

# 毕赤酵母表达猪干扰素- $\gamma$ 基因及其抑制蓝耳病病毒效果

万建青 吴文学 夏 春\*

(中国农业大学动物医学院 北京 100094)

**摘 要** 为了研究和应用猪重组干扰素- $\gamma$  (rPoIFN- $\gamma$ ) 预防和治疗病毒性疫病, 将大白猪 PoIFN- $\gamma$  基因插入到酵母整合载体 pHIL-S1, 构建了重组 GS115 工程菌 (pHIL-S1/rPoIFN- $\gamma$ )。经过 SDS-PAGE、Western blot 分析和抗滤泡性口炎病毒 (VSV) 活性测定, 证实 rPoIFN- $\gamma$  分子量为 18 kD, 在 GS115 中的表达量为 18% ; 其抗 VSV 活性为 450 ~ 540 u/mL。用 rPoIFN- $\gamma$  处理猪肺巨噬细胞系 Marc-145 后, 经细胞病变抑制法 (CPE50) 测定, rPoIFN- $\gamma$  可以抵抗蓝耳病病毒 (PRRSV) 感染。结果显示酵母表达的 rPoIFN- $\gamma$  是有应用价值的抗病毒生物工程制剂。

**关键词** 猪干扰素- $\gamma$ , 毕赤酵母, 蓝耳病病毒

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0683-04

猪干扰素- $\gamma$  (PoIFN- $\gamma$ ) 是由  $\alpha\beta$ T 细胞和  $\gamma\delta$ T 细胞产生, 并能诱导机体产生多种抗病毒蛋白的细胞因子<sup>[1,2]</sup>。1990 年, Dijkmans 等首先从基因水平开展了 PoIFN- $\gamma$  的研究, 该小组以人干扰素- $\gamma$  cDNA 为探针从猪基因组中克隆了含内含子的单拷贝 PoIFN- $\gamma$  基因<sup>[3]</sup>。随后, Vandenbroeck 等又应用 PCR 技术从猪基因组中分段克隆了 PoIFN- $\gamma$  基因的外显子, 连成完整 PoIFN- $\gamma$  基因后在大肠杆菌中进行了表达。近年来, PoIFN- $\gamma$  分别在昆虫细胞 (Sf9) 和兔肾细胞 (RK13) 中成功表达<sup>[4,5]</sup>。并且, PoIFN 在抑制猪口蹄疫病毒 (FMDV)、蓝耳病病毒 (PRRSV) 和非洲猪瘟病毒 (ASFV) 的实验中效果明显<sup>[6-8]</sup>。最近, 机体 PoIFN- $\gamma$  水平的高低被作为评价疫苗诱导细胞性免疫应答的指标<sup>[1]</sup>。

毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 是近年发展起来的真核表达系统。它具有原核表达系易发酵的优点, 又具有安全、能正确加工等特点, 广泛用于人类重组蛋白的生产。为了研究和开发猪重组干扰素- $\gamma$  (rPoIFN- $\gamma$ ) 类生物治疗制剂、控制猪的病毒性疫病, 本研究亚克隆了大白猪 PoIFN- $\gamma$  cDNA, 构建了酵母表达 rPoIFN- $\gamma$  系统, 并且对表达产物进行了 Western blot 分析及进行了 rPoIFN- $\gamma$  抑制 PRRSV 增殖的实验。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、质粒、工具酶、细胞和培养基

酵母 (*Pichia pastoris* GS115/His<sup>-4</sup>) 和酵母表达质粒 pHIL-S1 由中国生物药品检定所肝炎室馈赠。大肠杆菌 JM109、T-Easy/PoIFN- $\gamma$  重组质粒和滤泡性口炎病毒 (VSV) 为本室保存。限制酶 *Bam*HI、*Eco*RI、T4 连接酶及 ExTaq PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。质粒抽提试剂盒购于 QIAGEN 公司。DNA 快速回收试剂盒购于鼎国公司。小牛血清购于 GIBCO 公司。酵母培养基用蛋白胨、酵母氮碱 (YNB) 购于 Difco 公司。牛肾细胞 (MDBK) 购于中国兽药监察所。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购于北方同正公司。酵母完全培养基 (YPD)、选择培养基 (MD)、甲醇选择培养基 (MM)、诱导培养基 (BMGY) 和甲醇诱导培养基 (BMMY) 按文献<sup>[9]</sup>配制。

