

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(9):1258-1263; 4 September 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

鸡白介素 18 成熟蛋白突变体在毕赤酵母中的高效表达及其生物活性检测

王希辉¹, 岳寿松³, 胡敬东¹, 黄亦钧³, 陈金龙¹, 王婷婷¹, 范忠玲¹, 赵宏坤^{1,2*}

(¹ 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

(² 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东省肉类食品质量控制工程技术研究中心, 青岛 266109)

(³ 山东农业科学院高新技术研究中心, 济南 250000)

摘要:【目的】通过目的基因克隆, 表达获得高产量具有生物活性的鸡白介素 18 成熟蛋白 (mature chicken interleukin-18, mChIL-18)。【方法】根据毕赤酵母密码子偏嗜性, 通过引物设计来定点突变鸡白介素 18 基因, 构建了重组质粒 pPIC9K-mChIL-18。将线性化的重组阳性质粒电转到毕赤酵母 GS115 中, 经筛选多拷贝阳性子后进行诱导表达。用 MTT 法和微量细胞病变抑制法检测其生物活性。【结果】筛选的多拷贝重组菌在诱导温度为 28℃, 培养液 pH 值为 6.5, 甲醇的诱导浓度为 2%, 诱导时间为 120 h 时表达量最高, 约为 480 mg/L。表达的 mChIL-18 蛋白能够刺激 SPF 鸡淋巴细胞大量增殖, 用 400 μg/L 的 mChIL-18 诱导淋巴细胞产生 γ-干扰素 (IFN-γ), 其生物活性最高可达 1.7×10^4 U/mL, 且能有效抑制水泡性口炎病毒 (VSV) 在鸡胚成纤维细胞 (CEF) 上的生长。【结论】毕赤酵母能够高效表达具有生物活性的鸡白介素 18, 有望作为免疫佐剂运用到工业化生产和兽医临床中。

关键词: 鸡白介素 18; 毕赤酵母; 突变体; 生物活性

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1258-06

白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18) 作为一种新型的细胞因子, 因具有抗肿瘤、抗感染及免疫增强等方面的功能而受到各国研究者的高度关注^[1]。自日本学者 Okamura 等从小鼠肝细胞克隆到白介素 18 以来, 国内外对鼠及人等哺乳动物白介素 18 研究的比较深入, 而对鸡白介素 18 的研究相对滞后。从 2002 年开始, 本研究室就克隆了鸡白介素 18 成熟蛋白全长基因, 并建立了原核和真核表达体系^[2-3], 并对其生物活性进行了较深入的探索^[4]。由于原核表达系统不能对鸡白介素 18 进行正确翻译和翻译后加工与修饰, 影响了它的生物活性; 而一些真核系统表达的蛋白虽具有较高的活性, 但因其操作复

杂、生长较慢、表达量低等缺点, 不能使其扩大化生产, 限制了它的应用。本实验使用的毕赤酵母表达系统克服了上述缺点, 并在通过点突变实现大量表达及其生物学活性方面进行相关研究, 为鸡白介素 18 的规模化、工业化生产提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和病毒: 重组质粒 pMD18-T-mChIL-18 含鸡白细胞介素 18 成熟蛋白基因, 由山东农业大学动物科技学院传染病研究室构建保存; 毕赤酵母菌株 GS115 (*Pichia pastoris* GS115) 及表

基金项目: 国家“十一五”食品安全关键技术重大项目 (2006BAK02A21); 国家肉鸡产业技术体系建设项目; 山东省科技支撑计划项目“肉鸡福利型养殖模式的建立与应用” (2007GG20009001)

* 通信作者。Tel: +86-538-8249851-8207; E-mail: hkzhao2009@163.com

作者简介: 王希辉 (1981-), 男, 山东平度人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病诊断与防治方面的研究。E-mail: wangxi_hui@163.com

收稿日期: 2010-02-05; **修回日期:** 2010-04-13

达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司、水泡性口炎病毒 (VSV) 由山东信德药业马凤龙博士馈赠。

1.1.2 主要试剂和仪器: G418 抗生素购自 Invitrogen 公司; *EcoR* I、*Not* I、*Sal* I 等限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自大连宝生物公司; 胰蛋白胨、酵母浸出粉购自 OXOID 公司; 葡萄糖、琼脂、山梨醇、生物素、YNB、MTT、DTT 均购自 Solarbio 公司。His-tag 抗体购自碧云天生物技术研究所; 羊抗小鼠 IgG-HRP 购自武汉博士德生物工程有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海生工公司; 胎牛血清购自美国 MDgenics 公司; 电穿孔仪、凝胶成像分析系统购自美国 BIO-

