

新型融合基因 hIFN α 1-CB在大肠杆菌中表达邱定红^①,毛晓华,高向东¹,李新荣,林碧蓉¹,徐 衡(东南大学基础医学院,南京 210009; ¹中国药科大学生物制药学院,南京 210009)

摘要 目的 构建人干扰素 α 1和抗菌肽B的融合蛋白表达质粒pHC,并初步研究融合蛋白的抗病毒活性。方法 重组质粒pHC转化*E. coli* JM83,温控诱导表达,SDS-PAGE制备蛋白质,病变抑制法测定其抗病毒比活性。结果 得到分子量约为21ku的目的蛋白,抗病毒比活性为 2.62×10^6 IU/mg。结论 成功构建了融合蛋白表达质粒pHC,重组蛋白的构象及C-端的 β 位酰胺化等因素可能影响重组蛋白的生物学活性。

关键词 基因重组;人干扰素;抗菌肽B;抗病毒活性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)06-0521-05

干扰素(Interferon, IFN)主要分为 α -IFN, β -IFN, ω -IFN和 γ -IFN。干扰素有广谱的抗病毒活性、抗肿瘤作用和免疫调节功能。抗菌肽(Antibacterial Peptide, AP)最早在昆虫体内发现,是昆虫免疫应答的产物,迄今已从动物界不同组织中分离和鉴定出100多种具有抗菌作用的肽类物质。Cecropins是其中一种,亦称为天蚕素。抗菌肽分子量小、热稳定、水溶性好,具有抗菌、抗病毒和杀伤肿瘤细胞的功能,而不破坏人体正常细胞。基于它的这种选择性效应和分子无抗原性的特点,抗菌肽可望成为新一代的抗菌、抗病毒、抗肿瘤的药物。然而,天然抗菌肽来源十分困难,不能满足研究和临床应用的需要,通过基因工程技术生产抗菌肽已成为人们普遍关注的焦点。

由于人干扰素、抗菌肽在医学研究方面有着不可估量的前景,国内外学者通过各种途径研制干扰素和抗菌肽。重组的hIFN α 十多年前就用来治疗某些肿瘤^[1]。近年来,我国病毒基因工程国家重点实验室利用噬菌体显示技术改造人干扰素 α 1,得到高受体结合能力和高比活性的新人干扰素 α 1^[2,3];天然抗菌肽和抗菌肽的类似物的研究更是层出不穷。早在1987年, Jaynes等就报道将修饰过的天蚕素B基因以融合蛋白的方式在大肠杆菌中表达。我国的谢维^[4]等也积极寻找更高活性的抗菌肽,他们的研究还证明抗菌肽与其它因子融合,抗菌肽的抗菌作用受到抑制。受他们启发,我们选择自然界中活性最强的抗菌肽B(CB)cDNA与人干扰素 α 1cDNA融合,构建融合蛋

白表达质粒,通过大肠杆菌表达,以期得到具更强抗病毒、抗肿瘤活性的药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒 *E. coli* JM83东南大学医学院生化教研室保存, pUCNde-hIFN α 1 pUCNde-CB由本室构建,分别克隆有hIFN α 1和CB cDNA; pBV220原核表达质粒,含有 λ 噬菌体启动子P_{tr} P_L,由南京军事医学研究所张林元教授馈赠。

1.1.2 工具酶 内切酶、T₄连接酶购自大连宝生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA操作 DNA提取、酶切、电泳、回收、纯化方法见《分子克隆》(金冬雁等译)。

1.2.2 重组表达质粒pHC诱导表达 接种转化有pHC的*E. coli* JM83单菌落至1.5ml LA(含有80 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基), 30 $^{\circ}$ C培养过夜,转1ml过夜培养菌至40ml LA, 30 $^{\circ}$ C振荡培养至OD₆₀₀ \approx 0.4后转至40 $^{\circ}$ C摇床诱导表达。分别取诱导1, 2, 3, 4h菌液1ml,离心收集菌体,加1 \times SDS凝胶加样缓冲液100 μ l,混匀,沸水浴5min,取15 μ l行6%~20%梯度SDS-PAGE,考马斯亮蓝R250染色。

1.2.3 包涵体制备 收集40 $^{\circ}$ C诱导3h的600ml

① 收稿日期 2002-04-09 * 通讯作者 Tel 025-3272474

基金项目 铁道部科技基金和东南大学教育基金资助项目(JP72013, 9223001165)

