

猪 $\alpha 1$ -干扰素的基因改造与高效原核表达

曹瑞兵 徐学清 周斌 陈德胜 陈溥言*

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,南京 210095)

摘 要 poIFN- $\alpha 1$ 基因中含有大量的大肠杆菌稀有密码子,为了获得高表达,使用了大肠杆菌的偏爱密码子,人工合成了 poIFN- $\alpha 1$ 成熟蛋白编码基因。在保留编码蛋白序列的同时,使其 5'端 A+T 的含量增加到最大限度,并将其终止密码子改为 TAA。将合成的 poIFN- $\alpha 1$ 成熟蛋白编码基因插入原核单纯表达载体 pRLC 中,转化大肠杆菌 DH5 α 。实现了 poIFN- $\alpha 1$ 在大肠杆菌中的高效表达,表达产物以包涵体形式存在。纯化的包涵体经含 DTT 的 6 mol/L 盐酸胍的变性液溶解及含 GSH-GSSG 的复性液复性处理,复性后的表达产物浓缩后经凝胶层析纯化。细胞病变抑制测定表明,重组 poIFN- $\alpha 1$ 具有较高的抗病毒活性,约为 6.4×10^6 u/mg。

关键词 猪 $\alpha 1$ 干扰素,基因改造

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0291-04

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 因具有显著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年来的研究热点。

猪 IFN- α (porcine interferon alpha, poIFN α)分为 2 个亚型,至少有 17 个亚种,分布于猪的 1 号染色体,目前只有部分被测序和表达^[1]。PoIFN- α 全基因为 570bp,编码 189 个氨基酸(Aa),其中前 23 个 Aa 为信号肽,后 166 个 Aa 为成熟活性蛋白。Francois Lefevre 等首先克隆了 poIFN $\alpha 1$ 基因并将 poIFN- $\alpha 1$ 成熟蛋白基因在大肠杆菌中进行了表达,证明具有较高抗病毒活性^[1,2]。国内学者陈涛^[3]也进行了 poIFN- α 基因原核融合表达研究。但国内至今未见有 poIFN- α 单纯表达及重组 poIFN- α 在猪病防治中应用的研究报道。

为了比较研究本实验室已克隆和表达的 poIFN- α (另文发表)与 poIFN- $\alpha 1$ 的抗病毒等生物学特性的差异,本研究人工合成了 poIFN- $\alpha 1$ 基因。分析发现 poIFN- $\alpha 1$ 基因中含有较多的大肠杆菌稀有密码子,而稀有密码子的存在会大大降低蛋白质合成的速率,使蛋白表达量降低,甚至使蛋白合成中途停止^[4]。通常选用大肠杆菌嗜性密码子合成其 cDNA 或选用含有 *dnaY* 基因——一种编码精氨酸的 tRNA_{AGA/AGG} 基因的宿主菌来解决这一问题^[5]。因此,本研究选用大肠杆菌嗜性密码子合成了 poIFN- $\alpha 1$ 基因,在大肠杆菌中进行表达,提取、纯化并测定其抗病毒活性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

原核单纯表达载体 pRLC 由本室构建, *E. coli* DH5 α 为

本室保存。MDBK 细胞、蛋白质分子量标准购自中科院上海生物化学与生物细胞研究所。限制酶、连接酶、聚合酶、核酸分子量标准均购自 TaKaRa 公司。层析介质购自发玛西亚公司。二硫苏糖醇(DTT)还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)购自上海生工,其它试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 基因的设计与合成 参照 GenBank 上的 poIFN- $\alpha 1$ 基因序列(Accession No. M28623)。将 poIFN- $\alpha 1$ 基因中的大肠杆菌稀有密码子改为大肠杆菌偏爱密码子,如:将编码精氨酸的密码子 AGG/AGA/CAG/CGG 改为 CGT,将编码脯氨酸的密码子 CCC/CCU/CCA 改为 CCG,将编码异亮氨酸的密码子 AUA 改为 AUC。在其 5'端添加起始密码子 ATG, *EcoRI* 酶切位点及保护碱基,3'端添加 *SalI* 酶切位点及保护碱基。在保留编码蛋白序列的同时,使其 5'端 A+T 的含量增加到最大限度,并将其终止密码子改为 TAA。由上海申能博彩生物有限公司合成并测序。