RAD 公司; 低温离心机、PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司; 酶标仪购自瑞士 TECAN 公司; 倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司; CO₂ 培养箱购自日本 SANYO Electric Biomedical 公司; 核酸及蛋白质电泳仪、蛋白质转印装置购自北京六一仪器厂。

1.1.3 引物: 通用引物 AOX1 及 F1、F2、R1 引物由上海生工公司合成。根据毕赤酵母密码子偏嗜性, 通过设计引物的方法将 mChIL-18 基因的第 10、13 个密码子 CGA 中的 C 突变为 A (下面引物中有字符底纹的为突变碱基), 为了便于纯化和检测, 将下游引物加入 6 个组氨酸基因序列 (划线部分为六个组氨酸碱基)。设计的引物见表 1:

表 1 PCR 扩增所用引物

Table 1 PCR primers used for amplification

Primer	Sequence(5'→3')	Size/bp	Restriction site
F1	ACTATCAAA <u>A</u> GATTCTTT <u>A</u> GAAACGTCAATAGCCAG	36	
F2	CCCGAATTCGCCCTTTTGTAAAGATAAACTATCAAA <u>A</u> GATTCTT	44	<i>EcoR</i> I
R1	ATGCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGTTGTCTTTCAT	48	<i>Not</i> I

The mutational bases are shaded and the polyhistidine tag is underlined.

1.2 鸡白介素 18 突变基因的获得

首先以 pMD18-T-mChIL-18 为模板, 用 F1、R1 引物进行 PCR 扩增。反应条件: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 61℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。然后再以得到的 PCR 产物为模板, 用 F2、R1 引物 PCR 扩增。反应条件: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物跑 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 切下目的条带, 然后用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收。

1.3 酵母表达载体的构建

用 *EcoR* I、*Not* I 两种限制性内切酶分别酶切 PCR 产物和 pPIC9K 载体, 回收酶切产物, 然后用 T4 DNA 连接酶 16℃ 过夜连接, 连接产物转化 DH5α 感受态细胞。挑取阳性菌培养, 提取质粒, 进行 PCR 和酶切鉴定, 同时将阳性菌液送至上海生工公司测序。将最终鉴定正确的重组质粒命名为 pPIC9K-mChIL-18。

1.4 线性化 pPIC9K-mChIL-18 电转化进毕赤酵母菌 GS115

用 *Sal* I 将 pPIC9K-mChIL-18 单酶切, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收。根据 Shixuan Wu 等^[5]的方法制备 GS115 酵母感受态, 按毕赤酵母表达试剂盒说明书将重组载体单酶切产物与酵母感受态混匀, 加入到电转杯中进行电转。电转后将菌液涂布在 MD 平板上, 筛选阳性克隆, 然后挑取单菌落, 依次接种在含 G418 浓度为 4.0、3.0、2.0、1.0 g/L 的

YPD 平板上, 筛选高拷贝的阳性克隆, 以其基因组 DNA 为模板, 分别以 AOX1 通用引物和 F2、R1 引物进行 PCR 扩增, 扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.5 阳性转化子的诱导表达、SDS-PAGE 及 Western blot 分析

挑取具有高拷贝数的 His⁺/Mut⁺ 型的毕赤酵母阳性转化子单菌落, 接种于 10 mL BMGY 液体培养基中, 于 28℃、250 r/min 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 2.0 - 6.0 左右, 离心收集菌体, 转接到装有 20 mL BMMY 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 相同培养条件继续培养, 每 24 h 补加 100% 甲醇于培养基至终浓度为 2%, 诱导表达 7 d。将诱导上清进行 SDS-PAGE。Western blot: 将 SDS-PAGE 中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用 1:2000 的 His-tag 抗体作为一抗, 1:4000 的羊抗小鼠 IgG-HRP 作为二抗, 最后用二氨基联苯胺 (DAB) 显色。

