

干扰素与转铁蛋白融合蛋白在毕赤酵母中的表达及鉴定

李晓静 张 豪 薛 冲 李彦英 陈 璟 苗 林 方宏清* 陈惠鹏*

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 利用重叠 PCR 技术将干扰素(interferon, IFN)基因与转铁蛋白 N 端半分子(transferrin N-terminal half-molecule, TFN)基因在体外融合, 融合基因和单独的 TFN 基因分别克隆至真核表达载体 pPIC9 中, 转化毕赤酵母 GS115, 得到的转化子经诱导表达后在发酵上清中均获得了表达. 经 SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析、Phenyl Sepharose Fast Flow 疏水层析纯化, 获得了纯度大于 93% 的重组融合蛋白 IFN-TFN 和纯度大于 95% 的重组 TFN 样品. 生物活性实验证明融合蛋白 IFN-TFN 具有抗病毒活性. 铁饱和实验证明融合蛋白 IFN-TFN 和单独的 TFN 具有相同的铁结合能力. 因而 TFN 可望作为 IFN 的天然运输载体.

关键词 转铁蛋白, 干扰素- α , 毕赤酵母

学科分类号 Q812, R978.7

近年来在疾病的治疗过程中, 为了提高药效减轻毒副作用, 药物的定向转运、定点释放和特异性靶细胞治疗方案已引起人们极大的兴趣^[1]. 人们正在积极探索药物定向转运的可能性及其应用方案^[2]. 最新研究表明, 转铁蛋白-转铁蛋白受体介导的定向药物转运系统已接近实用临床阶段, 对肿瘤, 脑部中央神经系统疾病的治疗研究取得了令人振奋的结果^[3]. 自 1987 年 Anderson 等首先得到人乳铁蛋白的晶体结构以来, 已陆续得到一系列完整的转铁蛋白及其片段的晶体结构. 人转铁蛋白(transferrin, TF)是一个能够结合铁的单体糖蛋白, 主要生理功能为结合、运输三价铁离子, 控制体液中游离铁离子浓度, 提供可利用的铁和防止铁在血液中的沉积. 成熟的人转铁蛋白由 679 个氨基酸残基组成, 分子质量约 80 ku, 可分为性质相似的两个结构域 TFN (转铁蛋白 N 端半分子) 和 TFC (转铁蛋白 C 端半分子)^[4]. 近年来, 已有不少以转铁蛋白为天然运输配体, 使其结合一些活性多肽, 形成一个具有靶向功能的蛋白复合物, 从而作为相应疾病靶向前药的成功报道^[4-7]. 在此基础上, 亦可利用蛋白质工程技术将蛋白质药物基因偶联转铁蛋白基因生产蛋白质复合物, 在药物蛋白与转铁蛋白之间引入蛋白酶切位点, 当蛋白质复合物进入细胞后被蛋白酶酶切, 释放出药物蛋白而发挥作用^[8].

本实验利用重叠 PCR 技术将干扰素(interferon, IFN)基因与 TFN 基因在体外融合,

融合基因和单独的 TFN 基因克隆至表达载体 pPIC9 中, 转入大肠杆菌 DH5 α , 经菌落 PCR、酶切和测序证明, 表达载体 pPIC9-IFN-TFN 和 pPIC9-TFN 构建成功. 将重组载体经 *Sac* I 酶切后转化毕赤酵母 GS115, 均获得了表达. 经阳离子交换层析、疏水层析纯化, 获得了纯度大于 93% 的 IFN-TFN 和纯度大于 95% 的 TFN 样品. 生物活性实验证明 IFN-TFN 具有抗病毒活性, 铁饱和实验证明融合蛋白中的 TFN 和单独的 TFN 均具有铁饱和特性, 因而 TFN 可望作为 IFN 的天然运输载体.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因、菌株及试剂. IFN 基因, 含人转铁蛋白基因的质粒为本实验室保存. 载体 pPIC9, 大肠杆菌 DH5 α 及毕赤酵母 GS115 菌株为本室保存. *Xho* I 和 *Not* I 限制酶, T4DNA 连接酶, TaqDNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品. 质粒提取试剂盒购自 Promega 公司, 玻璃奶回收试剂盒购自美国 Q. BIOgene 公司. YNB 购自 Difco 公司, IPTG 购自 Inaia 公司. 层析介质 Q Sepharose Fast Flow 和 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 购自 Amersham 公司.

