

重组酵母鸡 γ 干扰素的抗病毒活性测定及临床初步应用

蔡梅红¹ 张素芳² 曹瑞兵² 郭伟玲³ 陈溥言^{2*}

(¹ 江苏大学生物与环境工程学院 镇江 212013)

(² 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京农业大学动物医学院 南京 210095)

(³ 山东潍坊华辰科技有限公司 潍坊 261061)

摘 要: 为了获得具有天然抗病毒活性的重组酵母鸡 γ 干扰素,以 Con A(刀豆素 A)诱导培养 4~10h 的鸡全血中提取的淋巴细胞总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 的方法扩增出鸡 γ 干扰素成熟蛋白基因。通过 *EcoR* I 和 *Xba* I 两个酶切位点把鸡 γ 干扰素成熟蛋白基因插入到酵母表达载体 pPICZa-A 上,得到了重组酵母鸡 γ 干扰素表达载体 pPICZa-A-CHIFN- γ 经 *Bstx* I 线性化后的重组载体被转入酵母菌株 X33 中,通过 PCR 的方法来筛选重组酵母菌,在甲醇诱导表达后,SDS-PAGE 结果显示有两株重组菌在诱导 72h 后其表达上清中有大小为 16kDa 的目的条带。干扰素生物活性测定经典实验(微量病变抑制实验)和临床初步应用结果皆说明重组酵母鸡 γ 干扰素具有较强的抗病毒的生物活性和较好的临床使用前景。

关键词: 鸡 γ 干扰素;分泌表达;临床应用

中图分类号 S852.4 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2006)01-0115-05

鸡 γ 干扰素又称鸡免疫干扰素,它具有较强的免疫调节作用和广谱抗病毒作用,目前研究已证实其对流感病毒、新城疫病毒^[1],马立克氏病毒^[2~4],鸡劳氏肉瘤病毒^[5]等具有较好的抑制作用,另外它还可增加细胞表面 MHC 类 II 型分子的表达,激活巨噬细胞调节内部 N 化物的产生,如 N_0 的产生可以协助抗病毒、抗菌、抗寄生虫^[6]和抗肿瘤细胞作用的发挥^[7]。

鸡 γ 干扰素开放性阅读框有 495 个碱基,包括一个起始密码子,编码 19 个氨基酸的信号肽和 145 个氨基酸的成熟蛋白,其成熟蛋白大小为 16kDa。鸡 γ 干扰素基因是一种真核基因,酵母表达系统可以对其表达的蛋白质进行类似真核动物细胞中蛋白翻译后的修饰,如蛋白质的糖基化与磷酸化^[8],蛋白质的正确折叠,二硫键的形成等,而蛋白质的糖基化与动物机体的细胞免疫和体液免疫有着很密切的关系^[9]。因此大部分利用毕赤氏酵母表达的重组蛋白具有同天然蛋白质相近的生物学活性。2001 年, Kogut 等^[10]的研究表明大肠杆菌表达的鸡 γ 干扰素重组蛋白可增加异嗜细胞的数量,能增强雏鸡的非特异性免疫力。本实验室也成功地利用大肠杆菌表达出具有高生物活性的鸡 γ 干扰素^[11],但真核基因

在原核表达系统中其产物主要以无生物活性的包涵体形式存在,若要想获得具有生物活性的重组蛋白,必须对包涵体进行变性、复性等繁琐的后续处理工作,而后续处理工作中重组蛋白的损失量大而且对工作人员的技术水平要求也很高,这不利于工业化生产,因此我们重新研究使用毕赤氏酵母表达系统生产鸡 γ 干扰素。研究结果表明:重组毕赤氏酵母鸡 γ 干扰素具有较强的抗病毒活性,临床初步应用也证明,其对大肠杆菌与新城疫混合感染的鸡群有较好的治疗效果。因此我们可以说用毕赤氏酵母表达系统生产鸡 γ 干扰素具有易于工业化生产,生产成本低,生物活性好的优点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: 两周龄雏鸡,由江苏省农科院实验动物中心提供。水疱性口炎病毒(VSV)为南京市军事医学研究所王永山博士惠赠。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 为本实验室保存。毕赤氏巴斯德酵母 *Pichia pastoris* 受体菌 X-33(*His*⁻ *Mut*⁺) 表达载体 pPICZa-A 购于 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 实验所用一切限制性内切

