

猪 γ 干扰素基因的克隆、表达及其纯化

郭瀛军 吴丹 陈蕊雯 孙树汉*

(第二军医大学医学遗传学教研室 上海 200433)

摘 要 以 RT-PCR 方法,从经丝裂原诱导的猪外周血淋巴细胞总 RNA 中扩增出编码猪 IFN γ 的基因。经测序证实后插入载体 pJLA-503,并实现在大肠杆菌中的高表达。表达产物以包涵体形式存在,经 7mol/L 盐酸胍变性及精氨酸存在的情况下复性。再经 DEAE-Sepharose 离子交换柱、Sephdex-200 凝胶过滤柱分离获得电泳单一纯猪 IFN- γ 蛋白,细胞病变抑制实验检测纯化产物有干扰素活性。

关键词 γ 干扰素,基因表达,分离纯化,大肠杆菌

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0183-04

猪 IFN γ (Porcine interferon gamma, pIFN γ)是由 T 淋巴细胞和 NK 细胞产生的细胞因子,在免疫应答调控中处于中心地位,其抗病毒和抗肿瘤发生的特性使其具有用于免疫预防和治疗潜能^[1]。目前,有关人 IFN γ 的基因工程技术研究^[2,3]十分活跃,而 pIFN γ cDNA 的克隆及表达国内却未见报道。研究表明细胞因子是一类安全性较高的疫苗佐剂,IFN γ 也是其中之一^[4,5],本实验室在猪疾病疫苗的研究中拟采用 pIFN γ 作为增强疫苗免疫效果的佐剂,因此构建 pIFN γ 的高表达菌株及摸索产物的纯化方法就显得尤为重要。本文报道用大肠杆菌表达系统,表达 pIFN γ cDNA 编码区,纯化后的目的产物经检测具有干扰素活性。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种 :*E. coli* XL1-Blue :*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F* [*proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15 Tn10(tet^r)*]

载体 :pJLA-503^[6]及滤泡口炎病毒 VSV 均为本实验室保存。

牛肾细胞 MDBK 购于中国科学院细胞研究所。

猪 IFN γ 标准品购自 Genetimes 科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 pIFN γ cDNA 片段的克隆:根据文献报道的

猪 IFN γ cDNA 序列^[7],设计了两条 PCR 引物。5'引物在编码 pIFN γ 成熟蛋白基因的第一个密码子之前加入了一个 *Nde*I 酶切位点及 ATG 起始码。3'引物与 cDNA 3'端互补,并设计了一个 *Bam*HI 酶切位点。从经丝裂原诱导的猪外周血淋巴细胞总 RNA 中用 RT-PCR 方法进行扩增。逆转录反应条件依次为:25 $^{\circ}$ C 10min,37 $^{\circ}$ C 1h,94 $^{\circ}$ C 3min。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 180s,94 $^{\circ}$ C 40s,55 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 45s 为一个循环,进行 30 个循环的 PCR 扩增;最后 72 $^{\circ}$ C 180s 延伸反应。反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。回收和纯化 PCR 产物,连接在 pGEM-T 载体中,命名为 pGEM- γ 。

1.2.2 测序及质粒构建:少量制备 pGEM- γ 质粒,测序工作在全自动测序仪上进行。测序方法按 ABI PRISMTM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction kit 3 所附说明操作。重组质粒的构建,大肠杆菌转化及克隆筛选按 Sambrook^[8]等的方法进行。

1.2.3 菌株的诱导表达:菌株在含氨卞青霉素(100 μ g/mL)的 LB 培养基中 28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,次日以 10% 量接种扩大培养,28 $^{\circ}$ C 继续培养 3~4h,当 A_{600} 约等于 0.6 时,快速变温至 42 $^{\circ}$ C,诱导表达 5h。

