

董亚青,朱文斗,王琳琳,等. 鸡 α -干扰素在毕赤酵母中的表达及其表达条件优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):275-277.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.084

鸡 α -干扰素在毕赤酵母中的表达及其表达条件优化

董亚青¹, 朱文斗², 王琳琳¹, 王永娟¹

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 江苏省兴化市新垛镇兽医站, 江苏兴化 225747)

摘要:选择毕赤酵母表达系统,根据酵母密码子偏爱性合成 ChIFN- α 成熟肽的基因序列,连接至载体 pPIC9K 中,构建重组质粒 pPIC9K- α ,将重组载体酶切线性后克隆至毕赤酵母 GS115,筛选高拷贝转化子及其甲醇利用型,对其表达条件进行优化。结果表明:鸡 α -干扰素在毕赤酵母中成功表达,在含 2% 酸水解酪蛋白,经 0.5% 甲醇在 28 °C 诱导表达 72 h 后,重组蛋白表达量最多,抗病活性最高。

关键词:鸡; α -干扰素;毕赤酵母;基因表达;表达条件

中图分类号: S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0275-03

干扰素 (IFN) 是 1 种具有抗病毒、调节免疫等作用的细胞因子,由英国科学家 Isaacs 和 Lindemann 于 1957 年首次发现^[1]。Lamp 等于 1963 年纯化了这种细胞因子,并证明其为蛋白质^[2]。干扰素具有一定的特异性,只有同种的生物细胞产生的干扰素才能起到保护作用,对异种生物细胞则无作用^[3]。根据细胞来源、生化特性及生物学活性可将其分为两大类: I 类、II 类^[4]。鸡 α -干扰素 (ChIFN- α) 全基因为 582 个碱基,编码 193 个氨基酸,包含 31 个氨基酸的信号肽、162 个氨基酸的成熟蛋白^[5]。ChIFN- α 属于 I 类干扰素,是禽类主要干扰素,具有抑制病毒复制、加强 NK 细胞杀伤力的能力^[6]。本试验根据酵母密码子偏爱性合成 ChIFN- α 成熟

肽的基因序列,克隆至毕赤酵母分泌表达型载体 pPIC9K 中,构建重组质粒 pPIC9K- α ,电转化至毕赤酵母 GS115,筛选并鉴定其甲醇利用型,优化其表达条件,以期获得表达量多、抗病活性高的重组蛋白,旨在为干扰素应用研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

ChIFN- α 序列合成由生工生物工程上海 (股份) 有限公司完成;毕赤酵母 GS115 由笔者所在实验室保存;限制性内切酶、连接酶、Pretained Protein 分子量 marker 均购自 Fermentas 公司;Wizard DNA Clean-up System 均购自美国 Promega 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、培养基等均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 重组质粒 pPIC9K- α 的构建

根据酵母密码子偏爱性合成 ChIFN- α 成熟肽的基因序列,在其末端加入设计好的酶切位点,经过酶切、连接将 ChIFN- α 的基因序列克隆至毕赤酵母分泌表达型载体 pPIC9K 中,转化至大肠杆菌 DH5 α 中进行扩增,提取质粒进

收稿日期:2014-11-27

基金项目:江苏省科技支撑计划 (编号:BE2014380);江苏农牧科技职业学院 2014 年度重点支持项目 (编号:NSFZD1405);扬州朝天歌农牧科技有限公司横向合作课题 (编号:00010114012)。

作者简介:董亚青 (1980—),女,江苏兴化人,硕士,讲师,主要从事预防兽医学研究。E-mail:156815306@qq.com。

通信作者:王永娟,博士,副教授,主要从事生物工程技术研究。E-mail:43088591@qq.com。

[6] Huang H B. Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the People's Republic of China [J]. Revue Scientifique et Technique, 1991, 10 (2): 481-498.

[7] Marín M S, Martín A J, Pérez O G L, et al. Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine [J]. Virus Research, 1995, 39 (2/3): 119-128.

[8] 王启明,董亚芳. NY/T 572—2002 兔出血病血凝和血凝抑制试验方法[S].

[9] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典:三部[M]. 北京:中国农业出版社,2011.

[10] 唐应华,陆吉虎,吴培培,等. 免疫增强剂对禽流感疫苗免疫持续期、安全性和鸡淋巴细胞转化的影响[J]. 江苏农业学报, 2014, 30 (4): 821-825.

[11] 宁宜宝. 兽用疫苗学[M]. 北京:中国农业出版社,2008:390-

391.

