

重组猪 α 干扰素基因定点突变及在大肠杆菌中的表达

陈 涛¹ 于瑞嵩^{2,3} 刘惠莉^{2,3} 李 震^{2,3*} 曹祥荣¹

¹(南京师范大学生命科学学院,南京 210097)

²(上海市农业科学院畜牧兽医研究所,上海 201106)

³(上海市农业遗传育种重点实验室,上海 201106)

摘 要 用巨引物 PCR 法介导的定点突变把猪 α 干扰素(PoIFN- α)第 86 位 Cys(TGC)突变为 Tyr(TAC),同时将其成熟蛋白 N 端第一个密码子 TGT 同义突变大肠杆菌偏爱的密码子 TGC,构建了大肠杆菌融合基因表达载体 pGEX-IFN 表达产物占菌体总蛋白的 20%。将以包涵体形式表达的目的蛋白经变、复性处理,并以 FPLC 进一步纯化,得到了具有较高生物活性的产物(5200IU/mg)。

关键词 猪 α 干扰素,巨引物 PCR,定点突变,包涵体

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0339-04

干扰素是动物中目前所知出现最早、作用最快的第一抵御病毒体系。人和鼠的干扰素已得到深入研究,但对于猪的干扰素研究相对较少。我国是养猪大国,而猪的病毒性疾病种类多、危害大,发展具广谱抗病毒效应的猪干扰素无疑有重要意义。

猪 α 型干扰素(PoIFN- α)基因无内含子,蛋白糖基化修饰也不重要^[1],因而方便利用原核表达载体表达。我们在研究中克隆到编码猪 α 型干扰素成熟肽部分的基因片段^[2]并在大肠杆菌中进行了表达,发现其活性较低,估计其编码肽段的第 86 位 Cys 可能影响了干扰素的抗病毒活性^[3]。本实验参照 PoIFN- α 1 序列^[1]将此位点突变为 Tyr,然后用大肠杆菌融合表达系统表达出 GST-IFN 融合蛋白,目的产物纯化后具有较高的抗病毒活性。

1 材料与方 法

1.1 材料

菌种和质粒:受体菌 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 为本室保藏菌种;pGEX-4T-3 载体购自 Pharmacia 公司;pUCm-IFN 质粒为本室构建、保存。

工具酶和试剂:Pfu DNA 聚合酶购自上海生物工程公司,限制酶、T4 DNA 连接酶、S1 核酸酶购自 TaKaRa 公司,HuIFN- α 标准品购自卫生部上海

生物制品研究所,Sephacryc 200 购自 Pharmacia 公司,其它试剂均为国产分析纯。

人羊膜上皮细胞(WISH)及水疱性口炎病毒(VSV)购自卫生部上海生物制品研究所。

1.2 方法

1.2.1 定点突变:采用巨引物 PCR 法^[4]。根据所得 PoIFN- α 序列^[2]设计 3 条引物:

P1 5'GATCCTGCGACCTGCCTCA 3';

P2 5'GCTGATCCAGTCC AGTG TAGAAC3';

P3 5'CAGAATTCAGAATGGGCTTG 3'。

其中 P1 处于 IFN 基因的 5'端,斜体 C 为引入的突变碱基,并在前面加了 GATCC(下划线部分),以便与经 *Bam*HI 酶切后用 S1 核酸酶削平的载体进行平端连接构成新的 *Bam*HI 酶切位点。P2 处于 IFN 基因内部,斜体 T 为引入的突变碱基。P3 处于 IFN 基因的 3'末端,下划线部分为引入的 *Eco*RI 酶切位点(引物示意参见图 1)。

