 左右。

讨 论

本文采用 PL 启动子和拼接终止密码的方法使人 IFN- α D 基因在大肠杆菌中获得直接高效表达, 每升菌液可达 0.8×10^7 单位。这比 trp 启动子表达 IFN- α A2 融合蛋白要高 20 倍左右^[3] 但比采用 Trp 启动子及人工合成 DNA 接头直接表达成熟 IFN- α A 尚低 20 倍左右^[4]。

pBV-867 干扰素经 SDS-PAGE 后, 从活性效价来推算干扰素的量仅为直接蛋白定量的大约十分之一。说明电泳后 18—20K 区带并不全是活性干扰素多肽, 这可

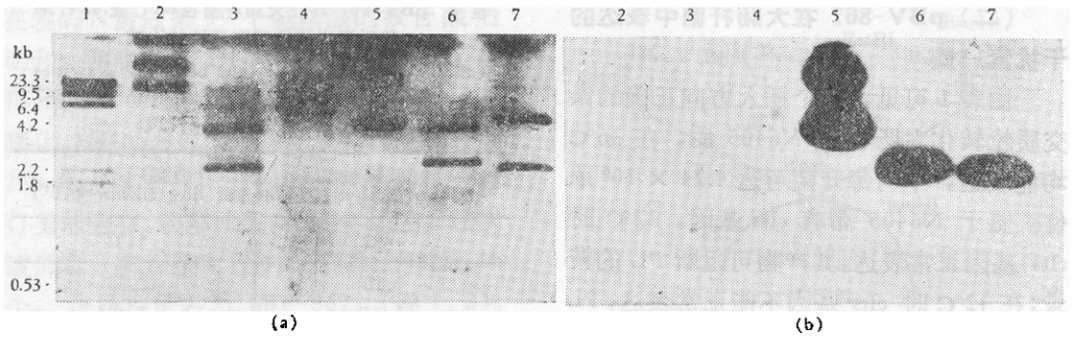


图3 pBV-867 琼脂糖凝胶电泳
Fig. 3 Agarose electrophoresis of pBV-867

a. E. B 染色; b. 同一样本, 用 $[\alpha^{32}\text{P}]\text{IFN-}\alpha\text{D cDNA}$ 杂交结果

1. $\lambda\text{DNA-HindIII}$ 分子量标记, 2. pKC-30 未水解, 3. pKC-30、HindIII、BamHI 双酶解, 4. pKC-30、EcoRI 水解, 5. pBV-867 未水解, 6. pBV-867、HindIII、BamHI 双酶解, 7. pBV-867、EcoRI 水解

a. EB stain; b. Same sample hybridized with $[\alpha^{32}\text{P}]\text{IFN-}\alpha\text{D cDNA}$

1. DNA HindIII molecular marker; 2. pKC-30 undigested; 3. pKC-30 digested with HindIII and BamHI; 4. pKC-30 digested with EcoRI; 5. pBV-867 undigested; 6. pBV-867 digested with HindIII and BamHI; 7. pBV-867 digested with EcoRI

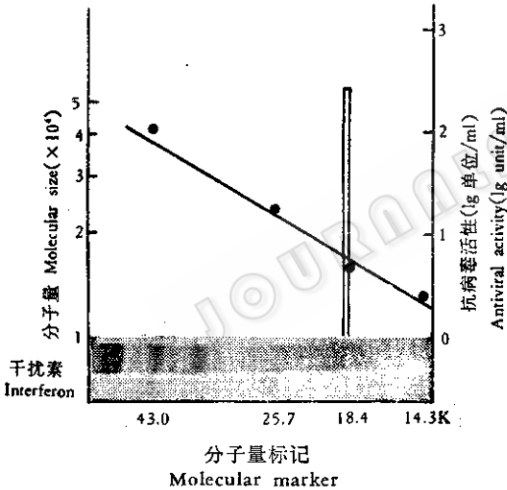


图4 大肠杆菌干扰素在 SDS-PAGE 后
抗病毒活性的检出

Fig. 4 Detection of antiviral activity of *E. Coli* derived interferon after SDS-PAGE

能是因为: (1) 细菌不能完全正确加工真核基因表达的多肽, 而干扰素前体没有活性^[15]; (2) 细菌的酶类可以切割干扰素前体*, 其中 18—19Kb 片段具有活性。

鉴于 pBV-867 表达的干扰素水平较高, 而且不是融合蛋白, 所以具有一定的生产价值。

参考文献

- [1] 侯云德: 《干扰素及其临床应用》, 江苏科技出版社, 1981。
- [2] 侯云德、吴淑华: 《干扰素》, 人民卫生出版社, 1981。
- [3] Taniguchi, T. et al.: *Proc. Japan. Acad.*, B55: 464, 1979.
- [4] Maeda, S. et al.: *PNAS*, 77: 7010, 1981.
- [5] Nagata, S. et al.: *Nature*, 284: 316, 1980.
- [6] Goeddel, D. V. et al.: *Nature*, 295: 505, 1982.
- [7] 侯云德等: 中国医学科学院学报, 4: 327, 1982。
- [8] 侯云德等: 科学通报 28: 1402, 1983。
- [9] 陆长德等: 中国医学科学院学报, 6(1): 1—4, 1984。
- [10] Ruether, U. et al.: *Nuc. Acid. Res.*, 9: 4087, 1981.
- [11] Shimatake, H. et al.: *Nature*, 292: 128, 1981.
- [12] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [13] Goeddel, D. V. et al.: *Nature*, 287: 411, 1980.
- [14] Pestka, S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 210: 307, 1981.
- [15] Guarente, L. et al.: *Science*, 209: 1428, 1980.

* Fiers, w个人通讯

DIRECT EXPRESSION OF HUMAN α D INTERFERON GENE IN *E. COLI* USING LEFT ARM PROMOTER OF λ BACTERIOPHAGE

Hou Yunde Zhou Jianhua Yang Xinke Zhang Zhiqing Li Yingxia

Wu Shuhua Duan Shumin Hu Gang

(*Institute of Virology, China Centre for Preventable Medicine, Beijing*)

Liu Xinyuan Lu Changde

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Shanghai*)

New hybrid plasmid was constructed from p8218, pUR-222, pBV-114 and pKC-30 to allow to human α D interferon gene to be directly expressed in *E. coli* under the left arm promoter of λ bac-

teriophage. The expression level reaches to 0.8×10^7 units per litre culture.

Key words

Promoter; *E. coli*; Interferon