

猪 β -干扰素在毕赤酵母中的分泌表达及其活性

姚清侠, 曹毅, 钱平, 徐卓菲, 何雁南, 司有辉, 陈焕春*

(华中农业大学预防兽医学院动物病毒室, 武汉 430070)

摘要: 为了高效表达分泌型的猪 β -干扰素, 将去除信号肽的编码梅山猪 β -干扰素成熟多肽基因 (mPoIFN β) 插入酵母-大肠杆菌穿梭载体 pPIC9K, 构建成分泌型重组表达载体 pPIC9K-mPoIFN β 。将以 *Sal* I 线性化的 pPIC9K-mPoIFN β 用化学方法 (LiCl), 与鲑鱼精 DNA (ssDNA) 共转入毕赤酵母菌株 GS115, 转化子经 MD 平板筛选和 PCR 鉴定后获得阳性菌株, 再经高浓度 G418 筛选到多拷贝菌株。以 1% 甲醇连续诱导 4 d, SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果表明: 表达产物为 22 ku 和 26 ku 的混合物, 在 GS115 中的表达量约为 80 mg/L, 占分泌型总蛋白的 29.4%~30.8%, 表明猪 β -干扰素基因在毕赤酵母中获得了高效分泌表达。对表达产物进行理化分析发现, 重组酵母菌表达的蛋白耐酸 (pH2), 对热 (56 $^{\circ}$ C) 部分敏感, 并能被特异性的抗猪 β -干扰素抗体中和而不与抗猪 γ -干扰素抗体反应。以细胞病变抑制法 (CPE₅₀) 测定干扰素抗病毒活性, 在 MDBK (牛肾细胞系) 中表达的猪 β -干扰素的抗 VSV 比活性达到 2.0×10^6 U/mg; 对口蹄疫病毒在 IBRS-2 细胞中的增殖也有明显的抑制作用。

关键词: 猪 β -干扰素; 毕赤酵母; 分泌表达; 抗病毒活性; 口蹄疫病毒

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)05-0506-07

Secreting Expression of Porcine Interferon- β in *Pichia pastoris* and Its Antiviral Activity

YAO Qing-xia, CAO Yi, QIAN Ping, XU Zuo-fei, HE Yan-nan,
SI You-hui, CHEN Huan-chun*

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

Abstract: To highly express secreted porcine interferon- β (rPoIFN β), the signal peptide was excised from the porcine interferon- β gene and the mature gene (mPoIFN β) was cloned into the yeast-Escherichia shuttle vector pPIC9K to construct secreting recombinant expressing plasmid of pPIC9K-mPoIFN β . The pPIC9K-mPoIFN β was linearized by *Sal* I and co-transformed with ssDNA into *Pichia pastoris* cells GS115 with LiCl. The GS115 was defective with histidine (His). The transformants were selected with MD culture plate and identified by PCR. And then, the multicopy recombinant *Pichia pastoris* strain was selected by G418 resistance. The selected strain could specifically secrete 22 ku and 26 ku mPoIFN β proteins which were demonstrated by SDS-PAGE and Western blot. The mPoIFN β proteins were about 29.4%-30.8% of total secreted proteins and the concentration was about 80 mg/L. The results of physicochemical property of the secreted protein indicated that the recombinant protein was insensitive to acid (pH2), partly sensitive to heat (56 $^{\circ}$ C), and the antiviral activity could be neutralized by anti-PoIFN β serum but not by anti-PoIFN γ serum. The antiviral activity of rPoIFN β was tested by CPE₅₀ method. The results showed that the rPoIFN β was of high antiviral activity, which was 2.0×10^6 U/mg against VSV in MDBK cells. The rPoIFN β could suppress propagation of FMDV in IBRS-2 cells.

