

猪白细胞介素-6 在巴斯德毕氏酵母(*Pichia pastoris*)中的分泌表达

严 琳¹ 顾 贫¹ 陈焕春^{1,2*}

(¹华中农业大学动物医学院 ²农业微生物国家重点实验室动物传染病分室 武汉 430070)

摘 要 : 白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 是一种具有多种生物学效应的细胞因子, 在疾病诊断与疫苗佐剂领域有广阔的应用前景。在本试验中, 猪白细胞介素-6 (pIL-6) 的 cDNA 序列被克隆入甲醇酵母(*Pichia pastoris*)分泌表达载体 pPIC9K 中, 并转化入 *P. pastoris* GS115 菌株。其重组菌株 GS115/pPIC9K-IL6 经 1% 甲醇诱导后, 能分泌表达分子量约为 24.5KD 的重组蛋白, Western blot 确证为 pIL-6。该酵母表达产物无 N 端糖基化修饰。用依赖 IL6 生长的 B9 细胞株检测提纯后的 pIL-6, 其生物学活性可达 8×10^4 IU/mg。

关键词 猪白细胞介素 6, *Pichia pastoris*, 酵母表达, 生物学活性

中图分类号 : Q78 **文献标识码** : A **文章编号** : 0001-6209 (2005) 03-0387-05

相关 IL-6 的研究, 最早可追溯到 1980 年 Weissenbach J 等人^[1]对两种干扰素分子的克隆报道, 当时他们将其称为干扰素 β_2 (Interferon β_2 , IFN β_2)。在随后的研究中, 人们发现后来克隆到的一些生长因子, 诸如 B 细胞刺激因子 2, 浆细胞瘤生长因子, 肝细胞刺激因子, 细胞毒 T 细胞分化因子等, 包括最初报道的干扰素 β_2 , 实为分子量约在 21 ~ 30kD 的同一种蛋白, 后来统一命名为白细胞介素 6^[2]。由此可见, IL-6 是一种具有多种生物学效应的细胞因子, 在调节免疫应答, 调节造血系统, 诱导急性蛋白, 调节肿瘤生长, 调节神经内分泌系统等方面均起了重要的作用^[3]。其中在调节免疫应答方面, IL-6 作为 B 细胞刺激因子, 能促进 B 细胞增殖分化, 并诱导活化后期的 B 细胞大量合成分泌型 Ig 的 mRNA, 从而增加 Ig (IgM、IgG 和 IgA) 的分泌^[4~6]。同时, IL-6 也能诱导 T 细胞活化增殖, 在抗原或丝裂原的刺激 T 细胞时, 提供 T 细胞增殖的第二信号, 能促进胸腺细胞及亚剂量 PH 刺激的外周血 T 细胞增生; 促进 T 细胞产生 IL-2 及表达 IL-2R^[7~9]。可见, IL-6 参与了整个免疫体系的反应, 包括体液免疫与细胞免疫。另外, 体内 IL-6 水平异常与许多疾病相关, 是动物机体一个主要的全身性报警信号^[10]。因此, IL-6 作为一种多效性细胞因子, 在疾病诊治与疫苗佐剂领域有广阔的应用前景, 近年来愈来愈受到科学界的重视。

20 世纪 90 年代以来, 巴斯德毕氏酵母(*Pichia pastoris*)表达系统作为生产外源蛋白的一种重要的宿主系统已经得到了广泛地应用。酵母作为单细胞生物, 保留了细菌表达体系的易操作与生长快的优点, 同时又具有真核表达体系的蛋白加工修饰功能。而以 *P. pastoris* 为代表的甲醇酵母更以其稳定性及高表达量获得众多科学工作者的亲昵^[11]。目前已报道有许多细胞因子在 *P. pastoris* 中获得了高效表达^[12~15]。在本试验中, 我们成功构建了 *P. pastoris* 表达载体 pPIC9K-IL6 并在酵母菌 GS115 中获得了分泌表达的 pIL-6, 同时对表达产物进行了生物活性分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 : SK⁺-IL6 质粒含有去除信号肽片断, 大小约 550bp 的成熟 pIL6 序列, 由本室构建。酵母表达载体 pPIC9K 及 *P. pastoris* 酵母 GS115 菌株为 Invitrogen 公司产品, B9 细胞购自中国第四军医大免疫学教研室。

