

QIAexpress 系统高效表达鸡 γ -干扰素 cDNA 的研究

吴志光* 夏春 汪明 蒋金书

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要 为深入进行基因工程鸡干扰素的研究, 将前期工作所得到的 pGEM T Easy/ChIFN- γ 重组质粒中的 ChIFN- γ 基因亚克隆到表达质粒 pQE30 上, 构建了重组表达质粒 pQE-ChIFN- γ , 转化大肠杆菌 M15, 构建了高效表达重组蛋白的双质粒 QIAexpress 系统。经对重组蛋白的可溶性判定、包涵体的溶解、纯化、复性及活性测定, 结果表明 ChIFN- γ 的表达水平为 22%, 包涵体的纯度为 80%, 生物学活性为 3 200~ 6 400 U·mg⁻¹。本方法可供大量制备活性鸡 γ -干扰素参考。

关键词 γ -干扰素; QIAexpress 系统; 抗病毒活性

中图分类号 S831; Q78

Expression of Chicken Interferon- γ cDNA by QIAexpress System

Wu Zhiguang Xia Chun Wang Ming Jiang Jinshu

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract In order to lucubrate recombinant chicken interferons, the chicken interferon- γ (ChIFN- γ) gene was subcloned into high level expression vectors pQE30 for construction of expression plasmids pQE30/ChIFN- γ M15 strains (containing pREP4) transformed with pQE30/ChIFN- γ formed QIAexpress system, which can efficiently produce recombinant protein. The inclusion bodies of recombinant proteins were isolated, dissolved, purified, renatured and the activity was tested. The result showed that the expression level was about 22%, the purity of inclusion bodies was 80%. The anti-viral activity was 3 200~ 6 400 U·mg⁻¹. This research established a foundation for the production of ChIFN- γ largely.

Key words chicken interferon- γ ; QIAexpress system; anti-virus activity

γ -干扰素 (Interferon gamma, IFN- γ) 是淋巴细胞分泌的功能调节蛋白, 具有抗病毒、抗肿瘤等活性, 并在免疫应答调控中起重要作用, 其免疫调节的活性和抑制细胞分裂的活性远比 α β 干扰素高, 具有免疫预防和治疗的潜能^[1,2]。由生物诱导产生 IFN- γ , 因来源少、成本高、纯化工艺复杂等诸多限制而价格昂贵, 极大限制了临床和科研的应用。自 80 年代初期以来, 利用基因工程技术生产的人重组干扰素在临床治疗中已显示出一定的疗效^[3]。猪狗等动物重组干扰素的研究取得了较大的进展^[4,5]。近几年关于重组鸡干扰素的研究也非常活跃, 但都处于实验室研究阶段, 距离养鸡业大规模的应用尚有一段距离^[6,7]。原核表达存在着表达蛋白的活性低, 不易于纯化以及菌株不稳定等问题, 限制了向规模化生产的转化。本研究在总结多方面经验的基础上, 挑选了 QIAexpress 系统, 建立了高效、稳定表达重组 ChIFN- γ 的双操纵子、双质

收稿日期: 2001-11-13

* 吴志光, 博士生, 研究方向为禽类细胞因子。北京圆明园西路 2 号

粒和双抗性筛选表达系,表达的产物为融合蛋白,与其他系统表达的融合蛋白相比具有易于纯化,N-端仅为6个组氨酸,具有不影响蛋白活性等优点。本研究为筛选高效表达及制备干扰素技术进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:大肠杆菌 JM 109 由本实验室保存,宿主表达菌 M 15,购自 Q IAGEN 公司,基因型 $\text{Nal}^s, \text{Str}^s, \text{Rif}^s, \text{Lac}^-, \text{Ara}^-, \text{Gal}^-, \text{Mtl}^-, \text{F}^-, \text{Rec}^+, \text{Uvr}^+, \text{Lon}^+$ 。其自身还含有低拷贝的表达调节质粒 pREP4(含卡那霉素抗性基因),用以维持高水平的 *lac* 阻遏蛋白。

载体: pQE30 表达载体,购自 Q IAGEN 公司。

滤泡性口炎病毒(VSV)购于中国生物药品检定所。

SPF 鸡胚由中国农业大学赵继勋教授提供。

1.2 方法

1.2.1 ChIFN- γ 基因片段的亚克隆 根据已有的 ChIFN- γ cDNA 序列^[8]设计了一对引物,并分别在 5'引物和 3'引物的末端设计了一个 *Sph* I 和一个 *Hind* III 酶切位点。应用 PCR 技术从质粒 pGEM T/ChIFN- γ 中克隆 ChIFN- γ 基因片段。

