

在大肠杆菌中提高人 $\alpha 1b$ 型基因工程干扰素的表达

薛水星 吴淑华 韩峰 魏佳 侯云德

(中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

摘要 将人 $\alpha 1b$ 型干扰素(IFN- $\alpha 1b$)基因插入带有原核增强子样序列的新型载体 pBV322,使干扰素在大肠杆菌中的表达水平明显高于原表达载体,达到 1.6×10^8 u/L 培养液。重组质粒的特点是:含增强子序列 X, trp 启动子控制。利用 DEAE-Sephrose、CM-Sephrose 离子交换层析及单克隆抗体亲和层析纯化 IFN- $\alpha 1b$, 获得了电泳纯产品,其比活性为 2×10^7 u/mg, 分子量为 19kDa。此外,用 pAT153 代替 pBV322, 构建了带有和不带有 X 序列的两种表达载体,平行对比表明增强子 X 序列可以将 IFN- $\alpha 1b$ 表达提高 4 倍。

关键词 人 $\alpha 1b$ 型干扰素,原核增强子样序列,蛋白质纯化

干扰素是一类由细胞分泌的具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等多种生物学活性的蛋白质。自从 1980 年 Nagata 首次克隆 IFN- α 基因无性繁殖系^[1]至今,已有 20 多种 IFN- α 亚型相继得到了克隆表达。我国于 1982 年首次利用新城疫病毒刺激脐血白细胞,成功地克隆了 IFN- $\alpha 1$ cDNA 无性繁殖系,并在大肠杆菌中得到了高效表达^[2],1989 年人 $\alpha 1$ 型基因工程干扰素已获准投放市场,得到了广泛应用。但是目前所用的生产菌株表达 IFN- $\alpha 1b$ 的水平还不够高,而且因为使用了 Amp^r 作标记基因,容易因氨苄青霉素污染制剂给人体带来不良影响。

1981 年 Gruss 及 Benoist 等在 SV40 中发现了增强子^[3,4],以后增强子的研究工作不断深入。1985 年吴淑华、侯云德等人发现 SV40 DNA 的 Hind III 片段能增强大肠杆菌中基因的表达^[5,6],潘卫及刘哲伟等人又先后在大肠杆菌 JM103 和人乳头瘤病毒(HPV6b)中发现有原核增强子样序列的存在^[7,8]。这些研究为增强子应用于原核系统增强外源基因的表达奠定了基础。

本文利用带有原核增强子样序列的质粒,通过抗性标记基因的转换,构建了表达 IFN- $\alpha 1b$ 的新型表达载体,新组建的载体表达 IFN 的水平明显高于原表达载体,并使用了 Tet^r 作标记基因,从而为 IFN- $\alpha 1b$ 的生产提供了更安全更高效的生产菌株。

1 材料与方 法

1.1 质粒与菌种

质粒 pBV320 为带有原核增强子样序列 X 和 trp 启动子的新型表达载体。质粒 pBV220/ $\alpha 1b$ 由人 $\alpha 1b$ 型干扰素基因(IFN- $\alpha 1b$)克隆于 pBV220 质粒所构成^[2,9]。以上质

国家 863 高科技生物技术领域资助项目。

本文于 1995 年 7 月 31 日收到。

粒以及 pAT153 和 M13SK 质粒均由本室提供。大肠杆菌 JM103 购自美国 BRL 公司。

1.2 试剂

限制酶、T4DNA 连接酶和大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段购自美国 BRL 公司、BioLabs 公司和德国 Boehringer Mannheim 公司,阴、阳离子交换基质 DEAE-Sepharose 和 CM-Sepharose 购自瑞典 Pharmacia 公司,抗人 IFN- $\alpha 1$ 的单克隆抗体亲和层析基质 (McAb-Sepharose) 由长春生物制品研究所惠赠。

1.3 质粒的重组、转化及重组子的筛选鉴定

参阅文献[10]。

1.4 重组 IFN- $\alpha 1b$ 的表达和提取

将重组质粒转化大肠杆菌 JM103,经 37℃ 过夜活化后,次日按 1:100 比例稀释于含 Amp^r 或 Tet^r 的 LB 培养液中,在试管中振荡培养 8~10h,5000r/min 离心 5min,收集菌体,每毫升菌液加入 0.4ml 含 30mmol/L NaCl、50mmol/L Tris (pH8.0) 的溶液和 44 μ l 10mg/ml 新鲜配制的溶菌酶,4℃ 下作用 30min,反复冻融 3 次,12000r/min 离心 5min,上清即为 IFN 提取液。