1.2.4 裂菌和包涵体洗涤:将 1L 诱导表达菌液离心收集菌体,用 STE(25% 蔗糖,10mmol/L Tris \cdot HCl pH8.0,1mmol/L EDTA)洗涤 1 次。菌体重悬于 100mL STE 中,冰浴超声破菌,每次超声 30s 静

收稿日期 2000-10-08,修回日期 2000-12-18。

基金项目 国家高技术研究发展计划项目(101-06-05-04)。

* 联系作者。Tel 86-21-25070296 Fax 86-21-25070296 E-mail gyjz268@yahoo.com

置 30s, 反复共 20 次。10000r/min 离心 15min, 弃上清得包涵体, 再用包涵体洗涤液(1% Triton X-100, 50mmol/L Tris·HCl pH8.0, 10mmol/L EDTA, 0.15mol/L NaCl)洗涤 3 次, 最后用 4mol/L 尿素溶液清洗(溶剂为超声液)。

1.2.5 表达产物的变性与复性: 上述洗涤后的包涵体溶于包涵体裂解液(7mol/L Gu·HCl, 100mmol/L Tris·HCl pH8.0, 0.2mmol/L EDTA pH8.0)室温下缓慢搅动 2h, 10000r/min 离心 30min 后取上清, 经蛋白浓度测定^[9]后以包涵体裂解液将浓度调整至 10mg/mL。变性蛋白质溶液在 10℃ 预冷的复性液(100mmol/L Tris·HCl pH8.0, 0.2mmol/L EDTA, 0.5mmol/L L-精氨酸)中快速稀释后不断搅动, 间隔 2h 后再次加入等量包涵体裂解液。如此重复 2 次, 使复性液中蛋白浓度约为 100 μ g/mL, 10℃ 静置过夜。再将复性液置于透析袋内, 放在透析液(20mmol/L Tris·HCl pH8.0, 100mmol/L 尿素)中 10℃ 透析 24h, 离心(10000r/min)15min, 收取上清待用。

1.2.6 重组蛋白的柱层析分离纯化:

(1) SP Sepharose FF 离子交换层析: 20mmol/L pH8.0 的 Tris·HCl 0~1mol/L NaCl 梯度洗脱。

(2) Sephadex G-25 柱层析: 以 20mmol/L Tris·HCl pH8.0 溶液平衡洗脱除盐, 收集蛋白峰。

(3) Sephacryl S-200 HR: 以 pH7.4 的 PBS 溶液平衡洗脱, A_{280} 检测, 收集主峰。

1.2.7 细胞病变抑制法测干扰素抗病毒活性: 牛肾细胞 MDBK-滤泡性口腔炎病毒 Indiana 株为测定系统(培养体系中采用马血清, 以避免牛血清中可能存在的牛病毒的污染)。牛肾细胞 MDBK 株在 96 孔板上贴壁生长过夜(5% CO₂ 培养箱, 37℃ 培养), 每孔约有 4 万个细胞, 3 个孔为 1 组, 每组各加不同稀释度的待测样品(按倍比稀释法进行), 在 5% CO₂ 培养箱培养过夜(15~18h)再加 10~100TCID₅₀ 的滤泡性口腔炎病毒(VSV)攻击 24~30h。以标准干扰素为准计算待测 IFN γ 的活性; 对照孔以维持液代替干扰素同时间同方法处理, 待对照孔出现完全细胞病变时, 判断结果, 用 0.1% 结晶紫柠檬酸染色观察病变。

2 结果与讨论

2.1 pIFN γ 基因的克隆

2.1.1 pIFN γ 基因的 RT-PCR 扩增: 以靛酸胍一步法^[10]提取的 RNA 经甲醛变性胶电泳, 18S 及 28S 条带清晰, 28S 约为 18S 的 2 倍, 表明 RNA 提取完

整。RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后显示一约 450bp 的片段, 这与预计相符(结果未显示)。