[12] Mikschofsky H, Schirmmeier H, Keil G M, et al. Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus [J]. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7 (6): 537-549.

[13] Ludwig C, Wagner R. Virus-like particles - universal molecular toolboxes [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18 (6): 537-545.

[14] Perez - Filgueira D M, Resino - Talavan P, Cubillos C, et al. Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV [J]. Virology, 2007, 364 (2): 422-430.

[15] Fernández E, Toledo J R, Chiong M, et al. Single dose adenovirus vectored vaccine induces a potent and long-lasting immune response against rabbit hemorrhagic disease virus after parenteral or mucosal administration [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011, 142 (3/4): 179-188.

行酶切鉴定。

1.3 重组质粒 pPIC9K- α 的转化及筛选

制备毕赤酵母感受态, -70°C 保存。将鉴定正确的重组质粒 pPIC9K- α 大量制备并纯化, 经 *Sal* I 酶切线性并纯化后电转化至毕赤酵母 GS115 感受态中, 将转化菌涂布于不含组氨酸的 MD 琼脂平板上, 30°C 孵育 3 d。用含不同浓度 G418 的 YPD 平板筛选高拷贝转化子。用 MD、MM 平板鉴定其甲醇利用型, 通常在 MD 平板上生长快且 MM 平板上生长缓慢或不生长的为 Muts, 生长速度一样的为 Mut+。

1.4 重组质粒 pPIC9K- α 的表达及抗病毒试验

挑取生长于 YPD 平板上的单菌落, 接种于 BMGY 培养基中培养 24 h 左右, 至 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 $2 \sim 6$, $3\ 000\text{ g}$ 离心 3 min, 收集菌体沉淀, 悬浮于含甲醇的 BMMY 液体培养基中, 至 $D_{600\text{ nm}}$ 值约为 1, 30°C 230 r/min 进行诱导表达, 每隔 24 h 补加甲醇至终浓度为 0.5%, 96 h 后收获培养液, $3\ 000\text{ g}$ 离心 5 min, 收集上清。在鸡胚成纤维细胞-水疱性口炎病毒 (CEF-VSV) 系统中检测重组 ChIFN- α 的抗病毒活性, 在生长正常的 CEF 中, 分别加入重组的 ChIFN- α 、病毒和重组 ChIFN- α 、病毒, 培养约 36 h, 观察细胞的生长情况。

1.5 ChIFN- α 成熟肽表达条件的优化

挑取生长于 YPD 平板上的高拷贝重组菌的单菌落, 接种于 BMGY 培养基中培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 $2 \sim 6$, $3\ 000\text{ g}$ 离心 3 min, 收集菌体沉淀, 悬浮于含 0.5% 甲醇的 BMMY 培养基中, 至 $D_{600\text{ nm}}$ 值约为 1, 分别从第 1 天起每隔 1 d 取发酵液上清进行抗病毒试验。挑取高拷贝重组菌单菌落, 同上进行诱导表达, 诱导温度分别设定为 20°C 、 22°C 、 24°C 、 26°C 、 28°C 、 30°C , 取诱导后 72 h 培养上清测其抗病毒活性。挑取高拷贝重组菌单菌落, 同上进行诱导表达, 甲醇质量分数分别设置为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%, 取诱导后 72 h 培养上清测其抗病毒活性。在培养基中加入酸水解酪蛋白作为竞争性底物, 酸水解酪蛋白的质量分数分别设置为 1%、2%、3%, 诱导表达方法同上。