* 通讯联系人. Tel: 010-66948824

E-mail: fanghongqing@yahoo.com.cn; ChenHP@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2005-01-18, 接受日期: 2005-03-28

1.1.2 PCR 引物. 所有引物均由上海博亚生物技术有限公司合成. 融合蛋白中 IFN 的 5' 端引物 IF5 (含有 *Xho* I 酶切位点): 5' CCGCTCGAGAAAA GATGTGATTTACCTCAAACCTCATTCT 3'; 融合蛋白中 IFN 的 3' 端引物 IF3: 5' AGAGCCAC CGCCACCTTCTTTACGGCGCAGACGCTC 3'. 融合蛋白中 TFN 的 5' 端引物 IFT (含有 IFN 的 C 端部分基因): 5' CGTAAAGAAGGTGGCGGTGGCT CTGTCCCTGATAAACTGTGAGATG 3'; TFN 的 3' 端引物 3NY (含有 *Not* I 酶切位点): 5' ATA AGAATGCGGCCGCTTATTCATCTGTTGGGGCT TCTGG 3'. 单独 TFN 的 5' 端引物 5Y (含有 *Xho* I 酶切位点): 5' CCGCTCGAGAAAAGAGTCCCTG ATAAACTGTGA 3'.

1.1.3 培养基. LB 培养基: 酵母抽提物 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L. YPD 培养基: 1% 酵母抽提物, 2% 胰蛋白胨, 2% 葡萄糖. BMGY 培养基: 1% 酵母抽提物, 2% 胰蛋白胨, 1.34% YNB, 0.00004% 生物素, 1% 甘油, 100 mmol/L pH 6.0 磷酸钾缓冲液. BMMY 培养基: 1% 酵母抽提物, 2%

胰蛋白胨, 1.34% YNB, 0.000 04% 生物素, 0.5% 甲醇, 100 mmol/L pH 6.0 磷酸钾缓冲液. MD 平板培养基: 1.34% YNB, 0.000 04% 生物素, 2% 葡萄糖, 1.0% 琼脂. MM 平板培养基: 1.34% YNB, 0.000 04% 生物素, 0.5% 甲醇, 1.0% 琼脂.

1.2 方法

1.2.1 融合蛋白基因的克隆与表达载体的构建. 以 IFN 基因为模板, 以 IF5、IF3 为上下游引物, 扩增上游含 *Xho* I 酶切位点的 IFN; 以含 TF 基因的质粒为模板, 以 IFT、3NY 为上下游引物, 扩增上游含 IFN 的 C 端部分基因、下游含 *Not* I 酶切位点的 TFN 基因. 然后以扩增产物 IFN、TFN 为模板, 以 IF5、3NY 为引物, 扩增 IFN-TFN 融合基因. 以含人转铁蛋白基因的质粒为模板, 以 5Y 和 3NY 为上下游引物, 扩增 TFN 基因. 将 IFN-TFN 和 TFN 扩增片段及 pPIC9 载体用 *Xho* I 及 *Not* I 双酶切后, 在 T4 连接酶的催化下进行连接 (载体构建过程参见图 1), 连接产物转化 DH5 α , 提取阳性转化子的重组质粒, 进行双酶切及质粒 PCR 鉴定.

