

重组酵母鸡 α 干扰素的诱导表达及其 抗 MDV、NDV 能力

蔡梅红¹, 曹瑞兵², 曹景立³, 王秀红⁴, 陈溥言²

(1 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095; 3 中国人民解放军 73081 部队农副业基地, 江苏 连云港 222143; 4 江苏大学 理学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] 【目的】获得鸡 α 干扰素重组酵母菌诱导表达的最佳诱导时间和甲醇的体积分数, 并测定诱导表达产物对鸡马立克氏病毒(MDV)和鸡新城疫病毒(NDV)的抑制能力。【方法】挑取 2 个鸡 α 干扰素重组酵母菌单菌落至 BMGY 培养基中培养, 待菌液 OD₆₀₀ 为 4 左右时, 分别转接至 BMMY 培养液诱导, 1 瓶每隔 12 h 补加 1 次体积分数 0.5% 甲醇, 另 1 瓶每隔 12 h 补加 1 次体积分数 1% 甲醇, 于 24, 48, 72 h 收集样品, 备 SDS-PAGE 检测用。根据不同时间(24, 48, 72, 96 h)诱导上清液表达量的差异, 留用表达量最高时段的上清液, 经初步纯化后, 利用鸡胚成纤维细胞(CEF), 分别测定重组酵母鸡 α 干扰素抑制 MDV 及 NDV 的能力。【结果】鸡 α 干扰素重组酵母菌在每隔 12 h 补加 1 次体积分数 1% 甲醇诱导 48 h 时, 或每隔 12 h 补加 1 次体积分数 0.5% 甲醇诱导 72 h 时, 重组酵母鸡 α 干扰素表达量均达到最高; 且诱导上清液具有较好地抑制 MDV、NDV 的能力。【结论】获得了鸡 α 干扰素重组酵母菌小量发酵的最佳条件; 获得的重组酵母鸡 α 干扰素对 MDV 和 NDV 有明显的抑制作用。

[关键词] 鸡 α 干扰素; 酵母; MDV; NDV

[中图分类号] Q78; S858.31

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)09-0037-05

The fermenting optimization of the recombinant chicken interferon- α yeast and detection for its antiviral activity to MDV and NDV

CAI Mei-hong¹, CAO Rui-bing², CAO Jing-li³, WANG Xiu-hong⁴, CHEN Pu-yan²

(1 School of Food and Biological Engineering of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China; 2 Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;

3 The Agriculture and Sideline Base of 73081 Army, Lianyungang, Jiangsu 222143, China;

4 School of Science of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: 【Objective】The research was to find the optimal conditions for induction and volume fraction of the recombinant ChIFN- α yeast and study its activity of inhibiting Markers Disease virus (MDV) and Newcastle Disease virus (NDV). 【Method】Two recombinants were induced at different time and different concentrations of methanol, the production of recombinant ChIFN- α was detected by SDS-PAGE. The antiviral activity to MDV and NDV of the ChIFN- α was detected in the chicken embryonic fibroblast (CEF). 【Result】The optimal induction time was in the 48 h with 1% (V/V) methanol added into culture at every 12 h; the optimal induction time was in the 72 h with 0.5% (V/V) methanol added into culture at every 12 h and into culture. The recombinant chicken interferon expressed in yeast was of better activity of

* [收稿日期] 2010-03-01

[基金项目] 江苏大学高级人才专项资助项目(1283000152)

[作者简介] 蔡梅红(1973—), 女, 安徽天长人, 讲师, 在读博士, 主要从事动物分子免疫学及分子病毒学研究。

E-mail: caimeihong@ujs.edu.cn

[通信作者] 陈溥言(1942—), 男, 江苏南京人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物传染病的防制研究。E-mail: aid@njau.edu.cn

inhibiting MDV and NDV. 【Conclusion】 The fermenting optimization of the recombinant chicken interferon- α has been obtained, which can inhibit the multiplication of MDV and NDV highly.