1.1.2 生化试剂 : 各种限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶、PCR 试剂、DNA Marker 均为 TaKaRa 产品; 酵母培养基成分 YNB, CAA 为 Pifco 公司产品; 蛋白去 N 端糖基化试剂 PNGase F 和 Denaturing buffer 为 Bio-labs 公司产品; HRP 抗兔二抗为华美公司产品; 标准 rhIL-6 为 PeproTech 公司产品, 购至晶美生物工程有

基金项目 国际科学基金-瑞典(IFS)资助(B3528-1)

* 通讯作者。Tel 86-27-87282608; Fax 86-27-87281795; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

作者简介 严 琳 (1980-) 女, 浙江东阳人, 博士研究生, 研究方向为分子病毒学。E-mail: yanlinalin@yahoo.com.cn

收稿日期 2004-09-14, 修回日期 2004-12-20

限公司;MTS 反应试剂盒为 Promega 公司产品;RPMI-1640 胎牛血清购至 GIBCO 公司;兔抗猪 IL6 多抗由本室制备。

1.1.3 培养基 细菌用 LB 培养基,每升含 10g 胰蛋白胨,5g 酵母浸出粉,5g NaCl。酵母用 MD 固体培养基:每升含 13.4g YNB,0.4 mg 生物素,20g 葡萄糖,15g 琼脂粉;YPD 培养基:每升含 20g 蛋白胨,10g 酵母浸出粉,20g D-葡萄糖;BMGY 培养基:每升含 20g 蛋白胨,10g 酵母浸出粉,0.1mol 磷酸缓冲液(pH6.0),13.4g YNB,0.4 mg 生物素,10mL 甘油;BMMY 培养基:每升含 20g 蛋白胨,10g 酵母浸出粉,0.1mol 磷酸缓冲液(pH6.0),13.4g YNB,0.4 mg 生物素,5mL 甲醇,10g CAA。

1.2 重组质粒 pPIC9K-IL6 的构建

SK⁺-IL6 用 *Eco*R I 与 *Not* I 双酶消化,将 IL6 片断连入进行相同酶切的 pPIC9K 中。转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞,挑取单菌落,小量制备重组质粒 pPIC9K-IL6 酶切鉴定。

1.3 重组质粒 pPIC9K-IL6 的转化

1.3.1 pPIC9K-IL6 的转化 取 5 ~ 10 ng 提纯的 pPIC9K-IL6 用 *Sal* I 酶切线性化,电泳回收后置于 -20℃ 备用。依照 Invitrogen 公司提供的方法,用 0.1mol/L 的 LiCl 致敏 *P. pastoris* GS115 菌株。致敏的 *P. pastoris* GS115 菌株与线性化的 pPIC9K-IL6 混和在 50% PEG 与 2mg/ml SS DNA 的辅助下,通过 42℃ 热激转化,最后涂布于 His⁻ 的 MD 平皿上,置 28℃ 温箱培养 4 d。(具体方法参照 Invitrogen 公司提供的说明书)。

1.3.2 酵母重组基因组的提取 4d 后挑取 His⁺ 克隆子,在 YPD 培养基中培养至对数生长期。依刘秋云等^[16]报道的方法提取重组酵母菌 GS115/9K-IL6 基因组。主要步骤为:取 1.5mL 培养液,离心后用 100 μ L TE 重悬。加 200 μ L 含 2% Triton X-100 与 1% SDS 的裂解液,200 μ L 苯酚/氯仿/异戊醇,300mg 石英砂混合后,振荡 2min。离心后取上清用乙醇沉淀,TE 溶解后即可作为模板使用。

1.3.3 酵母阳性克隆子的 PCR 鉴定 以提纯的重组酵母菌 GS115/9K-IL6 DNA 作为模板,以 5'端 α -factor primer 5'-TACTATTGCCAGCATGTGCTGC-3' 与 3'端 IL6 序列 primer: 5'-TTTCTCGAGTGCCCAGCTAC-3' 作为引物进行 PCR 鉴定,拟扩增一段约 600bp 的片段。挑取一个空白表达载体 pPIC-9K 转化的重组菌 GS115/9K 作为对照,进行相同处理。PCR 反应体系(50 μ L): 5.0 μ L 缓冲液(10 倍储存液) 5.0 μ L MgCl₂