培养液中菌体,溶于 50 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl 裂解缓冲液中,加 PMSF 至终浓度为 0.5 mmol/L,超声破碎细胞,离心,洗涤缓冲液 (50 mmol/L Tris-Cl [pH 8.0], 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100) 漂洗,沉淀即为包涵体。

1.2.4 融合蛋白快速纯化 漂洗后的包涵体加 6 ml 1% SDS 凝胶加样缓冲液, 42°C 温浴溶解包涵体,溶解后的包涵体蛋白拟 6%~20% 梯度制备性 SDS-PAGE, 凝胶用预冷的含 0.25 mol/L KCl 和 1 mmol/L DTT 的染色液染色,切取目的蛋白条带,置于硅化的玻璃管中。用 1 mmol/L DTT 漂洗,研碎胶条,加 3 倍体积的浸提缓冲液 (50 mmol/L Tris-Cl [pH 8.0], 0.1% SDS, 0.1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT, 150 mmol/L NaCl) 洗脱,离心,取上清;用 4 倍体积的预冷 (-20°C) 丙酮沉淀蛋白;所得沉淀以含 6 mol/L 盐酸胍的稀释缓冲液 (50 mmol/L Tris-Cl [pH 8.0], 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 150 mmol/L NaCl, 20% 甘油) 溶解;加 20 倍体积的稀释缓冲液,室温过夜复性;重新装入透析袋,用稀释缓冲

液透析;适当浓缩。取适量拟 6%~20% 梯度 SDS-PAGE, 观察重组蛋白纯度。

1.2.5 抗病毒活性检测 按文献方法进行^[5]。采用 VSV-WISH 系统进行,抗病毒活性测定采用病变抑制法,以 50% 保护的稀释度为终浓度,并用标准干扰素校正。

2 实验结果

2.1 重组质粒 pBV220-hIFN α 1-CB 的构建

pBV220 用 *Eco*R I / *Bam*H I 双酶切,去掉两酶切位点间约 10bp 的小片段,使其线性化。pUCNde-hIFN α 1 用 *Eco*R I / *Nde*I 双酶切分离出约 490bp hIFN α 1 cDNA 片段; pUCNde-CB 用 *Nde*I / *Bam*H I 双酶切分离出约 130bp CB cDNA 片段。将这两个基因片段与线性化的 pBV220 重组,连接后转化 *E. coli* JM83 整个重组表达质粒构建如图 1。由于线性化后的 pBV220 不可能自身环化,因此理论上讲 Amp 抗性菌落应含有所需要的重组质粒。为此,从 Amp

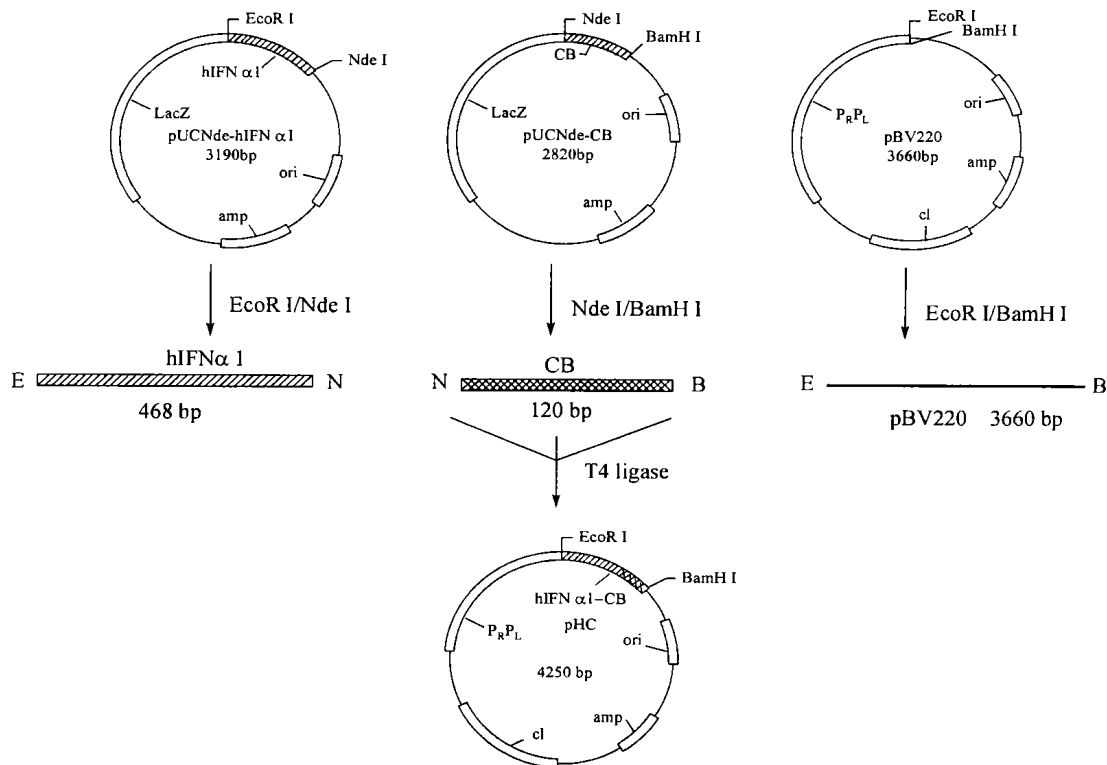
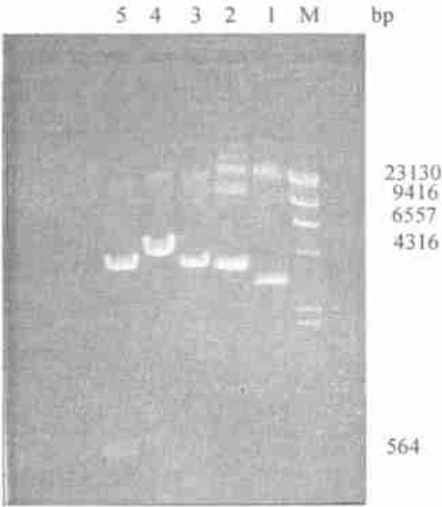