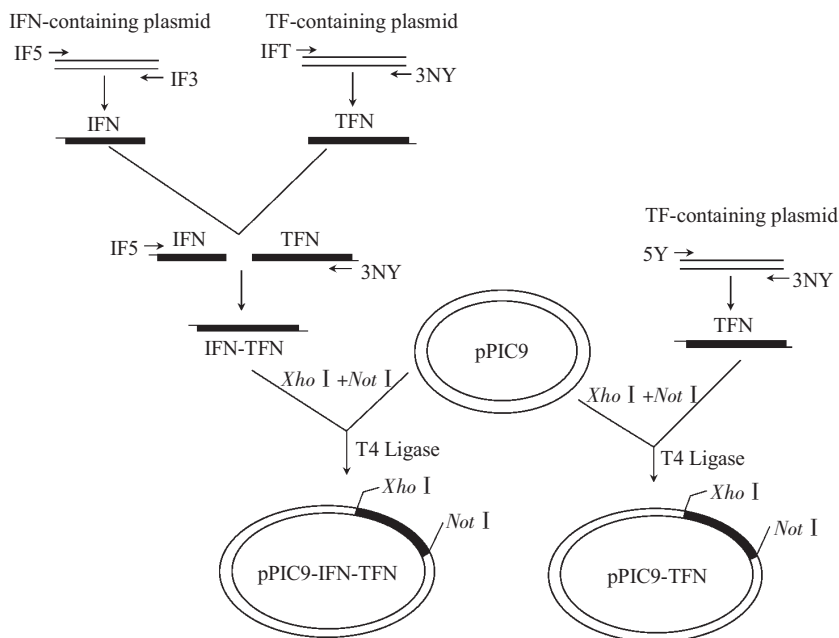


Fig.1 Scheme for the construction of the expression vector pPIC9-IFN-TFN and pPIC9-TFN

1.2.2 毕赤酵母的转化与鉴定. 将重组质粒 pPIC9-IFN-TFN 和 pPIC9-TFN 以 *Sac* I 进行酶切, 线性化后的重组质粒以 PEG1000 法转化毕赤酵母 GS115 细胞, 转化产物先涂布 MM 平板, 在 30℃

培养 2~3 天, 再转至 MD 平板上, 观察生长情况. 以长出的 Mut⁺ 型重组酵母转化子为模板, 进行菌落 PCR 鉴定, 筛选含目的基因的重组子进行诱导表达分析.

1.2.3 重组酵母的诱导表达与分析. 随机挑取经菌落 PCR 鉴定含目的基因的重组子各 8~10 株, 进行诱导表达筛选. 先将重组子于 YPD 培养基中活化, 再接种于 BMGY 培养基中, 30℃, 220 r/min 培养至 A_{600} 达 10.0 时, 离心, 将菌体转至 BMMY 培养基中, 之后每隔 12 h 加入终浓度为 0.5% 的甲醇诱导目的蛋白的表达, 取表达上清进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析.

1.2.4 表达产物的纯化及鉴定.

诱导 60 h 后, 将菌液离心, 表达上清上样于经 50 mmol/L pH 5.0 柠檬酸缓冲液预平衡的 SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析柱, 以含 0.6 mol/L 氯化钠的 50 mmol/L, pH 5.0 柠檬酸缓冲液梯度洗脱, 分段收集洗脱液, 根据电泳结果合并含目的蛋白的洗脱液, 上样于含 1 mol/L 硫酸铵的 50 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液预平衡的 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水层析柱, 以 50 mmol/L 的磷酸缓冲液梯度洗脱, 分段收集洗脱液, 根据电泳结果合并含目的蛋白的洗脱液. 以 Lowry 法对纯化后的目的蛋白进行浓度测定, SDS-PAGE 薄层凝胶扫描分析蛋白质纯度.

抗病毒活性测定: 96 孔板加入 50 μ l 不同稀释度的 IFN-TFN, 病毒对照不加 IFN-TFN, 每孔加入 100 μ l $1.5 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ /ml 的 Vero 细胞悬液, 37℃, CO₂ 培养 24 h, 使细胞贴壁为单层, 每孔加入 100 个 TCID₅₀VSV, 细胞对照不加病毒液. 37℃ 继续培养, 使对照细胞完全病变后, 每孔加入适当生理盐水, 用滴管轻轻吹吸悬浮病变细胞和死细胞, 结晶紫染色法判断结果.

重组蛋白 IFN-TFN 和 TFN 的铁饱和实验按文献[9,10]进行, 测定其蛋白质在缓冲液中结合 Fe³⁺ 后 A_{280}/A_{465} 的比值. 铁饱和的转铁蛋白在 A_{465} 处有最大吸光度值, 这是因为转铁蛋白饱和和铁后, 铁-酚化合物的存在而引起其最大吸光度值的变化.

2 结 果

2.1 融合蛋白表达载体的构建与鉴定

融合蛋白基因及 TFN 基因扩增结果见图 2, 片段大小与预期相符. 扩增时所用的上游引物和下游引物分别引入了 *Xho* I 和 *Not* I 的酶切位点, 可使 PCR 扩增片段插入到 pPIC9 穿梭载体的相应酶切位点中, 表达载体的构建过程见图 1. 转化 DH5 α 后, 提取阳性转化子的重组质粒, 以 *Xho* I 和 *Not* I 进行双酶切鉴定, 同时以原引物及原条件进

行质粒 PCR 鉴定, 均得到预期大小的条带, 说明表达载体构建成功. 重组质粒的测序结果也与文献报道序列相符, 未发生碱基突变. 重组质粒的双酶切鉴定结果见图 3.