1.2.2 重组表达质粒(pQE/ChIFN- γ)的构建及诱导表达 将 PCR 产物用 *Sph* I 和 *Hind* III 双酶切,经低熔点琼脂糖法回收 500 bp 的特异片段,同时表达载体也进行 *Sph* I 和 *Hind* III 双酶切,回收 3.0 kb 的大片段,然后用 T4 DNA 连接酶连接,转化 JM 109,小量快速抽提质粒进行鉴定,阳性重组质粒转化 M 15,37℃ 振荡培养 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.7$ 时进行 IPTG 诱导表达,收集表达菌体进行表达产物的鉴定。

1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 取 1 mL 表达菌体离心沉淀,经 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 和加样缓冲液 90℃ 裂解变性 5 min,高速离心后直接用于 SDS-PAGE。

1.2.4 判断蛋白的可溶性及纯化 参照 Q IAGexpress^R Purification 试剂盒提供的方法鉴定所表达的蛋白是否形成不溶性包涵体,再根据此结果来决定纯化的方法。本实验表达的蛋白为不溶性包涵体,因此采用分步变性纯化法(NiNTA 柱纯化)。将冻存在 -70℃ 的细菌沉淀,室温下融化 15 min,提取包涵体后加入裂解缓冲液 B ($5 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿重),室温下摇动 1 h, $4 \times 10\,000 \times g$ 离心 20 min。收集上清液加入到预先平衡的 Ni 柱中,混匀,室温下剧烈摇动 15~60 min,装柱。依次用 $2 \times 4 \text{ mL}$ 缓冲液 C, $4 \times 0.5 \text{ mL}$ 缓冲液 D, $4 \times 0.5 \text{ mL}$ 缓冲液 E 洗柱,收集洗脱液。将收集的样品,进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 Western blot 分析 根据 Q IAGexpress^R Detection 手册,SDS-PAGE 结束后,取出凝胶,在转移缓冲液中浸泡 30 min,将浸泡过的与胶同样大小的 NC 膜和滤纸,按纤维垫—滤纸—凝胶—NC 膜—滤纸—纤维垫的结构,装入转印夹。转印时凝胶侧接负极,NC 膜侧接正极,电泳槽冰浴,100 V,350 mA 转印 1 h。转印结束后,按剪下分子量标准的膜条用氨基黑染色,其余部分先封闭 2 h,然后以鼠 Anti-His 抗体为一抗,以羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗进行反应,最后在底物中显色。

1.2.6 包涵体的制备 采用冻融(-70℃)和冰浴超声波破碎法,每次超声 10 s,间隔 10 s,功率为 350 W,然后 $10\,000 \times g$ 离心 30 min,沉淀用含 0.5% Triton X-100 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的缓冲液洗涤 2 次,制备所需包涵体。

1.2.7 包涵体的溶解与复性 收集包涵体溶于 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素缓冲液, 通过分步透析进行复性。

1.2.8 生物学活性的测定 对复性后的包涵体蛋白, 采用细胞病变抑制法测定其抗病毒活性^[9]。即鸡胚成纤维细胞在 96 孔板上生长约 24 h, 待细胞长成单层后, 去除生长液, 每孔加入 2 倍比稀释的干扰素 $100\ \mu\text{L}$, 每个稀释度接 2 孔, 37^o 孵育过夜, 加入 $100\ \mu\text{L}$ 100TCID_{50} 的 VSV 病毒进行攻毒, 37^o 培养 1~2 d, 待对照孔细胞全部发生明显的细胞病变时在倒置显微镜下观察结果, 将抑制 50% 细胞病变的干扰素的最高稀释度定为 1 个干扰素单位。

2 结果

2.1 重组 ChIFN- γ 2 表达质粒的构建和鉴定

通过 PCR 技术从质粒 pGEM T/ChIFN- γ 2 中亚克隆了 ChIFN- γ 2 基因片段, 双酶切后与 pQE30 相连接, 构建 pQE/ChIFN- γ 2 表达质粒, 酶切鉴定 (图 2), 将阳性的表达质粒转入 M15 (pREP4), 构建了表达 ChIFN- γ 2 的基因工程菌 (图 1)。

2.2 重组 ChIFN- γ 2 基因的高效诱导表达及鉴定

经 SDS-PAGE 结果表明, 与未诱导对照组比较, 并参照蛋白分子量标准, 在电泳图谱上出现约 16~18 kD 的特异带 (图 3), 初步确定为表达的干扰素蛋白。对诱导条件的摸索表明 $OD_{600} = 0.5$, 诱导表达 5 h 时, 表达量最高, 1-D 分析表明, 表达量占菌体总蛋白的 22% 左右。Western Blotting 结果可见在分子量大小相符的特异带, 证明为具有 $6\times\text{His}$ 的干扰素蛋白 (图 4)。

