

研究报告

中国人 γ -干扰素 cDNA 在大肠杆菌中的高效表达

瞿成奎 魏汉东 鱼咏涛 贺福初* 吴祖泽

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 应用 RT-PCR 技术从中国人淋巴细胞 mRNA 反转录产物中克隆了 IFN- γ cDNA, 序列分析证实了分子进化规律对 IFN- γ cDNA 序列存在多态性的推论. 在此基础上应用 DNA 重组技术, 将去信号肽中国人 IFN- γ cDNA 克隆到原核表达质粒 pBV220 P_RPL 启动子下游, 转化大肠杆菌 DH5 α , 通过温度诱导表达, 成功地在大肠杆菌中稳定、高效地表达了中国人 IFN- γ cDNA, 其表达水平占全菌可溶性总蛋白的 44.4%, 初步复性后生物学活性测定结果表明 γ -IFN 表达量为 $0.45 \times 10^7 \sim 2.34 \times 10^7$ 单位/L.

关键词 人 γ -干扰素, 分子进化, 高效表达

干扰素是淋巴细胞分泌的一类功能调节蛋白, 具有抑制病毒复制、抑制细胞分裂及机体免疫调节等功能, γ -干扰素是其中免疫调节活性及抑制细胞分裂活性最强的一种亚型. 利用基因工程技术生产的 γ -干扰素在临床治疗中已显示一定的治疗效果^[1,2].

根据我们已经发现的分子进化规律^[3], 推测人 IFN- γ cDNA 在东西方人群间存在序列多态性, 最近我们^[4]应用 RT-PCR 技术克隆了中国人 IFN- γ cDNA, 多个克隆的 DNA 序列分析表明中国人 IFN- γ cDNA 与国外文献报道^[5]有三个位点不同: 185 位 A $\rightarrow$ G (Lys $\rightarrow$ Arg), 399 位 A $\rightarrow$ G (氨基酸未变), 422 位 A $\rightarrow$ G (Gln $\rightarrow$ Arg). 但目前国内外所生产的重组 IFN- γ 均采用西方人种 IFN- γ cDNA, 其重组产品如长期应用于中国病人有可能因序列差别引起免疫学反应而降低药效. 因此构建中国人 IFN- γ 基因工程菌株, 进而开展中国人重组 IFN- γ 的基因工程生产, 替代进口产品应用于临床具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

质粒 pUC19-IFN 含去信号肽的中国人 IFN- γ cDNA, 由本室构建. 原核表达质粒 pBV220^[6]由病毒所侯云德教授惠赠. 大肠杆菌 DH5 α 系本室保存. DNA 限制性内切酶、T4 连接酶及其他试剂均购自华美生物公司.

1.2 重组表达质粒 pBVIFN 的构建及其诱导表达

从 pUC19-IFN 上以 EcoR I, BamH I 双酶解, 切下 440 bp 片段, 经低熔点琼脂糖法回收, 与 pBV220 经 EcoR I, BamH I 酶切回收的 3.64 kb 大片段以摩尔比 3:1 连接, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 以小量快速抽提质粒 DNA 法鉴定阳性重组子(图 1). 阳性克隆细菌在 LB-Ap 中 30 $^{\circ}$ C 培养至 $A_{600} = 0.45$, 迅速提高培养温度至 42 $^{\circ}$ C, 继续振荡培养 6 h, 收集

*联系人.