* 通讯作者。Tel 86-25-84396028; Fax 86-25-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

作者简介: 蔡梅红(1973-),女,安徽天长人,助教,硕士,研究方向为动物分子免疫学及分子病毒学。Tel: 86-511-8787335。E-mail: caimeihong@ujjs.edu.cn

收稿日期: 2005-05-27; 接受日期: 2005-07-04; 修回日期: 2005-07-27

酶均购自 TaKaRa 公司 ;M-MLV 反转录酶和 Rnasin 购自冷泉港中国科技公司 ;ConA(伴刀豆素球蛋白) 购自 Sigama 公司 ;Amp 由 Gene 公司生产 ;胶回收试剂盒由上海华舜公司提供 ;SDS-PAGE 低分子量 Marker 购于南京生兴生物公司 ;Zeocin 购于 Invitrogen 公司 ;其它试剂均为进口或国产之分析纯。

1.1.3 引物 根据 GenBank 提供的鸡 γ 干扰素基因序列 ,在其编码成熟蛋白基因的两侧设计了一对引物 由 TaKaRa 公司合成。两端分别设计了 *EcoR* I 和 *Pst* I 两个酶切位点。引物 1 5'-CCGGAATTCATGCACTACTGCAATTACTCTCA -3' ;引物 2 :5'-TAACTGCAGGAGCACAGGCGGTCATAA -3'。

1.2 鸡外周血淋巴细胞的分离及培养

两周龄鸡 ,翅静脉无菌采血 3mL(适量肝素抗凝)。将采得的抗凝血在无菌状态下缓慢加入 2 倍 Ficoll 淋巴细胞分离液上层 ,2000r/min \times 10min ,取云雾状的单核细胞层。用含 15% 小牛血清的 RPMI1640 营养液稀释成 0.5×10^6 个/mL 的细胞悬浮液 ,每孔 2mL ,然后加入 Con A ,使其每孔终浓度为 $15 \sim 20 \mu\text{g/mL}$,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养 4 ~ 10h。

1.3 目的基因的扩增及序列的测定

以 ConA 刺激的不同时段的细胞提出的总 RNA 为模板 ,进行 RT-PCR。RT 反应条件 :65 $^{\circ}\text{C}$ 15min ,42 $^{\circ}\text{C}$ 60min ;PCR 反应条件 :94 $^{\circ}\text{C}$ 1min ,50 $^{\circ}\text{C}$ 1min ,72 $^{\circ}\text{C}$ 1min 35 个循环 ,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。扩增出目的片段 ,并将其与 pMD₁₈-T 载体相连接 ,送至大连 TaKaRa 公司测定序列组成并 GenBank 上的序列相比较以确定序列的正确性。

1.4 酵母表达载体的构建与鉴定

利用已构建好的 pMD₁₈-T-chIFN γ 的 *EcoR* I 和 *Xba* I 两个酶切位点 ,把鸡 γ 干扰素基因经酶切后与已经同样两种限制性内切酶酶切的 pPICZa-A 酵母载体相连 ,再经 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切 ,如能切下大小为 490bp 的条带则可以鉴定为阳性重组表达载体。

1.5 重组鸡 γ 干扰素基因酵母菌株的鉴定

把阳性酵母表达载体用 *Bst*X I 线性化处理后电转化酵母菌(X33)并筛选整合上鸡 γ 干扰素基因的酵母菌株。根据酵母表达载体 pPICZa-A 上的一部分基因序列分别在目的基因插入的两端设计一对引物 ,上游引物 5'-GACTGGTTCCAATTGAGAAGC-3' ;下游引物 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'。

未重组任何目的基因的 pPICZa-A 酵母的染色体通过上一对引物可扩增出大小为 580bp 左右的

片段 ,如果是阳性重组酵母表达菌株通过上一对引物扩增的片段应包含鸡 γ 干扰素成熟蛋白基因(约 490bp) ,那么总长度应为 1080bp 左右。

1.6 高拷贝重组酵母菌株的筛选

将 YPDS 培养基平皿中长大的最初转化子 ,影印法依次接种到含 Zeocin 抗生素浓度梯度为 250 $\mu\text{g/mL}$,500 $\mu\text{g/mL}$,1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 YPDS 培养基中 ,逐级筛选 Zeocin 抗性菌株即含目的基因的高拷贝菌株。