收稿日期: 2006-07-27

基金项目: 国家 863 计划基金 (2002AA245071); 湖北省科技攻关 (2004AA202B01) 资助项目

作者简介: 姚清侠 (1980-), 女, 博士, 湖北武汉人, 主要从事病毒分子生物学和免疫学研究, E-mail: yaoqingxia@sohu.com

* 通讯作者: 陈焕春, Tel: 027-87282608

Key words: porcine interferon- β ; *Pichia pastoris*; secreting expression; antiviral activity; FMDV

干扰素(Interferon, IFN)是一类具有抗病毒、抗肿瘤、调节细胞生长和免疫功能的细胞因子。根据其产生细胞、抗原特异性和分子结构的不同分为 3 种类型:(1)白细胞干扰素(IFN- α);(2)纤维母细胞干扰素(IFN- β);(3)由激活的 T 细胞和 NK 细胞产生的免疫干扰素(IFN- γ)^[1]。从人干扰素的研究进入基因水平以来,一系列干扰素制剂已成功应用于临床^[2, 3]。

对猪 β 干扰素基因的研究始于 1992 年, Artursson 等^[4]从基因组文库中扩增到猪 β 干扰素基因,研究发现猪 β 干扰素基因不含内含子,仅以单拷贝的形式存在于猪的基因组中,每 2 000 个经伪狂犬病毒(PRV)刺激的猪淋巴细胞仅能产生 1 分子的 β 干扰素 mRNA。我国于 2000 年克隆到猪 β 干扰素基因,夏春等^[5]研究证实猪 β 干扰素基因全长 561 bp,共编码 186 个氨基酸的前体蛋白,其中含 21 个氨基酸的信号肽和 165 个氨基酸的成熟多肽。

迄今为止,获得大量表达的猪 β 干扰素的方法多为原核表达^[6, 7]。毕赤酵母系统是近年来发展起来的一种表达系统,它作为另一类异源蛋白表达系统有其独到之处。一方面,它属于单细胞生物,因而保留了细菌系统易于操作和生长快速的特点;另一方面,酵母又具有真核生物细胞的亚细胞结构,故具有翻译后正确的加工和修饰功能;而且由于毕赤酵母分泌的内源性蛋白少,故而外源蛋白分泌表达后比较易于纯化。

本研究利用毕赤酵母表达系统生产猪 β -干扰素,实现了猪 β -干扰素的高效表达,对表达产物进行 Western blot 分析和微量病变抑制试验分析,结果表明重组毕赤酵母猪 β -干扰素具有较强的抗病毒活性,不仅可保护 MDBK 细胞抵抗 VSV 的攻击,还可保护 IBRS-2 细胞抵抗口蹄疫病毒(FMDV)的攻击,从而为猪 β -干扰素的进一步研究和临床应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

pcDNA3.1-PoIFN β 质粒含有猪 β 干扰素(GenBank: AY687281)全长片段,由本室保存。pPIC9K(9.3 kb)载体为携带 α 因子启动子,同时具备 Amp 和 Kan 双重抗性的酵母—大肠杆菌穿梭质

粒。毕赤酵母菌株 GS115/His⁻⁴ 及其毕赤酵母表达载体 pPIC9K 均购自 Invitrogen 公司。

1.2 细胞、病毒

牛肾细胞(MDBK)及猪肾细胞(IBRS-2)购自中国兽医药品监察所。水泡性口炎病毒(VSV)和口蹄疫病毒(FMDV)为本室保存。VSV 的 TCID₅₀ 为 10^{-7.383}/mL。FMDV 的 TCID₅₀ 为 10^{-5.8}/mL。

1.3 生化试剂

各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, DNA Marker 均为 TaKaRa(大连)公司产品; Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司; dNTPs、DNA 快速回收试剂盒购自上海生工公司; 胰蛋白酶、酵母浸出粉为 OXID 公司产品; YNB 购自 Difco 公司; 鲑鱼精 DNA(ssDNA)为 GIBCOL 公司产品; D-葡萄糖、LiCl 购自上海生工生物工程有限公司, 聚乙二醇 4000 为上海浦东高南化工厂产品; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购于 Sigma 公司。