Key words: chicken alpha interferon; yeast; MDV; NDV

鸡马立克氏病(Markers disease, MD)是由疱疹病毒科的马立克氏病毒(MDV)引起的鸡的一种高接触性传染性的淋巴组织增生性肿瘤病,其病理特征主要是引起鸡的外周神经及各种内脏器官、皮肤单核细胞浸润,产生淋巴细胞肿瘤。目前 MD 被列为养鸡业的三大疾病之首,且目前尚无理想的药物可治,只能用疫苗预防。但由于目前的 MDV 发生漂变的能力太强,出现强毒 MDV(V MDV)、超强毒 MDV(VV MDV)及超超强毒 MDV(VV⁺ MDV),使得各种疫苗对此病的保护力都不尽人意^[1]。

鸡新城疫(Newcastle disease, ND)是由病毒科的新城疫病毒(NDV)感染而引起的鸡的一种病毒性传染病,潜伏期较长,有呼吸道症状,下痢,食欲减退,精神萎顿,后期出现神经症状。ND 既是当今全球范围内最严重的家禽传染病之一,也是我国所有鸡病中危害最大的一种,被国际兽疫局列为 A 类传染病^[2]。 α 干扰素(Interferon, IFN)也称为白细胞干扰素^[3],是一种具有较强抗病毒、抗肿瘤、抗增殖以及免疫调节作用的多效性细胞因子^[4-5],且其抗病毒性能具有广谱性的特点,因而目前在医学临床上,人 α 干扰素已被广泛用于乙型肝炎、丙型肝炎、艾滋病及多发性硬化症^[6-7]、非典型肺炎(SARS)^[8]等各种疾病的治疗,而在兽医临床上禽类干扰素的研究和使用远没有人 α 干扰素广泛。蔡梅红等^[9]根据目前鸡病毒性疾病危害比较严重的现状,开展了重组鸡 α 干扰素的研究。本试验进一步对重组鸡 α 干扰素酵母菌株小量发酵条件进行了初步优化,并对其表达产物的抗 MDV、NDV 能力进行了测定,以期为重组合成鸡 α 干扰素的产业化奠定基础,从而为我国养鸡业的发展提供更多帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 生物材料 鸡 α 干扰素重组酵母菌,由笔者构建;9~10 龄 SPF 鸡胚购自中牧集团南京药械厂 SPF 鸡胚孵化车间;NDV 病毒(F₄₈E₉)为本课题组齐香荣硕士提供;MDV(Rb1B 株)由本课题组王秀花同学提供;小牛血清为杭州四季青公司生产。

1.1.2 试剂 DMEM 营养粉、酵母氮源(YNB)等为 Gbico 公司产品,生物素为 Sigma 公司产品,伯

莱霉素(Zeocin)购于 Invitrogen 公司,其他试剂均为进口、国产分析纯或生物级试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 鸡 α 干扰素重组酵母菌的复苏培养 从 -20 ℃ 冰箱中取出 1 支保存的鸡 α 干扰素重组酵母菌,在无菌操作台中采用四区划线的方法转接于含 500 μ g/mL Zeocin 的 YPDS 培养基平板上,并倒扣于 30 ℃ 培养箱中培养 2~3 d,观察酵母菌落的生长情况。

1.2.2 鸡 α 干扰素重组酵母菌最佳诱导表达时间的确定 从固体 YPDS 平板上挑取 1 个形态饱满、大小适中的菌落,转接至含 25 mL BMGY 的 250 mL 锥形瓶中,并以 3 层无菌干燥纱布覆盖,扎紧瓶口,经 28 ℃ 摇床培养至 OD₆₀₀ 约为 4 时,室温、1 500 g 离心 5 min,收获细胞。将收获的细胞用 100 mL BMMY 培养液悬浮,再分别转接至容量为 1 000 mL 的三角瓶中,28 ℃ 诱导表达,按本实验室常规方法,每隔 12 h 补加 1 次体积分数 0.5% 的甲醇诱导表达,同时在不同时间(24, 48, 72, 96 h)取 20 mL 菌液离心(5 000 g、10 min),取上清液,浓缩 5 倍后用 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白的表达情况。取保存于 -20 ℃ 的 PICZ α A 载体整合酵母菌,每隔 12 h 补加 1 次体积分数 0.5% 甲醇诱导 72 h,将其 5 倍浓缩上清液作为阴性对照;取保存于 -20 ℃、未整合任何质粒的酵母菌,每隔 12 h 补加 1 次体积分数 0.5% 甲醇诱导 72 h,将其 5 倍浓缩上清液作为空白对照。