1.7 重组酵母菌株的诱导表达

挑取 500 $\mu\text{g/mL}$,1000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 Zeocin 下筛选出的两株菌株转接至 25mL 的 BMGY 中 ,经 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养至 OD_{600} 为 4 左右时 ,室温 1500 \times g 离心 5min 收获细胞 ,将收获的细胞用 100mL 的 BMMY 培养液悬浮再转接至容量为 1000mL 的三角瓶中 28 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 ,每 24h 向培养基中补加 0.5% 的甲醇 ,以保持诱导的持续表达。同时在以下不同时段取诱导上清作电泳鉴定 24h ,48h ,72h ,96h。

1.8 重组酵母鸡 γ 干扰素生物活性的测定

采用细胞病变抑制法^[12]进行测定 :取孵化了 9 ~ 10d 的 SPF 鸡胚 ,去头、四肢及内脏 ,无菌状态下用 PBS 洗 3 遍 ,剪碎。吹打成单个细胞后上 96 孔板 ,生长约 12h 使细胞全部贴壁生长至单层后 ,去除生长液 ,每孔加入 4 倍倍比稀释的干扰素(用无血清营养液稀释)共 100 μL ,每个稀释度设六孔平行样 ,孵育 12h 后用 100TCID₅₀ 的剂量的口泡炎病毒(VSV)进行攻毒 ,同时设立阳性对照孔(不加干扰素 ,只加病毒) ,阴性对照孔(只加干扰素 ,不加病毒) ,空白对照孔(不加干扰素 ,不加病毒) ,大约 12 ~ 24h 后在倒置显微镜下观察结果 ,在阳性对照孔出现 75% 以上病变的时候 ,判断结果。以能抑制 50% 细胞病变的样品的干扰素稀释度定义为一个单位干扰素^[13]

1.9 临床初步应用

在实验室生产一批约 25mL 的重组酵母鸡 γ 干扰素备用 ,在山东潍坊华辰公司的实验动物场 ,把一批已确诊为大肠杆菌与鸡新城疫混合感染的鸡群(80 只)随机分成四组 ,每组 20 只 :对照组 :鸡群不给干扰素治疗 ;实验 1 组 :鸡群通过滴鼻、滴眼方式给干扰素 500U/次(50 μL 重组干扰素) ;实验 2 组 :鸡群通过注射方式给干扰素 500U/次(50 μL 重组干扰素用 PBS 稀释至 1mL 后使用) ;实验 3 组 :鸡群通过强迫饮水方式给干扰素 500U/次(50 μL 重组干扰素) ;实验组每天给予干扰素一次 ,一周之内每天观察鸡群的病况 ,并记录。

2 结果

2.1 鸡 γ 干扰素基因的扩增及序列的测定

以 ConA 刺激 4~10h 的鸡全血淋巴细胞中提取的总 RNA 为模板,通过逆转录-聚合链式反应(RT-PCR)技术,扩增出一条大小为约为 500bp 的特异性目的条带。将目的片段连到 pMD18-T 载体上,把 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定为阳性的菌进行测序,结果与 GenBank 上提供的基因序列的同源性为 100%。

2.2 重组鸡 γ 干扰素基因酵母表达载体的鉴定

用酶切的方法从重组鸡 γ 干扰素基因测序质粒上获得鸡 γ 干扰素成熟蛋白基因,构建重组鸡 γ 干扰素基因酵母表达载体 pPICZa-A-CH γ 经 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切可见到大小为 493bp 的目的条带。

2.3 重组鸡 γ 干扰素基因酵母菌株的鉴定

通过设计好的一对引物做 PCR 鉴定,发现以正确重组鸡 γ 干扰素基因的酵母菌株的染色体为模板的扩增出现了大小约为 1000bp 的条带。而未整合上鸡 γ 干扰素基因酵母菌株(X-33)只扩增出一条大小约为 500bp 的条带。

2.4 重组酵母菌株的诱导表达

把含不同浓度(500 μ g/mL, 1000 μ g/mL)的 Zeocin 筛选的抗性菌株进行诱导表达,通过在不同时段取

其发酵上清浓缩 10 倍以后进行电泳分析,发现在以 500 μ g/mL 的 Zeocin 筛选出的 2 株重组酵母菌株在诱导 72h 时的发酵上清的电泳分析图上有一条大小约为 16kDa 的蛋白印迹(图 1)。

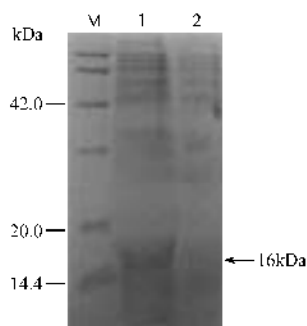


图 1 重组酵母诱导上清浓缩后的电泳

Fig.1 SDS-PAGE of the induced condensed supernatant of the recombinant yeast

M. Protein marker; 1. Condensed supernatant of the recombinant yeast expressed highly; 2. Supernatant of the unrecombinant yeast.