1.4 猪 β -干扰素成熟蛋白基因的亚克隆

根据笔者已克隆测序的梅山猪 β -干扰素序列^[6], 在其成熟蛋白序列两端合成引物对。上游引物 P_L: 5'-TTTGAATTCATGAGCTATGATGTG-3', 含有 EcoR I 位点; 下游引物 P_R: 5'-TTTGCG-GCCGCTCAGTTCCGGAGGTA-3', 含有 Not I 位点。以 pcDNA3.1-PoIFN β 为模板进行 PCR, 扩增梅山猪 β 干扰素成熟肽基因 mPoIFN β 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳。切割目的片段(约 498 bp), 再以 DNA 快速回收试剂盒回收。

1.5 酵母穿梭重组质粒 pPIC9K-mPoIFN β 的构建和测序

PCR 回收产物分别用 EcoR I 和 Not I 双酶切后, 回收目的片段(mPoIFN β), 并与同样双酶切回收的穿梭质粒 pPIC9K 在 16 °C 连接过夜, 转化 DH5 α 菌株, 提取质粒, 进行 PCR、双酶切鉴定和测序, 将获得的阳性重组质粒命名为 pPIC9K-mPoIFN β 。取 5 ~ 10 μ g pPIC9K-mPoIFN β , 用 Sal I 酶切, 电泳回收 9.8 kb 片段, 置 -20 °C 备用。

1.6 酵母细胞的转化与阳性重组子的筛选

参照 Easy Select™ *Pichia* Expression Kit Introduction Manual 的说明, 用 0.1 mol/L 的 LiCl

致敏毕氏酵母菌株 GS115 制备成感受态细胞,将它与线性化的 pPIC9K-mPoIFN β 混合,在 50% PEG 与 2 mg/mL ssDNA 的辅助下,通过 42 °C 热激转化,最后涂布于 His⁻ 的 MD 平板,28~30 °C 培养 2~4 d。

将长出的酵母菌落(挑取白色大菌落)挑于 2 mL MD 培养基中 28~30 °C 培养 24 h,依照刘秋云等^[8]报道的方法提取重组酵母菌 GS115/pPIC 9K-mPoIFN β 基因组。以此基因组为模板并以酵母载体引物(5' α -factor primer: 5'-TACTATTGCCAG-CATTGCTGC-3'; 3' AOX1 Primer: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3')进行 PCR 扩增,重组在理论上应扩出 693 bp(195+498)的片段。挑取空白表达载体 pPIC9K 转化的重组菌 GS115/9K 作为对照,进行相同处理,应扩出 195 bp 片段。PCR 反应条件:95 °C 5 min;94 °C 1 min,56 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂凝胶电泳鉴定。

1.7 多拷贝插入重组子的筛选

将通过 MD 平板初步筛选获得的约 700 个转化子经含不同浓度 G418(0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL)的 MD 平板进一步筛选多拷贝插入的重组子。在 4.0 mg/mL 的 MD 平板上获得高抗菌株。

1.8 酵母阳性重组子的诱导表达

将此高抗菌株菌落挑入 2 mL BMGY,28~30 °C 培养 24 h,待 OD₆₃₀ 达到 10 后,以 1:10 的比例转入 BMMY 中连续培养 4 d,期间每隔 24 h 加甲醇 1 次,使其终浓度为 1%,离心收集上清。进行 SDS-PAGE 及 Western blot 分析。

1.9 抗猪 β -干扰素血清的制备

以 pcDNA3.1-PoIFN β 按 200 μ g/只肌肉免疫家兔,每周注射 1 次,共免疫 3 次。心脏采血收集兔抗猪 β -干扰素血清,分装于 -80 °C 备用。

1.10 猪 β -干扰素理化性质的鉴定

1.10.1 对胰酶的敏感性 向重组猪 β -干扰素中加入 0.25% 的胰酶液 37 °C 水浴作用 30 min 后,立即在 MDBK-VSV 系统上测定效价,并设立对照。

1.10.2 对热的敏感性 将重组猪 β -干扰素水浴(56 °C)加热 2 h,测定效价,并设立对照。

1.10.3 对酸的敏感性 将重组猪 β -干扰素用 HCl 调 pH 值至 2.0,4 °C 放置 24 h,用 NaOH 将 pH 值调回后,测定效价,并设立对照。