1.2.3 鸡 α 干扰素重组酵母菌甲醇最佳诱导体积分数的确定 从固体 YPDS 平板上另挑取 2 个形态饱满、大小适中的菌落,分别转接至含 25 mL BMGY 的 250 mL 锥形瓶中,按 1.2.2 中的方法培养,并转接 BMMY 培养基诱导,每隔 12 h 向其中 1 瓶培养基中补 1 次加体积分数 0.5% 的甲醇,每隔 12 h 向另外 1 瓶培养基中补加 1 次体积分数 1% 的甲醇,以保证诱导的持续表达。同时在不同时间(24, 48, 72 h)取 20 mL 菌液离心(5 000 g、10 min),取上清液,并透析纯化浓缩 5 倍,取部分进行处理,备 SDS-PAGE 用。

1.2.4 鸡 α 干扰素重组酵母菌诱导上清液的透析纯化 将 1.2.2 诱导 72 h 的剩余诱导上清液置于一个小烧杯中,然后用移液器将其装入已处理好的

透析带(一端已用透析夹夹紧)中,然后夹紧加样口,置于 500 mL PBS(pH=7.0)中,4℃磁力搅拌透析,并且每隔 12 h 换 1 次透析液,待样品变为无色时停止透析,并立即经无菌小滤器进行膜分离(滤膜孔径为 0.22 μm 的微滤膜)处理,以除去残留菌液和大分子物质,收集滤液于经 180℃烤干处理的青霉素瓶中,置 4℃冰箱保存备用。

1.2.5 鸡胚成纤维细胞(CEF)的制备 取孵化 9~10 d 的 SPF 鸡胚,在超净台中去其头、四肢及内脏,无菌状态下用 PBS 洗 3 遍,剪碎,用 2.5 g/L 的胰酶于 37℃下消化至蓬松状后,用无血清营养液洗去胰酶,并用大孔吸管吹打成单个细胞,用 3 层无菌纱布过滤后转接至 200 mL 细胞瓶中,置于 37℃的 CO₂ 培养箱中培养,48 h 后,转接至 96 孔板(每孔 10 000 个细胞、100 μL 培养液)培养。

1.2.6 表达的重组酵母鸡 α 干扰素抑制 MDV 能力的测定 去除长成单层的传代 CEF 营养液,每孔加入经 100 μL 无血清培养液 4 倍倍比稀释的重组酵母鸡 α 干扰素(每孔 100 μL),每个稀释度设 3 孔重复,孵育 12 h,用 100 倍半数组织感染量(TCID₅₀)剂量的 MDV 进行攻毒,同时设阳性对照孔(不加重组酵母鸡 α 干扰素,只加 MDV),阴性对照孔(只加重组酵母鸡 α 干扰素,不加 MDV),空白对照孔(不加重组酵母鸡 α 干扰素和 MDV),当阳性对照孔接种 MDV 24~120 h 时,在倒置显微镜下观察所有细胞培养孔的结果,当阳性对照孔 50%以上细胞出现 MDV 病变时,判断结果。

1.2.7 表达的重组酵母鸡 α 干扰素抑制 NDV 的能力测定 去除长成单层的传代 CEF 的营养液,每孔加入经 100 μL 无血清培养液 4 倍倍比稀释的重组酵母鸡 α 干扰素(每孔 100 μL),每个稀释度设 3 孔重复,孵育 12 h,用 100 倍 TCID₅₀ 剂量的 NDV 攻毒,同时设阳性对照孔(不加重组酵母鸡 α 干扰素,只加 NDV),阴性对照孔(只加重组酵母鸡 α 干扰素,不加 NDV),空白对照孔(不加重组酵母鸡 α 干扰素和 NDV),当阳性对照孔接种 NDV 24~120 h 时,在倒置显微镜下观察细胞培养孔的结果,当阳性对照孔 50%以上细胞出现明显 NDV 病变时,判断结果。

2 结果与分析

2.1 鸡 α 干扰素重组酵母菌的最佳诱导表达时间

当鸡 α 干扰素重组酵母菌分别在甲醇诱导表达 24,48,72,96 h 时,收集培养液上清液,并经 5 倍浓缩。将浓缩后的上清液加入 SDS-PAGE buffer 处

理后,100℃沸水浴处理 10 min,再进行 SDS-PAGE,电泳结果见图 1。从图 1 可以看出,鸡 α 干扰素重组酵母菌每隔 12 h 添加 1 次体积分数 0.5% 甲醇诱导后,在 24~72 h,重组酵母鸡 α 干扰素的表达量逐渐增加;但是在诱导 96 h 时,重组酵母鸡 α 干扰素的表达量下降。这说明鸡 α 干扰素重组酵母菌表达的鸡干扰素到达一个平台期后不再上升,而且由于受酵母菌分泌的一些酶类的影响,鸡 α 干扰素表达量在诱导 96 h 时出现了下降。