1.5 干扰素抗病毒活性的测定

采用细胞病变抑制法,在人羊膜传代细胞(WISH)——水泡性口炎病毒(VSV)系统上测定 IFN 活性,详见文献[11]。

1.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参阅文献[10]。

1.7 蛋白质含量测定

采用 Lowry's 法定量。

2 结果

2.1 pBV321 和 pBV322 载体的构建

pBV320 表达载体的特点是在 trp 启动子上游 300 bp 处有大肠杆菌增强子序列 X, trp 启动子下游有 XbaI、SalI、PstI 酶切点,为增加多酶切点,本文将 M13SK 质粒上 XbaI 至 SalI 中间含 10 个多酶切点的约 50bpDNA 片段插入 pBV320 的 XbaI 和 SalI 位点,得到 pBV321 质粒(图 1),将 pBV321 质粒 trp 启动子上游 290bp 处的 EcoRI 位点缺失,得到 pBV322 质粒。

2.2 人 $\alpha 1b$ 型干扰素高效表达载体 pBVX/ $\alpha 1b$ 的组建

人 $\alpha 1b$ 型干扰素 cDNA 两端为 EcoRI 位点,全长 565bp。组建时,先将 pBV322 用 XbaI 和 EcoRI 切开,Klenow 酶补平;同时 pBV220/ $\alpha 1b$ 上的干扰素片段用 EcoRI 切开,也用 Klenow 酶补平,两者连接组建