1.10.4 与抗猪干扰素抗体的中和试验 分别制备

抗猪 β -干扰素抗体和抗猪 γ -干扰素抗体(以 pcDNA-PoIFN β 、pcDNA-PoIFN γ 免疫兔体收取血清)。将重组猪 β -干扰素分别等量与上述抗体混合后,37 °C 水浴作用 1 h,然后测定效价。同时设阴性兔血清做对照。

1.11 猪 β -干扰素抗 VSV 活性的测定

微量细胞病变抑制法测定重组酵母猪 β -干扰素生物学活性,采用牛肾细胞 MDBK-VSV 系统测定^[9]。将抑制 50% 细胞病变(CPE₅₀)出现孔的干扰素最高稀释度定为 1 个干扰素活性单位(U)。分别以镜下观察结果和甲基紫染色法测定表达产物活性单位。

甲基紫染色法^[10]:用 100 μ L PBS 洗涤各孔 1 次。每孔加入 100 μ L 甲基紫染液(5 g/L 结晶紫溶于 70% 甲醇),染色 1 min,倾除染液,以自来水轻轻洗涤 96 孔板,自然干燥,肉眼观察结果,标准同上。

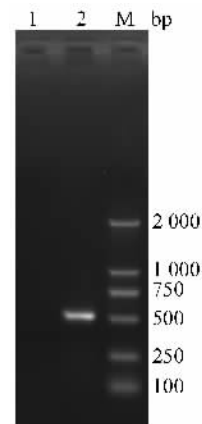
1.12 猪 β -干扰素抗 FMDV 活性的测定

IBRS-2 细胞接种于 96 孔细胞培养板,待细胞长至单层后,加入不同稀释滴度的猪 β -干扰素,24 h 后以 100 TCID₅₀ FMDV 攻毒,观察其抗口蹄疫病毒的效价。

2 结果

2.1 猪 β -干扰素成熟蛋白基因的克隆

以 P_L(含有 EcoR I 位点)和 P_R(含有 Not I 位点)为引物扩增到梅山猪 β -干扰素成熟肽基因 mPoIFN β (498 bp),如图 1 所示。



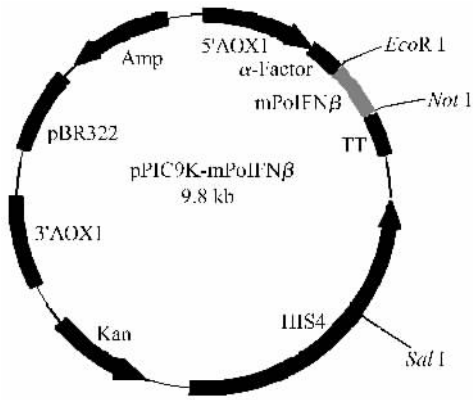
1. Negative control; 2. PCR product of mPoIFN β ; M. DNA marker (DL2000)

图 1 猪 β -干扰素成熟蛋白基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR product of mature protein gene of porcine interferon- β

2.2 重组穿梭质粒 pPIC9K-IFN β 的构建与鉴定

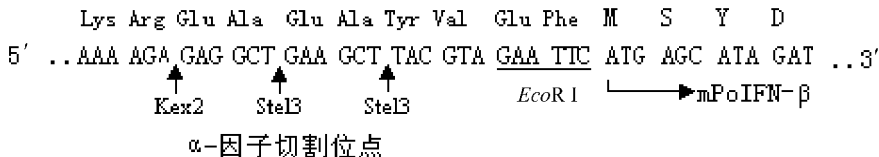
pPIC9K-mPoIFN β 重组穿梭质粒的构建见图 2; α 因子切割位点如图 3 所示。用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切重组质粒 pPIC9K-mPoIFN β , 1% 琼脂糖凝胶电泳在 9.3 kb 和 498 bp 处发现条带, 与预计结果相符(图 4)。