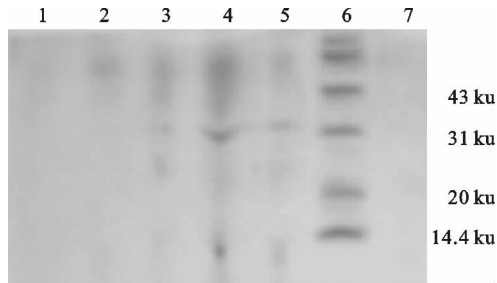


图 1 不同诱导时间重组酵母鸡 α 干扰素的表达

1. 阴性对照;2. 诱导 24 h;3. 诱导 48 h;4. 诱导 72 h;
5. 诱导 96 h;6. 标准蛋白;7. 空白对照

Fig.1 Product of chicken alpha interferon at different inducing time

1. Negative control;2. Induce 24 h;3. Induce 48 h;4. Induce 72 h;
5. Induce 96 h;6. Protein Marker;7. The blank control

2.2 不同体积分数甲醇诱导重组酵母鸡 α 干扰素的表达

不同体积分数甲醇诱导重组酵母鸡 α 干扰素的表达情况见图 2。

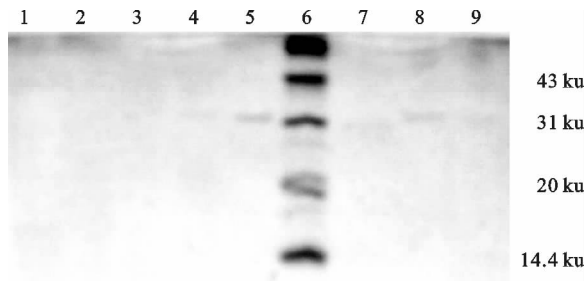


图 2 不同体积分数甲醇诱导重组酵母鸡 α 干扰素的表达

1. 空白对照;2. 阴性对照;3~5. 分别为每 12 h 补加 1 次
体积分数 0.5% 甲醇诱导 24,48,72 h;6. 蛋白标样;
7~9. 分别为每 12 h 补加 1 次体积分数 1% 甲醇诱导 24,48,72 h

Fig.2 Expression of recombinant ChIFN- α at different menthal concentrations

1. The blank control;2. Negative control;3~5. Induce at 24, 48,72 h adding 0.5% (V/V)menthal every 12 h;6. Protein Marker;7~9. Induce at 24,48,72 h adding 1% (V/V)menthal every 12 h

图 2 表明,每隔 12 h 补加 1 次体积分数 0.5%

甲醇,鸡 α 干扰素重组菌在诱导 72 h 时,重组酵母鸡 α 干扰素表达量较高;而每隔 12 h 补加 1 次体积分数 1%甲醇,鸡 α 干扰素重组菌在诱导 48 h 时,重组酵母鸡 α 干扰素表达量较高。但是总体而言,每隔 12 h 补加 1 次体积分数 0.5%甲醇,在诱导 72 h 时,重组酵母鸡 α 干扰素获得了最高表达量。

2.3 重组酵母鸡 α 干扰素抑制 MDV 的能力

96 孔细胞培养板 A、B、C 排孔接 MDV(除阴性对照孔和空白对照孔外),48 h 后阳性对照孔开始

出现病变。细胞接 MDV 96 h 时,阳性对照孔 50%以上细胞出现病变(图 3A),加入 4^4 倍稀释重组酵母鸡 α 干扰素的孔中细胞没有任何病变(图 3B),加入 4^5 倍(图 3C)和 4^6 倍(图 3D)稀释的重组酵母鸡 α 干扰素的孔中细胞有不同程度病变,而阴性对照孔中的细胞没有出现任何病变(图 3E),空白对照孔中的细胞生长正常,没有出现任何病变(图 3F)。说明 4^4 倍稀释的重组酵母鸡 α 干扰素可完全抑制 100 倍 TCID₅₀剂量的 MDV 在 CEF 上复制。