(25mmol/L), 0.5 μ L 5'端 α -factor primer(50mmol/L), 0.5 μ L 3'端 IL6 序列 primer(50mmol/L) 2.0 μ L dNTPs (2mmol/L) 0.5 μ L Taqase 2 μ L 模板 34.5 μ L ddH₂O。PCR 反应条件:95℃ 3min;94℃ 1min,55℃ 1min,72℃ 35 s,进行 30 个循环,72℃ 10min。扩增产物经 0.8% 琼脂凝胶电泳鉴定。

1.4 重组酵母菌的表达和 Western blot 分析

将 PCR 鉴定阳性的酵母菌 GS115/9K-IL6 接种于 BMGY 培养基中,28℃ 摇菌培养至 OD₆₀₀ 为 10,用 BMMY 稀释 10 倍后继续培养,每隔 24h 补加 1% 甲醇用于诱导重组蛋白的表达。4d 后 10000r/min 离心 10min,收集上清,经 12% SDS-PAGE,硝酸银染色检测外源蛋白的表达情况。Western blot 分析采用半干转膜法将 PAGE 中的蛋白转至硝酸纤维素膜上。以兔抗猪 IL-6 多抗作为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗,DAB 作为底物进行显色。

1.5 N 端糖基化分析

将酵母菌 GS115/9K-IL6 的表达上清液在 Denaturing buffer 的作用下 100℃ 变性 10min,再加 PNGase F(N-糖基水解酶)37℃ 放置过夜使其充分反应。将反应前后的样品进行 SDS-PAGE,分析重组蛋白的糖基化修饰情况。

1.6 蛋白浓缩和纯化

挑取重组菌 GS115/9K-IL6,经 BMGY 复苏后,在 100mL BMMY 培养基中诱导培养。经多次试验证实,GS115/9K-IL6 在诱导培养第 8 天为表达量最高。因此,在诱导培养 8d 后离心收集上清,缓慢加入固体 (NH₄)₂SO₄ 至终浓度为 42.5%。4℃ 搅拌 2h,使目的蛋白充分盐析。再 10000r/min 离心 10min,收集盐析出的蛋白质,用 10mL PBS(pH7.2)溶解,装入透析袋,4℃ 搅拌透析 2d。后再用 PEG20000 浓缩经透析而稀释的样品,使其定容至 10mL。浓缩了的蛋白取少量进行 SDS-PAGE 检测,并用 Bradford 方法检测蛋白浓度,剩余样品置 -80℃ 备用。

1.7 生物学活性测定

参照文献[2]的方法,用依赖 IL6 生长的 B9 细胞株检测 pIL6 的生物学活性。依据 Bradford 检测结果,将提纯的蛋白 pIL-6 用含 5% FBS 的 RPMI-1640 稀释 15 倍,以 10 μ g/mL 作为 pIL-6 样品的初始浓度,在 96 孔板中进行 2⁸ 次倍比稀释;标准品 rhIL-6 以 10 IU/mL 为起始浓度,同样进行 2⁸ 次倍比稀释,每个稀释度均设置 3 个重复(100 μ L 每孔)。另外再设 3 孔细胞对照与空白对照。将 B9 细胞用 RPMI-1640 洗涤 2 次,除去培养基中残留的 IL6 成分,再以每孔

100 μ l(500 细胞数)加入试验孔中 ,在 37 $^{\circ}$ C ,CO₂ 培养箱中连续培养 3d。在培养结束前 4h 加入 20 μ lMTS。37 $^{\circ}$ C 闭光作用 4h 后 ,将 96 孔板取出 ,用酶标检测仪在 OD₄₉₂ 处 ,以空白对照孔调零 ,检测各样品孔 OD 值 ,制备出样品曲线和标准曲线。将样品曲线与标准曲线比较 ,确定表达产物的生物活性单位。