### 1.2 亚克隆猪干扰素- $\gamma$ (PoIFN- $\gamma$ )

根据我们克隆报道的大白猪 PoIFN- $\gamma$  序列<sup>[10]</sup>, 在其成熟蛋白序列两端合成引物对。上游引物为 5' TATGAATTCCAGCGCCCTTTTTTAAAGAA, 含有 *Eco*RI 位点; 下游引物为 5' TTAGGATCCTTATTTT-GATGCTCTCTGGCC, 含有 *Bam*HI 位点。以 pGEM T-Easy/PoIFN- $\gamma$  为模板进行 PCR。PCR 扩增条件为

收稿日期 2002-06-18, 修回日期 2002-08-15。

基金项目 本研究为国家 863 计划基金资助项目 (2001AA249032)。

\* 通讯作者。 Tel 86-10-62893372, Fax 86-10-62893154, E-mail xiachun@cau.edu.cn

94℃ 1 min 60℃ 1 min 72℃ 1 min, 共 25 个循环。最后一循环后再 72℃ 延伸 10min。

### 1.3 酵母整合质粒 pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$ 的构建和测序

PCR 产物电泳回收后分别用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切, 回收约 439 bp 处片段, 并将其插入 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切后的 pHIL-S1 酵母整合质粒, 转化宿主菌 JM109, 提取质粒, 进行 PCR、双酶切鉴定和测序。随后, 再以 *Sca*I 酶切、电泳回收 8.7 kb 片段, 即线性化 pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$ 。

### 1.4 阳性转化子的筛选与诱导表达

按文献 [11] 方法将 GS115 酵母菌制备成感受态后, 取 80 $\mu$ L 与 10 $\mu$ g 的线性化 pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$  混合放入 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪的 0.2 cm 电转杯中, 冰浴 5min 后, 用 1.5 kV、20 $\mu$ F、200 $\Omega$  进行电激, 随后立即加入 1 mL 1mol/L 浓度的冷山梨醇, 然后悬浮、涂布于 MD 平板。30℃ 孵育 2~3d 后观察转化子的生长情况。将阳性转化酵母菌株分别接种于 MM 和 MD 选择培养基平板上, 挑选在 MM 平板上生长缓慢而在 MD 平板生长良好的菌株 (*His*<sup>+</sup> *Mut*<sup>s</sup> 表型) 进行重新培养, 再接种于 100 mL 的 BM-GY 培养基中, 30℃ 培养至 *OD*<sub>600</sub> 为 3 时, 5000r/min 离心 15min 收集菌体, 再用 20 mL BMMY 培养基重悬, 继续培养, 并每间隔 24 h 加入最终浓度为 1% 的甲醇诱导 PoIFN- $\gamma$  表达, 5d 后离心收集菌体。

### 1.5 抗 PoIFN- $\gamma$ 血清的制备

以大肠杆菌表达纯化后的 rPoIFN- $\gamma$ <sup>[10]</sup> 加等量弗氏完全佐剂乳化后, 按 50 $\mu$ g rPoIFN- $\gamma$ /只皮下注射体重为 22~28g BALB/C 鼠, 间隔 15d, 以同等量加弗氏不完全佐剂注射, 共免疫 3 次。采用眼眶采血法收集鼠抗 rPoIFN- $\gamma$  血清, 分装保存于 -30℃ 备用。

### 1.6 SDS-PAGE 和 Western blot

SDS-PAGE 和 Western blot 参照吴文学等方法进行<sup>[10]</sup>。即将收集的菌体经 0.5mmol/L Tris-Cl 和加样缓冲液 90℃ 裂解变性 5min, 5000 r/min 离心 3 min 后取上清用于 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE、转 NC 膜后, 用封闭液稀释度为 1:200 的鼠抗 rPoIFN- $\gamma$  抗血清, 室温反应 4h, 加入 1:50 稀释的二抗 HRP-IgG 中孵育 2h, 其余同文献 [10]。

### 1.7 rPoIFN- $\gamma$ 效价

离心收集 3 株经甲醇诱导表达的重组酵母菌上清液, 再超声波裂解处理重组酵母菌后取其离心上清液, 分别按吴文学等方法透析, 采用细胞病变抑制法在牛肾细胞 (MDBK) 滤泡性口炎病毒 (VSV) 上测定

重组猪  $\gamma$ -干扰素 (rPoIFN- $\gamma$ ) 的抗病毒活性。

### 1.8 抗 PRRSV 病毒

常规培养猪肺泡巨噬细胞系 Marc-145 在 96 孔板成单层后, 每孔加样 100 $\mu$ L 2 倍稀释 rPoIFN- $\gamma$  液 (每浓度设 2 孔), 37℃、24h 后用 10TCID<sub>50</sub> VR-2332 PRRSV 攻毒, 24h 后观察 Marc-145 细胞病变抑制结果。对照为未用 rPoIFN- $\gamma$  处理孔。