1.2.2 表达载体的构建 用 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切克隆有人工合成的 poIFN $\alpha 1$ 成熟蛋白编码基因的 T 载体,用 Gel Extraction Mini Kit 回收目的片段,插入表达载体 pRLC 的 *EcoRI* 和 *SalI* 位点间,将所构建质粒命名为 pRLC-poIFN $\alpha 1$,转化 *E. coli* DH5 α ,挑取单克隆,提取质粒,分别用 PCR 方法和 *EcoRI*、*SalI* 双酶切鉴定。

1.2.3 诱导表达 将含有 pRLC-poIFN $\alpha 1$ 表达载体的菌体接种于含氨苄青霉素浓度为 50 μ g/mL 的 LB 培养液,30 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日将 2% 的菌液接种于 2 \times YT 培养液,30 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4~0.5,迅速升温到 42 $^{\circ}$ C,继续诱导培养 4h。

1.2.4 表达产物的提取与溶解 将发酵的菌体用生理盐水

洗涤后超声波裂解,将裂解液 1000r/min(10min)离心去杂质,取上清液 12 000r/min \times 10min 离心收集沉淀即初制干扰素包涵体。将初制包涵体用洗涤液(0.5% Triton X-100、50mmol/L Tris-HCl(pH 8.5)、10 mmol/L EDTA、0.15 mol/L NaCl)搅拌洗涤 2 次,每次 1h,得到初步纯化的包涵体,加入变性液(6mol/L GmdCl、30 mmol/L DTT、50mmol/L Tris-HCl(pH 8.5)、2mmol/L EDTA),置 37 $^{\circ}$ C、120r/min 的摇床中反应 2 h 离心取上清。

1.2.5 表达产物的复性与纯化 在冰浴条件下,将包涵体裂解液分 3 次间隔 1h 注入搅动的含适量盐酸胍的复性液(3mmol/L GSSH、1mmol/L GSSG、50mmol/L Tris-HCl pH 8.5、2mmol/L EDTA、0.15mol/L NaCl)至蛋白质终浓度为 0.2 mg/mL 4 $^{\circ}$ C 静置过夜。0.45 μ m 滤膜过滤后测定蛋白含量及活性。

蛋白含量的测定按 2000 年版《中国生物制品规程》中微量法(Lowry)的要求进行。将复性产物过 Hiprep 26/10 Desalting 柱脱盐,洗脱液为 20mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、0.2mmol/L EDTA,冷冻浓缩后用 Sephacryl S-200 层析柱分离纯化干扰素,洗脱液为 PBS(pH 7.4)收集主峰。

1.2.6 重组 poIFN- α 的活性测定 微量细胞病变抑制法测定干扰素抗病毒活性。采用牛肾细胞 MDBK-VSV 系统测定,具体步骤参照文献[6]。

2 结果

2.1 猪 α 1-干扰素基因测序结果分析

测序结果分析表明:人工合成的 poIFN α 1 成熟蛋白编码基因与设计一致,将原序列中的 33 个大肠杆菌稀有密码子改为大肠杆菌偏爱密码子,其中 16 个 Arg 稀有密码子(7 个 AGA、8 个 AGG 和 1CGG)改为 CGU 或 CGC,6 个 Leu 稀有密码子 CTC 改为 CTG,5 个 Gly 稀有密码子(2 GGA、3GGG)改为 GGU 或 GGC,4 个 Pro 稀有密码子(2 个 CCC、2 个 CCU)改为 CCG,1 个 Ser 稀有密码子 TCG 改为 TCT,1 个 Thr 稀有密码子 ACA 改为 ACC。

2.2 表达载体的构建

用 EcoRI 和 SalI 双酶切 pT-poIFN- α 1,用 Gel Extraction Mini Kit 回收 poIFN- α 1 片段,插入表达载体 pRLC 的 EcoRI 和 SalI 位点之间,转化 *E. coli* DH5 α ,挑取转化菌单克隆培养,提取质粒,分别用 PCR 方法和 EcoRI、SalI 双酶切鉴定,结果与设计一致(图 1)。