The porcine interferon- β gene cut off signal peptide was inserted into pPIC9K, the shuttle vector between *E. coli* and *P. pastoris*. The upstream and downstream of mPoIFN β were designed with *EcoR* I and *Not* I site, respectively

图 2 重组穿梭质粒 pPIC9K-mPoIFN β 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant pPIC9K-mPoIFN β



↑. α 因子的切割位点 ↑. The digest sites of α -factor

图 3 α 因子信号序列和猪 β 干扰素编码序列间的核苷酸序列

Fig. 3 DNA sequence of α -factor signal and amino acid sequence of porcine interferon- β

2.5 mPoIFN- β 抗 VSV 病毒活性的检测

GS115/pPIC9K-mPoIFN β 阳性菌株以 1% 甲醇连续诱导 4 d 后取上清, 经 0.22 μ m 的滤膜过滤后, 以不同的稀释滴度与 MDBK 细胞共孵育 24 h, 然后以 100 TCID₅₀ 的水泡性口炎病毒(VSV)攻击, 检测结果表明, 上清中表达的蛋白对 VSV 表现出较高的抗病毒活性, 能够有效抑制 VSV 病毒对 MDBK 细胞的致病作用, 将抑制 50% 细胞病变的干扰素的最高稀释度定为 1 个干扰素单位, 显微镜下观察结果与结晶紫染色后肉眼观测结果一致, 其抗病毒效价达到 1.6×10^5 U/mL, 比活性达到 $2.0 \times$

2.3 重组酵母菌株的筛选

将 pPIC9K-mPoIFN β 重组质粒及 pPIC9K 空载体分别用 *Sal* I 线性化后, 回收线性化产物转化毕氏酵母 GS115, 利用 MD 选择性培养基挑选出生长快, 菌落白、大、圆的菌株, 并提取其基因组, 以 5' 端 α -factor primer 和 3' AOX1 Primer 为上下游引物进行 PCR 鉴定, 筛选含有目的基因片段的重组子。若 mPoIFN β 与酵母成功重组则应扩增出 693 bp (195+498) 的片段, 若未重组则只能扩出 195 bp 的小片段, 从图 5 可见成功重组。

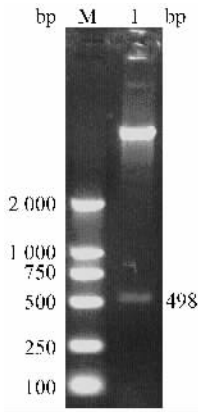
2.4 重组猪 β -干扰素的诱导表达、SDS-PAGE 及 Western blot 分析

挑取 GS115/pPIC9K-mPoIFN β 阳性酵母菌及 GS115/pPIC9K 对照菌落, 用 1% 甲醇连续诱导 4 d 后离心取上清进行 SDS-PAGE, 结果如图 6A 所示。可见与空白菌比较, 重组菌诱导表达上清液在分子量约 22 ku 和 26 ku 2 处有明显特异性条带出现, 比预期的 mPoIFN β 分子量(19.1 ku)稍大。分泌表达的猪 β 干扰素的量约为 80 mg/L, 占可溶性总蛋白的 29.4%~30.8%。取表达的上清用 75% 硫酸铵 4 $^{\circ}$ C 沉淀过夜, 以 PBS (pH 7.4) 透析 24 h, 然后进行 Western blot 分析。确证 GS115/pPIC9K-mPoIFN β 分泌表达了有免疫活性的 PoIFN β (图 6B)。

10^6 U/mg。

2.6 mPoIFN- β 理化性质

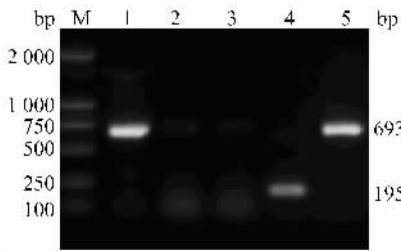
将上清经胰酶处理后完全失去活性; pH 2 的盐酸处理过夜其抗病毒活性下降很少(耐酸); 56 $^{\circ}$ C 作用 2 h, 其抗病毒活性下降一半(对热部分敏感); 与特异性的抗猪 β 干扰素抗体 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h 后, 活性完全被中和, 说明特异性的抗猪 β -干扰素抗体能特异性地与之相结合, 而抗猪 γ -干扰素的抗体或阴性兔血清都不能降低它的抗病毒活性, 这也证明所表达的蛋白是猪 β -干扰素(表 1)。