2.5 重组酵母鸡 γ 干扰素生物活性的测定

把酵母表达的含有鸡 γ 干扰素的诱导上清经透析后微孔过滤后备用,采用病毒抑制法测定其抗病毒活性。实验结果表明,加入 VSV 病毒(100 TCID₅₀) 24h 后可见 6 排孔中,加入低于或等于 4⁵ 稀释的干扰素的细胞孔细胞状态良好,拍摄了 4⁵ 稀释的重组酵母鸡 γ 干扰素的细胞状态见图 2-A,而加入 4⁶ 稀

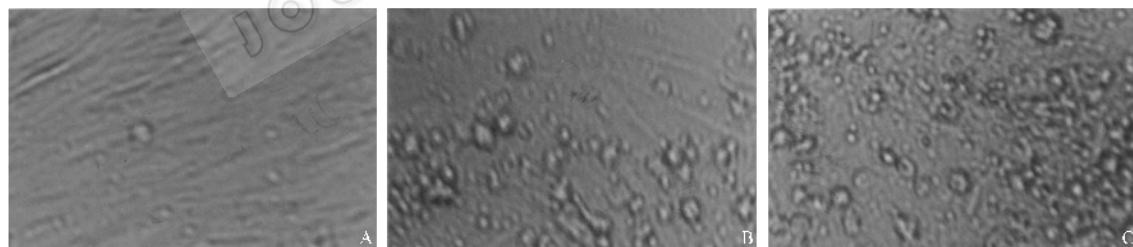


图 2 重组酵母鸡 γ 干扰素处理后攻毒的鸡的成纤维细胞

Fig.2 CEF dissolved the recombinant chicken γ interferon

A: Cell dissolved by 4⁵ diluted recombinant chicken γ interferon; B: 70% CPU in the Cell dissolved by 4⁶ diluted recombinant chicken gamma interferon. C: Cell dissolved by 4⁷ diluted recombinant chicken γ interferon.

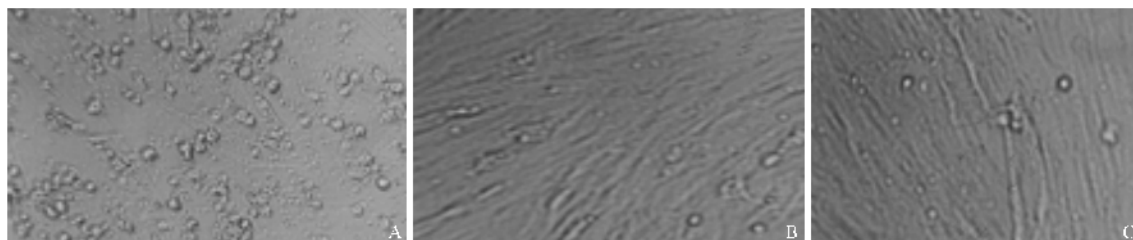


图 3 重组酵母鸡 γ 干扰素抗病毒活性测定实验对照孔的情况

Fig.3 The control of detection for the antiviral activity of the chicken γ interferon in yeast *Pichia pastoris*

A: The positive control; B: The native control; C: The blank control.

释的重组酵母鸡 γ 干扰素孔中:第 1、2、4、6 排中的孔中约有 70%(图 2-B),在第 3、5 排的 4^6 稀释的重组酵母鸡 γ 干扰素孔中细胞出现 90% 以上的病变,加入 4^7 稀释的重组酵母鸡 γ 干扰素孔中 6 排全部出现 100% 病变(图 2-C)阳性对照孔完全出现 100% 的 VSV 病变(图 3-A),阴性对照孔中,细胞生长良好(图 3-B),空白对照孔,细胞生长良好(图 3-C)本批重组酵母鸡 γ 干扰素的活性大小为 10×4^5 U/mL。