2.1.2 IFN- γ 表达质粒的构建: 将 RT-PCR 产物直接插入 pGEM-T 载体, 转化 HB101 菌株, 酶切鉴定后对有插入片段的阳性转化子 pGEM- γ 进行核酸序列分析, 测定结果表明, 我们克隆的 pIFN γ 序列与文献报道完全一致。用 *Nde*I/*Bam*H I 双酶切 pGEM- γ 质粒后回收小片段, 将之与同样酶切的 pJLA-503 载体大片段相连接, 转化 XL1-Blue 菌株, 经酶切鉴定分离出一约 450bp 小片段的即为阳性重组子 pJLA- γ (质粒图谱见图 1)。

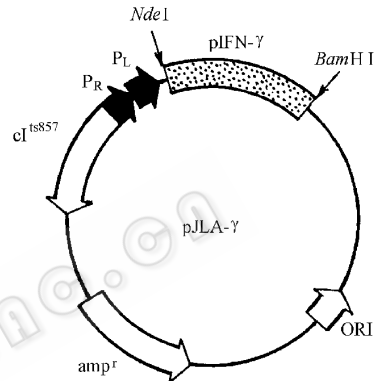


图 1 重组质粒 pJLA- γ 的质粒图谱

Fig. 1 Structure of the recombinant plasmid pJLA- γ

2.2 猪 IFN- γ 在大肠杆菌中的表达

pJLA- γ 表达质粒的启动子为 P_R、P_L 启动子, 以 42℃ 热诱导表达。诱导表达后作 SDS-PAGE, 与未诱导的对照菌相比较, 并参照分子量标准物, 在电泳图谱上出现一约 16kD 新带(见图 2)。光密度扫

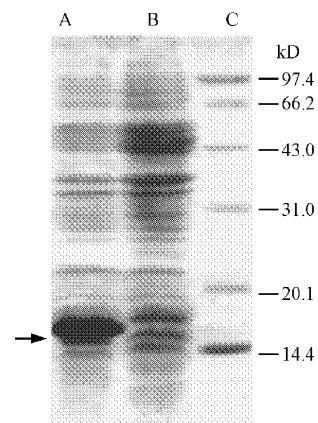


图 2 重组质粒 pJLA- γ 受体菌表达的 SDS-PAGE

Fig. 2 The expression of recombinant pJLA- γ in *E. coli* ;

A. Induced total cell lysate of XL1-Blue/pJLA- γ (The target protein is indicated by an arrow.) B. Induced total cell lysate of XL1-Blue/pJLA-503 ; C. Protein molecular weight markers

描结果显示,16kD 带占菌体总蛋白的 40%。对诱导时间进行摸索后将其定为 5h。

2.3 包涵体的分离

诱导表达后的菌体按方法 1.2.4 作裂菌处理,裂菌后的上清和沉淀作 SDS-PAGE 分析,16kD 带主要存在于沉淀中。用含 Triton-X 100 的包涵体洗涤液洗涤,表达产物仍存留于沉淀中。说明产物是以包涵体的形式存在的。继以 4mol/L 尿素溶液洗涤包涵体,可使其纯度进一步提高。蛋白定量结果表明,包涵体得率约为 280mg/L 菌液。

2.4 IFN γ 活性检测

IFN γ 的活性有种属特异性的特点,但在某些动物中又具有不同程度的交叉活性,pIFN γ 在牛细胞上也有活性^[11]。由于目前尚无适当的建株的猪细胞,因此本研究采用牛肾细胞 MDBK 株。国外相关研究也有采用此细胞株的报道。同时,我们采用应用较广的滤泡口炎病毒 VSV Indiana 株作为攻击病毒^[12]。

用牛肾细胞 MDBK 株与 pIFN γ 初提物共育后以 VSV 攻击的 3 次实验显示,同等蛋白量的情况下实验组的检测终点与标准品(1×10^7 IU/mg)接近。这表明 pIFN γ 的纯品比活约为 1×10^7 IU/mg。