M, DNA marker (DL2000); 1. Recombinant plasmid pPIC9K-mPoIFN β digested by *EcoR* I and *Not* I

图4 酶切鉴定重组质粒 pPIC9K-mPoIFN β

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pPIC9K-mPoIFN β by *EcoR* I and *Not* I



M, DNA marker (DL2000); 1. Positive control; 2. Negative control; 3. PCR products amplified from GS115; 4. PCR product amplified from GS115/pPIC9K; 5. PCR product amplified from GS115/pPIC9K-mPoIFN β

图5 重组酵母菌基因组 DNA 的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR products from the yeast genome DNA

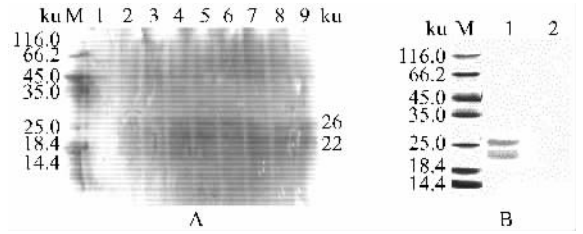


Fig. A, M, Protein molecular weight marker; 1. Supernatant of GS115/pPIC9K induced by 1% methanol; 2-9. Supernatant of GS115/pPIC9K-mPoIFN β induced by 1% methanol

Fig. B, M, Protein molecular weight marker; 1. Supernatant of GS115/pPIC 9K-mPoIFN γ induced by 1% methanol for 96 h; 2. Negative control of Supernatant GS115/pPIC9K induced by 1% methanol for 96 h

图6 重组酵母上清的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

Fig. 6 SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant yeast supernatants

表1 mPoIFN- β 的理化特性

| Table 1 Characteristics of recombinant mPoIFN- β | | % |
|--|------------------------------------|---|
| 处理 | 保留活性 | |
| Treatment | mPoIFN- β activity remaining | |
| 0.25% trypsin | 0 | |
| HCl(pH2) | 95~100 | |
| 56 $^{\circ}$ C 2 h | 50~60 | |
| Rabbit anti-PoIFN β | 0 | |
| Rabbit anti-PoIFN γ | 100 | |
| Preimmune serum | 100 | |

These assays utilized vesicular stomatitis virus on MDBK cell

2.7 mPoIFN- β 抗 FMDV 病毒活性

将酵母上清经 1 000~64 000 倍比稀释后加入长满的 IBRS-2 细胞, 24 h 后以 100TCID₅₀ 的 FMDV 攻毒, 可见 32 000 倍稀释的重组猪 β 干扰素尚可保护 IBRS-2 细胞 (表 2)。

表2 mPoIFN- β 抗 FMDV 病毒结果(CPE₅₀)

Table 2 Anti-FMDV activity (CPE₅₀) of mPoIFN- β

| 组别 | Challenged by FMDV | 稀释倍数 Dilution | | | | | | |
|-----------------|-----------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| | | 1 : 1 000 | 1 : 2 000 | 1 : 4 000 | 1 : 8 000 | 1 : 16 000 | 1 : 3 2000 | 1 : 64 000 |
| rPoIFN- β | 100TCID ₅₀ | - | - | - | - | - | - | + |
| Control | 100TCID ₅₀ | + | + | + | + | + | + | + |

+ . CPE₅₀ positive; - . CPE₅₀ negative

3 讨论

毕赤酵母 *Pichia pastoris* 是近几年发展起来的真核表达系统 [11, 12]。作为一种新型真核表达系统, 能对所表达的外源蛋白进行加工、折叠、翻译后

修饰(信号肽切割、蛋白折叠、二硫键的形成、某些脂类的添加以及 O-联和 N-联糖基化等), 并将其分泌到培养基中, 分离纯化简便, 因而是一种较为理想的真核蛋白表达系统 [13~15]。