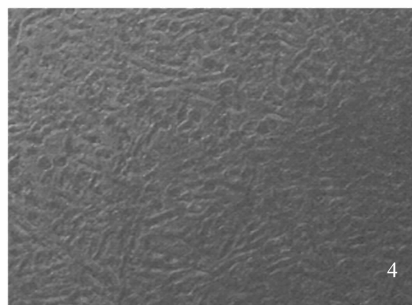
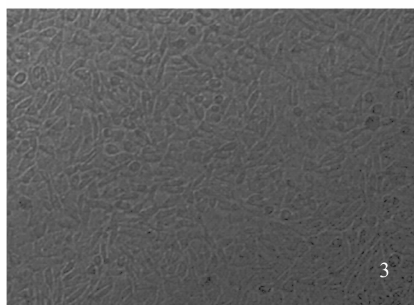
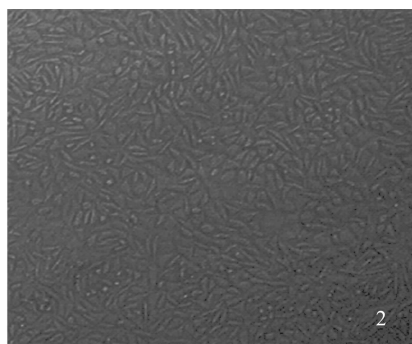
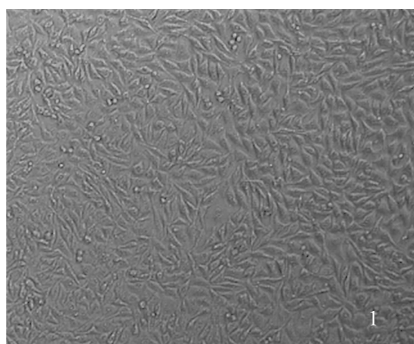
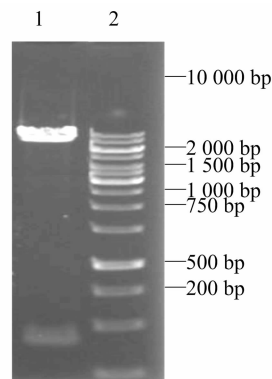


图2 重组ChIFN- α 的抗病毒试验

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pPIC9K- α 的构建

将连接有 ChIFN- α 基因的 pPIC9K 转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 挑去阳性菌落进行扩增, 提取质粒, 用 *Eco*R I、*Sna*IB I 进行双酶切, 显示结果正确 (图 1)。



1—*Eco*R I /*Sna*IB I 酶切pPIC9K- α ; 2—1 kb DNA Ladder

图1 pPIC9K- α 的酶切鉴定

2.2 重组质粒 pPIC9K- α 的转化及筛选

将重组质粒 pPIC9K- α 电转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 将 MD 琼脂平板上的阳性克隆用含不同质量浓度 G418 的 YPD 平板筛选高拷贝转化子, 获得 4 株抗 4 mg/mL G418 的高拷贝转化子及 5 株抗 3 mg/mL G418 的高拷贝转化子。用 MD、MM 平板鉴定其甲醇利用型, 结果显示均为 Mut+。

2.3 重组质粒 pPIC9K- α 的表达及细胞毒性试验

接毒约 36 h 后, 正常生长的 GEFs 基本未出现病变 (图 2-1), 加入了重组 ChIFN- α 的正常生长的 CEFs 情况更加良好 (图 2-2), 加入了病毒和重组 ChIFN- α 的细胞 (图 2-3) 与只加病毒组细胞 (图 2-4) 相比, 细胞残缺程度明显较轻。4 mg/mL G418 抗性的重组酵母菌株的表达水平

与 3 mg/mL G418 抗性重组酵母菌株相当,不存在拷贝数依赖性。

2.4 ChIFN- α 成熟肽表达条件的优化

诱导 24 h 所得的抗病毒效果不明显,1~3 d 重组蛋白的活性增强,3 d 后活性有所下降(图 3)。不同温度诱导 3 d 后,28℃ 摇瓶发酵培养时,重组蛋白的活性最高(图 4)。不同甲醇质量分数时,0.5% 甲醇诱导表达的重组蛋白活性最高(图 5)。在培养基中加入酸水解酪蛋白作为竞争性底物时,当酪蛋白质量分数为 2% 时,重组蛋白活性最强(图 6)。