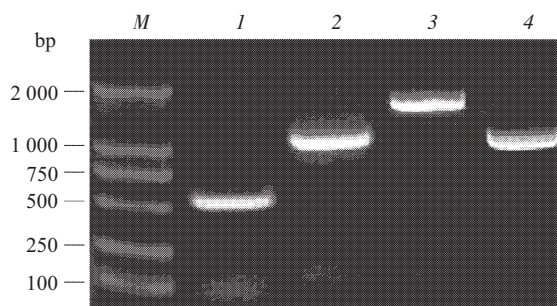


Fig.2 PCR amplification of IFN-TFN and TFN genes

M: DNA marker; 1: IFN gene; 2: TFN gene amplified by primers IFT and 3NY; 3: IFN-TFN gene; 4: TFN gene amplified by primers 5Y and 3NY.

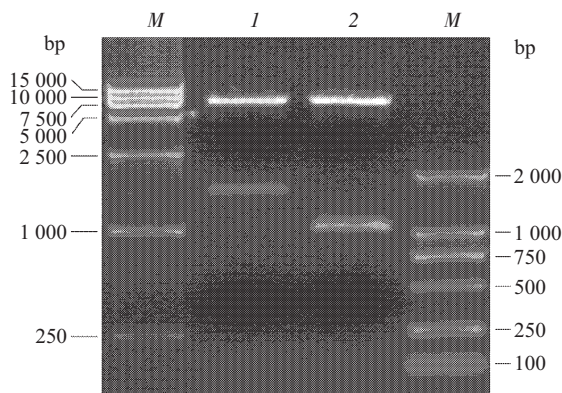


Fig.3 Restriction analysis of the construction of the expression vector pPIC9-IFN-TFN and pPIC9-TFN

M: DNA marker; 1: pPIC9-IFN-TFN/*Xho* I + *Not* I; 2: pPIC9-TFN/*Xho* I + *Not* I.

2.2 酵母重组子的构建和表达筛选

毕赤酵母 GS115 为 His 缺陷型菌株, 只有重组质粒整合入其基因组中, 表达 His 后, 菌株才能在不含 His 的选择性平板 MM 或 MD 上生长而起筛选作用. 一般以 *Sac* I 线性化的重组质粒转化 GS115 后的重组子为 Mut⁺型, 即甲醇利用型. 筛选时, 挑选出既能在 MM 平板上生长, 又能在 MD 平板上生长的重组子, 便为 Mut⁺型.

从 MD 平板上挑取两种转化重组子各 10 株, 在 BMMY 培养基中于 30℃, 220 r/min 培养, 每隔 12 h 补加 0.5% (体积比) 甲醇诱导目的蛋白表达. 诱导表达 60 h 后, 离心取上清作 SDS-PAGE 分析,

考马斯亮蓝 G-250 染色. 结果均获得了表达阳性的重组毕赤酵母, 表达的 IFN-TFN (大小约为 57 ku 左右) 与 TFN (大小约为 38 ku), 分子质量均与理论值相近.

2.3 重组蛋白的纯化及鉴定

2.3.1 表达产物的纯化. 重组蛋白 IFN-TFN 和 TFN 分别经离子交换层析、疏水层析两步纯化后, 取各步层析的蛋白质收集液进行 SDS-PAGE, 结果见图 4. 薄层凝胶扫描送军事医学科学院生物医学分析中心进行, 结果显示两步纯化后重组蛋白 IFN-TFN 的纯度为 93.38% 和 95.17%, 从图 4 中可看出, 融合蛋白在纯化过程中有部分降解. 以 Lowry 法测得其蛋白质浓度分别为 0.2 g/L 和 0.4 g/L.