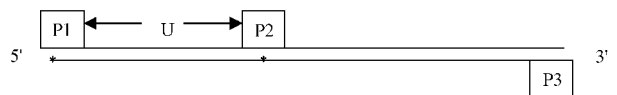


图 1 引物示意图

Fig.1 Position of primers

The asterisk (*) indicates the sites to be mutated

以 P1、P2 为引物, pUCm-IFN 质粒为模板, 用 Pfu 聚合酶进行扩增, 条件为 95℃ 预变性 3min, 95℃ 30s, 62℃ 退火及延伸 50s, 25 个循环, 产物用低熔点琼脂糖法割胶回收, 记为 U。再以 U、P3 作引物, pUCm-IFN 质粒为模板, 用 Pfu 聚合酶进行扩增, 扩增条件: 95℃ 预变性 3min, 95℃ 30s, 62℃ 退火及延伸 80s, 30 个循环, 所得产物即为突变后 IFN。暂记作 rPoIFN- α 1。

1.2.2 表达质粒的构建: 构建过程参见图 2。用 1% 低熔点琼脂糖凝胶分离回收 Pfu 聚合酶扩增的 rPoIFN- α 1, 以 EcoR I 酶切。载体质粒 pGEX-4T-3 经 BamHI 酶切后, 以稀释的 S1 核酸酶削平, 再以 EcoR I 酶切。酚: 氯仿: 异戊醇抽提后, 与酶切后的 rPoIFN- α 1 于 16℃ 进行一平端-粘端连接, 产物转化用常规 CaCl₂ 法^[5]制备的感受态细胞 *E. coli* BL21, 用菌落 PCR 法初步筛选, 即直接挑取微量菌体作为 PCR 反应的模板。将得到的阳性质粒进行表达, 产物用 SDS-PAGE 蛋白电泳复选。最后对得到的重组质粒测序确认, 记为 pGEX-IFN。

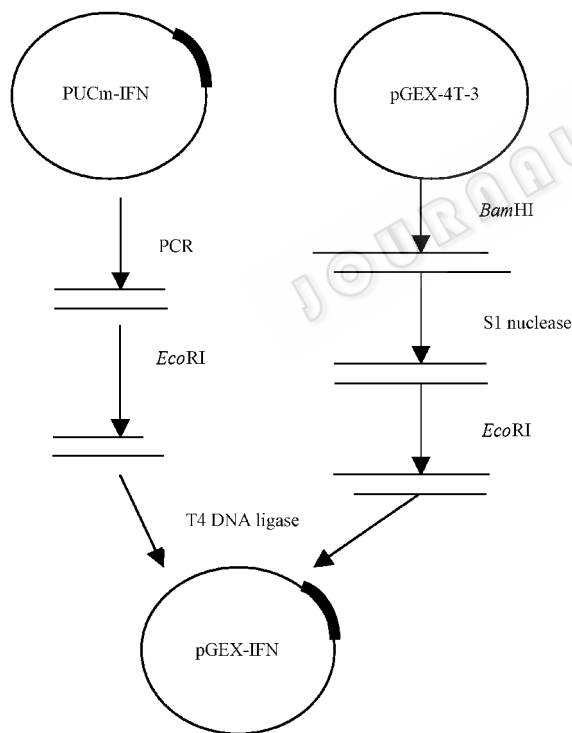


图 2 pGEX-IFN 质粒构建示意图

Fig. 2 Construction of recombinant plasmid pGEX-IFN

1.2.3 重组菌株的诱导表达: 将含 pGEX-IFN 重组质粒的菌株接种于含氨苄青霉素 (50 μ g/mL) 的 2 \times YTA 液体培养基 (蛋白胨 16g/L, 酵母提取物 10g/L, NaCl 5g/L) 中于 30℃ 震荡培养过夜, 次日 1:100 接种扩大培养, 30℃ 震荡培养至对数中期, 加 IPTG 至终

浓度 1mg/mL, 诱导 3h 后离心收集菌体。

1.2.4 表达产物纯化:

(1) 细胞破碎及包涵体洗涤: 以超声波破碎诱导后菌体, 离心后沉淀用适量包涵体洗涤液 (20mmol/L Tris/HCl, pH8.0, 5mmol/L EDTA, 0.02% 溶菌酶, 75 μ g/mL PMSF, 75 μ g/mL 苯甲酰胺) 重悬, 室温下置于磁力搅拌器上搅拌 1h。加 0.25 体积 10% (W/V) 脱氧胆酸钠, 使其终浓度为 2% (W/V), 继续搅拌 1h。室温 17 000g 离心 20min。沉淀以 2% (W/V) 脱氧胆酸钠的包涵体洗涤液重复洗涤 1 遍。

(2) 变性溶解配置变性缓冲液: 8mol/L 尿素, 50mmol/L 甘氨酸, 0.25mol/L β -巯基乙醇, 75 μ g/mL PMSF, 75 μ g/mL 苯甲酰胺, 0.1mol/L Tris/HCl, pH9.1。溶解洗涤后的包涵体, 使蛋白浓度约为 1.5mg/mL, 室温搅拌, 溶液变清亮时表明包涵体已完全溶解。

(3) 透析复性: 以 0.1mol/L Tris/HCl, pH9.1 配制 1~7mol/L 尿素溶液共 7 管, 取等量洗涤后的包涵体分别溶于其中, 以 SDS-PAGE 凝胶电泳检测目标蛋白开始溶解时的尿素浓度, 大致估算折叠中点。配制含折叠中点尿素浓度的变性缓冲液, 将变性溶解的包涵体于 5 倍体积此缓冲液中透析 2 遍, 使其缓慢通过折叠中点。再将其对 5 倍体积 BLM (0.25% 碳酸氢钠, 0.20% 甘露醇, 0.20% 乳糖) 透析过夜。最后对 PBS 透析。

(4) FPLC 纯化: 由于透析后蛋白溶液体积较大, 浓度较低, 而 FPLC 上样量有限, 故需先用 Sartorius 超滤系统对 10000D 滤膜超滤至合适体积。以 PBS 平衡 Sephecycic 200 柱 1 个柱体积, 上样浓缩后的蛋白液, 以 PBS 洗脱, 流速 1mL/min, 收集洗脱峰。

1.2.5 细胞病变抑制法测干扰素抗病毒活性: 采用 WISH 细胞/VSV 系统测定^[7]。

2 结 果

2.1 定点突变

首轮 PCR 产物 U 为 279bp, 第二轮扩增产物 rPoIFN- α 1 为 570bp, 均为单一条带, 如图 3 所示。

2.2 表达质粒的构建

首先用质粒 PCR 法初步筛选, 得到 5 个阳性重组子。分别诱导表达后, 进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳, 有一个重组子表达的产物大小与预期相同。将此重组质粒进行测序, 序列与设计的完全一致 (结果未显示)。

2.3 重组蛋白的表达及包涵体分离

如图 4 所示, 诱导后 SDS-PAGE 电泳图谱上在

43kD 处出现明显加深条带, 约占菌体总蛋白的 20%。诱导时间为 2.5h。表达产物主要以包涵体形式存在, 经洗涤后可得到纯度高于 80% 的产物。

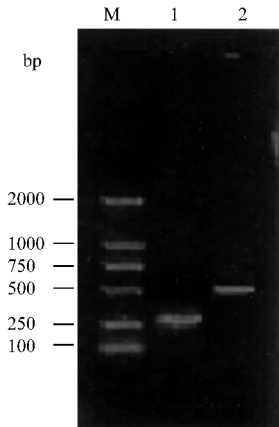


图 3 PCR 产物电泳分析图

Fig.3 Electrophoresis analysis of PCR product

M. Marker; 1. U; 2. rPoIFN- α

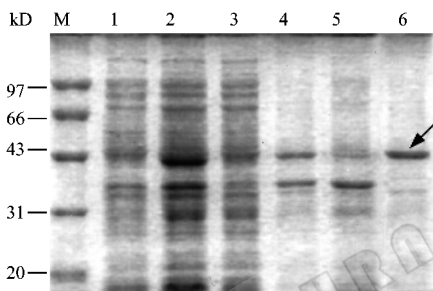


图 4 重组蛋白表达

Fig.4 The expression of recombinant protein

M. Marker; 1. BL21-pGEX-IFN before induction; 2. BL21-pGEX-IFN after induction; 3. Supernatant fraction after centrifugation of broken cells with 17 000g; 4. Pellet fraction after centrifugation of broken cells with 17 000g; 5. Supernatant fraction after extracting with sodium deoxycholate; 6. Pellet fraction after extracting with sodium deoxycholate