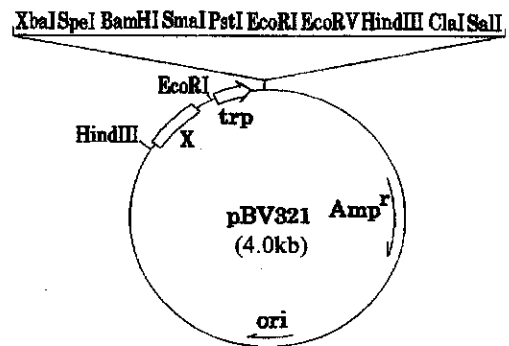


图 1 表达载体 pBV321 的质粒图

Fig. 1 Map of plasmid pBV321

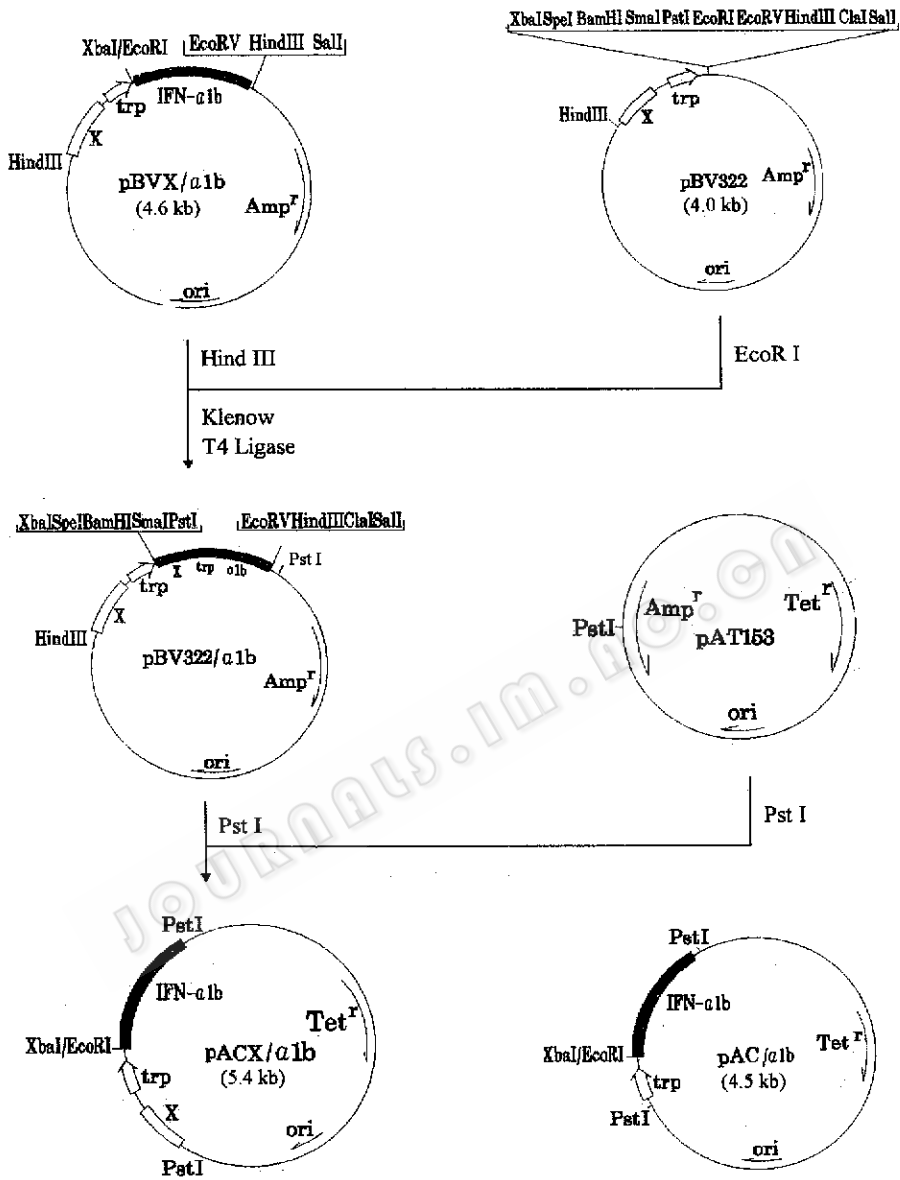


图 2 质粒 pACX/a1b 的构建和 pAC/a1b 的质粒图谱

Fig. 2 Construction of plasmid pACX/a1b and map of plasmid pAC/a1b

成 pBVX/a1b 质粒, 经酶切鉴定无误, 转化 JM103。

2.3 四环素抗性的 IFN- α 1b 高效表达载体的构建

pBVX/a1b 用 *Hind*III 酶切得到 1.8kb 含增强子序列 X、*trp* 启动子、*a1b* 基因的片段, 用 Klenow 酶补平, 载体 pBV322 用 *Eco*RI 酶切, Klenow 补平, 两者相连, 得到中间质粒 pBV322/a1b, 然后用 *Pst*I 酶切, 得到含增强子序列 X、*trp* 启动子、*a1b* 基因的片段, 将该片段插入 pAT153 *Pst*I 位点, 从而使 pAT153 氨苄青霉素抗性失活, 得到四环素抗性的

pACX/ $\alpha 1b$ 质粒(图 2)。为进一步研究增强子序列 X 对 IFN- $\alpha 1b$ 的作用,本文又构建了 pACX/ $\alpha 1b$ 的对照质粒 pAC/ $\alpha 1b$,它与 pACX/ $\alpha 1b$ 的区别在于去除了增强子序列 X(图 2)。

2.4 抗病毒活性的检测

将上述重组质粒转化大肠杆菌 JM103,用含有抗性的 LB 培养液振荡培养,菌体以溶菌酶作用,得到 IFN 提取液,测定抗病毒活性,结果表明:重组质粒 pBVX/ $\alpha 1b$ 表达 IFN 水平比原来温控型高效表达质粒 pBV220/ $\alpha 1b$ 高 4 倍,pACX/ $\alpha 1b$ 比 pAC/ $\alpha 1b$ 表达量高 4 倍,表明 X 序列对 *trp* 启动子控制下 IFN- $\alpha 1b$ 的表达有增强作用,结果详见表 1。

表 1 不同 IFN- $\alpha 1b$ 质粒载体在大肠杆菌中表达水平的比较

Table 1 Comparison of IFN expression level in *E. coli* by different plasmid vectors

Plasmid	Vector	Promotor	Enhancer(X)	Resistance	Incubation condition	IFN activity /($u \cdot L^{-1} \cdot 10^6$)
pBV220/ $\alpha 1b$	pBV220	P_{RPL}	without X	Amp ^r	30°C 3h 42°C 5h	41.0 ± 7.2
pBVX/ $\alpha 1b$	pBV322	<i>trp</i>	with X	Amp ^r	37°C 8h	168.4 ± 28.3
pACX/ $\alpha 1b$	pAT153	<i>trp</i>	with X	Tet ^r	37°C 8h	164.4 ± 21.7
pAC/ $\alpha 1b$	pAT153	<i>trp</i>	without X	Tet ^r	37°C 8h	41.4 ± 8.6

* n = 6, host is JM103 with LB culture.