本试验中所选用的酵母菌 GS115 由 NRRL-

Y11430 (Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL) 衍生而来^[11], 是一种营养缺陷型菌株, 本身不能合成组氨酸, 只有当表达载体转化酵母后利用载体上所携带的编码 *HIS4* 基因 (2.4 kb) 才能合成组氨酸。利用 GS115 的此种生长特点, 使用缺乏组氨酸的选择性 MD 平板就可以筛选到重组的酵母菌株。然而在缺乏组氨酸的平板上长出的 His⁺ 转化子并非 100% 发生重组, 一般有 50% ~ 80% 发生重组, 余下的 His⁺ 转化子可能是标记基因 *HIS4* 整合到宿主的同源位点而其他的载体序列没有整合的缘故^[16]。即使正确重组, 也可能由于重组质粒的拷贝数低而造成外源基因的低量表达。因此, 利用 pPIC9K 是 Kan^r 的表达载体, 而细菌的卡那霉素抗性基因也可抵抗与真核抗生素 G418 相关的药物的特点^[17], 可以认为对 G418 抗性的高低与卡那霉素抗性基因的拷贝数相关, 也就是与载体的拷贝数相关。通过这种方法, 在本试验中选用 700 个转化子在含高浓度 G418 (4.0 mg/mL) 的平板中筛选到 1 株高表达的酵母菌株, 利用 G418 筛选及 PCR 鉴定的方法大大减少筛选高表达的酵母工程菌的工作量。

与大肠杆菌表达系统相比, *P. pastoris* 最重要的优点在于它的高效分泌表达。本试验中将猪 β -干扰素成熟蛋白基因与 α -分泌信号肽融合表达^[18], 使重组蛋白在 α -分泌信号肽的引导下穿过细胞膜被分泌到培养基中, 易于分离和纯化, 可获得高活性重组蛋白。若采用发酵罐高密度培养技术, 可进一步提高表达量^[11]。由于酵母分泌的内源性蛋白比较少, 所以分泌的异源蛋白在培养基中占绝大部分。因此, 引导异源蛋白分泌到培养基中, 其实也达到了初步纯化的效果。本试验中, 将重组菌 GS115/pPIC9K-mPoIFN β 的诱导上清经 SDS-PAGE 与 Western blot 分析, 证实表达的重组蛋白 mPoIFN- β (22 ku 和 26 ku) 在 α -factor 信号肽的引导下被分泌到 *P. pastoris* 胞外, 分泌表达猪 β 干扰素的量约为 80 mg/L, 占可溶性总蛋白的 29.4% ~ 30.8%。

虽然几种不同分泌信号序列, 包括异源蛋白天然的分泌信号, 都在 *P. pastoris* 中得到成功的应用, 但目前应用最为成功是酿酒酵母的 α -MF 信号肽。这个信号序列 N 端是由 19 个氨基酸残基组成的前体信号, 接下来是 1 个由 66 个残基组成的原蛋白序列, 含有 3 个保守的 N-联糖基化位点和 1 个双碱性 Kex2 内源蛋白酶切割位点^[19]。信号肽的切割

分 3 步进行。第 1 步内质网中的信号肽酶将 pre 信号切除, 第 2 步 Kex2 内源蛋白酶在 pro 前导序列的精氨酸和赖氨酸间切割, 第 3 步 Ste13 蛋白将 Glu-Ala 的重复序列切掉^[20]。整个过程能否有效地进行与切割位点周围氨基酸序列有关。另外, 蛋白质的四级结构也可以保护切割位点免受相关酶的切割。本研究分泌表达产物为 22 ku 和 26 ku 的混合物, 比预期 mPoIFN β 片段 (19 ku) 稍大, 其可能原因: 虽然 α -factor 分泌信号在分泌后其信号肽被切除, 但其前导区 (约 60 个氨基酸, 6.5 ku 左右) 未被 Kex2 酶切除。进一步的证实尚需通过 N 端氨基酸测序。虽然切割不完全但并不影响其活性; 对水泡性口炎病毒 (VSV) 在牛肾细胞 (MDBK) 中的增殖有明显的抑制作用, 其抗 VSV 活性达到 2.0×10^6 U/mg。对口蹄疫病毒 (FMDV) 在猪肾细胞 (IBRS-2) 中的增殖也有明显的抑制作用。