2.5 pIFN γ 的纯化

以 SP Sepharose FF 梯度洗脱复性后的蛋白,收集主峰即为目的蛋白峰(图 3),除盐浓缩后用凝胶过滤层析进一步纯化,主峰经聚丙烯酰胺凝胶电泳显示为一约 16kD 的单一蛋白带(图 4),蛋白浓度测

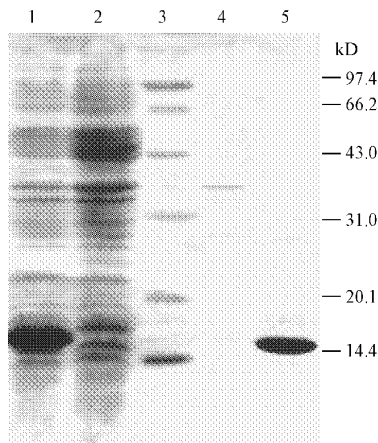


图 3 SP-Sepharose 层析后的蛋白分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the proteins from SP-Sepharose chromatography

1. Total cell lysate of XL1-Blue/pJLA- γ 2. Total cell lysate of XL1-Blue/pJLA-503 3. Molecular weight standards 4. Proteins from the inferior peak 5. Proteins from the main peak containing pIFN γ .

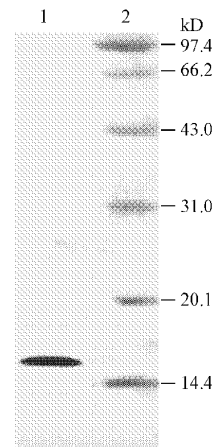


图 4 凝胶过滤层析后的蛋白电泳分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the proteins from gel filtration chromatography

1. The purified porcine IFN- γ 2. Molecular weight standards

定表明 pIFN γ 最终得率约为 14mg/L。扫描结果显示其纯度 >90%。

另外,在复性过程中,为了使变性包涵体的复性效率提升至尽可能高,我们对 L-精氨酸辅助复性的最佳浓度进行了摸索。500nm 波长处浊度检测表明 0.5mol/L L-精氨酸时光吸收值达到最低。此时蛋白重新聚集的量最少,即复性率达到最高,进一步提高 L-精氨酸浓度对复性并无更大的帮助。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Williams JG, Jurkovich GJ, Maier RV. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. *J Surg Res*, 1993, **54**(1):79~93
- [2] CHAI Y H (柴玉波), CHEN S M (陈苏民), ZHAO Z L (赵志良) *et al.* Over production of human IFN γ in *Escherichia coli* by novel expression. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1997, **13**(4):406~409
- [3] TONG K T (童葵塘), SONG Y M (宋一鸣), YING G Q (应国光) *et al.* A pilot study of recombinant interferon-gamma. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 1997, **13**(2):134~139
- [4] Heath A W, Playfair J H L. Conjugation of Interferon-gamma to antigen enhances its adjuvant activity. *Immunology*, 1990, **71**(3):454~456
- [5] el Kassas H, Kirkwood J M. Adjuvant application of interferons. *Semin Oncol*, 1996, **23**(6):737~743
- [6] Schauder B, Blöcker H, Frank R *et al.* Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli* aptE translational initiation region. *Gene*, 1987, **52**:279~283
- [7] Vandebroek K, Dijkmans R, Aerschot A V *et al.* Engineering by PCR-based exon amplification of the genomic porcine interferon-gamma DNA for expression in *Escherichia coli*. *Biochem Bio-*