1.6 鸡白介素 18 的生物活性测定

1.6.1 mChIL-18 蛋白促进鸡脾淋巴细胞增殖试验: 首先用 Bradford 法及 Bandsan 软件测定表达上清中 mChIL-18 蛋白含量。按李宏梅等^[4]的方法取 SPF 鸡脾淋巴细胞, 调整细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/mL, 取 100 μL 细胞悬液于 96 孔板内, 设 1000、800、600、400、300、200 和 100 μg/L 不同终浓度 mChIL-18 刺激孔, 及 40 μg/mL ConA 刺激孔, 同时设 Control 孔 (不作任何处理的淋巴细胞孔)、Gp 孔 (GS115/

pPIC9K 诱导上清)、1640 空白孔 (不加淋巴细胞), 每孔分别设 7 个重复, 37°C, 5% CO₂ 培养 56 h。每孔加入 10 μL 的 5 g/L 的 MTT, 继续培养 4 h, 加入 100 μL 裂解液, 37°C 条件下裂解 2 h, 于酶标仪 570 nm 处读取 OD 值。刺激指数 SI (Stimulating Index) 计算方法:

$$SI = \frac{\text{mChIL-18 OD}_{570} \text{ 平均值} - \text{空白孔 OD}_{570} \text{ 平均值}}{\text{细胞对照组 OD}_{570} \text{ 平均值} - \text{空白孔 OD}_{570} \text{ 平均值}}$$

采用 SPSS 17.0 统计软件, 对所测数据进行统计学处理, 应用单因子方差分析方法进行显著性检验。

1.6.2 mChIL-18 蛋白及其诱导产生的 IFN-γ 对 VSV 的抑制活性试验: 按以上方法诱生 IFN-γ, 取 400 μg/L 的 mChIL-18 蛋白诱导的上清检测 IFN-γ 生物学活性。取鸡胚成纤维细胞 (CEF) 分布于 96 孔板内, 每孔内含有 CEF 约为 10⁴ 个/mL, 37°C, 5% CO₂ 孵育 24 h 使细胞单层生长至 70% 密度, 弃去生长液, 用 DMEM 稀释诱导的 IFN-γ 淋巴细胞培养上清, 做连续 10 倍稀释, 即上清中 IFN-γ 稀释度为 1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 和 10⁻¹⁰, 将其分别加入细胞孔中, 每个处理设 7 个重复, 并设加 mChIL-18 对照孔和细胞阴性对照孔 (未经 IFN-γ 或 mChIL-18 处理的细胞孔), 37°C, 5% CO₂ 孵育 24 h。弃去生长液, 然后用 100 个细胞半数感染量 (TCID₅₀) 的 VSV 攻毒 (培养液血清浓度 2%), 观察 24 h, 直到阴性对照孔全部出现典型的细胞病变, 对相应处理孔出现的细胞病变进行判断。将抑制 50% 细胞病变出现孔的干扰素最大稀释度定义为 1 个干扰素活性单位 (U)。

2 结果

2.1 mChIL-18 酵母表达载体的构建与鉴定

将构建的 pPIC9k-mChIL-18 酵母表达质粒进行 PCR 扩增和酶切鉴定, 用 F2、R1 引物扩增出 510 bp 的特异性片段, 用 *Eco*RI、*Not*I 双酶切重组质粒, 出现了 510 bp 和 9.3 kb 两条条带, 与预期结果一致。

2.2 重组酵母菌株 GS115/pPIC9K-mChIL-18 的鉴定

提取重组酵母菌株染色体 DNA, 并以其为模板, 分别以 AOX1 通用引物和 F2、R1 引物进行 PCR 扩增并电泳检测。分别得到 1100 bp、510 bp 的片段, 说明 mChIL-18 基因确实整合到酵母基因组中。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

将 GS115/pPIC9K-mChIL-18 重组酵母菌株表达的上清液进行 SDS-PAGE, 经探索在 2% 甲醇诱导

下, 培养液 pH 值为 6.5, 诱导温度为 28°C, 在 120 h 时表达量最高。其表观分子量约为 22 kDa, 与预期大小一致。在培养的空载体重组菌株 GS115/pPIC9K 上清液中检测不到蛋白。进行 Western blot 实验结果表明, 目的条带与抗 His 单抗发生特异反应, 确证 GS115/pPIC9K-mChIL-18 分泌表达了 mChIL-18 蛋白, 表达量约为 480 mg/L (图 1)。