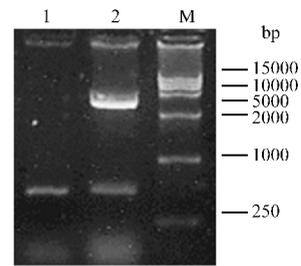


图 1 PCR 产物及表达载体酶切电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR product and restriction enzyme assay of expression vector

M: marker; 1: gene of phIFN- α 1;

2: pRLC-poIFN- α 1 EcoRI and SalI digest

2.3 重组蛋白的表达

表达质粒 pRLC-poIFN α 1 的启动子为 P_R、P_L 启动子,以 42 $^{\circ}$ C 热诱导表达。取开始诱导前以及诱导 1~4h 的菌体作 SDS-PAGE 电泳鉴定。在电泳图谱上出现一条约 18kD 的新带(见图 2),光密度扫描结果显示 18kD 的条带约占细菌总蛋白的 25.4%。

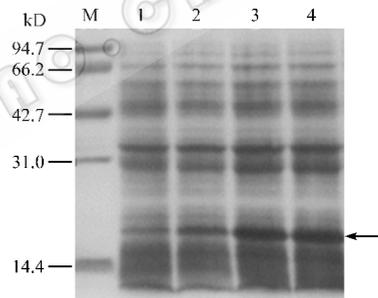


图 2 SDS-PAGE 分析 poIFN- α 1 在大肠杆菌中的表达

Fig. 2 Expression of poIFN- α 1 in *E. coli* analyzed by SDS-PAGE

1~4: expression of pRLC-poIFN- α 1 at 1~4h; M: MW marker

2.4 包涵体的提取与变性

收集诱导表达后的菌体按方法 1.2.6 作裂菌处理。分别取细菌裂解物的上清和离心后的沉淀作 SDS-PAGE 分析,18kD 的条带存在于沉淀中。包涵体用含 Triton X-100 的洗涤液洗涤,得到初步纯化的包涵体。包涵体在含 6mol/L 盐酸胍的变性液中较快地溶解至澄清。

2.5 表达产物的复性与纯化

为了提高变性的蛋白质的复性效果,比较研究了含不同浓度盐酸胍(0、0.5mol/L、1 mol/L、1.5 mol/L、2 mol/L)的复性

表 1 复性液中盐酸胍的浓度对重组猪干扰素- α 1 复性的影响

Table 1 The effects of the concentration of GmdCl on the renaturation of porcine interferon- α 1

| GmdCl(mol/L) | Volume(mL) | Protein concentration(mg/mL) | Bioactivity(u/mL) | Specific activity(u/mg) | Total activity/u |
|--------------|------------|------------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| 0 | 50 | 0.087 | 7.72×10^3 | 8.87×10^4 | 3.86×10^5 |
| 0.5 | 50 | 0.153 | 4.58×10^4 | 2.99×10^5 | 2.29×10^6 |
| 1.0 | 50 | 0.196 | 1.44×10^5 | 7.35×10^5 | 7.20×10^6 |
| 1.5 | 50 | 0.213 | 1.35×10^5 | 6.34×10^5 | 6.75×10^6 |
| 2.0 | 50 | 0.204 | 1.12×10^5 | 5.49×10^5 | 5.60×10^6 |

液的复性效果。分别将 0.5mL 蛋白浓度约 20mg/mL 的变性液多次间隔加入 50mL 含不同浓度盐酸胍的复性液,测定活性并比较分析(表 1)。

变性的干扰素在不含盐酸胍的复性液中溶解度较低,在 0.1mg/mL 时就会出现蛋白聚集、析出。在 0.5 ~ 2mol/L 的范围内,随着盐酸胍的浓度升高干扰素的溶解度增大,但盐酸胍的浓度大于 1mol/L 时,干扰素的复性率下降。在盐酸胍的浓度为 1mol/L 时干扰素的复性效果最佳,溶解蛋白浓度为 0.196mg/mL,重组猪干扰素- $\alpha 1$ 的比活可达 7.35×10^5 u/mg。复性后重组蛋白经脱盐、浓缩, Sephacryl S-200 层析柱纯化,洗脱液为 PBS(pH 7.4)收集主峰。SDS-PAGE 电泳结果表明,得到了较好纯化的重组猪 $\alpha 1$ -干扰素(图 3)。