2.6 临床应用结果

临床运用发现,两天后对照组鸡只精神萎靡,并陆续有鸡只死亡,到实验第 7 天共有 8 只鸡死亡,而实验 1、2、3 组在给鸡 γ 干扰素一天时维持精神萎靡的状态,但没有死亡鸡只,两天后精神有所好转,在干扰素治疗 3 天后发现注射给药组的鸡只采食量显著增加。到第 5 天,发现实验 1 组和实验 3 组的鸡只精神恢复正常,但采食量未恢复正常,而实验 2 组(鸡 γ 干扰素注射治疗组)鸡只采食、饮水、精神均恢复正常,同时发现体重有轻微增加。结果表明重组酵母鸡 γ 干扰素在使用 500U/次治疗时,可以用作临床治疗剂量,同时发现以注射给干扰素的方法效果最快,最明显。

3 讨论

近年来的研究表明,酵母真核表达系统所表达的外源蛋白比原核系统表达的外源蛋白具有许多的优点,具有与天然蛋白相似的空间结构,具有与天然蛋白相近的生物活性,而且很多研究表明其表达外源蛋白的产量一般都比较(表达上清直接电泳即能看到清晰,较粗的蛋白条带)。本研究的结果表明用酵母表达系统来获得鸡 γ 干扰素,产量虽不是太高,以蛋白质 Marker(50ng)为对照,按测活性时加入的样品体积以及电泳分析所用的样品体积折算出重组酵母鸡 γ 干扰素的产量为 $1 \mu\text{g/mL}$,但是病毒病变抑制实验表明其具有较高抗病毒生物活性,且重组酵母鸡 γ 干扰素的临床初步应用结果也显示疗效显著。这可能是由于酵母表达系统对外源蛋白进行磷酸化和糖基化等修饰后,使重组酵母鸡 γ 干扰素具有与天然干扰素相似的空间结构,从而能使之发挥较高生物活性的原因。

本研究中发现在用不同浓度的 Zeocin 来筛选高拷贝鸡 γ 干扰素基因的实验中,并不能确定对 Zeocin 抗性越强的酵母菌株其表达鸡 γ 干扰素的蛋白量就越高。在 Zeocin 浓度为 $1000 \mu\text{g/mL}$ 的培养基平板上,我们也筛选到一株生长良好的酵母菌株,

SDS-PAGE 结果并未发现目的产物的蛋白印迹,这种高拷贝低表达的原因可能在于 mRNA 翻译和蛋白质折叠效率的限制^[14]。

在重组酵母鸡 γ 干扰素的临床应用过程中,我们发现其对大肠杆菌与新城疫混合感染的鸡群有良好的临床治疗效果,这可能是一方面鸡 γ 干扰素直接抑制了 NDV 的繁殖,从另一方面来说虽然 γ 干扰素对大肠杆菌没有直接的杀伤、杀灭作用,但重组鸡 γ 干扰素应用于鸡群后可能提高了鸡只的整体免疫能力,达到了治疗 NDV 和大肠杆菌混合感染鸡群的效果,因此我们可以说重组酵母鸡 γ 干扰素较好的临床使用效果的取得是一个综合治疗的结果。

近年来无论是在人医还是兽医的病毒性疾病的防治上,由于病毒的抗原漂移以及环境等其他因素影响,导致疫苗对某些病毒性疾病的防治力不从心,因而鸡病毒性疾病的防控始终是个比较棘手的问题。而现代医学已证明 γ 干扰素具有广谱抗病毒和增强免疫功能的作用,它已成功地被用于医学临床,治疗或辅助治疗各种病毒性疾病。那么,在动物医学领域,重组酵母鸡 γ 干扰素在实验室研究阶段获得了成功,必将给我国养鸡业病毒性疾病的防治带来福音。