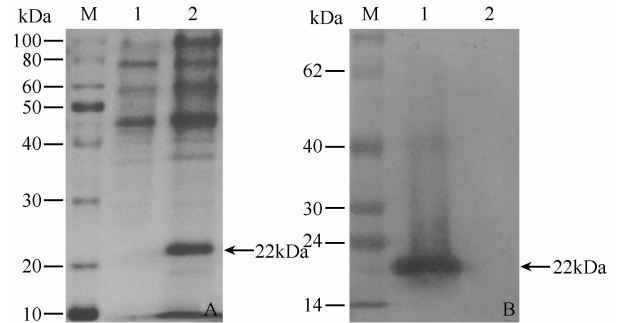


图 1 重组 mChIL-18 蛋白的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 分析

Fig. 1 Analysis of expression products by SDS-PAGE gel electrophoresis (A) and western blot (B). A: M. protein molecular weight marker; 1. GS115/pPIC9k induced supernatant; 2. GS115/pPIC9k-mChIL-18 expression supernatant at 120 hours of inducing time. B: M. Blue Plus II protein marker; 1. GS115/pPIC9k-mChIL-18 expression supernatant; 2. GS115/pPIC9k induced supernatant.

2.4 生物学活性测定

2.4.1 mChIL-18 蛋白促进鸡脾淋巴细胞增殖试验: MTT 法检测 mChIL-18 蛋白促进淋巴细胞增殖的活性, 用 SPSS 统计软件分析结果表明: 不同浓度的 mChIL-18 蛋白均能明显促进淋巴细胞的增殖。随着浓度的增加, 刺激指数 SI 增大。除在小于 200 μg/L 浓度时差异不显著外, 其它浓度的 mChIL-18 蛋白均差异显著 ($P < 0.05$) (图 2)。

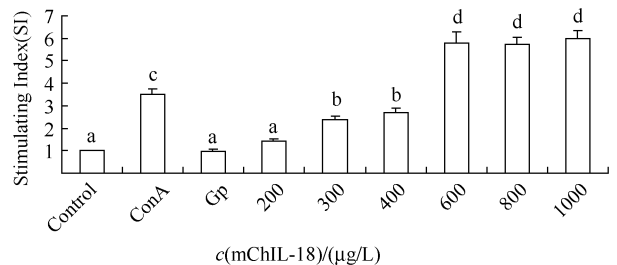


图 2 不同处理对 SPF 鸡脾淋巴细胞增殖转化的结果

Fig. 2 Result of SPF chickens splenocytes proliferation to ConA, Gp, and mChIL-18. Means with the different letter significance at the $P < 0.05$ level (a, b, c, d) or with the same letter significance at the $P > 0.05$ level (a, b, c, d).

2.4.2 mChIL-18 蛋白及其诱导产生的 IFN-γ 对 VSV 的抑制活性试验: 通过 CEF-VSV 检测系统检测

可知: 400 $\mu\text{g/L}$ 浓度的 mChIL-18 蛋白诱导脾淋巴细胞产生的 IFN- γ 具有较强的抗病毒活性, 活性可达 1.7×10^4 U/mL。细胞阴性对照孔 (即单纯病毒感染孔) 出现典型的细胞病变 (CPE), 见图 3。

同时, 单独的 1000、800 $\mu\text{g/L}$ 的 mChIL-18 蛋白对 100 个 TCID₅₀ 的 VSV 培养 24 h 时, 对病毒导致的细胞病变有 50% 的抑制效果, 说明该浓度 mChIL-18 对 CEF 上生长的 VSV 有部分的直接抑制效果, 其抗病毒活性可能与 mChIL-18 诱生的 IFN- γ 有关。当 mChIL-18 浓度低于 800 $\mu\text{g/L}$ 以下则没有抑制细胞病变的活性。

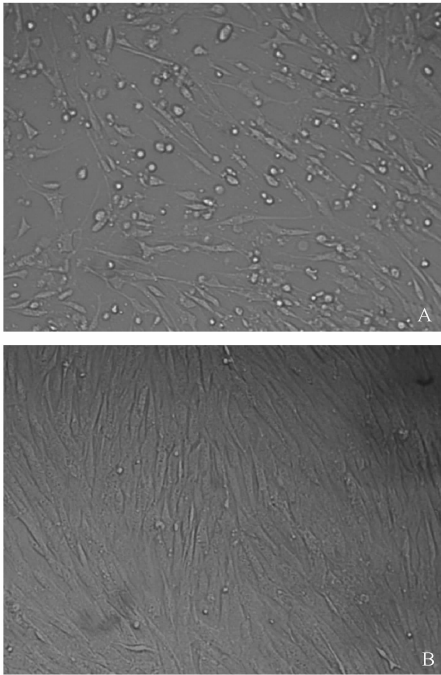


图 3 VSV 在 CEF 上出现的病变

Fig. 3 Cell pathologic element produced by VSV. A: CEF with CPE of VSV (100 \times); B: CEF without CPE of VSV (100 \times).