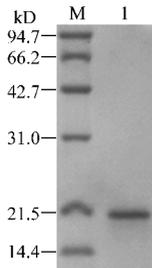


图 3 纯化重组 poIFN- α 的电泳鉴定

Fig.3 Identification of purified poIFN- $\alpha 1$ by SDS-PAGE

1: purified poIFN- $\alpha 1$; M: protein MW marker

2.6 重组猪 $\alpha 1$ -干扰素活性的测定

重组猪 $\alpha 1$ -干扰素的活性测定采用目前国内外已经建立的 MDBK 细胞-VSV(水泡性口炎病毒)系统微量细胞病变抑制法。多次活性检测结果表明,复性后的重组蛋白在 MDBK 细胞上表现出较高的抗病毒活性,能够有效地抑制 VSV 病毒对细胞的破坏作用。将抑制 50% 细胞病变(CPE)的干扰素的最高稀释度定为 1 个干扰素单位。复性后重组猪 $\alpha 1$ -干扰素的生物学活性为 7.35×10^5 u/mg。凝胶层析纯化后的重组猪 α -干扰素的生物学活性为 6.4×10^6 u/mg。

3 讨论

养猪业在我国有着悠久的历史,猪的品种资源和生产数量均名列世界前茅。然而多种疾病,如猪瘟、伪狂犬病、猪传染性胃肠炎等给养猪业造成很大的威胁。因此研制安全、高效的抗病毒制剂来预防和治疗猪的传染病具有重要意义。

Francois Lefevre 等^[2]研究发现原核表达的 poIFN- $\alpha 1$ 具有很高的抗病毒活性,比猪血白细胞诱导产生的干扰素活性约高 6 倍。本实验室克隆并成功表达的 poIFN- α 也具有较高抗病毒活性,其与 poIFN- $\alpha 1$ 基因同源率为 97.2%,成熟蛋白氨基酸的同源性分别为 95.2%(另文发表)。为了比较研究两者的生物学活性的差异与氨基酸组成的关系,研制高活性 poIFN- α 本研究应用大肠杆菌嗜性密码子人工合成了 poIFN- $\alpha 1$ 基因并成功地获得了高表达。获得表达的 poIFN- $\alpha 1$ 约为菌体总蛋白的 25.4%,而未经改造的 poIFN- α 表达量约为菌体总蛋白的 15%,因此通过密码子改造使 poIFN- $\alpha 1$ 表达量提高约 10%。

笔者在分析 poIFN- $\alpha 1$ 成熟蛋白基因发现其存在较多的

大肠杆菌稀有密码子且有些密集分布,稀有密码子占 poIFN- $\alpha 1$ 成熟蛋白基因的 22%,仅 Arg 稀有密码子 AGA、AGG 和 CGG 就有 16 个之多,占 poIFN- $\alpha 1$ 成熟蛋白基因的 9.8%。在大肠杆菌中密集 AGG/AGA 密码子对蛋白的表达起较强的抑制作用,其中原因主要有两点:细胞中 AGG/AGA 密码子所对应的 tRNA 的含量极低,当翻译进行到 AGG/AGA 密码子处时受阻滞;AGG/AGA 与天然的 SD 序列(AAGGAGGU)近似,竞争与 16S RNA 结合而抑制翻译进行^[7]。在本研究中将 poIFN- $\alpha 1$ 成熟蛋白编码基因中的稀有密码子进行了全面改造。还考虑到在保留编码蛋白的 DNA 序列的同时重新构建基因的 5'端,使其 A+T 的含量增加到最大限度,这将减少 mRNA 的二级结构,有利于增加翻译效率。

重组 poIFN- $\alpha 1$ 主要以包涵体的形式存在于大肠杆菌中,为了避免了杂质对重组蛋白复性的影响以及大肠杆菌外膜蛋白在包涵体的溶解和复性过程中可导致重组蛋白质的降解^[8]。本研究采用超声裂解分离出包涵体,通过差离心和含 Triton X-100 的洗涤液充分洗涤后得到了较纯的包涵体。

