

# 猪 $\beta$ 防御素 2 与猪 $\gamma$ 干扰素在毕赤酵母中的融合表达及生物学活性比较

张定勇, 孙蕾, 杨利敏, 刘文军

中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室 中国科学院微生物研究所分子病毒中心, 北京 100101

**摘要:** 为了研究猪  $\beta$  防御素 2(PBD-2) 与猪  $\gamma$  干扰素 (PoIFN $\gamma$ ), 采用重叠延伸 PCR 法合成嵌合编码序列 PBD-2-PoIFN $\gamma$ , 在此序列的基础上扩增 PoIFN $\gamma$  基因, 并分别克隆入毕赤酵母表达载体 pPICZ $\alpha$ A, 构建重组表达质粒 pPICZ $\alpha$ A-PBD-2-PoIFN $\gamma$  与 pPICZ $\alpha$ A-PoIFN $\gamma$ 。经 *Sac* I 线性化, 电击转化巴斯德毕赤酵母 X33, 筛选阳性重组子, 在含 0.5% 甲醇的 BMMY 培养基中诱导 72 h。SDS-PAGE 及 Western blotting 结果表明, 所获得的重组子能够分别分泌表达 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合蛋白与 PoIFN $\gamma$ 。琼脂扩散法和细胞病变抑制法未检测到融合蛋白的抑菌和抗病毒活性, 而 PoIFN $\gamma$  具有明显的抗病毒活性。圆二色谱分析显示 PoIFN $\gamma$  与 PBD-2-PoIFN $\gamma$  的螺旋和无规则卷曲含量差别较大, 推测是融合蛋白未能正确折叠影响了 PBD-2-PoIFN $\gamma$  的活性。

**关键词:** 重叠延伸 PCR, 猪  $\beta$  防御素 2, 猪  $\gamma$  干扰素, 融合蛋白, 毕赤酵母

## Fusion expression and bioactivity comparison of porcine $\beta$ -defensin-2 and porcine interferon-gamma in *Pichia pastoris*

Dingyong Zhang, Lei Sun, Limin Yang, and Wenjun Liu

Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Center for Molecular Virology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** In order to study PBD-2 and PoIFN $\gamma$ , the chimeric gene PBD-2-PoIFN $\gamma$  was synthesized by overlap extension PCR, and amplified PoIFN $\gamma$  on the basis of this sequence, then cloned into yeast expression vector pPICZ $\alpha$ A separately to get the recombinant plasmid pPICZ $\alpha$ A-PBD-2-PoIFN $\gamma$  and pPICZ $\alpha$ A-PoIFN $\gamma$ . The recombinant plasmid was digested by *Sac* I and introduced into *Pichia pastoris* X33 cells by electroporation. Positive clones were screened and cultivated in BMMY medium containing 0.5% methanol for 72 h. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the screened recombinant could secrete PBD-2-PoIFN $\gamma$  and PoIFN $\gamma$  separately. The activity of fusion protein was not detected by cytopathic effect inhibition assay and agar diffusion assay, but detected obvious antiviral activity of PoIFN $\gamma$ . The helix and random coil contents was showed vary greatly between PoIFN $\gamma$  and PBD-2-PoIFN $\gamma$  by circular dichroism analysis. It was speculated that the fusion protein was not correctly folded and may affect the activity of PBD-2-PoIFN $\gamma$ .

**Received:** March 22, 2010; **Accepted:** April 17, 2010

**Supported by:** Chinese Academy of Sciences Innovation Projects (No. KSCX2-YW-N-054), International Science and Technology Cooperation Program from Ministry of Science and Technology (No. 2007DFC30240), Tianjin Kanglai Sen Production and Research Program (No. 2009CXY04-03).

**Corresponding author:** Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807497; Fax: +86-10-64807503; E-mail: liuwj@im.ac.cn

中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No. KSCX2-YW-N-054), 科技部国际科技合作项目 (No. 2007DFC30240), 天津市康莱森产学研项目 (No. 2009CXY04-03) 资助。

**Keywords:** overlap extension PCR, PBD-2, PoIFN $\gamma$ , fusion protein, *Pichia pastoris*

抗菌肽通常是由小于 50 个氨基酸的氨基酸残基组成的具有重要生物学活性的小分子多肽, 是生物先天性免疫的重要组成部分。不同物种的抗菌肽一级结构有相似之处, 含有至少 2 个正电荷氨基酸以及一定比例的疏水氨基酸<sup>[1]</sup>。防御素是一类分子量约为 4.0~5.0 kDa, 含有 6 个半胱氨酸残基, 3 对二硫键的阳离子抗菌肽。猪  $\beta$ -防御素 2 (Porcine Beta-Defensin 2, PBD-2) 是新发现的一种  $\beta$ -防御素, 预测其成熟肽有 37 个氨基酸, 化学合成的 PBD-2 活性分析表明其具有广谱抗菌作用<sup>[2-4]</sup>, 但利用基因工程手段对其进行表达还未见报道。 $\gamma$  干扰素是由激活的 T 细胞和 NK 细胞产生, 具有抗病毒和免疫调节功能的细胞因子。猪  $\gamma$  干扰素 (Porcine interferon-gamma, PoIFN $\gamma$ ) 全基因为 501 个碱基, 编码 166 个氨基酸, 前 23 个氨基酸为信号肽, 后 143 个氨基酸为成熟多肽, 推测含有 2 个糖基化位点<sup>[5-7]</sup>。1990 年, Dijkmans 等首先对 PoIFN $\gamma$  基因进行了研究<sup>[8]</sup>。迄今为止, PoIFN $\gamma$  已在不同表达系统中获得了表达。

巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达系统是一种重要的外源基因表达系统, 迄今为止, 已有多种蛋白在该系统中实现了表达<sup>[9-10]</sup>。融合蛋白 (Fusion protein, FP) 技术通过人工手段有目的地把两段或多段编码功能蛋白的基因连接在一起, 进而表达所需要的蛋白。利用此技术可以构建和表达可能具有多种功能的新型目的蛋白, 同时还有可能提高原蛋白的表达量。将抗菌肽单独进行表达后, 一般表达量低, 纯化困难, 而将其串联融合后可显著提高表达量<sup>[11-12]</sup>, 但抗菌肽与其他蛋白融合表达的报道较少。目前已有关于  $\gamma$  干扰素融合蛋白的报道, 一般在融合蛋白中作为免疫佐剂发挥功能<sup>[13-14]</sup>, 但 PoIFN $\gamma$  在毕赤酵母中的表达还未见报道。通过酵母表达系

统, 如果抗菌肽与干扰素融合后能获得高产量且抑菌抗病毒活性的融合蛋白和高产量的 PoIFN $\gamma$ , 将具有积极的意义。在此假设的基础上, 我们将通过毕赤酵母分泌表达 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合蛋白与 PoIFN $\gamma$ , 并对它们的活性进行分析, 同时为大规模生产 PoIFN $\gamma$  作好准备。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 载体、菌株、病毒和细胞株

毕赤酵母表达载体 pPICZ $\alpha$ A 和 *P. pastoris* 表达菌株 X33 购自 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、vesicular stomatitis virus (VSV) 及 Madin-Darby Bovine Kidney Cells (MDBK) 均由本实验室保存。

#### 1.1.2 工具酶与主要试剂

限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 和 *Sac* I, *Pfu* 聚合酶和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司; 酵母提取物、蛋白胨和酵母氮源碱购自 Oxoid 公司; DL5000 DNA marker、凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自北京诺派生物科技有限公司; INF $\gamma$  多克隆抗体和 INF $\gamma$  标准品由本实验室自行制备。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 融合基因与 PoIFN $\gamma$ 基因的 PCR 扩增

根据 Uniprot 蛋白数据库中猪  $\beta$  防御素 (Q6R953) 和猪  $\gamma$  干扰素成熟肽 (P17803) 氨基酸序列, 利用 DNAworks 在线软件<sup>[15]</sup>, 根据毕赤酵母密码子偏爱性<sup>[16]</sup>, 自动合成 14 条引物 (表 1), 经基因重叠延伸 PCR (Gene splicing by overlap extension PCR, SOE PCR)<sup>[17-18]</sup> 将上述两基因融合, PBD-2 置于融合蛋白 N 端, PoIFN $\gamma$  置于融合蛋白 C 端 (图 1)。



图 1 融合基因序列结构示意图

Fig. 1 Sequence structure schematic of PBD-2-PoIFN $\gamma$  fusion gene.

表 1 融合基因引物

Table 1 Primers for fusion gene

Primers	Sequences (5'-3')
P1	ctgctcgagaaaagagaccactatctgcaaaagaagggtgacttg
P2	tggtccctcgattctgtgaaacaatgggcaagggtgagaattgcaagtacca ccctctttgcg
P3	attgttcaacagaatcgagggcaacatgctattctggttaaggcaaaagtctgt ataaggcaggcac
P4	agatgcggtgaaagtgtcctcaagatagttatctccttgaagaatggtgctc gccttatacagc
P5	ctggaagactacttcaacgcatctacatctgatgcccaaacggaggtcct ttgttctggaga
P6	ttgaattattcttctgactcctcctccagttctcaaaatcctaagaaca aaggacctc
P7	gaggagtcagataagaagatcattcaatcacagatcgtctcattctactcaa gttcttcgagat
P8	tccattgatcttggatagcttggttatccttgaagatctcgaagaactgaa tagaatgagac
P9	ccaagctccaagatcaatggatgttcaagcaggatattgtccagaga ttctgaaatggt
P10	atcttgattaactctcgaaacgttcaacttccagaagaaccattcaagaat ctctggaacat
P11	ttgaacgatttcgagaagttaatacaagaccctgtgacaactgcagatcca gagaaggctat
P12	cctagagacaagaatcgttcataactttatcaactctgatagcctttctctg gatctgcaagt
P13	gttatgaacgactgtctcctaggtctaaccttgaggaagagagaggtctc agacaatgtcca
P14	cgctctagattacttagatgctctttgaccttgaacattgtctgagacctc
PorF	ctgctcgagaaaagacagaccattcttcaag
PorR	cgctctagattacttagatgctctttgacc