## 2 结 果

### 2.1 酵母整合质粒 pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$ 的构建与序列测定

pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$  重组载体的构建如图 1 所示。用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切重组质粒 pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$  后结果如图 2 所示。在 8.3kb 和 440bp 处有条带, 与预计相符。采用 PoIFN- $\gamma$  下游引物测序结果显示 AOX1 引物序列、pHIL-S1 上的 PHO 信号肽序列 (115-191 位) PoIFN- $\gamma$  基因序列 (192-601 位), PoIFN- $\gamma$  蛋白分子量为 16.8kD。

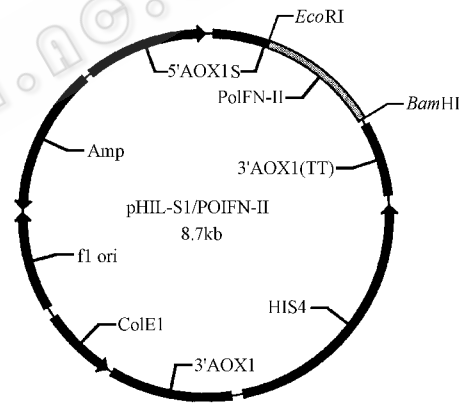


图 1 重组表达载体 pHIL-S1/PoIFN-II 的构建

Fig.1 Construction of recombinant expression vector pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$

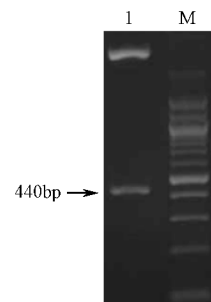


图 2 双酶切鉴定 pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$  重组表达载体

Fig.2 Identification of recombinant expression vector pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$  by *Bam*HI and *Eco*RI

1. Digestion of pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$  with *Bam*HI and *Eco*RI. M. 100bp-Base DNA Marker.

## 2.2 重组酵母菌株的筛选

将 pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$  质粒用 *ScaI* 消化后,回收线性 DNA 片段、转化毕赤酵母后,利用 MM、MD 选择培养基筛选阳性 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 表型转化子结果显示:在 MM 选择培养基上,阳性转化子生长慢,第 3 天,菌落小( $\leq 0.2$ cm);而在 MD 培养基上,17 株阳性转化子生长均快,菌落大( $\geq 0.4$ cm)。差别十分显著。

## 2.3 SDS-PAGE 和 Western blot

三株阳性酵母菌经超声裂解后取上清进行 SDS-PAGE 后结果如图 3A 所示。用鼠抗 rPoIFN- $\gamma$  蛋白血清进行 Western blot 分析的结果如图 3B 所示。加二抗(HRP 标记的兔抗鼠 IgG)后,在 18kD 处有一条特异反应带,与 SDS-PAGE 结果相吻合。

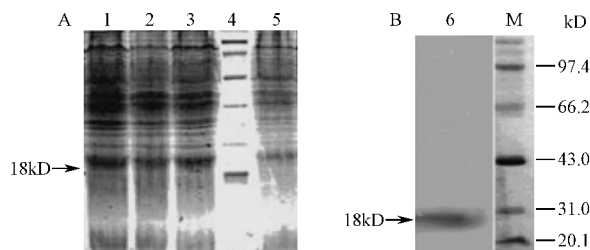


图 3 SDS-PAGE(A)和免疫印迹(B)分析甲醇诱导表达 PoIFN- $\gamma$  酵母 GS115 株

Fig.3 Analysis of recombinant GS115 (pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$ ) by SDS-PAGE(A) and Western blot(B)

1~3. Recombinant GS115 expressing rPoIFN- $\gamma$  induced by methanol alcohol. 4. Standard Markers. 5. Recombinant GS115 without methanol alcohol. 6. recombinant GS115 expressing PoIFN- $\gamma$  induced by methanol alcohol. M. Standard Markers.