Fig 1. Construction of expression vector pHC

抗性菌落抽提质粒进行酶切分析(图 2),经 *EcoRI* 酶切后片段约 4.2 kb(泳道 4),此为空载体及 hIFN α 1 cDNA 和 CB cDNA 之和;经 *EcoRI* /*Bam* H I 双酶切后,除产生 3.6kb的空载体之外,还出现了 580 bp 的小片段(泳道 5),此即为所克隆的 hIFN α 1-CB DNA,测序正明与文献报道一致。这些结果表明我们获得了插入有融合基因 hIFN α 1-CB 的重组表达质粒 pBV220-hIFN α 1-CB,将其命名为 pHC



M: Lambda DNA/*Hind* III; Lane1: pBV220; Lane2: pHC; Lane3: pBV220/*EcoRI*; Lane4: pHC/*EcoRI*; Lane5: pHC/*EcoRI* + *Bam* H I

Fig 2 Restriction Analysis of pHC

2.2 重组质粒 pHC 的诱导表达

pHC 是温控表达质粒,由噬菌体的强启动子 PRPL 启动转录。PRPL 受温度敏感性阻遏蛋白调控,通常选择 42℃ 进行诱导表达,但我们发现就 pHC 而言 40℃ 诱导效果要好于 42℃,可能的原因是目的蛋白在 42℃ 时稳定性差,易被宿主菌降解。图 3 是 hIFN α 1-CB 融合基因在大肠杆菌中表达分析,诱导 1, 2, 3, 4 h 后可见约 21 kD 的蛋白带(泳道 1, 2, 3, 4),与设计的大小相符合,而未诱导的样品缺乏此条带(泳道 0),因此,此诱导带即为目的蛋白。融合蛋白经初步定位,主要以包涵体形式存在。

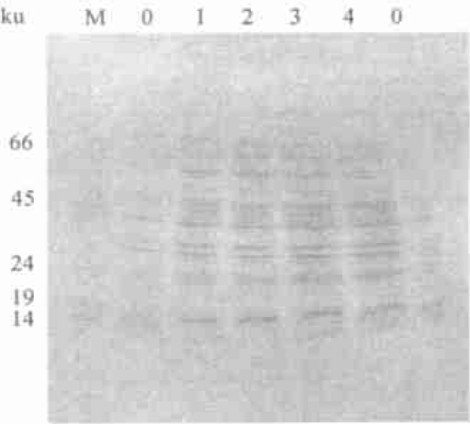
2.3 目的蛋白纯化

Tab 1. Examine protective percentage(%) of fusion protein antiviral activity by CPE

Samples	Dlution 4 ⁻¹			4 ⁻²			4 ⁻³			4 ⁻⁴			4 ⁻⁵			4 ⁻⁶			4 ⁻⁷			4 ⁻⁸		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Standard IFN α 1	0	4	100	1	3	92	1	3	83	2	2	64	2	2	45	2	2	27	3	1	8	4	0	0
Purified hIFN α 1-CB	0	4	100	0	4	100	1	3	92	1	3	82	2	2	60	2	2	40	3	1	18	3	1	8

A: Abnormal average(per well) B Normal average(per well) G Protective percentage

制备性 SDS-PAGE 纯化包涵体中目的蛋白,经变性、复性后,取约 3 μ g 样品电泳检测,结果见图 5 重组蛋白的纯度达 70%。



M: Protein molecular weight Marker; Lane 0: without induction; Lane 1, 2, 3 and 4: 1, 2, 3 and 4 h after thermal induction respectively.