收稿日期: 1994-09-27, 修回日期: 1995-01-03

表达菌体。

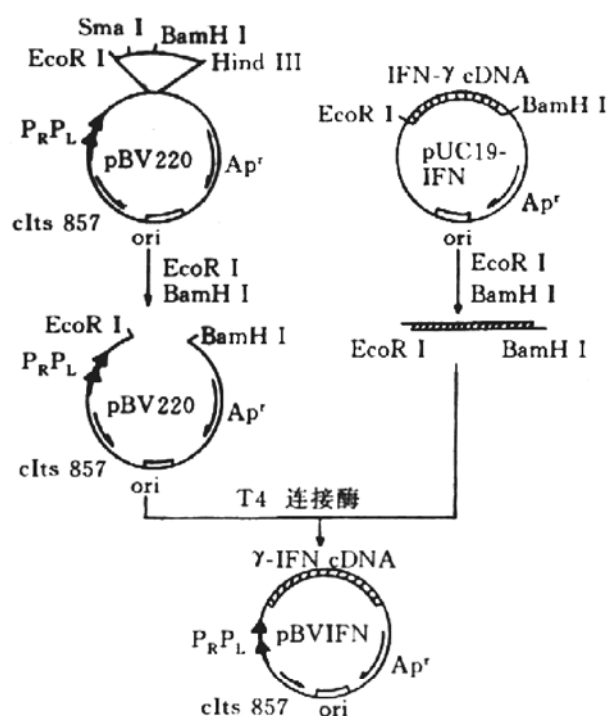


图1 重组质粒 pBVIFN 构建图

1.3 SDS-PAGE

参见 Laemmli^[7]方法。0.5 ml 表达菌体沉淀溶于 $2 \times$ 样品缓冲液 [0.125 mol/L Tris-HCl ($\text{pH} 6.8$), 4% SDS, 10% 甘油, 0.02% 溴酚蓝, 4% β -巯基乙醇] 100°C 煮沸 5 min, 离心取上清适量上样电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 表达产物在菌体总蛋白中所占比例由 590 nm 光密度薄层扫描确定。

1.4 表达产物生物学活性鉴定

收集表达菌体, 再悬于 50 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH} 8.0$)、 1 mmol/L EDTA 缓冲液中, 经超声波破碎后 $12\,000 \text{ g}$, 15 min 离心收集包涵体, 溶于 7 mol/L 尿素、 25 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH} 8.0$)、 1 mmol/L DTT、 1 mmol/L EDTA 溶液中, 再经直接稀释或在 25 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH} 8.0$)、 1 mmol/L EDTA 溶液及 PBS 溶液中透析后除菌, 以细胞病变抑制法^[8]测定 IFN- γ 抗病毒活性。测定系统为 Hep-2-VSV, 测定方法为微量板染色法, 标准品 IFN- γ 为经美国 NIH 标准参考制品标定的 IFN- γ 。

2 结 果

2.1 中国人 IFN- γ cDNA 高效表达质粒的构建与诱导表达

从 pUC19-IFN 上切下 IFN- γ cDNA 片段, 与 pBV220 大片段连接、转化大肠杆菌 DH5 α , 快速抽提质粒 DNA, 以 pBV220 为阴性对照, 12 个克隆中 9 个含插入片段, 再经 EcoR I、BamH I 双酶切鉴定, 所有阳性克隆重组质粒上均能切下 IFN- γ cDNA 条带, 其分子量大小正确 (图 2)。

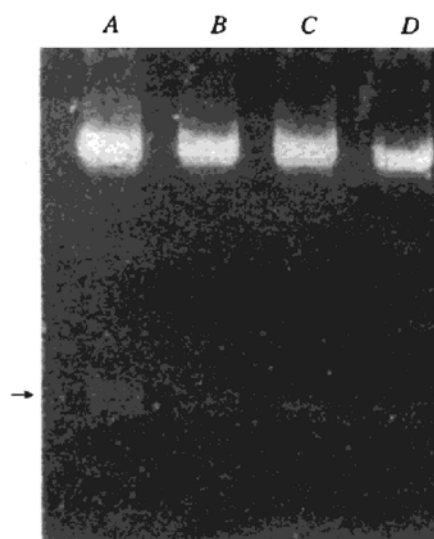


图2 pBVIFN 重组质粒酶切鉴定图

A: pBVIFN2; B: pBVIFN4; C: pBVIFN5; D: pBV220.

阳性菌落接种于 LB-Ap 培养基中, 30°C 培养过夜, 次日以 2% 比例扩种, 待细菌生长至对数期, 提高培养温度至 42°C , 诱导表达 6 h. 工程菌诱导表达后 SDS-PAGE 结果表明有特异表达产物带, 其相对分子量为 $17\,500$ 左右, 光密度扫描结果表明表达的 IFN- γ 占菌体可溶性总蛋白的 44.4% (图 3)。

2.2 表达产物生物活性鉴定

工程菌诱导表达后, 经超声波破碎, 取包涵体, 在 7 mol/L 尿素溶液中裂解, 以直接稀释法或透析法初步复性处理后, 测定其抗病毒活性, Hep-2-VSV 法测定结果表明, 表达产物具有明显的抗病毒活性 (图 4), 根据不同的复

性处理方案, 其活性滴度不等, 二次结果分别为 4.5×10^6 单位/L, 2.34×10^7 单位/L.