引物由北京博迈德生物科技有限公司合成，其中在引物 P1 的 5'端引入 *Xho* I 限制性酶切位点和 $\alpha$ 信号肽裂解位点 *Kex2* (aaaaga)，在引物 P14 的 5'端引入 *Xba* I 酶切位点和终止子 (taa)。通过 5 次 PCR 反应合成融合基因 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 。其中第 1 次 PCR 反应以 P1、P2、P3、P4 互为模板引物；第 2 次 PCR 反应以 P5、P6、P7、P8 互为模板引物；第 3 次 PCR 反应以 P9、P10、P11、P12、P13、P14 互为模板引物；第 4 次 PCR 反应以第 1 次和第 2 次 PCR 产物为模板，引物为 P1 和 P8；第 5 次 PCR 反应以第 3 次和第 4 次 PCR 反应产物为模板，引物为 P1 和 P14。利用融合基因序列，设计 2 条引物 PorF 和 PorR 以合成的融合基因为模板扩增 PoIFN $\gamma$  基因。PCR 反应条件：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 30 s，60℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，30 个循环；72℃ 再延伸 10 min。

### 1.2.2 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 融合基因与 PoIFN $\gamma$ 基因重组酵母表达载体的构建与鉴定

用 *Xho* I 与 *Xba* I 双酶切融合基因 PBD-2-

PoIFN $\gamma$ 、PoIFN $\gamma$  基因和载体 pPICZ $\alpha$ A，酶切产物经琼脂糖电泳回收后在 16℃ 连接过夜，分别转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞；提取质粒，经 PCR 和双酶切鉴定正确后，送至北京博迈德科技发展有限公司测序。将测序正确的重组表达质粒命名为 pPICZ $\alpha$ A-PBD-2-PoIFN $\gamma$  和 pPICZ $\alpha$ A-PoIFN $\gamma$ 。

### 1.2.3 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 融合基因与 PoIFN $\gamma$ 基因重组表达质粒的线性化和电击转化

用 *Sac* I 单酶切 5~10  $\mu$ g 的 pPICZ $\alpha$ A-PBD-2-PoIFN $\gamma$  和 pPICZ $\alpha$ A-PoIFN $\gamma$  重组表达质粒使之线性化，参照 Easy Select<sup>TM</sup> Pichia Expression Kit 操作说明书将 *P. pastoris* X33 制备成感受态细胞，取出 90  $\mu$ L 分别与 10  $\mu$ L (500 ng/ $\mu$ L) 线性化的重组表达质粒 pPICZ $\alpha$ A-PBD-2-PoIFN $\gamma$  及 pPICZ $\alpha$ A-PoIFN $\gamma$  混合，使用 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪于 1.5 kV、25  $\mu$ F 和 200  $\Omega$  条件下电转化，立即加入 1 mL (1 mol/L) 冰浴山梨醇。转化的酵母细胞涂布 YPDS 平板 (Zeocin<sup>TM</sup> 抗性浓度为 100  $\mu$ g/mL)，30℃ 培养 2~4 d。

### 1.2.4 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 与 PoIFN $\gamma$ 高抗性菌株的筛选与鉴定

将在 YPDS 平板上长出的 PBD-2-PoIFN $\gamma$  与 PoIFN $\gamma$  单菌落分别转移到含高浓度 Zeocin<sup>TM</sup> 平板上 (浓度为 800  $\mu$ g/mL) 进行筛选，将在高抗性平板上长出的菌落接种到 5 mL YPD 液体培养基 (Zeocin<sup>TM</sup> 抗性浓度为 100  $\mu$ g/mL) 中，30℃ 培养过夜；提取阳性酵母基因组 DNA (TIANGEN)，以原始菌和空白表达载体转化的重组酵母基因组作对照，分别以 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合基因与 PoIFN $\gamma$  基因特异性引物，进行 PCR 鉴定，PCR 鉴定阳性的重组子用于诱导表达。

### 1.2.5 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 与 PoIFN $\gamma$ 重组菌株的诱导表达与检测

将 PBD-2-PoIFN $\gamma$  与 PoIFN $\gamma$  高抗性重组酵母菌分别按 1:50 接种到 5 mL BMGY 培养基中，30℃ 培养至  $OD_{600}$ =5~6，菌体离心后重悬于 20 mL BMMY 培养基，体积浓度为 0.5% 的甲醇诱导培养，收集 24、48、72 h 诱导表达上清液，经 TCA 法浓缩后用 SDS-PAGE 初步检测表达结果。