3 讨论

自 20 世纪 80 年代初期以来, 巴斯德毕赤酵母表达系统已经发展成为生产多种外源蛋白的高效表达系统^[6-8]。它具有生产成本低、操作简单、生长迅速、转录后加工修饰和良好的发酵与分泌性能等优点, 受到国内外研究者的高度重视, 并且已成功运用到工业生产。近年来它被应用到动物传染病防治中, 为抗菌肽和疫苗的生产以及诊断试剂盒的开发发挥了重要作用。

白介素 18 具有很强的免疫调节功能, 能刺激 Th1 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 和 GM-CSF, 并促进 Th1 细胞增殖^[9], 增强 FasL 介导的 Th1 细胞的细胞毒活

性和 NK 细胞的细胞毒活性, 在临床上具有潜在的应用前景。据报道用表达的白介素 18 作为免疫佐剂对疫苗介导的体液免疫和细胞免疫具有明显的增强作用, 其效果和安全性方面明显高于其他类型的佐剂^[10-12]。本实验室已经在原核和真核系统中成功表达了鸡白介素 18, 并检测了其生物活性^[2-4]。但由于原核和一些真核系统自身的缺陷, 限制了它的应用。鉴于上述毕赤酵母表达系统所具有的优点, 因此用其表达鸡白介素 18 具有无可比拟的应用优势。

试验表明, 采用毕赤酵母表达系统, 并非所有的外源基因都能得到大量表达。在某些因素的影响下, 很多外源基因的表达量很少甚至不表达。比如外源基因的内在此特性、载体和菌株的选择、外源基因整合拷贝数、发酵条件等因素都会影响外源蛋白的有效表达^[13]。在试验过程中, 我们对表达因素进行排除性探索, 并优化了外源蛋白在毕赤酵母中高效表达的策略。试验起初没有将 mChIL-18 基因点突变, 使用传代次数较多的菌株和质粒, 结果目的蛋白没有表达和表达量很少。然后通过更换传代次数少的菌株和质粒, 将目的基因点突变, 优化表达条件, 最终得到较高的表达量。通过试验得出, 菌株染色体和质粒基因发生突变、目的基因含有酵母低频密码子、重组质粒与酵母染色体的整合拷贝数少等因素很大程度上影响了目的蛋白的表达。如目的基因含有酵母低频密码子, 且低频密码子在翻译起始位置或有 2 个及多个低频密码子相距很近时, 会严重影响翻译速度和表达量。在 mChIL-18 基因中第 10、13 个密码子为编码精氨酸的 CGA, 是低频密码子, 且相距较近, 这就影响了 mChIL-18 蛋白的高效表达。精氨酸 (Arg) 在其 6 个同义密码子 (CGC、CGA、CGG、CGT、AGA、AGG) 中, 偏爱密码子 AGA 的相对使用频率最高, 而 CGA 相对使用频率偏低。故可以用酵母高频密码子 AGA 来代替低频密码子 CGA 以达到高效表达 mChIL-18 的目的。刘一尘等采用反向长距离 PCR 来定点突变 mChIL-18 基因, 得到较为理想的表达量^[14]。本试验则通过设计引物将目的序列点突变: 首先设计引物 F1, 将 mChIL-18 基因的第 10、13 个密码子 CGA 中的 C 突变为 A, 使其成为酵母偏爱的密码子 AGA。然后以 pMD18-T-mChIL-18 为模板, 用 F1、R1 引物进行 PCR 扩增, 再以得到的 PCR 产物为模板, 用 F2、R1 引物 PCR 扩增, 将 PCR 酶切产物与 pPIC9K 载体连接构建成功重组表达质粒。为了便于检测目的蛋白, 将下游