Fig 3. SDS-PAGE analysis of hIFN α 1-CB expression in *E. coli*



M: Protein molecular weight Marker; Lane 0: without induction; Lane 3: 3 h after induction; Lane 1: Purified fusion protein.

Fig 4. Fusion protein purified by preparative SDS-PAGE

2.4 抗病毒活性检测

2.4.1 以抗病毒作用为指标,分析 hIFN α 1-CB 融合蛋白生物学活性,结果见表 1

2.4.2 当融合蛋白稀释至 4^{-55} 时,能保护半数细胞免受攻击病毒损害,经标准品修正,包涵体中经过纯化的融合蛋白比活性 2.62×10^6 IU/mg,结果见表 2

Tab 2 Distance ratio of sample

Sample	standard IFN α 1	purified hIFN α 1-CB
Distance ratio	0.74	0.5

表 2表示当融合蛋白稀释到 4^{-55} 时,能保护半数细胞免受攻击病毒损害,经标准品修正,包涵体中经过纯化的融合蛋白比活性 2.62×10^6 IU/mg

3 讨 论

表达质粒 pBV220是温控诱导表达载体,是我国张智清等构建。我们通过特异的引物对人干扰素 α 1进行改造,氨基端去掉信号肽序列,羧基端去掉 11个氨基酸,这种分子改造不影响干扰素的活性^[6]。hIFN α 1 cDNA和 CB cDNA以特定方向连接至酶切线性化的 pBV 220 PRPL启动子下游 Eco R 位点连接 hIFN α 1 cDNA 5'端,hIFN α 1 cDNA 3'端 Nde I 位点连接 CB cDNA 5'端,CB cDNA 3'端 Bam H 位点连接至线性化的 pBV 220另一端,这样构建了重组表达质粒 pHc 两个片段拼接后大小为 588bp,编码 195个氨基酸的融合蛋白,分子量约为 21 ku,1~ 156为干扰素氨基酸序列;159~ 195为抗菌肽氨基酸序列;连接部位两个氨基酸分别是组氨酸和蛋氨酸,即 CATATG(Nde I 识别位点)所编码的序列。我们将 pHc导入 *E. coli* JM83菌株,40℃诱导表达,制备性 SDS-PAGE纯化融合蛋白,根据卫生部标准,初步研究了融合蛋白抗病毒活性,比活性为 2.62×10^6 IU/mg 活性相对较低的原因可能有以下几点:①人干扰素 α 1有五个 Cys,形成两个二硫键,其中 29~ 139之间的二硫键维持人干扰素 α 1的天然结构和热稳定性,对干扰素 α 1的抗病毒活性至关重要^[6],融合蛋白复性时一些因素如 DTT可能影响二硫键的正确形成。②有人认为 C端酰胺化是抗菌肽完整功能所不

可缺少的^[7],为了模拟天然抗菌肽,解决 *E. coli* 无翻译后酰胺化修饰之问题,我们在终止密码前设计一个天冬酰胺密码子 AAC,以便直接翻译出 C端带酰胺的多肽 这种 β 位酰胺基团与天然抗菌肽中 α 位酰胺基团对抗菌活性作用的差异尚不清楚,谢维等认为加入天冬酰胺密码子 AAC的基因,编码出 C端带有酰胺基团的抗菌肽具抗菌活性^[2,3],但它是否影响其抗病毒活性还有待研究 ③融合蛋白 hIFN α 1和 CB仅间隔两个氨基酸(分别是 H和 M),且其中之一为极性碱性氨基酸,这样可能妨碍 hIFN α 1和 CB折叠成相对独立的高级结构 因此,可以通过优化复性体系以及 hIFN α 1和 CB之间插入连接肽等方法进一步提高重组蛋白的活性 要说明的是,我们仅测定了重组蛋白的抗病毒作用,对该蛋白的抗肿瘤作用等未作测定,只有对这些指标进行综合分析,才能全面评价 hIFN α 1-CB融合蛋白的生物学功能及活性

参 考 文 献

[1] Lawrence MP, Charles AD, Ronald BH, et al. Biological properties of recombinant α -interferons 40th anniversary of the discovery of interferons cancer research. 1998, 58 2489-2499.