2 结果

2.1 pPIC9K-IL6 重组入酵母染色体的 PCR 鉴定

随机挑取在 MD 平皿中转化出的 His⁺ GS115/9K-IL6 与 GS115/9K 酵母单菌落 ,经 YPD 培养至对数生长期 ,提取酵母 DNA 作为模板进行 PCR 检测。从图 1 可见 ,GS115/9K-IL6 DNA 均扩出一条特异性很高的目的片段 ,而 GS115/9K 酵母菌无带。这表明 9K-IL6 已成功整合到 GS115 菌株染色体中。

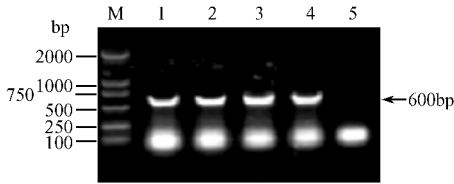


图 1 重组酵母基因组 DNA 的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR products of IL-6 amplified from the yeast genome DNA
1~4 : PCR products amplified from the genome DNA of GS115/9K-IL6 ;
5 : PCR products amplified from the genome DNA of GS115/9K ;M : DNA marker (DL2000) .

2.2 pIL6 的表达和 Western blot 分析

挑取 GS115/9K-IL6 与 GS115/9K 酵母单菌落 ,用 1% 甲醇连续诱导 4d 后取上清进行 SDS-PAGE ,硝酸银染色。结果表明 ,与空白菌比较 ,重组菌诱导表达上清液在分子量约 24.5 kD 处有明显特异性条带出现 ,与预期的 IL6 分子量大小相符(图 2-A)。经 Western blot 分析确证 GS115/9K-IL6 分泌表达了有免疫活性的 pIL α (图 2-B)。

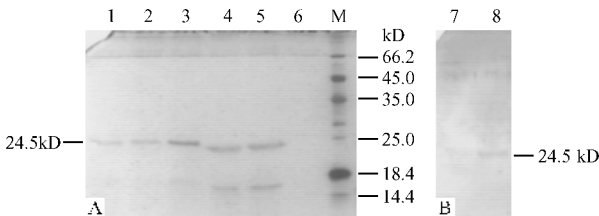


图 2 重组酵母上清的 SDS-PAGE 分析及 western blot 鉴定

Fig.2 SDS-PAGE and western blot analysis of recombinant yeast supernatant
1~5 , 8 : Supernatants of GS115/9K-IL6 induced by 1% methanol ;6 , 7 : Supernatant of GS115/9K induced 4d by 1% methanol ;M : protein molecular weight marker .

2.3 pIL6 的去 N 端糖基化分析

SDS-PAGE 结果表明 ,酵母菌 GS115/9K-IL6 的表 达上清液在用 PNGase F 处理前与处理后其蛋白分子 量没有发生变化 ,表明该酵母表达产物并未进行 N 端糖基化修饰(图略)。

2.4 pIL-6 蛋白的浓缩和纯化

由于 pIL-6 在酵母菌 GS115/9K-IL6 中是分泌表达的 ,酵母上清液中杂蛋白很少 ,这在很大程度上简化了 pIL-6 的纯化步骤。首先用 42.5% 的硫酸铵将酵母上清液中的目的蛋白盐析出来 ,再用 PBS (pH7.2)透析出硫酸铵 ,辅以 PEG20000 进一步浓缩。经 SDS-PAGE 检测证实经过该纯化步骤 ,pIL-6 浓度得到很大提高(图略)。用 Bradford 方法检测浓缩的蛋白浓度 ,可达到 0.15mg/mL。

2.5 表达产物的生物学活性鉴定

提纯的 pIL-6 以 10 μ g/mL 作为初始浓度 ,标准品 rhIL-6 以 10 IU/mL 作为起始浓度 ,在 96 孔板中进行 2⁸ 次倍比稀释。比较样品曲线与标准曲线 ,得出在获得标准品 rhIL-6 最大 OD 值的 50% (OD₄₉₂ = 0.15)时样品 pIL-6 稀释度与标准品 rhIL-6 稀释度相差 2³。因而 ,推算出该纯化后的酵母表达产物 pIL-6 生物活性可达到 8 $\times$ 10⁴ IU/mg(图 3)。