### 1.2.6 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 融合蛋白与 PoIFN $\gamma$ 的初步纯化与鉴定

诱导表达上清液浓缩与脱盐: 收集 100 mL 诱导表达上清液, 分别用 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 和 90% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  进行浓度梯度盐析沉淀, 4 $^\circ\text{C}$  放置 2 h 后 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀产物分别溶于 2 mL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中, SDS-PAGE 检测沉淀结果。

Superdex 75<sup>TM</sup> 分子筛层析纯化融合蛋白 PBD-2-PoIFN $\gamma$  与 PoIFN $\gamma$ : 综合比较在不同浓度梯度下的沉淀结果, 将含蛋白量大且杂蛋白少的沉淀进行透析脱盐处理, 然后再用 10 kDa 超滤浓缩管进行处理, 去除小分子杂质, 得到 500  $\mu\text{L}$  样品。在 AKATA 系统上用 0.5 mL/min 的缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0) 平衡 Superdex 75<sup>TM</sup> 柱, 然后以 0.2 mL/min 上样 500  $\mu\text{L}$ , 再用同一缓冲液以 0.2 mL/min 进行洗脱, 出现洗脱峰后收集样品, 将收集的纯化产物分别进行 SDS-PAGE 与 Western blotting 检测。Western blotting 的一抗为 PoIFN $\gamma$  多抗 (1:5 000 稀释), 二抗为辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG (1:2 500 稀释)。

### 1.2.7 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 融合蛋白与 PoIFN $\gamma$ 的活性检测

琼脂扩散法测定 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合蛋白的抑菌活性: 将 25  $\mu\text{L}$  处于对数生长期的 *E. coli* DH5 $\alpha$  与 55 $^\circ\text{C}$  LB 固体培养基 25 mL 混匀后铺平板, 待其凝固后, 用灭菌的打孔器 (直径 5 mm) 打孔, 滴加 100  $\mu\text{L}$  待测的融合蛋白样品, 37 $^\circ\text{C}$  培养过夜。以同体积 pPICZ $\alpha$ A 空载体转化的 X33 酵母表达蛋白为阴性对照, 10  $\mu\text{L}$  Kana (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为阳性对照。第 2 天测量抑菌直径 (抑菌直径=抑菌圈直径-加样孔直径)。

细胞病变抑制法测定 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合蛋白与 PoIFN $\gamma$  的抗病毒活性: 以含有 10% 小牛血清的 MEM 培养基在 37 $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养 MDBK 细胞, 传代 2 次。用完全培养基稀释成每 1 mL 含  $2.5 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$  个细胞的细胞悬液, 接种于 96 孔细胞板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 于同上的培养条件下培养 5 h。将配制的干扰素标准品、PoIFN $\gamma$  和 PBD-2-PoIFN $\gamma$  样品溶液移入接种 MDBK 细胞的培养板中, 每孔加

入 100  $\mu\text{L}$ 。培养 18~24 h, 弃去培养板中的上清, 加入水泡性口炎病毒 (VSV, -80 $^\circ\text{C}$  保存), 用含 3% 小牛血清的 MEM 培养基稀释至 100 TCID<sub>50</sub>, 每孔 100  $\mu\text{L}$ 。同样条件下培养 24 h, 然后进行染色和脱色。用酶标仪在 570 nm 处测定吸光值。以干扰素标准品为参照, 计算 PoIFN $\gamma$  和 PBD-2-PoIFN $\gamma$  的效价。

### 1.2.8 圆二色谱测定 PoIFN $\gamma$ 和 pBD-2-PoIFN $\gamma$ 的二级结构

用 pH 8.0 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液将纯化的 PoIFN $\gamma$  和 pBD-2-PoIFN $\gamma$  分别配成浓度为 0.2 mg/mL 的溶液, 在 Jasco (J-810) 圆二色谱仪上测 CD 谱, 扫描区域为远紫外 190~260 nm, 样品池光程为 1 mm。

## 2 结果

### 2.1 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 融合基因与 PoIFN $\gamma$ 基因的 PCR 扩增

将 PCR 扩增后得到的产物进行琼脂糖凝胶电泳, 以 DNA DL5000 marker 为分子质量标准, 分别获得了大小约为 560 bp 和 460 bp 的扩增带, 与预期 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合基因 (图 2A) 与 PoIFN $\gamma$  基因 (图 2B) 片段大小相符。

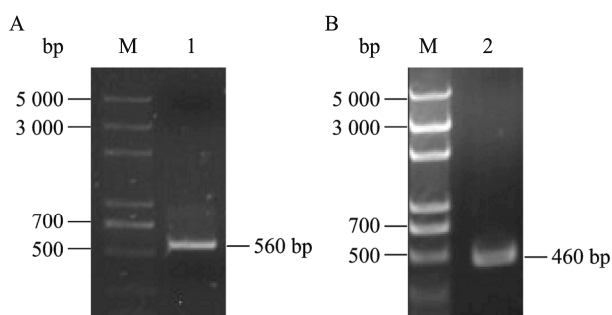


图 2 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合基因 (A) 与 PoIFN $\gamma$  基因 (B) PCR 扩增结果 (B)

Fig. 2 Fusion gene of PBD-2-PoIFN $\gamma$  (A) and gene of PoIFN $\gamma$  (B) amplified by PCR. M: DNA DL 5000 marker; 1: fusion gene of PBD-2-PoIFN $\gamma$ ; 2: gene of PoIFN $\gamma$ .