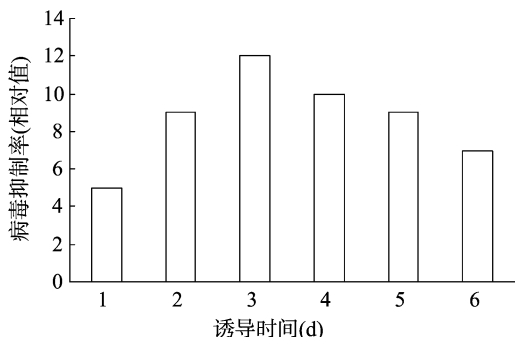


图3 诱导时间对重组酵母表达 ChIFN- α 成熟肽活性的影响

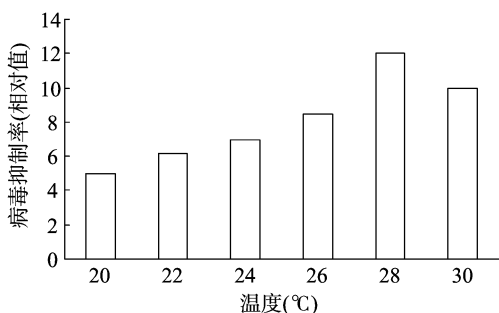


图4 诱导温度对重组酵母表达 ChIFN- α 成熟肽活性的影响

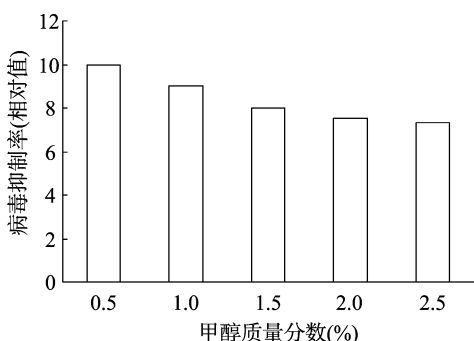


图5 甲醇浓度对重组酵母表达 ChIFN- α 成熟肽活性的影响

综上所述,重组蛋白 ChIFN- α 最佳诱导表达条件为:在含 2% 酸水解酪蛋白、经 0.5% 甲醇 28℃ 诱导表达 3 d 后,重组蛋白表达量最多,抗病毒活性最高。

3 结论与讨论

我国养禽业规模及总量均居世界首位^[7],但禽病仍然阻碍养禽业发展,给养禽业带来了巨大的经济损失。一些禽病的治疗及预防缺乏有效手段。因此,寻求安全、高效的治疗制

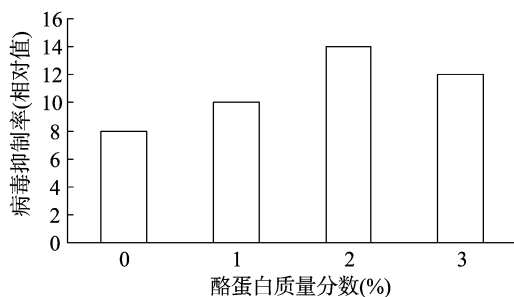


图6 酸水解酪蛋白质量分数对重组酵母表达 ChIFN- α 成熟肽活性的影响

剂和预防制剂迫在眉睫。干扰素是多功能的糖蛋白,与免疫球蛋白不同,它不具有免疫球蛋白的抗体特异性,但其具备广谱的抗病毒活性及强大的免疫调节作用^[8-10],对防治禽病具有重要意义。由于天然的干扰素在机体内表达量甚微,无法满足临床需要,因此人们利用基因工程技术来研究开发高效生产干扰素,用于防治病毒性疾病^[11]。本研究利用毕赤酵母表达体系表达制备了 ChIFN- α ,构建了毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9K- α ,获得了高拷贝重组酵母菌株,对重组酵母菌进行诱导,使重组蛋白获得了较高水平表达,且具有良好的抗病毒活性,解决了原核表达系统抗菌肽生产过程中普遍存在的表达量低、活性低、成本高等问题,为禽病防治奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Isaaca A, Lindenmann J. Virus interference; 1. The interferon [J]. Proc R Soc Lond Ser, 1957, 147: 258-263.
- [2] Lamp S P, Tytell A, Nemes M M, et al. Purification and characterization of chick embryo interferon [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1963, 112: 468-478.
- [3] 朱颖慧, 朱兰才, 刘然义, 等. 干扰素- γ 治疗肿瘤的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2008, 14(1): 4-9.
- [4] 焦道忠, 王云龙, 李晨阳, 等. 鸡 α 干扰素基因的克隆与表达 [J]. 生物学杂志, 2008, 25(5): 48-51.
- [5] 王永娟, 朱善元, 左伟勇, 等. 鸡 α -干扰素成熟肽的原核表达及其多价血清的制备 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 34(1): 32-35, 40.
- [6] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学技术出版社, 1997: 704-735.
- [7] 侯庆华. 养禽业的现状及发展趋势 [J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2013, 33(3): 22-23.
- [8] 霍海龙, 赵跃, 王锐, 等. 猪白介素 6 和 α 干扰素基因的融合及其原核表达 [J]. 江苏农业学报, 2013, 29(2): 329-334.
- [9] 吴静, 李玉峰, 宋敏训, 等. 鸡 α -干扰素在毕赤酵母中的分泌表达、纯化及其抗病毒活性测定 [J]. 山东农业科学, 2006(1): 61-64.
- [10] 韦琴, 吴士筠, 梅辉, 等. 鸡 α 干扰素在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达及抗病毒功能初探 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 49-51.
- [11] 姚清侠, 钱平, 曹毅, 等. 猪 α -干扰素在毕赤酵母中的分泌表达及其生物活性测定 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(12): 1456-1460.