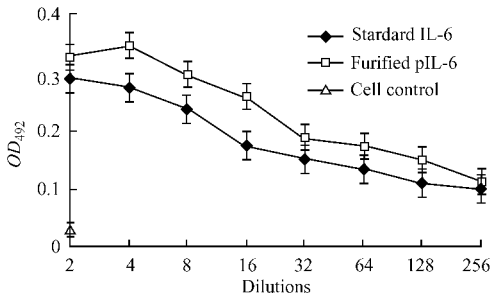


图 3 pIL-6 的生物学活性鉴定

Fig.3 Cell proliferation assay of B9 cell
Standard rhIL6 ($\blacklozenge$) was diluted with preliminary concentration of 10 IU/mL ; purified recombinant protein pIL-6 ($\square$) with preliminary concentration of 10 μ g/mL , cell control ($\triangle$) was cells without IL-6 . According to the standard curve by standard rhIL6 , the specific IL6 activity of the recombinant protein pIL-6 was calculated as 8 $\times$ 10⁴ IU/mg . Each point represents the mean $\pm$ SD of triplicate assay .

3 讨论

P. pastoris 由于兼具原核与真核表达体系的优点 ,是目前研究与应用最为广泛的外源蛋白表达体系之一。自 1987 年由 Gregg 等表达乙肝表面抗原 (HBsAg)以来 ,已有数百种外源蛋白在 *P. pastoris* 中获得表达 ,表达量可达到细胞总蛋白的 5% ~

40%^[17,18]。本实验室也曾用 *P. pastoris* 体系成功表达了猪蓝耳病毒的 gI 蛋白^[19], 伪狂犬病毒的 gG 蛋白^[20], 猪白细胞介素 2^[21] 等。在本实验中, 我们制备了 GS115/9K-IL6 工程菌, 能分泌表达出有生物学活性的 pIL-6。

我们原先构建了酵母表达载体 3.5K-IL6(含 pIL-6 信号肽序列), 尝试利用 pIL-6 自身信号肽序列在 *P. pastoris* 中进行分泌表达, 但结果是诱导后菌株既没分泌表达, 也未在胞内形成重组蛋白。推测其原因, 估计是 pIL6 信号肽序列不易被异源生物识别, 从而影响其在 *P. pastoris* 中的表达。余兴龙等在大肠杆菌中的表达报道中也有相关论述^[22]。而 Farrarese L 等人^[23]也阐述利用酵母蛋白的信号肽引导表达的外源蛋白更稳定。因此, 我们重新构建 pPIC9K-IL6 表达载体, 利用 pPIC-9K 载体的 α -Factor 信号肽序列引导 pIL-6 的分泌表达。在本实验中, 重组菌 GS115/9K-IL6 的诱导上清经 SDS-PAGE 与 Western blot 分析, 证实分子量为 24.5kD 的重组蛋白 pIL-6 确实在 α -Factor 信号肽的引导下被分泌到 *P. pastoris* 胞外。

据报道, 外源蛋白在 *P. pastoris* 表达体系中表达量可达到 mg/L 级, 像 MIC-1, 达到 1 ~ 2mg/L^[12]; rhIFN α -1, 达到 3.5mg/L^[24]; SIL-6R, 为 1 ~ 5mg/L^[25]。在本研究中, 我们用 42.5% 硫酸铵盐析-PBS 透析-PEG20000 浓缩等初提方法, 将 GS115/9K-IL6 重组菌诱导上清液浓缩 10 倍后, 用 Bradford 方法检测得浓度为 150mg/L。由此估算该 GS115/9K-IL6 重组菌的外源蛋白 pIL-6 的表达量约为 15mg/L, 产量相对较高。而熊志洪在人 IL-6 的 *P. pastoris* 表达研究中, 报道表达量可高达 0.4g/L^[26]。如用发酵罐进行大量、高密度培养, 外源蛋白在 *P. pastoris* 表达体系中的表达产量可 g/L 级, 像破伤风毒素在发酵罐培养下产量占总蛋白 27%, 浓度高达 12g/L^[27]; rTNF 占总蛋白 30%, 浓度高达 10g/L^[15]。如今后为生产用, 改用发酵罐进行 GS115/9K-IL6 工程菌大量诱导表达, 估计表达量会有所上升。