引物 R1 加入 6 个组氨酸基因序列。通过优化表达条件,探索最高表达量,最终表达量为 480 mg/L,约占总蛋白的 48%。

本研究室采用淋巴细胞增殖试验及 IFN- γ 诱生试验,对大肠杆菌原核表达的 ChIL-18 重组蛋白进行了生物活性检测^[4],表明大肠杆菌经溶菌酶冻融、亲和层析,所得可溶性产物生物活性较好,但含量非常低,且必须亲和层析提取;不可溶的包涵体经变性复性提取,复性效率很低,含活性蛋白比例偏低,这可能是由于 ChIL-18 蛋白分子中含 4 个半胱氨酸残基,复性过程中易发生二硫键的错配。本试验用毕赤酵母表达的 mChIL-18 通过过滤除菌后检测其生物活性,不同浓度的 mChIL-18 蛋白均能明显促进淋巴细胞的增殖。随着浓度的增加,增殖指数增大。除在低于 200 $\mu\text{g/L}$ 浓度时差异不显著外,其它浓度均差异显著 ($P < 0.05$)。据报道 16 - 1000 $\mu\text{g/L}$ 浓度的 mChIL-18 均可诱导脾淋巴细胞产生 IFN- γ , mChIL-18 浓度越大,IFN- γ 活性越强^[15],根据该报道本研究取浓度为 400 $\mu\text{g/L}$ 的 mChIL-18,通过 CEF-VSV 系统检测 mChIL-18 诱导鸡脾淋巴细胞产生的 IFN- γ 具有很强的抗病毒活性,活性可达 1.7×10^4 U/mL。单独的 1000, 800 $\mu\text{g/L}$ 的 mChIL-18 蛋白对 CEF 上生长的 VSV 有部分的直接抑制效果,低浓度的没有抑制作用。这可能是高浓度 mChIL-18 蛋白直接诱导 CEF 产生的 IFN- γ 对 VSV 起到了抑制作用。但具体原因尚需确证。

GS115 菌株分泌的某些的蛋白酶,及在发酵过程中由于产酸而不断降低的 pH 值,还有某些血浆蛋白都会影响 mChIL-18 的生物活性。因此笔者认为在诱导上清中加入适量的蛋白酶抑制剂,实时控制诱导培养基的 pH 值,通过纯化和透析的方法除去培养上清的有害物质会大幅度提高 mChIL-18 的生物活性。发酵罐能实时控制培养基的 pH 值、通氧量和温度,我们下一步将用其进行目的蛋白的批量生产试验,相信其表达量和生物活性都会有大幅提高,也会为 mChIL-18 的工业化生产提供理论和实验依据。

参考文献

[1] Cao R, Farnebo J, Kurimoto M, Cao Y. Interleukin 18 acts as angiogenesis and tumor suppressor. *FASEB*, 1999, 13: 2195-2202.

[2] 胡敬东,崔治中,赵宏坤. 鸡 IL-18 cDNA 的克隆及在大肠杆菌中的高效表达. *畜牧兽医学报* (*Acta*

Veterinaria et Zootechnica Sinica), 2005, 36 (3): 264-268.