2.4 重组蛋白的变复性处理

浓度为 1.5mg/mL 的重组蛋白在含 8mol/L 尿素的变性液中搅拌 3h 后即变清亮。SDS-PAGE 凝胶电泳表明在 4mol/L 尿素处开始有目的蛋白条带出现 (结果未显示), 因而折叠中点约在 3.5mol/L 尿素处。

2.5 FPLC 纯化

见图 5。以 PBS 平衡 Sephacryl-S200 柱(1.5 × 53.5cm), 上样经 PBS 透析的复性产物, 可看到明显的目的蛋白峰出现, 保留时间约为 40min。复性后存在于上清中的蛋白基本为活性形式的 PoIFN 单体分子。

2.6 重组蛋白活性鉴定

在 WISH/VSV 系统上, 采用细胞病变抑制法, 用标准干扰素作对照。于 96 孔板上将两种干扰素均做

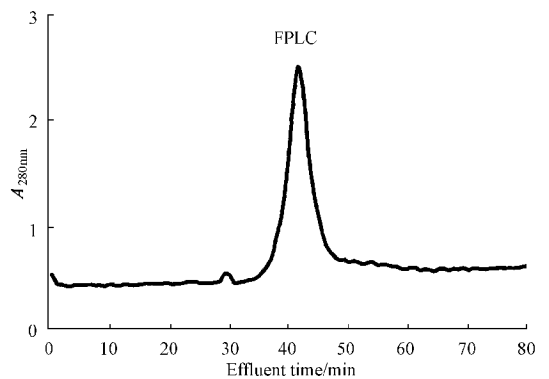


图 5 S200 快速液相色谱在高浓度盐酸胍中分离纯化复性后的 IFN α

Fig.5 Sephacryl-S200 gel filtration of renatured IFN α

倍比稀释, 以结晶紫染色显示其抗病毒活性, 用酶标仪测定 540nm 的 A 值, 确定其比活性为 5200IU/mg。

3 讨论

PoIFN- α 是已知干扰素中与 HuIFN- α 同源性最高的。它同样在 1-99 29-139 之间形成 2 个二硫键, 其中 29-139 之间的二硫键对于干扰素的生物学活性更为重要^[7]。文献报道, HuIFN- α D 的第 86 位多一个 Cys, 将其改成 Asp 后, 生物学活性有明显提高^[3]。我们在以前的研究中克隆到编码猪 α 型干扰素成熟肽部分的基因片段, 在大肠杆菌中进行原核表达, 结果其抗病毒活性只有 3600IU/mg (陈涛等, 待发表)。查究其序列, 发现其编码的肽段恰在第 86 位也多出一个 Cys, 可能影响了干扰素的生物活性。本实验用巨引物 PCR 法介导的定点突变将其突变为 Tyx (以 PoIFN- α 1 为参照), 同时将干扰素成熟肽的第一个氨基酸 (Cys) 的密码子 TGT 同义突变大肠杆菌偏爱的密码子 TGC, 以期提高其活性和表达效率, 得到了较满意的结果。所运用的巨引物 PCR 方法只需设计 3 条引物, 进行两次 PCR 反应就可在模板的任意部位引入突变, 是一种简单有效的方法^[4]。

在构建融合蛋白表达载体时, 由于 PoIFN- α 基因内部已有一个 BamHI 酶切位点, 故采用一平端一粘端方式连接, 以保证阅读框的正确。因 S1 核酸酶用量较难控制, 因而在高倍稀释的 S1 核酸酶作用后, 除用菌落 PCR 法初步筛选外, 还需将得到的质粒表达产物用 SDS-PAGE 蛋白电泳作复选, 排除被切过头的载体, 最后对得到的重组质粒测序确认。