我们构建 GS115/9K-IL6 工程菌, 旨在获得重组蛋白 pIL-6 能作为兽用疫苗佐剂使用, 因此, 该表达产物是否具有生物学活性是至关重要的。本实验中, 我们用 IL-6 依赖的 B9 细胞增殖试验来检测酵母表达产物的生物学活性。根据已知的商品化 rhIL-6 的活性单位, 我们换算出该 GS115/9K-IL6 工程菌表达的 pIL-6 生物学活性可达到 8×10^4 IU/mg。下一步我们将直接将表达产物作为疫苗佐剂进行动

物试验, 检测重组蛋白 pIL-6 在体内活性的发挥情况。

本报道首次阐述了猪白细胞介素-6 在酵母表达体系中的表达, 为进一步大规模生产猪白细胞介素 6 蛋白提供了理论依据, 为重组猪白细胞介素-6 作为兽用疫苗佐剂研究打下基础。

参 考 文 献

- [1] Weissenbach J, Chemajovsky Y, Zeevi M, et al. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia cell cloning studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**: 7152 - 7156.
- [2] Richard J S, Annet H, David K S, et al. Interleukin - 6: structure-function relationships. *Protein Sci*, 1997, **6**: 929 - 955.
- [3] 孙为民, 王惠琴. 细胞因子研究方法论. 北京: 人民出版社, 1999, 443 - 458.
- [4] Monica C R, Erik L M, Steven M, et al. Interleukin-6 enhances production of anti-ospC immunoglobulin g2b borreliacidal antibody. *Infect Immun*, 2001, **69**: 4268 - 4275.
- [5] Lue C, Kiyono H, McGhee J R, et al. Recombinant human interleukin 6 (rhIL-6) promotes the terminal differentiation of in vivo-activated human B cells into antibody-secreting cells. *Cell Immunol*, 1991, **132**(2): 423 - 432.
- [6] Ramsay A J, Husdand A J, Ramshaw I A, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science*, 1994, **264**: 561 - 563.
- [7] Camille A, Flamme L, Pearce E J. The absence of IL-6 does not affect TH2 cell development in vivo, but does lead to impaired proliferation, IL-2 receptor expression, and B cell responses. *J Immunol*, 1999, **162**: 5829 - 5837.
- [8] Joseph S B, Miner K T, Croft M. Augmentation of naive, Th1 and Th2 effector CD4 responses by IL-6, IL-1, and TNF. *Eur J Immunol*, 1998, **28**(1): 277 - 289.
- [9] Noma T, Mizuta T, Rosen A, et al. Enhancement of interleukin-2 receptor expression on T cells by multiple B-lymotropic lymphokines. *Immunol Lett*, 1987, **15**(3): 249 - 253.
- [10] Wolvekamp M C, Marquet R L. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett*, 1990, **24**: 1 - 9.
- [11] 陈琳, 张亚东. 嗜甲醇酵母表达系统研究进展. 国外医学: 分子生物学分册, 2002, **24**(1): 11 - 14.
- [12] Fairlie W D, Zhang H, Brown P K, et al. Expression of a TGF-beta superfamily protein, macrophage inhibitory cytokines-1, in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 2000, **254**(1-2): 67 - 76.
- [13] Murphy K P Jr, Gagne P, Pazmany C, et al. Expression of human interleukin-17 in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Pro Exp Puri*, 1998, **12**(2): 208 - 214.
- [14] Clare J J, Romanos M A, Rayment F B, et al. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 1991, **105**(2): 205 - 212.