- [3] 胡敬东,赵宏坤,崔治中. 鸡白细胞介素 18 成熟蛋白基因真核表达质粒的构建及其在鸡胚成纤维细胞中的表达. *畜牧兽医学报* (*Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*), 2006, 37 (1): 91-94.
- [4] 李宏梅,胡敬东,马凤龙,郑玉姝,刘翠艳,田兆菊,赵宏坤. 鸡白细胞介素-18(ChIL-18)重组蛋白的生物学活性检测. *农业生物技术学报* (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2007, 15(1): 5-10.
- [5] Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Drug Discovery and Genomic Technologies*, 2004, 36: 152-154.
- [6] Shi XJ, Wang B, Zhang C, Wang M. Expressions of Bovine IFN- γ and Foot-and-Mouth Disease VP1 antigen in *P. pastoris* and their effects on mouse immune response to FMD antigens. *Vaccine*, 2006, 24: 82-89.
- [7] Micheelsen PO, Østergaard PR, Lange L, Skjøt M. High-level expression of the native barley α -amylase/subtilisin inhibitor in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2008, 133: 424-432.
- [8] Westerholm-Parvinen A, Selinheimo E, Boer H, Kalkkinen N, Mattinen M, Saloheimo M. Expression of the *Trichoderma reesei* tyrosinase 2 in *Pichia pastoris*: Isotopic labeling and physicochemical characterization. *Protein Expression and Purification*, 2007, 55: 147-158.
- [9] Lowenthal JW, York JJ, O'Neil TE, Steven RA, Strom DG, Digby MR. Potential use of cytokine therapy in poultry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1998, 63 (1-2): 191-198.
- [10] Shi XJ, Wang B, Wang M. Immune enhancing effects of recombinant bovine IL-18 on foot and mouth disease vaccination in mice model. *Vaccine*, 2007, 25 (7): 1257-1264.
- [11] Hung LH, Li HP, Lien YY, Wu ML, Chaung HC. Adjuvant effects of chicken interleukin-18 in avian Newcastle disease vaccine. *Vaccine*, 2009, 28 (5): 1148-1155.
- [12] Degen WGJ, Zuilekom HI, Scholtes NC, Daal N, Schijns VEJC. Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigens by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18). *Vaccine*, 2005, 23: 4212-4218.
- [13] 丁镬,宋跃芬,袁野,刘娣. 毕赤酵母表达外源基因存在的问题与对策. *畜牧与兽医* (*Animal Husbandry & Veterinary Medicine*), 2007, 39(2): 57-59.
- [14] 刘一尘,张春杰,程安春,程相朝,汪铭书,李银聚,吴庭才,易明林. 鸡 IL-18 成熟蛋白基因变构体毕赤酵母表达载体的构建及表达. *中国兽医学报* (*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2009, 29(4): 502-506.

[15] Göbel TW, Schneider K, Schaerer B, Mejri I, Puehler F, Weigend S, Staeheli P, Kaspers B. IL-18 Stimulates the Proliferation and IFN- γ Release of CD4⁺ T Cells in the

Chicken: Conservation of a Th1-Like System in a Nonmammalian Species. *The Journal of Immunology*, 2003, 171:1809-1815.

Expression and bioactivity assay of mature chicken interleukin-18 protein mutant using *Pichia pastoris* expression system

Xihui Wang¹, Shousong Yue³, Jingdong Hu¹, Yijun Huang³, Jinlong Chen¹, Tingting Wang¹, Zhongling Fan¹, Hongkun Zhao^{1,2,*}

(¹ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Shandong Taian 271018, China)

(² Shandong Engineering Research Center for Meatproduct Quality Control, College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Shandong Qingdao 266109, China)

(³ High -Tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Shandong Ji'nan 250100, China)

Abstract: [**Objective**] We expressed mature chicken interleukin-18 (mChIL-18) in *Pichia pastoris*. [**Methods**] The mChIL-18 gen was reconstructed by using site-specific mutagenesis based on the *Pichia pastoris*-preferred codons. The recombinant plasmid pPIC9K/mChIL-18 was constructed and transformed to *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. Multi-copy recombinant strains were screened by Geneticin (G418). The expression of mChIL-18 protein was induced by methanol. SDS-PAGE and Western-blot were used to analyze the expressed products. The bioactivity of mChIL-18 was measured by methyl thiazolyl tetrazolium assays and chicken embryo fibroblasts-vesicular stomatitis virus (CEF-VSV) system. [**Results**] The protein of mChIL-18 could be secreted by GS115. The optimum expression conditions, a rate of 480 mg/L, were obtained as follows: temperature 28°C, pH 6.5, methanol concentration 2% and expression time 120 h. The obtained mChIL-18 protein could stimulate T lymphocytes proliferation. IFN- γ induced by mChIL-18 could directly inhibit the growth of VSV in CEF, and its antiviral activity was about 1.7×10^4 U/mL which was produced by 400 μ g/L of mChIL-18. [**Conclusion**] The high expression of bioactive recombinant mature chicken interleukin-18 (mChIL-18) in *Pichia pastoris* had been achieved.

Keywords: chicken interleukin-18; *Pichia pastoris*; mutant; bioactivity

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the 11th Five Years Programs for Food Safety Key Technology of China (2006BAK02A21), the Broiler Industry of National Agricultural Technology System and Science and the Technology Development Support of Shandong "The Building and Application of Broiler Welfare Cultural Model" (2007GG20009001)

* Corresponding author. Tel: +86-538-8249851-8207; E-mail: hkzhao2009@163.com

Received: 5 February 2010/Revised: 13 April 2010