### 2.2 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 融合基因与 PoIFN $\gamma$ 基因重组表达载体的构建与鉴定

将连接产物分别转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 提取质粒, 用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切重组表达质粒, 获得了预期目的条带 (图略)。测序结果表明重组表达载体中 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合基因与 PoIFN $\gamma$  基因序列未发现

突变碱基,且阅读框正确,表明成功构建含有目的基因的重组酵母表达质粒 pPICZ $\alpha$ A-PBD-2-PoIFN $\gamma$  与 pPICZ $\alpha$ A-PoIFN $\gamma$ 。

### 2.3 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 与 PoIFN $\gamma$ 阳性重组表达酵母菌株的 PCR 鉴定

利用 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合基因特异性引物对 (P1 和 P14) 和 PoIFN $\gamma$  特异性引物对 (PorF 和 PorR) 分别对 Zeocin<sup>TM</sup> 抗性平板筛选出的 PBD-2-PoIFN $\gamma$  与 PoIFN $\gamma$  酵母菌株进行 PCR 鉴定。从图 3 中可以看出,分别扩增出约 560 bp (图 3A) 和 460 bp (图 3B) 的片段,均与理论大小相符,表明线性化的 pPICZ $\alpha$ A-PBD-2-PoIFN $\gamma$  与 pPICZ $\alpha$ A-PoIFN $\gamma$  成功与酵母菌 X33 染色体基因组整合。

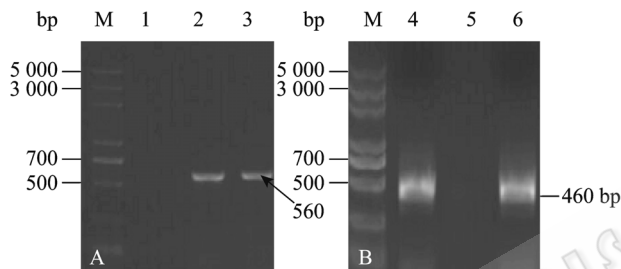


图 3 PBD-2-PoIFN $\gamma$  (A) 与 PoIFN $\gamma$  (B) 重组酵母菌株的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant yeast of PBD-2-PoIFN $\gamma$  (A) and PoIFN $\gamma$  (B) by PCR. M: DNA DL5000 marker; 1: negative control; 2: positive control; 3: positive yeast of PBD-2-PoIFN $\gamma$ , 560 bp fragment amplified with specific primer; 4: positive control; 5: negative control; 6: positive yeast of PoIFN $\gamma$ , 460 bp fragment amplified with specific primer.

### 2.4 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 融合蛋白与 PoIFN $\gamma$ 的诱导表达

将选出的 PBD-2-PoIFN $\gamma$  与 PoIFN $\gamma$  高抗阳性酵母菌株以及阴性对照菌 X33 和只转入空载体 pPICZ $\alpha$ A 的阴性对照菌分别在含 0.5% (V/V) 甲醇的 BMMY 培养基中诱导培养后,离心取上清,浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳。都发现两条明显特异性条带,与理论大小相符,而阴性对照菌和转入空载体的对照菌未见相应条带 (图略)。

### 2.5 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 融合蛋白与 PoIFN $\gamma$ 的初步纯化与鉴定

#### 2.5.1 诱导表达上清的盐析与脱盐

将阳性 PBD-2-PoIFN $\gamma$  重组酵母菌诱导表达上

清分别用 20%~90% 饱和度 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀后,用 pH 8.0 的 0.1 mol/L Tris-HCl 溶解,SDS-PAGE 检测沉淀产物 (图 4)。其中在 70% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度时得到的 PBD-2-PoIFN $\gamma$  沉淀量最大,但杂蛋白也较多。而在 50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度时得到的 PBD-2-PoIFN $\gamma$  纯度较高,杂蛋白较少,经透析后可以直接用分子筛进行纯化,得到纯度更高的目的蛋白。而 PoIFN $\gamma$  重组酵母菌的诱导表达上清直接用 50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度进行沉淀,经相同处理后进行分子筛纯化。