目的蛋白以包涵体形式表达的一个好处是可以 通过洗涤、离心方法将其迅速纯化, 但包涵体蛋白需 经过变复性处理才能得到有生物活性的蛋白。一般

用 6mol/L 的盐酸胍或 8mol/L 的尿素进行变性溶解,然后将变性液直接稀释或透析到较低的变性剂浓度,蛋白质即可在一定程度上自发复性。其中确定蛋白质在多大浓度的变性剂下进行重折叠(即折叠中点),并以明确方式通过此区域非常重要^[8]。本实验只是对 PoIFN- α 的折叠中点进行了粗略估算,更适宜的条件有待进一步摸索。提纯过程中,在包涵体洗涤及变复性初期加入适量 PMSF 及苯甲酰胺可抑制目的蛋白降解,适量的 β -巯基乙醇则有助于防止二硫键氧化和减少蛋白间凝聚形成。

总之,本实验通过对 PoIFN- α 基因进行有目的的改造,使其得到了较好的表达,经纯化后具有较高的生物活性,为进一步研究利用 PoIFN- α 打下了基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Lefevre F, Bonnardiere C L. Molecular cloning and sequencing of a gene encoding biologically active porcine α -Interferon. *J Interferon Res*, 1986, **6**: 349 ~ 360

[2] CHEN T(陈涛), WANG Y(王莹), LI Z(李震) *et al.* Studying Po-IFN α with allele specific PCR and splicing by overlap extension technique. *Acta Agriculture Shanghai(上海农业学报)*, 2001, **17** (4): 18 ~ 20

[3] WANG W(王伟), HOU Y I(侯云德). Construction of an interferon mutant(IFN- α 1/86D) and its biological activities. *Chinese Journal of Virology(病毒学报)*, 1990, **4** (4): 322 ~ 325

[4] Kammann M, Laufs J, Schell J *et al.* Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction(PCR). *Nucleic Acids Res*, 1989, **17** (13): 5404

[5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual; second edition*, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, 1989, pp. 26 ~ 27

[6] Lefevre F, L'haridon R, Borrás-Cuesta F *et al.* Production, purification and biological properties of an *Escherichia coli*-derived recombinant porcine alpha interferon. *J Gen Vir*, 1990, **71**: 1057 ~ 1063

[7] Pestka S, Langer J A *et al.* Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem*, 1987, **56**: 727 ~ 777

[8] Marshak D, Kadonaga J T, Burgess R R. *Strategies for protein purification and characterization: A Laboratory Course Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996

Site-directed Mutation of PoIFN- α and Its Expression in *Escherichia coli*

CHEN Tao¹ YU Rui-Song^{2,3} LIU Hui-Li^{2,3} LI Zhen^{2,3} CAO Xiang-Rong¹

¹(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

²(Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

³(Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China)

Abstract By using huge primer PCR Cys86 (TGC) of PoIFN- α was mutated to Ty (TAC), and the first code TGT was simultaneously changed to TGC, which is a bias code of *E. coli*. The expression plasmid pGEX-IFN was constructed successfully. Recombinant porcine IFN α , which is expressed as inclusion bodies, was about 20% of the total proteins. The inclusion body was dissolved in 8mol/L urea and subsequently renatured by dilution in refolding buffer. In order to obtain pure protein, the renatured IFN α was purified by FPLC, and the cytokine activity (5200IU/mg) was verified by inhibiting the cytopathic effect.

Key words PoIFN- α , huge primer PCR, site-directed mutation, inclusion bodies

Received: 12-17-2001

This work was supported by Grants from Shanghai Academy of Agricultural Science.

* Corresponding author. Tel 86-21-62200389; Fax 86-21-62207858; E-mail: chenruihong@public1.sina.com.cn <http://journals.im.ac.cn>