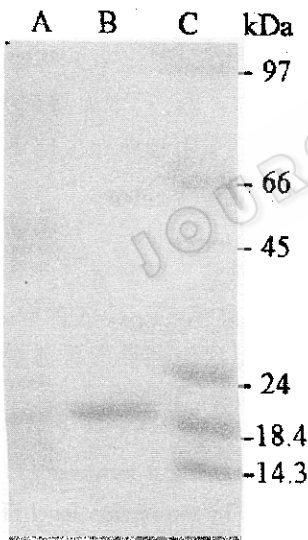


图 3 大肠杆菌表达的重组 IFN- $\alpha 1b$ 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant IFN- $\alpha 1b$ expressed in *E. coli*

A: Guanidiniumchlorid-treated crude product of IFN-containing *E. coli* cell

B: Purified IFN- $\alpha 1b$ after affinity chromatography

C: Molecular weight standard

2.5 重组人 IFN- $\alpha 1b$ 的纯化和鉴定

将重组质粒 pBVX/ $\alpha 1b$ 转化大肠杆菌 JM103,37°C 培养后,收获菌体,以 1:5(重量:体积)加入 7mol/L 盐酸胍裂解,再加入 5 倍体积 0.1mol/L Tris (pH8)溶液稀释并对此溶液透析过夜,离心去沉淀,上清加入 80% 饱和度的硫酸铵,沉淀的蛋白用去离子水溶解。溶液对 25mmol/L Tris (pH7.5)透析后,通过 DEAE-Sephrose 离子交换柱,分别用 0.1、0.3、0.6 和 1mol/L 的 NaCl 洗脱,收集 0.3mol/L NaCl 活性峰,过 CM-Sephrose 离心交换柱,以 0.1、0.2、0.5 和 1mol/L 乙酸钠(pH5)洗脱,收集 0.2mol/L 的活性峰。再经 PBS 平衡后,进行抗 IFN- $\alpha 1$ 的 McAb-Sephrose 亲和层析,收集 0.1mol/L Gly/HCl(pH2.5)洗脱峰。所得到的 IFN 比活性达到 $2 \times 10^7 u/mg$ 蛋白,SDS-PAGE 显示一条带,为人 IFN- $\alpha 1b$ 的电泳纯产品,分子量约为 19kDa(图 3)。

3 讨论

外源基因在大肠杆菌中要获得高效表达,

SD 序列与翻译起始信号 ATG 保持适当的距离至关重要。重组质粒 pBVX/ α 1b 中 SD 序列与 ATG 之间相隔 12 个核苷酸, 根据 Whitehorn 等人报道^[12], 距离在 8~12bp 之间为最适范围, 因此这一距离不会影响 IFN 基因的表达。平行对比 pAC/ α 1b 与 pACX/ α 1b 的抗病毒活性实验表明: 原核增强子样序列 X 能够增强 trp 启动子下游人 IFN- α 1b 基因的表达, 表达水平提高了 4 倍, 这一结果为进一步阐明原核增强子的结构和功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Nagata S, Mantei N, Weissmann C: *Nature*, 1980, **287**: 401~408.
- [2] 侯云德, 张志清, 杨新科等. 中国医学科学院学报, 1982, **4**(6): 327~335.
- [3] Gruss P, Dhar R, Khoury G: *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(2): 943~947
- [4] Benoist C, Chambon P: *Nature*, 1981, **290**: 304~310.
- [5] 吴淑华, 张丽兰, 张秀珍等. 病毒学报, 1985, **1**: 385~388.
- [6] 侯云德, 崔宏, 段淑敏. 病毒学报, 1985, **1**: 278~280.
- [7] 潘卫, 吴淑华, 金奇等. 生物工程学报, 1990, **6**: 265~271.
- [8] 刘哲伟, 吴淑华, 金奇等. 病毒学报, 1992, **8**: 195~199.
- [9] 张智清, 侯云德, 李玉英等. 病毒学报, 1988, **4**: 97~101.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Second Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [11] 侯云德. 病毒基因工程的原理与方法, 北京: 人民卫生出版社(第一版), 1985, pp245~247.
- [12] Whitehorn E A, Livak K J, Petteway L: *Gene*, 1985, **36**: 375~379.

Expression of Human IFN- α 1b by Using a New Vector Containing a Prokaryotic Enhancer Sequence

Xue Shuixing · Wu Shuhua · Han Feng · Wei Jia · Hou Yunde

(National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering,

Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052)

Abstract Human native IFN- α 1b was highly expressed in *E. coli* by using a new vector, which contains a prokaryotic enhancer sequence X upstream to trp promoter. The expression level of IFN- α 1b reached 1.6×10^8 units per liter culture, 4 times higher as compared with the original expression plasmid. *E. coli* produced IFN- α 1b was purified by DEAE-Sepharose, CM-Sepharose and McAb affinity chromatography to homogeneity in SDS-PAGE with a specific activity of 2×10^7 u/mg and molecular weight of 19 kDa.

Key words Human interferon- α 1b, prokaryotic enhancer sequence, protein purification