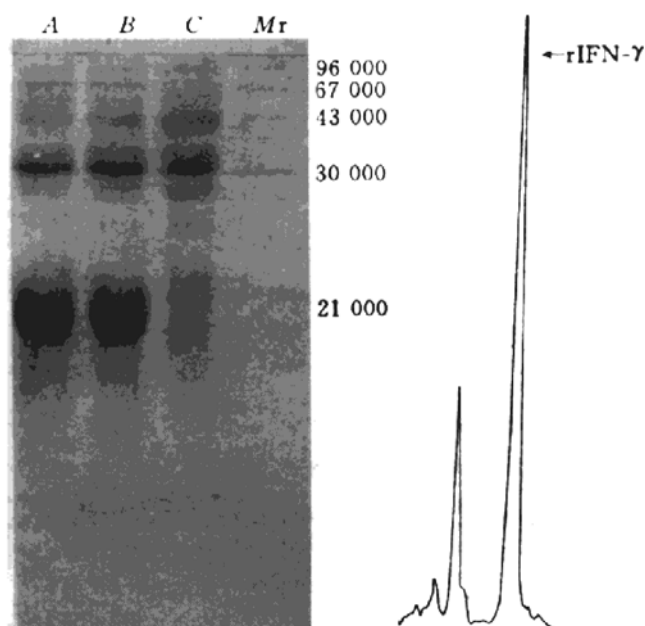


图3 含 pBVIFN 大肠杆菌诱导表达后 SDS-PAGE 及光密度扫描图

A, B: 含 pBVIFN 的 DH5α; C: 含 pBV220 DH5α; Mr: 蛋白分子量标准.

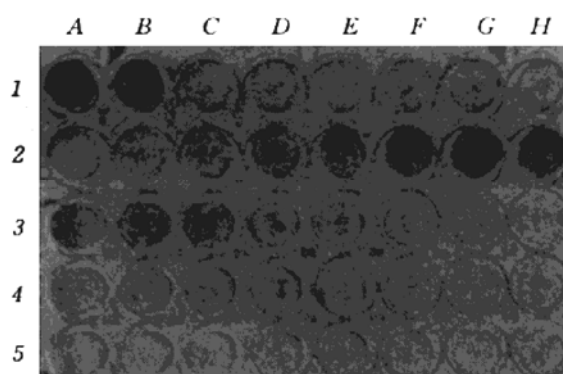


图4 工程菌表达产物生物活性测定结果

1A, 1B: 未加病毒; 1C~1H, 2A~2H: 标准品对照; 3A~3H: 10^2 稀释后梯度递减表达产物组; 4A~4H: 10^4 稀释后梯度递减表达产物组; 5A~5H: 10^6 稀释后梯度递减表达产物组.

3 讨 论

IFN-γ 主要来源于 T 淋巴细胞, 其生物学作用广泛, 如诱导细胞抗病毒状态, 提高机体免疫功能等, 基因工程技术的发展为临床大量

应用 IFN-γ 提供了可能. 虽然早在 1982 年即有西方人 IFN-γ cDNA 序列报道^[5], 我们根据已发现的分子进化规律^[3]推测, 东西方人群间 IFN-γ cDNA 应存在序列多态性, 鱼咏涛等^[4]的报道证实了这一推论的正确性. 由于中国人 IFN-γ cDNA 与国外文献报道序列有三个位点的不同, 导致在二个部位氨基酸发生变异. 由于东西方人群 IFN-γ 的氨基酸序列的差异, 采用西方人 IFN-γ cDNA 构建的工程菌株生产的重组产品长期应用于中国病人可能会引起免疫学反应从而降低药效, 因此, 实现中国人 IFN-γ cDNA 的高效表达, 进而进行重组中国人 IFN-γ 的基因工程生产具有重要意义.

本研究在中国人 IFN-γ cDNA 克隆基础上, 利用 DNA 重组技术, 在大肠杆菌中成功地高效表达了 IFN-γ, 其表达水平达全菌可溶性总蛋白的 44.4%, 且表达产物具有明显的抗病毒活性, 进而为其进一步的发酵生产奠定了基础.

由于大肠杆菌中表达的中国人 IFN-γ 绝大部分以不溶性的包涵体形式存在, 不同处理条件下, 表达产物生物活性测定结果的差别较大, 其原因可能与 IFN-γ 复性效率不同有关. 有 IFN-γ 包涵体变性溶解复性条件的优化正在进一步研究中.

致谢 IFN-γ 生物活性测定得到了本院生物工程所邓继先、陈昭烈等同仁的大力协助, 特表感谢.