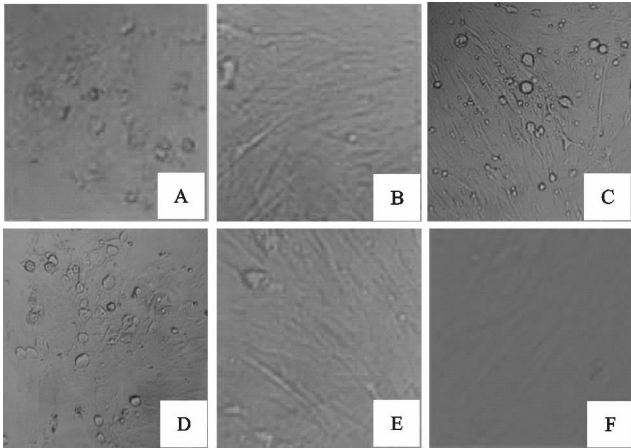


图 3 重组酵母鸡 α 干扰素处理后 MDV 攻毒的鸡成纤维细胞($\times 100$)
A. 阳性对照;B、C、D. 分别为经 4^4 倍, 4^5 倍, 4^6 倍稀释重组酵母鸡 α 干扰素处理后的细胞;E. 阴性对照;F. 空白对照

Fig. 3 CEF dissolved the recombinant chicken α interferon ($\times 100$)

A. Postive control;B,C,D. Cell dissolved by three different diluted recombinants 4^4 , 4^5 , 4^6 chicken alpha interferon;E. Negative control;F. Blank control

2.4 重组酵母鸡 α 干扰素抑制 NDV 的能力

96 孔细胞培养板 D、E、F 排孔接 NDV(除阴性对照孔和空白对照孔外)后,在倒置显微镜下观察所有细胞培养孔的结果,50 h 后阳性对照孔开始出现病变;至 72 h,阳性对照孔 50%以上细胞出现病变,至 96 h 细胞出现 100%病变(图 4A),鸡胚成纤维细

胞已看不出正常细胞形态,但在加入 4^3 倍稀释的重组酵母鸡 α 干扰素的孔中细胞没有任何病变(图 4B),而阴性对照孔中细胞状态正常,生长良好(图 4C),空白对照孔中的细胞生长正常(图 4D)。说明 4^3 倍稀释的重组酵母鸡 α 干扰素可完全抑制 100 倍 TCID₅₀剂量的 NDV 在 CEF 上复制。

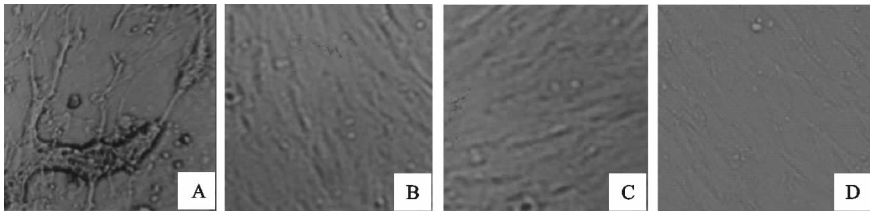


图 4 重组酵母鸡 α 干扰素处理后 NDV 攻毒的鸡成纤维细胞($\times 100$)
A. 阳性对照;B. 经 4^3 倍稀释重组酵母鸡 α 干扰素处理后的细胞;C. 阴性对照;D 空白对照

Fig. 4 CEF dissolved the recombinant chicken α interferon($\times 100$)

A. Postive control;B. Cell dissolved by 4^3 diluted recombinant chicken alpha interferon;C. Negative control;D. Blank control

3 讨论

目前,国内关于重组基因工程产品的研究比较

多,但是真正成功产业化的仅占很少一部分。本研究的主要目的是将重组酵母鸡 α 干扰素这种新型的抗鸡病毒性疾病细胞因子的生产进一步产业化,因

此先从实验室诱导鸡 α 干扰素重组酵母菌发酵入手,并测定诱导发酵的鸡 α 干扰素对鸡临床2种烈性疾病病原的抑制作用,拟循序渐进地完成最终的产业化生产。

本研究中,将-20℃冻存的鸡 α 干扰素重组酵母菌复苏培养后,经诱导表达发现,所有的电泳凝胶中,目的蛋白只有1条,位于蛋白质标准对照的31~43 ku,而并没有出现此菌刚刚构建完后,直接培养诱导表达时出现3条蛋白印迹、糖基化不完全的现象^[9],目前尚不能确定是经过冻存导致此结果或者是另有其他因素影响。