#### 2.5.2 Superdex 75<sup>TM</sup> 分子筛层析纯化 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 与 PoIFN $\gamma$

含 PBD-2-PoIFN $\gamma$  或 PoIFN $\gamma$  的浓缩脱盐样品分别经 Superdex 75<sup>TM</sup> 分子筛层析处理后,将收集液进行 SDS-PAGE 和 Western blotting。图 5 (PBD-2-PoIFN $\gamma$ ) 中主要有 2 个洗脱峰,第 1 个峰为杂蛋白峰,第 2 个峰为目的蛋白峰。从图 6A 和图 6B 的 SDS-PAGE 结果中发现 2 条无法分开的蛋白条带,

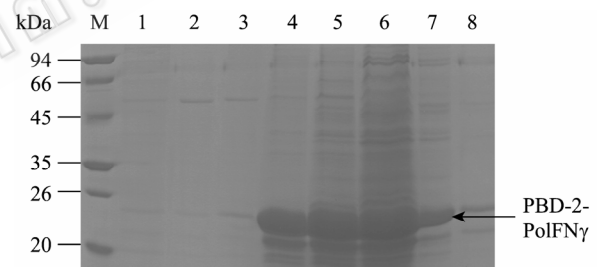


图 4 硫酸铵盐析 PBD-2-PoIFN $\gamma$  的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE of PBD-2-PoIFN $\gamma$  by salting-out lane with ammonium sulphate. M: protein marker; 1-8: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

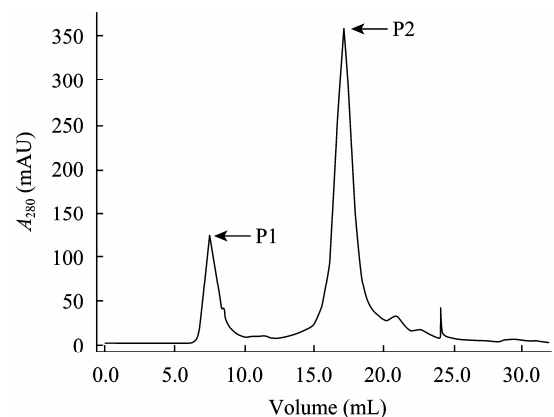


图 5 Superdex 75<sup>TM</sup> 分子筛层析纯化 pBD-2-PoIFN $\gamma$

Fig. 5 Purification of pBD-2-PoIFN $\gamma$  by Superdex 75<sup>TM</sup> size-exclusion chromatography. P1: peaks of other protein; P2: elute peaks of target protein.

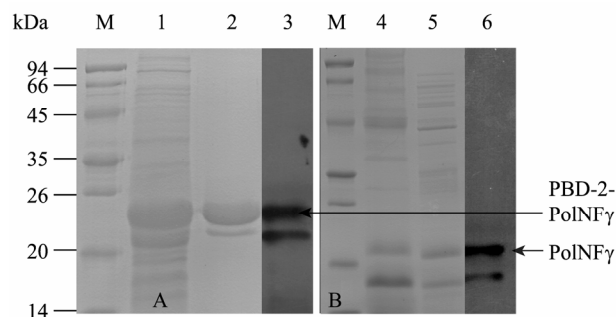


图 6 纯化的 PBD-2-PoIFN $\gamma$  (A) 与 PoIFN $\gamma$  (B) SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

Fig. 6 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis of purified PBD-2-PoIFN $\gamma$ . M: protein marker; 1: sample of PBD-2-PoIFN $\gamma$ ; 2: purified PBD-2-PoIFN $\gamma$ ; 3: identification of purified PBD-2-PoIFN $\gamma$  by Western blotting; 4: sample of PoIFN $\gamma$ ; 5: purified PoIFN $\gamma$ ; 6: identification of purified PoIFN $\gamma$  by Western blotting.

Western blotting 分析检测也是如此, 说明这 2 条带都能有效结合 PoIFN $\gamma$  多克隆抗体, 据此推测 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合蛋白与 PoIFN $\gamma$  以两种形式存在。

### 2.6 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 融合蛋白与 PoIFN $\gamma$ 的活性检测

细胞病变抑制法实验结果显示测定的 PoIFN $\gamma$  效价达到  $10^5 \sim 10^6$  U/mg。阴性对照和经不同浓度梯度的融合蛋白处理的 MDBK 细胞都出现了病变, 而标准 INF $\gamma$  处理过的 MDBK 细胞并没有发生病变; 琼脂孔穴扩散测定结果表明融合蛋白并不能抑制大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 融合蛋白 pBD-2-PoIFN $\gamma$  没有像单独的 pBD-2 一样具有广谱的抑菌作用。

### 2.7 圆二色谱测定 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 与 PoIFN $\gamma$ 的二级结构

对纯化的 PoIFN $\gamma$  和 pBD-2-PoIFN $\gamma$  进行圆二色谱测量, 测定的 CD 谱图利用 Secondary Structure Estimation 软件包对其 CD 谱进行最小二乘法修正计算和拟合 (图 7), 表 2 列出了用圆二色谱法测定的 PoIFN $\gamma$  和 pBD-2-PoIFN $\gamma$  的二级结构含量, 从计算结果中可以看到片层和转角含量相差不大, 而螺旋和无规则卷曲含量差别较大, 可推测是部分螺旋结构变为无规则卷曲影响了 PBD-2-PoIFN $\gamma$  的抗病毒活性。