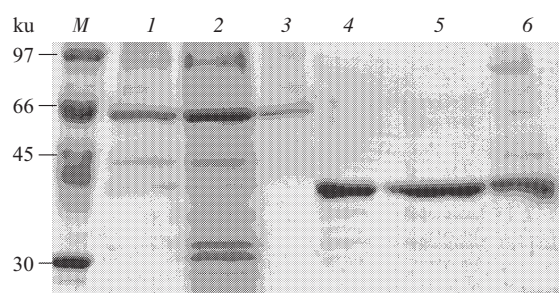


Fig.4 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of PTH-TFN and TFN

1: IFN-TFN supernatant; 2: IFN-TFN SP Sepharose FF; 3: IFN-TFN Phenyl Sepharose FF; 4: TFN Phenyl Sepharose FF; 5: TFN SP Sepharose FF; 6: TFN supernatant. M: low molecular mass marker.

2.3.2 抗病毒活性测定. 以保护半数 (50%) 细胞免受病毒损害的最高干扰素稀释度为 1 个干扰素活性单位. 3 次取平均值计算 IFN-TFN 的活性为 $1 \times 10^5/\text{mg}$, 而 IFN 的比活为 $1 \times 10^7/\text{mg}$. 表明融合蛋白具有抗病毒活性, 但比活要比干扰素低很多. 其原因可能是 C 端融合的 TFN 对 IFN 结构有影响.

2.3.3 铁饱和实验. 重组融合蛋白 IFN-TFN 和重组蛋白 TFN 在缓冲液中结合 Fe^{3+} 后, 分别测定 A_{280} 和 A_{465} , 计算比值 λ , 结果见表 1, 结果显示, 重

组融合蛋白以及重组 TFN 的 A_{280}/A_{465} 比值 λ 与文献报道的标准值 21.5 相当, 说明融合蛋白中的 TFN 具有较强的结合铁的能力.

综合分析抗病毒活性及铁饱和实验的结果表明, 融合蛋白中的 IFN 具有抗病毒活性, 其中的 TFN 也保留了原有的铁饱和特性.

3 讨 论

毕赤酵母系统是一个近年来发展很快的优秀真核表达系统, 数百种蛋白质已在毕赤酵母中成功表达, 且数量在不断增加. 作为真核表达系统, 它可对外源蛋白进行翻译后的加工和修饰, 营养要求低, 生长快, 大规模高密度发酵工艺成熟, 便于工业化生产. 据文献报道, 在高密度培养条件下巴斯德毕赤酵母的菌密度 A_{600} 值可达到 600 ~ 800, 表达水平较高, 许多蛋白质的表达水平可达到 g/L 级以上, 许多不能在酿酒酵母和昆虫细胞表达系统中进行表达的蛋白质也能在巴斯德毕赤酵母表达系统中得到很好的表达^[1].

本实验中使用的表达载体 pPIC9 具有强有力的醇氧化酶 1 (AOX1) 启动子, 能够实现外源基因的高效表达. 该载体中还含 α 交配因子信号肽序列及与之相连的 KEX2 酶切位点序列, 它们可将外源蛋白分泌至胞外并将 α 交配因子信号肽切除^[2]. 尽管 IFN-TFN 在 GS115 中成功表达, 但目的蛋白降解也较为严重. 我们通过加入酪蛋白水解物、降低培养基 pH 及培养温度等方法仍未能很好地抑制蛋白质降解. 对于蛋白质降解问题, 可望通过改变融合基因中的酶切位点、添加蛋白酶抑制剂、使用蛋白酶缺陷受体菌等办法解决.

在纯化过程中, 主要的杂蛋白来自目的蛋白的降解物及色素, 还有少部分内源蛋白. 由于降解蛋白与目的蛋白性质相近, 在进行第一步阳离子交换层析后, 仅去除了大部分色素及少数杂蛋白, 经过第二步的疏水层析后杂蛋白才基本去除, 目的蛋白得到较好的纯化. 对纯化后的重组融合蛋白 IFN-TFN 进行的活性测定及铁饱和实验的结果表明, 融合蛋白中的 IFN 具有抗病毒活性, 其中的 TFN 也保留了原有的铁饱和特性. 虽然融合蛋白具有抗病毒活性, 但比活要比单独的干扰素低很多. 其原因可能是干扰素分子 C 端直接融合的 TFN 对 IFN 结构有影响, 也许在两个分子之间加上一段柔性 linker 或者改变两者的融合方向能够提高融合蛋白分子的抗病毒活性. 总之, IFN-TFN 融合蛋白构