在本研究的SDS-PAGE中,虽然重组酵母鸡 α 干扰素的印迹位置一致,但其印迹的形状却有所不同,其中图1中重组酵母鸡 α 干扰素的蛋白印迹有点弯曲、变形,而在同一块凝胶上的蛋白质Marker的印迹却比较清楚,形状也规则;图2中的重组酵母鸡 α 干扰素的蛋白印迹清楚、规则。这可能是因为:图1中的样品是重组酵母鸡 α 干扰素菌的发酵上清液浓缩5倍后直接电泳的结果,并未进行透析纯化处理,而酵母培养基中含有较多的磷酸盐及部分甲醇,它们导致了重组酵母鸡 α 干扰素蛋白印迹的变形。同一块凝胶上的标准蛋白质对照和图2中的重组酵母鸡 α 干扰素的蛋白印迹比较整齐,原因在于样品经透析初步纯化处理后,去除了影响电泳效果的磷酸盐和甲醇。

本研究结果表明,在体外,利用酵母表达系统生产的鸡 α 干扰素对MDV、NDV 2种鸡临床烈性传染病病原都有较好的抑制效果,与目前国内外报道的用大肠杆菌表达的鸡 α 干扰素^[10]以及杆状病毒^[11]表达的鸡 γ 干扰素相比,本研究用酵母系统表达鸡 α 干扰素,具有易培养易操作、操作技术要求相对较低等优点,因此具有较好的产业化前景和临床使用前景。

[参考文献]

- [1] 许大明,汉丽梅,刘丹,等. 马立克氏病疫苗研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯,2007(3):13-14.
Xu D M, Han L M, Liu D, et al. The development of Marek's

- disease vaccine [J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2007(3):13-14. (in Chinese)
- [2] 卡尔尼克 B W. 禽病学 [M]. 高福,译. 10 版. 北京:中国农业出版社,1999:692-694.
Carnic B W. Diseases of poultry [M]. Translated by Gao F. 10th ed. Beijing: China Agricultural Press, 1999:692-694. (in Chinese)
- [3] 孙亚萍,王英明,乔守怡. 干扰素及其最新研究进展 [J]. 中国免疫学杂志,2006,22(7):676-679.
Sun Y P, Wang Y M, Qiao S Y. Interferon and its development [J]. Chinese Journal of Immunology, 2006 22(7):676-679. (in Chinese)
- [4] Ardelli F, Ferrantini M, Proietti E. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy [J]. Cytokine Growth Rev, 2002(13):119-134.
- [5] Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity [J]. Curr Opin Immunol Immunol, 2000(12):419-424.
- [6] Cooksley W G. Treatment with interferons (including pegylated interferon) in patients with hepatitis B [J]. Semin Liver Dis, 2004,24(1):45-53.
- [7] Pawlowsky J M. The nature of interferon alpha resistance in hepatitis C virus infection [J]. Curr Opin Infect Dis, 2003,16(6):587-592.
- [8] 罗中云. 干扰素 SARAS 发迹 [J]. 当代医学,2003,9(5):57-58.
Luo Z Y. Interferon make a success depending on SARAS [J]. China Contemporary Medicine, 2003,9(5):57-58. (in Chinese)
- [9] 蔡梅红,曹瑞兵,王传友,等. 重组酵母鸡 α 干扰素的研制及抗病毒活性测定 [J]. 中国免疫学杂志,2007,23(9):829-832.
Cai M H, Cao R B, Wang C Y, et al. Study on recombinant chicken α interferon production in yeast *pichia pastoris* and detection for its antiviral activity [J]. Chinese Journal of Immunology, 2007,23(9):829-832. (in Chinese)
- [10] 韦琴,彭贵青,金梅林,等. 鸡 α 干扰素基因的克隆、原核表达及抗病毒效果研究 [J]. 生物工程学报,2006,22(5):737-743.
Wei Q, Peng G Q, Jin M L, et al. Cloning prokaryotic expression of chicken interferon- α gene and study on antiviral effect of recombinant chicken interferon- α [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006,22(5):737-743. (in Chinese)
- [11] Koji Y, John W, Lowenthsl, et al. High-level production of recombinant chicken interferon- γ by *Brevibacillus choshinensis* [J]. Protein Expression and Purification, 2001(23):113-120.