表 2 PoIFN $\gamma$  和 PBD-2-PoIFN $\gamma$  蛋白的二级结构比较  
Table 2 Comparison of the secondary structures of PoIFN $\gamma$  and PBD-2-PoIFN $\gamma$

Protein	Helix (%)	Sheet (%)	Turn (%)	Random coil (%)
PoIFN $\gamma$	20.2	39.7	15.1	25.0
PBD-2-PoIFN $\gamma$	4.8	32.6	12.2	50.4

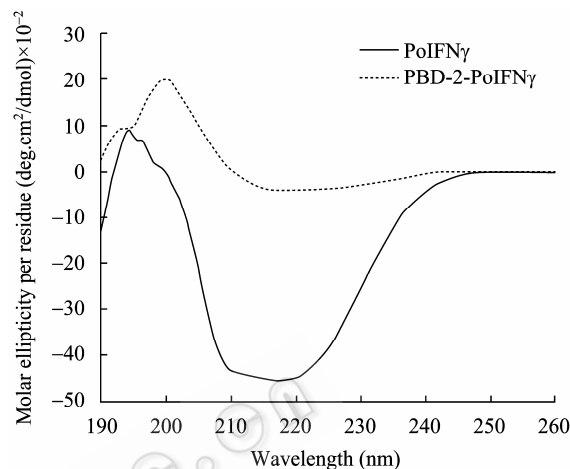


图 7 PoIFN $\gamma$  和 PBD-2-PoIFN $\gamma$  的 CD 图谱

Fig. 7 CD spectra of PoIFN $\gamma$  and PBD-2-PoIFN $\gamma$ .

## 3 讨论

通常融合基因的拼接大多采用限制性内切酶消化和连接酶处理的方法得到, 但是费时费力, 非常不方便, 而重叠延伸 PCR 技术能快速获得其他依靠限制性内切酶消化的方法难以得到的基因产物。该技术成功的关键是重叠互补引物的设计, DNAWORKS 程序能根据密码子偏爱性, 方便、准确地指导寡核苷酸的设计, 能最大限度地减少引物“发夹”结构形成, 使体外基因拼接工作更易进行。本实验通过 DNAWORKS 设计 14 条引物, 根据 SOE 法原理分 5 次 PCR 方便地合成了融合蛋白基因 PBD-2-PoIFN $\gamma$ 。在融合基因序列基础上, 我们扩增出了 PoIFN $\gamma$  基因的序列, 并用相同载体和酵母菌实现了 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合蛋白和 PoIFN $\gamma$  的表达。本实验中所使用的 *P. pastoris* 菌株 X33 是野生型, 耐受性比较好, 在含甲醇的培养基中能快速生长, 表达载体 pPICZ $\alpha$ A 含有  $\alpha$ -MF 信号肽序列, 在信号肽序列和目的蛋白序列之间引入 Kex2 蛋白酶切位点, 可以在目的蛋白质分泌到胞外时将信号肽切除<sup>[19]</sup>。由于酵母分泌表达得到大量的上清液, 内含一些杂

质, 直接进行分离纯化并不方便, 通过盐析方法, 可以将蛋白质在保持活性的前提下得到浓缩和粗分离。本实验首先通过硫酸铵分级梯度沉淀法, 获得了较佳蛋白沉淀量但杂蛋白较少时的饱和硫酸铵浓度, 在该浓度下将含有融合蛋白 PBD-2-PoIFN $\gamma$  和 PoIFN $\gamma$  的上清液进行浓缩, 透析脱盐后, 经过一次分子筛纯化即可得到纯度较高的蛋白。通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测发现, 无论 PBD-2-PoIFN $\gamma$  融合蛋白还是 PoIFN $\gamma$  都有 2 条明显的条带, 因为 PoIFN $\gamma$  上具有 2 个糖基化位点, 推测这 2 条带可能是糖基化水平不同造成的。