[2] 马学军 (Ma XJ),胡 荣 (Hu R),吕 海 (LU H)等.噬菌体显示技术改造人干扰素 α 1C/86D的研究 [J]. 中国科学 (C辑), 1999, 29(2): 209-216.

[3] 马学军 (Ma XJ),杜东毅 (Du DY),尹华丽 (Yin HL)等.特异结合人 hIFN α 1b中和抗体两个短肽 [J]. 病毒学报, 1997, 13(2): 169-172.

[4] 谢 维 (Xie W),奚 非 (Dou F),吴海宏 (Wu HH)等.抗菌肽 CMIV突变基因在 *E. coli* 中融合表达的研究 [J]. 中国科学 (C), 1997, 27(3): 278-283.

[5] 中国生物制品规程 (一部). 北京: 中国人口出版社, 1996.

[6] 侯云德编著. 分子病毒学. 北京: 学苑出版社, 1990. 589-642.

[7] Hellers M, Gunne H, Steiner H. Expression and post-translational procession of preprocecropin A using a baculovirus vector [J]. Eur J Biochem, 1991, 199 435-439.

Expression of a Novel Fusion Gene hIFN α 1-CB in *E. coli*

QIU Ding-Hong, MAO Xiao-Hua, GAO Xiang-Dong¹, LI Xin-Rong, LIN Bi-Rong¹, XU Heng
Department of Biochemistry, Medical School of Southeast University, Nanjing 210009; ¹School of Biopharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

ABSTRACT **AIM** To construct a plasmid expressing fusion protein, and to study the antiviral activity of the proteins. **METHODS** Artificially modified hIFN α 1 cDNA was fused precisely to the reading frame of CB cDNA and further cloned into expression vector pBV 220. The plasmid was transformed into *E. coli* and expressed under thermal induction. The fusion protein was purified by preparative SDS-PAGE. **RESULTS** Expression analysis revealed accounts for 2.8% of total cellular proteins. Antiviral activity of this fusion protein was 2.62×10^6 IU/mg by CPE. **CONCLUSION** We succeeded in constructing the recombinant plasmid expressing hIFN α 1-CB fusion proteins. Factors such as non-native conformation and β -amidation were responsible for the low activity of hIFN α 1-CB fusion molecule.

KEY WORDS Gene recombination; Human interferon α 1(hIFN α 1); Cecropin B(CB); Antiviral activity

。 校园信息。

中国药科大学 2002年 10月国际(地区)学术交流信息

- △ 10月 2日 中药学院 闵知大教授应邀赴香港科技大学进行为期一个月的合作研究。
- △ 10月 8日 应我校邀请,日本九州大学药学部学部长 姬野胜教授和末宗洋教授来校访问。
- △ 10月 11日 以日本高木康为首的日本长崎县药剂师会代表团一行 11人来校考察访问。
- △ 10月 12日 应我校邀请,日本贵志丰和教授来校作有关生药学方面的系列讲座。
- △ 10月 13日 经我校推荐并经澳门大学录取,药学院硕士研究生陈莹、中药学院硕士研究生万建波和余华、商学院硕士研究生胡元佳赴澳门大学攻读硕士学位课程,作为我校与澳门大学商定的联合培养研究生项目。
- △ 10月 13日 美国弗吉尼亚大学沈宗瀛教授应邀来我校作系列讲座。
- △ 10月 14日 法国巴黎十一大学药学院 PROGNON

- 教授应邀来我校基础部进行合作研究。
- △ 10月 17日 李萍教授应台湾中国医药学院的邀请,赴该校参加“2002年中草产业技术品质管制研讨会”。
- △ 10月 22日 制药有限公司总经理王强应邀随南京市经济委员会组织的医药访问团赴美国和加拿大进行招商考察。
- △ 10月 25日 应日本岐阜药科大学的邀请,吴晓明校长和王季平处长赴该校参加日本岐阜药科大建校 70周年校庆。
- △ 10月 30日 应我校邀请,日本岐阜药科大葛谷昌之校长、事务局长水谷治雄先生、森裕志教授来校访问并讲学。同时恰逢今年两校建立校际交流关系 20周年,10月 31日,三位外宾参加了我校举行的中国药科大学和日本岐阜药科大学建立 20周年庆典。