目前, 人干扰素已成为用于临床的治疗人类疾病的基因工程药物, 然而在动物疾病的临床治疗上相关报道还极为少见。本试验选择毕氏酵母表达系统表达猪 β 干扰素, 为研究和开发重组猪干扰素- β 类生物治疗制剂及免疫佐剂奠定了基础。

参考文献:

- [1] Williams J G, Jurkovich G J, Maier R V. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine [J]. *J Surg Res*, 1993, 54(1): 79~93.
- [2] Goodin D S, Frohman E M, Garmany G P Jr, et al. Disease modifying therapies in multiple sclerosis; report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the american academy of neurology and the MS council for clinical practice guidelines [J]. *Neurology*, 2002, 58(2): 169~178.
- [3] Chiarion-Sileni V, Del Bianco P, Romanini A, et al. Tolerability of intensified intravenous interferon alfa-2b versus the ECOG 1684 schedule as adjuvant therapy for stage III melanoma: a randomized phase III Italian Melanoma Inter-group trial (IMI - Mel. A.) [J]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 44.
- [4] Artursson K, Gobl A, Lindersson M, et al. Molecular cloning of a gene encoding porcine interferon-beta [J]. *J Interferon Res*, 1992, 12(3): 153~160.
- [5] 夏春, 刘津, 杨洪, 等. 猪干扰素 β 基因的分子克隆和测序 [J]. *中国兽医杂志*, 2000, 26(6): 6~7.
- [6] 彭贵青, 陈焕春, 钱平, 等. 梅山猪 β 干扰素基因的克隆、原核表达及生物活性 [J]. *中国兽医学报*, 2005,

- 25(1): 40~42.
- [7] 曹瑞兵,包晶晶,周海霞,等. 猪 β 干扰素的原核表达及其对猪流行性腹泻病毒的抑制作用研究[J]. 中国病毒学,2004,19(4):364~368.
- [8] 刘秋云,罗 樾,何康泽,等. 快速制备酵母质粒和基因组 DNA PCR 模板[J]. 微生物学通报,2001,28(5): 77~79.
- [9] 张德震,吴淑华,侯云德,等. 重组人 γ 干扰素的纯化[J]. 病毒学报,1989,5(1):3~8.
- [10] Rubinstein S,Familletti P C,Pestka S. Convenient assay for interferons[J]. J Virol,1981,37(2): 755~758.
- [11] Cereghino J L,Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. FEMS Microbiology Reviews,2000,24(1): 45~66.
- [12] 章如安,杨 晟,邱荣德,等. 巴斯德毕赤酵母表达体系研究及进展[J]. 微生物学通报,2000,27(5): 371~373.
- [13] Hong F,Meinander N Q,Jonsson L J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnol Bioeng,2002,79(4): 438~449.
- [14] Sreekrishna K,Brankamp R G,Kropp K E, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Gene,1997,190(1): 55~62.
- [15] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression[J]. Curr Opin Biotechnol,1995,6(5):527~533.
- [16] Cregg J M,Cereghino J L,Shi J. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. Mol Biotechnol,2000,16(1):23~52.
- [17] Scorer C A,Buckholz R G,Clare J J. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Gene,1993,136(1-2): 111~119.
- [18] Farrarese L,Trainotti L,Gattolin S. Secretion, purification and activity of two recombinant pepper endo- β -1,4-glucanases expressed in the yeast *Pichia pastoris* [J]. FEBS Lett,1998,422(1):23~26.
- [19] Kurjan J,Herskowitz I. Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor[J]. Cell,1982,30(3): 933~943.
- [20] Brake A J,Merryweather J P,Coit D G, et al. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1984,81(15): 4 642~4 646.