- [15] Sreekrishna K , Nelles L , Potenz R , *et al.* High-level expression , purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *Biochemistry* , 1989 , **28** (9) : 4117 - 4125 .
- [16] 刘秋云 , 罗 樨 , 何康泽 , 等 . 快速制备酵母质粒和基因组 DNA PCR 模板 . 微生物学通报 , 2001 , **28** (5) : 77 - 79 .
- [17] Cregg J M , Cereginio J L , Shi J , *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia Pastoris* . *Mole Biotech* , 2000 , **16** : 23 - 52 .
- [18] 隋少飞 , 陈松林 . 巴氏毕赤酵母表达系统的特点及其研究进展 . 生物技术通报 2004 **3** : 1 - 4 .
- [19] Qian P , Li X , Tong G W , *et al.* High-level expression of the ORF6 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in *Pichia Pastoris* . *Virus Genes* , 2003 , 2789 - 196 .
- [20] 覃雅丽 , 陈焕春 , 唐 勇 , 等 . 伪狂犬病毒 E_a 株 gE 基因主要抗原区在巴斯德毕赤酵母中的表达 . 微生物学报 , 2002 , **42** (5) : 543 - 549 .
- [21] 严 琳 , 陈焕春 , 覃雅丽 , 等 . 猪白细胞介素-2 在甲醇酵母 (*Pichia pastoris*) 中的表达 . 畜牧兽医学报 2004 **35** (2) : 208 - 212 .
- [22] 余兴龙 , 涂长春 , 徐兴然 , 等 . 猪 IL-6cDNA 的克隆及在大肠杆菌中的高效表达 . 中国兽医学报 2003 **23** (4) : 313 - 315 .
- [23] Farrarese L , Trainotti L , Gattolin S , *et al.* Secretion , purification and activity of two recombinant pepper endo-β-1 , 4-glucanases expressed in the yeast *Pichia pastoris* . *FEBS Lett* , 1998 , **422** (1) : 23 - 26 .
- [24] Philip T L , Tuan V T , Lorelie H V . High-yield expression and purification of human interferon α-1 in *Pichia pastoris* . *Pro Exp Puri* , 2001 , **22** : 381 - 387 .
- [25] Petra V , Malte P , Marc E , *et al.* Yeast expression of the cytokine receptor domain of the soluble interleukin-6 receptor . *J Immunol Methods* , 1996 , **199** : 47 - 54 .
- [26] 熊志红 逮好英 王嘉玺 . 人白介素 6 基因在酵母中的高效分泌表达 . 军事医学科学院院刊 , 1997 , **21** (4) : 314 - 315 .
- [27] Clare J J , Rayment F B , Ballantine S P , *et al.* High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing tandem integrations of the gene . *Bio/technology* , 1991 , **9** : 455 - 460 .

Expression of porcine interleukin-6 in *Pichia pastoris*

YAN Lin¹ GU Ping¹ CHEN Huan-chun^{1 2*}

(¹ Laboratory of Animal Virology , College of Veterinary Medicine , Huazhong Agriculture University , Wuhan 430070 , China)

(² Division of Animal Infectious Disease , State Key Laboratory of Agriculture Microbiology , Huazhong Agriculture University , Wuhan 430070 , China)

Abstract : As a kind of pleiotropic cytokine , Interleukin-6 (IL-6) becomes more and more popular in the fields of disease diagnoses and candidate adjuvants . In this study , the porcine Interleukin-6 (pIL-6) cDNAs un-coding signal peptides was cloned into pPIC9K (the expression vector of *Pichia pastoris*) to construct the pPIC9K-IL6 , which was further transformed into *P. pastoris* GS115 strain . After being induced by 1% methanol , the recombinant strain excreted a protein in supernate of culture , with molecular weight of 24.5KD approximately , which was proved to be pIL6 through SDS-PAGE and western blotting . This *P. pastoris* product wasn't modified by N-hyperglycosylation . After purified , pIL-6 could reach to 8×10^4 IU/mg of bioactivity unit by the cell proliferation of B9 assay . Through researching the characters of the recombinant protein pIL6 , we have made a great progress on the study of rpIL6 as veterinary vaccine 's adjuvant .

Key words : Porcine Interleukin-6 , *Pichia pastoris* , Yeast expression , Bioactivity

Foundation item : The International Foundation for Science from Stockholm , Sweden (B/3528-1)

* Corresponding author . Tel 86-27-87282608 ; Fax 86-27-87281795 ; E-mail : hzauvet@public.wh.hb.cn

Received date : 09-14-2004