参 考 文 献

- [1] Yeh HY, Winslow BJ, Junker DE, et al. *In vitro* effects of recombinant chicken interferon gamma on immune cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 1999, **19**(6): 687-691.
- [2] Volpini LM, Caalnek BW, Sekelick M, et al. Stage of Marek's Disease Virus latency defined by variable sensitivity to interferon modulation of viral antigen expression. *Veterinary Microbiology*, 1995, **47**(1-2): 99-109.
- [3] Volpini LM, Caalnek BW, Sneath B. Interferon modulation of Marek's disease virus genome expression in chicken cell lines. *Avian Disease*, 1996, **40**(1): 78-87.
- [4] Xing Z, Schat KA. Inhibitory effects of Nitric Oxide and gamma interferon on in vitro and vivo replication of Marek's disease virus. *Virology*, 2000, **74**(8): 3605-3612.
- [5] Plachy J, Weining KC, Kremmer E, et al. Protective effects of type I and type II Interferon toward Rous Sarcoma virus-induced tumors in chickens. *Virology*, 1999, **256**(1): 85-91.
- [6] Lowenthal JW, Lambrecht B. Avian cytokines-the Nat-approach to therapeutics. *Dev Comp Immunol*, 2000, **24**(2-3): 355-365.
- [7] Lambrecht B, Gonze M, Morales D, et al. Comparison of biological activity of natural and recombinant chicken interferon-gamma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999, **70**: 257-267.
- [8] 齐连权, 陈薇, 宋大志, 等. 毕赤氏酵母表达系统研究进展. *中国生物工程杂志*, 2002, **22**(6): 44-47.
- [9] 章晓连. 蛋白糖基化与免疫. *中国免疫学杂志*, 2004, **20**: 290-293.

- [10] Kogut MH, Pishko EJ, Kaspers B, *et al.* Modulation of functional activities of chicken heterophils by recombinant chicken IFN- γ . *Interferon Cytokine Res*, 2001 **21**(3) 85 – 92.
- [11] 蔡梅红, 曹瑞兵, 周 斌, 等. 鸡 γ 干扰素成熟蛋白基因的克隆、表达及其纯化产物抗病毒活性测定. *中国病毒学* 2004, **19** (1) 32 – 35.
- [12] 侯云德. 分子病毒学. 北京: 学苑出版社, 1990, 598 ~ 642.
- [13] 瞿成奎, 魏汉东, 鱼咏涛, 等. 中国人 γ 干扰素 cDNA 在大肠杆菌中的高效表达. *生物化学与生物物理进展*, 1995, **22**(5) 433 – 436.
- [14] 李洪钊, 李亮助, 孙强明, 等. 巴斯德毕赤氏酵母表达系统优化策略. *微生物学报* 2003, **43**(2) 288 – 292.

Detection for the antiviral activity and primary application of the chicken γ interferon in yeast *Pichia pastoris*

CAI Mei-hong¹, ZHANG Su-fang², CAO Rui-bing², GUO Wei-ling³, CHEN Pu-yan^{2*}

(¹ College of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(² Key Laboratory of Animal Diseases Diagnosis & Immunology of China's Department of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(³ Shangdong Huachen Biology CO. LD, Weifang 261061, China)

Abstract: To obtain recombinant chicken interferon γ (ChIFN- γ) with natural antivirus bioactivity in yeast *Pichia pastoris* eukaryotic expression system, the cDNA of chicken interferon γ mature protein was synthesized by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from the total mRNA of the lymphocyte from chicken blood, which stimulated with Con A for 4 ~ 10 hours. The 493 bp nucleotide sequence of chicken interferon γ mature protein was cloned into expression vector pPICZa-A, which had been cleaved between *EcoR* I and *Xba* I. After linearized by *Bst*X I, the recombinant vector was transferred into yeast *Pichia pastoris*, strain X33. The recombinant strain was isolated and identified by polymerase chain reaction. After induced by methanol, the recombinant protein was examined by SDS-PAGE. The result of SDS-PAGE analysis in the concentrated fermentation supernatant showed that the molecular weight of the recombinant protein was approximate 16kDa, two recombinants were conformed to secrete chicken interferon γ (16kDa). The classical experiment of detection for interferon activity (cell pathological Effect Inhibition Assay) and the preliminary result of therapy proved that the recombinant protein is of good antivirus activity. So far chicken interferon γ had been expressed highly in *E. coli*, but it tend to form biologically inactive inclusion bodied combined with difficulties in refolding, so the recombinant chicken γ interferon with natural antivirus bioactivity produced in yeast expression system is the best way, the recombinant interferon γ have great practical value and application foreground.

Keywords: Chicken interferon- γ ; Secreted expression; Primary application

* Corresponding author. Tel: 86-25-84396028; Fax: 86-25-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

First author: Tel: 86-511-8787335; E-mail: caimeihong@uj.s.edu.cn

Received 27 May 2005/Accepted: 4 July 2005/Revised: 27 July 2005