Table 1 Absorption value of recombinant IFN-TFN and TFN after Fe^{3+} saturation study

TFN			IFN-TFN		
A_{280}	A_{465}	$\lambda(A_{280}/A_{465})$	A_{280}	A_{465}	$\lambda(A_{280}/A_{465})$
0.212	0.010	21.2	0.212	0.010	21.2
0.216	0.010	21.6	0.214	0.009	23.8
0.212	0.009	23.6	0.215	0.010	21.5
0.215	0.010	21.5	0.213	0.009	23.7

建可以为 IFN 通过小肠进入体内提供一条新的途径, 这为研究基于转铁蛋白 - 转铁蛋白受体转运系统的药物运输模型奠定了较好的基础。

参 考 文 献

- 1 Li H, Sun H, Qian Z M. The role of the transferring-transferrin-receptor system in drug delivery and targeting. Trends Pharmacol Sci, 2002, **23** (5): 206~209
- 2 Langer R. Drug delivery and targeting. Nature, 1998, **392** (6679 suppl): 5~10
- 3 Qian Z M, Li H Y, Sun H Z, *et al.* Targeted drug delivery via the transferring receptor-mediated endocytosis pathway. Pharmacological Reviews, 2002, **54** (4): 561~587
- 4 Dalmastri C, Valenti P, Visca P, *et al.* Enhanced antimicrobial activity of lactoferrin by binding to the bacterial surface. Microbiologica, 1998, **11** (3): 225~230
- 5 Anderson B F, Baker H M, Dodson E J, *et al.* Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84** (7): 1769~1773
- 6 Xia C Q, Wang J, Shen W C, *et al.* Hypoglycemic effect of insulin-transferrin conjugate in streptozocin-induced diabetic rats. J Pharmacol Exp Ther, 2000, **295** (2): 594~600
- 7 Douglas W L, Richard Y, Edward H Q. Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumor. Nature Medicine, 1997, **3** (12): 1362~1368
- 8 Ali S A, Joao H C, Hammerschmid F, *et al.* Transferrin trojan horse as a rational approach for the biological delivery of therapeutic peptide domain. J Biol Chem, 1999, **274** (34): 24066~24073
- 9 Steinlein L M, Graf S T, Ikeda R A. Production and purification of N-terminal half-transferrin in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 1995, **6** (5): 619~624
- 10 Stuart A A, Heidi C J, Robert C, *et al.* High-yield production of functionally active human serum transferring using a baculovirus expression system, and its structural characterization. Biochem J, 1996, **319** (Pt 1): 191~195
- 11 Cregg J M, Cereghino J L, Shi J Y, *et al.* Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. Molecular Biotechnology, 2000, **16**(1): 23~52
- 12 Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Rev, 2000, **24** (1): 45~66

Expression and Characterization of Fusion Protein of Interferon and Transferrin in *Pichia pastoris*

LI Xiao-Jing, ZHANG Hao, XUE Chong, LI Yan-Ying,

CHEN Jing, MIAO Lin, FANG Hong-Qing*, CHEN Hui-Peng*

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract The fused gene (IFN-TFN) of TFN (transferring N-terminal half-molecule) gene and IFN (interferon) gene was amplified by multiple PCR. The fused gene and TFN gene was inserted into pPIC9 vector. The recombinant plasmid pPIC9-IFN-TFN and pPIC9-TFN were transformed into *Pichia pastoris* GS115 by PEG. After being induced by methanol, the target proteins were expressed in ferment supernatant at high level. The recombinant fused protein IFN-TFN and recombinant TFN with purity respectively being higher than 93% and 95% were finally obtained after purification through two-step chromatography: SP Sepharose Fast Flow and Phenyl Sepharose Fast Flow. According to *in vitro* bioactivity assay, the fused protein IFN-TFN had antiviral activity but which was much lower than the natural IFN. Fe³⁺ saturation study confirmed that the recombinant IFN-TFN was able to bind Fe³⁺ as the recombinant TFN did. It was shown that TFN could be used as the transcellular carrier of IFN.

Key words transferrin, interferon- α , *Pichia pastoris*

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948824, E-mail: fanghongqing@yahoo.com.cn; ChenHP@nic.bmi.ac.cn

Received: January 18, 2005 Accepted: March 28, 2005