## 2.4 rPoIFN- $\gamma$ 效价

三株阳性酵母菌经超声裂解后取上清进行 SDS-PAGE 后结果如图 4 所示。用牛肾细胞 MDBK 株与 PoIFN- $\gamma$  初提物共育后以滤泡性口炎病毒(VSV)攻击实验显示猪  $\gamma$  干扰素的生物学活性为 450~540u/mL。

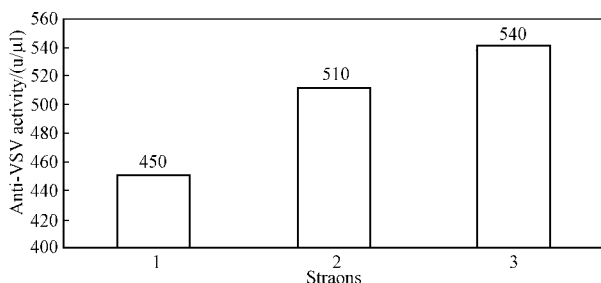


图 4 rPoIFN- $\gamma$  病毒活性检测结果

Fig.4 Effect of recombinant PoIFN- $\gamma$  on anti-VSV activity

## 2.5 rPoIFN- $\gamma$ 抗 PRRSV 病毒

rPoIFN- $\gamma$  抗 PRRSV 病毒结果如表 1 所示。用稀释的 rPoIFN- $\gamma$  处理 Marc-145 后,用 10TCID<sub>50</sub> VR-2332 PRRSV 攻毒 90h 后,对照组出现 CPE<sub>50</sub>,而 1:4~1:32 倍稀释的 rPoIFN- $\gamma$  未出现细胞病变。

表 1 rPoIFN- $\gamma$  抗 PRRSV 病毒结果

Table 1 Anti-PRRSV activity of recombinant PoIFN- $\gamma$

Group	Challenged by VR-2332	CPE <sub>50</sub>							
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
rPoIFN- $\gamma$	10TCID <sub>50</sub>	-	-	-	-	+	+	+	+
	VR-2332	-	-	-	-	-	-	-	-
Control	10TCID <sub>50</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
	VR-2332	-	-	-	-	-	-	-	-

+ :CPE<sub>50</sub> positive ; - :CPE<sub>50</sub> negative

## 3 讨论

猪口蹄疫、非洲猪瘟、蓝耳病、猪瘟、传染性胃肠炎、伪狂犬和轮状病毒均能诱导机体产生干扰素,并且由机体产生的天然干扰素能在体外抑制上述病毒的增殖<sup>[6~8,11]</sup>。但迄今为止采用基因工程方法规模化获得猪重组干扰素并将其应用于临床的报道还极为少见<sup>[11]</sup>。我们认为要将猪重组干扰素应用到临床,首先要解决其规模化生产等问题。因此,我们选择了毕赤酵母表达系统。

pHIL-S1 整合载体具有醇氧化酶基因(*AOX1*)启动子、*PHO1* 信号肽编码序列、多克隆位点和转录终止子片段。将 PoIFN- $\gamma$  cDNA 亚克隆到了 pHIL-S1 载体后,测序表明 PoIFN- $\gamma$  与 pHIL-S1 载体间的读码框架正确。使用 1500V 电压、20 $\mu$ F 电容、电击时间为 4.96ms 时并获得了 32 株酵母转化子。酵母 GS115 株为组氨酸(His)依赖型<sup>[9]</sup>。表达载体 pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$  中含有组氨酸脱氢酶基因,同源重组后,该基因整合到了酵母染色体,使重组酵母 GS115 株能在 MD 平板上生长。但是,并非在 MD 平板上生长的菌落都正确的整合了外源基因,因为酵母菌 GS115 株中仍保留了 *AOX1* 基因,能产生醇氧化酶,在 MM 平板上生长良好。与此相反,正确整合的酵母菌 GS115 株失去了 *AOX1* 基因,仅能依赖 *AOX2* 基因合成少量的醇氧化酶。通过 MD 和 MM 同步筛选,共选出了 17 株正确整合的阳性酵母 GS115 株,正确整合率为 50%。

PRRS 自 1994 年在我国首次报道后,其危害逐年增加,是造成母猪流产的主要疫病,尚无疫苗进行有效预防。Rowland 等曾报道,用 rPoIFN- $\gamma$  处理