本实验将纯化后的融合蛋白 PBD-2-PoIFN $\gamma$  通过细胞病变抑制法和琼脂孔穴扩散法进行了活性分析, 实验结果表明融合蛋白没有抗病毒和抑菌效果, 但非融合的 PoIFN $\gamma$  具有很好的抗病毒效果。原因分析如下: 抗菌肽 N 末端有较强的形成两亲 $\alpha$ 螺旋的趋势, 带电荷氨基酸均在螺旋一侧分布; C 端有形成疏水螺旋的倾向<sup>[1,20]</sup>。目前被学界比较认可的抗菌肽作用机制是: 首先抗菌肽的多聚体与细胞膜相互吸引使抗菌肽结合到膜上; 然后抗菌肽的疏水 C 端插入膜中, 而形成两亲 $\alpha$ 螺旋的 N 端留在膜界面上; 最后两亲性的 $\alpha$ 螺旋插入质膜, 在质膜上形成较大孔洞, 从而使细胞死亡。由于 PBD-2 是置于融合蛋白 N 端, 而 C 端连接具较长肽链的 PoIFN $\gamma$ , 使其 C 端不能插入到膜中, 从而无法使其 N 端与细菌表面相互作用而失去活性<sup>[21]</sup>。通过圆二色谱分析发现, PoIFN $\gamma$  和 pBD-2-PoIFN $\gamma$  的二级结构中螺旋差别较大, 推测可能是部分螺旋结构变为不规则卷曲影响了 PBD-2-PoIFN $\gamma$  的空间结构, 进而影响了其抗病毒活性。融合蛋白中的 PBD-2 和 PoIFN $\gamma$  都带有很强的正电荷, 但由于当初设计融合蛋白时并没有用间隔序列进行连接, 可能正是因为它们近距离的互斥电荷影响了融合蛋白的二级结构, 进而影响空间结构, 使融合蛋白无法以二聚体形式存在, 从而造成了融合基因虽在毕赤酵母中得到了正常表达, 但无法发挥各自的正常功能。如果通过调换抗菌肽和干扰素的位置, 并且在融合蛋白之间加入间隔序列可能会产生有活性的融合蛋白。

本研究通过 SOE PCR 合成融合基因 PBD-2-

PoIFN $\gamma$  和 PoIFN $\gamma$  基因, 并成功在毕赤酵母中表达出融合蛋白 PBD-2-PoIFN $\gamma$  和 PoIFN $\gamma$ 。虽然 PBD-2 与 PoIFN $\gamma$  融合后的活性分析表明我们采用的融合方式并不能有效发挥它们之间的协同性, 但实验结果为进一步深化对抗菌肽和干扰素融合蛋白研究提供了有益启示, 同时获得的有活性的 PoIFN $\gamma$  也为大规模生产打下了基础。

## REFERENCES

- [1] Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet*, 1997, **349**(9049): 418-422.
- [2] Zhang GL, Ross CR, Blecha F. Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet Res*, 2000, **31**(3): 277-296.
- [3] Veldhuizen EJ, Rijnders M, Claassen EA, et al. Porcine  $\beta$ -defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria. *Mol Immunol*, 2008, **45**(2): 386-394.
- [4] Veldhuizen EJA, van Dijk A, Tersteeg MHG, et al. Expression of  $\beta$ -defensins pBD-1 and pBD-2 along the small intestinal tract of the pig: lack of upregulation *in vivo* upon *Salmonella typhimurium* infection. *Mol Immunol*, 2007, **44**(4): 276-283.
- [5] Charley B, McCullough K, Martinod S. Antiviral and antigenic properties of recombinant porcine interferon gamma. *Vet Immunol Immunopathol*, 1988, **19**(2): 95-103.
- [6] Schreiber RD, Farrar MA. The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Gastroenterol Japon*, 1993, **28**(4): 88-94.
- [7] Williams JG, Jurkovich GJ, Maier RV. Interferon- $\gamma$ : a key immunoregulatory lymphokine. *J Surg Res*, 1993, **54**(1): 79-93.
- [8] Dijkmans R, Vandenbroeck K, Beuken E, et al. Sequence of the porcine interferon-gamma (IFN-gamma) gene. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(14): 4259.
- [9] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**(1): 45-66.
- [10] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, **22**(4): 249-270.
- [11] Zhong ZX, Xu ZN, Peng L, et al. Tandem repeat *mhBD2* gene enhance the soluble fusion expression of hBD2 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**(5): 661-667.

- [12] Tian ZG, Teng D, Yang YL, *et al.* Multimerization and fusion expression of bovine lactoferricin derivative LfcinB15-W4, 10 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(1): 117–124.
- [13] Ding YP, Tan WY, Hu R, *et al.* Construction of a novel fusion protein harboring mouse interferon  $\gamma$  and epidermal growth factor receptor binding domain and enhancement of its antitumor activity. *Sci China C: Life Sci*, 1997, **40**(3): 293–300.
- [14] McCormick AL, Thomas MS, Heath AW. Immunization with an interferon- $\gamma$ -gp120 fusion protein induces enhanced immune responses to human immunodeficiency virus gp120. *J Infect Dis*, 2001, **184**(11): 1423–1430.
- [15] Hoover DM, Lubkowski J. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(10): e43.
- [16] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*, 2004, **22**(7): 346–353.
- [17] Xiong AS, Yao QH, Peng RH, *et al.* A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(12): e98.
- [18] Young L, Dong Q. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(7): e59.
- [19] Fuller RS, Brake A, Thorner J. Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(5): 1434–1438.
- [20] Powers JPS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 2003, **24**(11): 1681–1691.
- [21] Christensen B, Fink J, Merrifield RB, *et al.* Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(14): 5072–5076.

JOURNALS.IM.AC.CN