参 考 文 献

- 1 Tamura K, Makino S, Araki Y *et al.* Cancer, 1987; **59**: 1059
- 2 Edmonson J H, Long H J, Creagan E T *et al.* Cancer Treat Rep, 1987; **71**: 211
- 3 贺福初, 吴祖泽. 科学通报, 1993; **38**: 1323
- 4 鱼咏涛, 贺福初. 高技术通讯, 1993; **3**: 27
- 5 Gray P W, Leung D W, Pennica D *et al.* Nature, 1982; **295**: 503
- 6 张智清, 姚立红, 侯云德. 病毒学报, 1990; **6**: 111
- 7 Laemmli U K. Nature, 1970; **227**: 680
- 8 Rubinstein S, Familletti P C, Pestka S. J Virol, 1981;

37: 755

High Level Expression of Chinese Human γ -Interferon cDNA in *E. coli*. Qu Chengkui, Wei Handong, Yu Yongtao, He Fuchu, Wu Zuze (*Institute of Beijing Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Chinese hIFN- γ cDNA deleted signal sequence was subcloned into downstream the P_{RPL} promoter of the expression plasmid pBV220 by using of DNA recombinant tech-

nique. This recombinant plasmid can express hIFN- γ stably with high efficiency (up to 44.4% of the total bacterial soluble protein) in *E. coli* DH5 α through thermal induction. The bioactivity assay showed that 0.45×10^7 U $\sim 2.34 \times 10^7$ U rhIFN- γ were expressed in every liter of bacteria culture after preliminary purification and refolding procedures.

Key words hIFN- γ , molecular evolution, high level expression

缺氧小鼠脑中神经节苷脂和单胺类神经递质水平

杨典洱 潘 颖 李爱华 黄如彬 熊 英

(首都医科大学生物化学教研室, 北京 100054)

摘要 脑缺氧和缺氧后的再灌注常导致一系列复杂的生理生化改变. 通过小鼠重复缺氧后, 观察其脑组织中的神经节苷脂和单胺类递质水平变化情况, 发现重复缺氧时, 随着缺氧次数的增加, a. 神经节苷脂水平 (以唾液酸含量表示) 非常明显地持续下降 ($P < 0.01$), 其中 GM1 与 GD1b 相对组分百分比值下降尤为突出 (GM1: $P < 0.05$, GD1b: $P < 0.01$); b. 单胺类神经递质中 NE 和 DOPA 水平下降, DA 和 HIAA 水平升高 ($P < 0.01$). 结果提示脑组织经重复缺氧后, 中枢神经组织细胞膜受到一定程度的损伤, 其结果可能影响到单胺类神经递质的合成、释放、重摄取和贮存的全过程; 据此推测脑组织缺氧时神经节苷脂与单胺类神经递质水平改变时存在着相互联系.

关键词 重复缺氧, 神经节苷脂 (Gls), 单胺类神经递质

缺氧和缺氧耐受的研究一直是临床医学、运动医学和航天医学的主要课题, 急性脑缺氧导致脑组织中乳酸水平升高, 去甲肾上腺素降低和 cAMP 含量的升高均已报道^[1,2]. 然而, 重复缺氧后所致的膜上受体类物质的变化则报道不多, 神经节苷脂 (gangliosides, Gls) 和单胺类神经递质水平变化的报道更少, 至于在缺氧条件下他们之间的相互影响关系还未见报道.

Gls 是神经细胞膜的正常成分, 可作为某些神经递质、激素、病毒和干扰素等的受体成分^[3,4], 参与突触间的信息传递, 影响神经组织分化、再生和修复, 促进脑的发育. 目前 Gls 的生物学作用的研究已成为神经科学的重要课题. 本文拟就小鼠重复缺氧时, 脑组织中 Gls 及

单胺类神经递质水平的变化进行讨论, 并寻求其可能的内在关系.

1 材 料

18 g 左右昆明小鼠, 雌雄不限 (来自本院动物室), 单胺类递质标准品: 3, 4-二羟基苯乙酸 (DOPA), 去甲肾上腺素 (NE), 肾上腺素 (E), 多巴胺 (DA) 和 5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA), 唾液酸 (NANA), 神经节苷脂 (Gls) (以上均为 Sigma 产品), 600E 高效液相色谱仪, 460 电化学检测器 (Waters 公司产品), TYG-C₁₈H₃₇ 色谱柱 (天津化学试剂二厂),