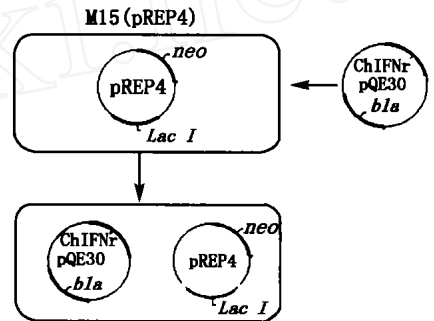


图 1 表达 ChIFN- γ 2 的基因工程菌的构建

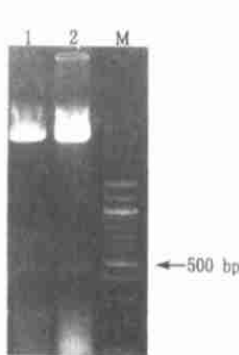


图 2 重组质粒酶切鉴定图
1, 2 均为阳性重组表达
质粒酶切结果; M Marker

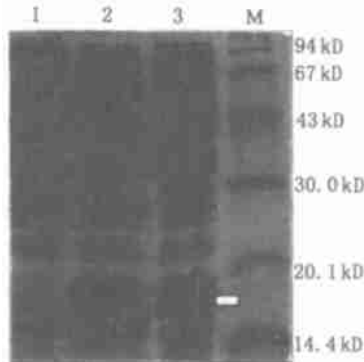


图 3 SDS-PAGE 分析
1 空质粒对照; 2, 3 转染重组
干扰素质粒组; M Marker

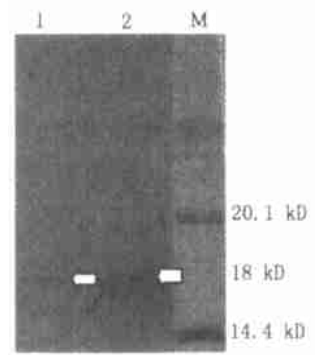


图 4 Western blot 分析
1 纯化的蛋白样品; 2 细菌
粗裂解样品; M Marker

2.3 蛋白可溶性判定及纯化

SDS-PAGE 结果表明, 表达的蛋白为不溶性包涵体, 离心后裂解液上清内未见特异带。包涵体经 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素缓冲液 (pH 8.0) 变性后, 应用镍整合剂亲和层析, 在不同 pH 的洗脱条件下, 进行重组蛋白的纯化。SDS-PAGE 电泳的结果显示, 仅在分子量约 17 kD 处有一条清晰的目的蛋白带, 而且只有在 pH 4.5 的尿素洗脱液中含有纯化的目的蛋白, 纯度达到 95% 以上。

2.4 包涵体的纯化、溶解与蛋白的复性

对收集的菌体进行-70℃冻融后超声、离心,用含有 Triton X-100 的缓冲液反复洗涤,包涵体纯度可达到 80%。用强变性剂 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素对包涵体进行变性,分步透析法进行复性。

2.5 重组蛋白活性检测

Ch IFN- γ 活性的检测是采用目前国内外已经建立的细胞病变抑制法在鸡胚成纤维细胞-水疱性口炎病毒(CEF-V SV)系统上对透析后的样品进行了抗病毒活性测定。多次活性检测结果表明,包涵体复性后的蛋白在 CEF 细胞表现出很高的抗病毒活性,能够有效地抑制 V SV 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,其生物学活性约为 $3\ 200\sim 6\ 400\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

3 讨论

1) 目前,禽类疾病的防制仍然采用疫苗免疫、化药以及抗生素。然而大量使用抗生素和化药容易导致环境问题以及危害人类健康。疫苗免疫预防也存在血清型单一以及疫苗研发的速度赶不上毒株变异的速度而常导致免疫失败等问题,而细胞因子作为一种高效的天然物质,是未来防治疾病的方向。其中鸡 γ 干扰素主要来源于由 T 淋巴细胞,由 164 个氨基酸组成,含有 19 个氨基酸的信号肽。它不仅具有抗病毒、细菌和寄生虫等功能,还具有作为免疫增强剂调节免疫反应的功能,以及促进增重等功能。而考虑在养鸡生产中推广使用干扰素,必须建立高效生产干扰素的体系,利用基因工程技术生产重组干扰素是一条有效途径。