Marc-145 细胞后,可抑制 PRRSV 野毒株和细胞适应株的增殖;其作用机理是 rPoIFN- $\gamma$  激活了 Marc-145 细胞内的蛋白激酶(PKR),并且其作用效果依赖于 rPoIFN- $\gamma$  的浓度<sup>[7]</sup>。我们用 rPoIFN- $\gamma$  处理 Marc-145 后,采用了我国流行血清型(美洲型)VR-2332 标准株进行了攻毒,这与 Rowland 等(2001)的实验结果类似。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Rodriguez-Carreno MP , Lopez-Fuertes L , Revilla C *et al.* Phenotypic characterization of porcine IFN-gamma-producing lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Method* 2002 **259**( 1 ~ 2 ) :171 ~ 179
- [ 2 ] Charley B , McCulloch K , Martinod S. Antiviral and antigenic properties of recombinant porcine interferon-gamma. *Vet Immunol Immunopathol* ,1998 **19** 95 ~ 103
- [ 3 ] Dijkmans R , Vandenbroeck Beuken E *et al.* Sequence of the porcine interferon-gamma gene. *Nucleic Acids Research* ,1990 **18** 42 ~ 59
- [ 4 ] Vandenbroeck K , Willems L , Billiau A *et al.* Glycoform heterogeneity of porcine interferon-gamma expressed in Sf9 cells. *Lymphok Cytok Res* ,1994 **13** 253 ~ 258
- [ 5 ] Lefevre A , Cencic , S Koren *et al.* Tetracycline-controlled expression of glycosylated porcine interferon-gamma in mammalian cells. *Animal Biotechnolog* ,1999 **10**( 1&2 ) 63 ~ 79
- [ 6 ] Jarasvech C , Maria E P , Marvin J G. Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon. *Journal of Virolog* ,1999 **12** :9891 ~ 9898
- [ 7 ] Rowland R R , Robinson B , Stefanick J *et al.* Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interferon-gamma and recovery of virus replication with 2-aminopurine. *Arch Virol* ,2001 **146**( 3 ) 539 ~ 555
- [ 8 ] Suradhat S , Intrakamhaeng M , Damrongwatanapokin S. The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2001 **83**( 3 ) :177 ~ 189
- [ 9 ] Invitrogn , Pichia Expression Kit Instruction Manual ( Version E ) , 2002 pp.92 ~ 94
- [ 10 ] WU W X 吴文学 , XIA C 夏春. Cloning and expression in *Escherichia coli* of porcine interferon-gamma gene. *Journal of Agricultural Biotechnolog*( 农业生物技术学报 ) 2002 **3** 255 ~ 258
- [ 11 ] Riffault S , Carrat C , van Reeth K , Pensaert M , Charley B. Interferon-alpha-producing cells are localized in gut-associated lymphoid tissues in transmissible gastroenteritis virus ( TGEV ) infected piglets. *Vet Res* 2001 **32**( 1 ) :71 ~ 79
- [ 12 ] Dufour V , Chevallier S , Cariolet R *et al.* Induction of porcine cytokine mRNA expression after DNA immunization and pseudorabies virus infection. *J Interferon Cytokine Res* 2000 **20**( 10 ) 889 ~ 895

## Expression of Porcine Interferon- $\gamma$ Gene in *Pichia pastoris* and Its Effect of Inhibiting Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

WAN Jian-Qing WU Wen-Xue XIA Chun\*

( College of Veterinary Medicine , Chinese Agricultural University , Beijing 100094 ,China )

**Abstract** In order to develop recombinant porcine Interferon- $\gamma$  ( rPoIFN- $\gamma$  ) to prevent porcine viral infection , PoIFN- $\gamma$  cDNA lacking the signal peptide was expressed in *Pichia pastoris* GS115 strain , and the effect of rPoIFN- $\gamma$  on porcine reproductive and respiratory syndrome virus ( PRRSV ) was investigated. The PoIFN- $\gamma$  gene was inserted into integrative vector pHIL-S1 , and the recombinant GS115 strain ( pHIL-S1/PoIFN- $\gamma$  ) was constructed by homologues recombinant. The rPoIFN- $\gamma$  protein was 18 kD with an expressing yield of 18% was assayed by SDS-PAGE and Western blot , respectively. The anti-viral activity of rPoIFN- $\gamma$  was in the range of 450 ~ 540 u/mL. In addition , the effect of rPoIFN- $\gamma$  ant-PRRSV was determined using CPE50 method. The results indicated that high concentration of rPoIFN- $\gamma$  could inhibit PRRSV on Marc-145 cell line. The rPoIFN- $\gamma$  is a potential drug for prevention and treatment of various kinds of viral pig diseases.

**Key words** porcine interferon- $\gamma$  , *pichia pastoris* , porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Received : 06-18-2002

This work was supported by Grant from the State " 863 " High Technology R&D Project of China ( No. 2001AA249032 ).

\* Corresponding author. Tel 86-10-62893372 ; Fax 86-10-62893154 ; E-mail : xiachun@cau.edu.cn