在重组 poIFN- $\alpha 1$ 的复性过程中,通过将变性蛋白分多次加入复性液,在两次蛋白加入之间间隔 1h,以及在复性液中加入终浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸胍可较好提高重组 poIFN- $\alpha 1$ 在复性液中的溶解度并能提高其复性效果。活性测定结果显示,纯化的重组 poIFN- $\alpha 1$ 的抗病毒活性约为 6.4×10^6 u/mg。

本研究为进一步研究 poIFN- $\alpha 1$ 的生物学特性以及研制高活性 poIFN- α 奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lefevre F, Bonnardiere CL. Molecular cloning and sequencing of a gene encoding biologically active porcine interferon- α . *J Interferon Res*, 1986, **6**: 349-360
- [2] Lefevre F, L'haridon R, Borrás-Cuesta F et al. Production, purification and biological properties of an *Escherichia coli*-derived recombinant porcine alpha interferon. *J Gen Vir*, 1990, **71**: 1057-1063
- [3] Chen T(陈涛), Yu RQ(于瑞嵩), Liu H(刘惠莉) et al. Site directed mutation of PoIFN- α and its expression in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2002, **18**(3): 339-342
- [4] Brinkmann U, Mattes RE, Bucke LP. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene*, 1989, **85**(1): 109-114
- [5] Sui GQ(隋广超), Hu MH(胡美浩). Effects that affect expression of foreign gene in *Escherichia coli*. *Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 1994, **21**(2): 128-132
- [6] Cao RB(曹瑞兵), Zhou B(周斌), Chen PY(陈溥言) et al. Molecular cloning, gene modification, expression and activity determination of porcine IFN- γ . *Journal of Nanjing Agricultural University(南京农业大学学报)*, 2003, **26**(2): 71-75
- [7] Li WP(李武平), Li HL(吕宏亮), Duan ZX(段招军) et al. High expression and purification of IFN- $\beta 1b$ and its antiviral activity. *Chinese Journal of Virology(病毒学报)*, 2002, **8**(3): 240-244
- [8] Feng XL(冯小黎). Refolding of recombinant inclusion body proteins. *Progress of Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 2001, **28**(4): 482-485

Gene Modification and High Prokaryotic Expression of Porcine Interferon Alpha-1

CAO Rui-Bing XU Xue-Qing ZHOU Bin CHEN De-Sheng CHEN Pu-Yan*

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract There are many *E. coli* rare codons in the gene of porcine interferon alpha-1. In order to obtain high expression of poIFN- α 1 in *E. coli*, the cDNA encoded poIFN- α 1 mature protein was synthesized using biased codons of *E. coli* without changing the original amino acid sequence and the terminator was changed as TAA. At the same time, Adenine and Thymine were used to the largest extent near the 5' terminus of poIFN- α 1 mature protein gene. The synthesized gene was inserted into the *Eco* RI and *Sal* I site of the expression vector pRLC resulting pRLC-poIFN- α 1. The poIFN- α 1 is highly expressed in *E. coli* DH5 α when the induction was carried out at 42°C. The expressed poIFN- α 1 account for 24.5% of the total cellular proteins and existed as inclusion body. The poIFN- α 1 inclusion body was dissolved in 6mol/L guanidine chloride contained DTT and subsequently the denatured poIFN- α 1 was re-natured by dilution in refolding buffer containing GSH and GSSH. In the present study it was found that the denatured poIFN- α 1 was most efficiently re-natured in refolding buffer containing 1mol/L guanidine chloride. In order to obtain pure protein, the concentrated re-natured poIFN- α 1 was purified by Sephacryl S-200 chromatography. As a result, the purified poIFN- α 1 is verified to be of high cytokine activity by inhibiting the cytopathic effect of vesicular stomatitis virus in MDBK cells, which is about 6.4×10^6 u/mg. This study paved the way for large-scale production of recombinant poIFN- α 1 and its usage in virus disease control of pigs.

Key words porcine interferon alpha-1, gene modification

Received : 08-02-2003

* Corresponding author. Tel : 86-25-4396028 Fax 86-25-4396335 E-mail : yachen@yahoo.com.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>