2) 本研究选择了目前较为先进的 Q IA express 双质粒(pQE, pREP4)系统,将 pGEM T Easy/Ch IFN- γ 重组质粒中的 Ch IFN- γ 基因亚克隆到表达质粒 pQE30 上,构建了重组表达质粒 pQE-Ch IFN- γ 。pQE 表达系统是一种建立在噬菌体 T5 启动子转录翻译系统上的高效表达载体,含有 2 个 *lac* 操纵子序列以及重组蛋白 N 端含 6 个组氨酸序列,前者可以增加 *lac* 抑制因子的结合能力,确保 T5 启动子的有效表达,后者可使表达产物带有组氨酸尾,有利于重组蛋白的纯化,但并不影响蛋白的分泌、重折叠以及融合蛋白的结构和功能。在 M15 宿主菌中含有的低拷贝型质粒 pREP4 具有高水平表达 *lac* 阻遏蛋白的功能,由于 T5 启动子的转录可以被 *lac* 阻遏蛋白所调节,因此 pQE 表达系统可有效调节重组蛋白的表达。另外,由于 IPTG 可与 *lac* 阻遏蛋白结合并使之失去与操纵子结合的能力,从而使 RNA 聚合酶从操纵子下游开始转录,并翻译成蛋白质,而 pQE 表达载体所编码的重组蛋白可在 IPTG 的诱导下迅速表达。由此可见,pQE 表达载体这种独特的“双操纵子”系统与 pREP4 产生的高浓度 *lac* 阻遏蛋白同时确保了在转录水平上的有效调控,有利于产物高效表达和纯化,又可使细菌免受高浓度异源蛋白的危害。同时,由于双质粒载体上的抗性基因使整个工程菌具有氨苄青霉素和卡那霉素的双重抗性,因此在反复传代中质粒不易丢失,能够稳定持续表达目的蛋白。Lowenthal 等^[10]曾使用该系统表达了 Ch IFN- γ , 获得了高活性的重组蛋白。然而 Q IA express 系统表达重组 Ch IFN- γ 在国内尚属首次,该系统的应用为推广使用 Ch IFN- γ 奠定了基础。

3) 包涵体的纯化采用了超声裂解法及 Triton X-100 的缓冲液反复洗涤,包涵体纯度达到了 80%,复性之后的活性测定表明,纯化的包涵体与柱层析纯化的重组蛋白生物学活性相当,对 CEF 无毒性,这就省去了蛋白纯化的过程,使有活性重组蛋白的获得方法更加简单,有利于大规模生产。另外,在研究中对基因工程菌进行了数十次的传代,结果表明构建的双质粒菌株能够十分稳定地高效表达 Ch IFN- γ , 这一特点适合规模化发酵生产。

参 考 文 献

- 1 Lowenthal J W, York J J, O'Neil T E, et al Potential use of cytokine there in poultry. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 63: 191~ 198
- 2 Sick C, Schultz U, Staeheli P A. Family of genes coding for two serologically distinct chicken interferon. *J Biol Chem*, 1996, 271(13): 7636~ 7639
- 3 Gray P W, Leung D W, Pennica, et al Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature*, 1982, 295: 503~ 506
- 4 夏春, 刘津, 杨琪, 等. 猪干扰素 β 基因的分子克隆与测序. *中国兽医杂志*, 2000, 26: 6~ 7
- 5 夏春, 汪明. 拉布拉多犬和德国牧羊犬 IFN- α 基因的分子克隆与测序. *农业生物技术学报*, 1999, 7(3): 245~ 247
- 6 Weining K C, Schultz U, Munitzer U, et al Biological properties of recombinant chicken interferon- γ . *Eur J Immunol*, 1996, 26: 2440~ 2447
- 7 Schijns V E, Weining K C, Nuijten P, et al Immunoadjuvant activities of *E. coli* and plasmid-expressed recombinant chicken IFN- α/β , IFN- γ and L- β in 1-day- and 3-week-old chickens. *Vaccine*, 2000, 18: 2147~ 2154
- 8 吴志光, 夏春, 汪明, 等. 鸡 II 型干扰素存在亚型. *动物医学进展*, 2001, 22: 50~ 54
- 9 侯云德主编. *分子病毒学*. 北京: 学苑出版社, 1990. 598~ 642
- 10 Lowenthal J W, York J J, O'Neil T E, et al. *In vivo* effects of chicken interferon- γ during infection with *Escherichia coli*. *J Interferon Cytokine Res*, 1997, 17: 551~ 558

简讯

我校“农业部饲料工业中心”通过国际质量体系认证

中国农业大学农业部饲料工业中心顺利通过由 Moody 国际认证有限公司组织的 ISO 9001-2000 质量体系认证(认证编号 014-A)。这是国内首家以教学、科研为主体通过 ISO 9001 体系认证单位。这对我校饲料工业中心与国际接轨, 提高整体管理水平和地位, 更好地为我国饲料工业及农民服务将起到重要作用。

我校获准一项 2001 年度“创新研究群科学基金”

经国家自然科学基金委员会生命科学部推荐、同行专家评议、专业评审组遴选以及专家小组实地考察、国家自然科学基金委员会审定, 我校动物科技学院以李德发教授为学术带头人的动物营养学研究群体获得 2001 年度“创新研究群体科学基金”的支持, 资助时间 3 年, 金额为 360 万元。