- [8] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. Molecular cloning (second edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
- [9] Bradford M M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding ,*Anal Biochem* ,1976 ,**72** :248~254
- [10] Chomczynski P ,Sacchi N. Single-step Method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction ,*Anal Biochem* ,1987 ,**162** (1) :156~159
- [11] Gresser I ,Bandu M T ,Brouty B D. Interferon and cell division. IX. interferon-resistant L1210 cells :characteristics and origin ,*J Nat Cancer Inst* ,1974 ,**52** (2) :553~559
- [12] Lin L S ,Wiranowska S M ,Chudzio T *et al* . Characterization of the heterogeneous molecules of human interferons :differences in the cross-species antiviral activities of various molecular populations in human leukocyte interferons *J Gen Virol* ,1978 ,**39** (1) :125~130

Cloning High Level Expression and Purification of Porcine IFN γ

GUO Ying-Jun WU Dan CHEN Rui-Wen SUN Shu-Han*

(Department of Medical Genetics ,The Second Military Medical University ,Shanghai 200433 ,China)

Abstract Peripheral blood lymphocytes from a single swine were stimulated with Concavadin A for 17h ,and the total RNA was isolated from it. Then ,the mRNA specific for porcine IFN γ was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction. After sequencing ,the IFN γ gene has been successfully inserted into vector pJLA-503 and highly expressed in *E. coli*. Recombinant porcine IFN γ expressed as inclusion body ,which was dissolved in 7mol/L guanidine chloride and subsequently renatured by dilution in refolding buffer containing 0.5mol/L L-arginine. In order to obtain pure protein ,the renatured IFN γ was purified by the chromatographies of SP-Sepharose FF and Sephacryl S-200 HR. As a result ,the final pure product can be seen as a single band in SDS-PAGE ,and the cytokine activity was verified by inhibiting the cytopathic effect.

Key words interferon- γ gene expression ,isolation and purification ,*E. coli*

Received October 8 ,2000

This work was supported by Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development(101-06-05-04).

* Corresponding author. Tel 86-21-25070296 ;Fax 86-21-25070296 ;E-mail gyjz268@yahoo.com

“ 发酵法生产丙酮酸中试 ” 通过鉴定和验收

由无锡轻工大学生物工程学院和常州常茂生物化学工程有限公司联合承担的江苏省“九五”工业重大科技攻关项目“发酵法生产丙酮酸中试”(BG98015-3),于2000年12月30日在常州通过江苏省科技厅组织的鉴定和验收。

丙酮酸是最重要的 α -氧代羧酸之一。它不仅在生物能量代谢中具有十分重要的作用,而且是多种有用化合物的前体,而在化工、制药和农用化学品等工业及科学研究中有着广泛的用途。工业上生产丙酮酸的方法主要是酒石酸脱水脱羧法,其高昂的成本使丙酮酸难以推广应用。为此,科学家们早在50年前就开始关注发酵法生产丙酮酸的可能性,但由于丙酮酸在代谢途径中所处的特殊地位,使得丙酮酸高产菌的选育十分困难,目前国际上仅有日本实现了发酵法丙酮酸的工业化生产,历史尚未超过10年。

无锡轻工大学生物工程学院选育获得了一株能利用无机氮源、糖酸转化率高、遗传性能稳定、抗杂菌能力强的丙酮酸高产菌——光滑球拟酵母WSH-IP303,然后与常州常茂生物化学工程有限公司合作,采用“萃取-精馏”技术攻克了丙酮酸提取的难关,5L罐中的丙酮酸产量、糖酸转化率和提取总收率分别达到70.4g/L、63.6%和93.1%,在5m³中试规模的发酵罐上丙酮酸产量、糖酸转化率和提取总收率平均达到55.8g/L、55.3%和80.5%,建成了年产30吨丙酮酸的中试生产装置,生产的丙酮酸产品经常州市产品质量监督所抽样检测,符合企业标准Q/320400CMS008-2000要求,经用户使用能满足要求。鉴定和验收委员会在参观了生产现场之后,一致认为,该项目采用直接发酵法以葡萄糖为原料生产丙酮酸,技术指标达到国际先进水平,填补了我国发酵法生产丙酮酸的空白。

(无锡轻工大学生物工程学院 李寅供稿)