

重组猪 α -干扰素的纯化及生化性质鉴定

邵菁^{1,2}, 于瑞嵩^{2,3}, 董世娟^{2,3}, 朱于敏^{2,3}, 沈世缘^{2,3}, 曹祥荣¹, 李震^{2,3}

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(2 上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106)

(3 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106)

[摘要] 对巴斯德毕赤酵母高效分泌表达的猪 α -干扰素 (PoIFN- α) 纯化工艺和纯化后重组蛋白的部分生化特性进行了研究, 结果表明: 猪 α -干扰素 (PoIFN- α) 发酵液经离心、透析、过滤处理之后, 依次利用亲和层析和离子交换层析使目的蛋白得到了纯化. 经 N 端氨基酸测序, Western-blot 对酸、热、巯基乙醇的稳定性和糖基化程度等检测后发现, 所表达的猪 α -干扰素 N 端氨基酸序列 (前 5 个) 正确, 对酸和热基本稳定, 二硫键对目的蛋白的活性至关重要, 没有发现目的蛋白的糖基化.

[关键词] 重组猪 α -干扰素 (PoIFN- α), 亲和层析, 离子交换层析, 糖基化, 生化性质

[中图分类号] S852.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2008)02-0097-04

Purification of Recombinant Porcine- α Interferon and the Identification of its Biochemical Characteristics

Shao Jing^{1,2}, Yu Ruison^{2,3}, Dong Shijuan^{2,3}, Zhu Yumin^{2,3}, Shen Shiyuan^{2,3},
Cao Xiangrong¹, Li Zhen^{2,3}

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2. Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

(3. Shanghai Municipal Key Laboratory of AgriGenetics and Breeding, Shanghai 201106, China)

Abstract In this study, we developed the technique for purifying recombinant porcine- α interferon (PoIFN- α) that was efficiently expressed by *Pichia Pastoris* and studied the biochemical characteristics of PoIFN- α . Recombinant porcine IFN- α was purified to homogeneity by affinity chromatography and ion-exchange chromatography stepwisely after centrifugation, dialysis and filtration. The results of its biochemical characteristics showed that the first five amino acids of N-terminal of the purified protein was correct. The protein was heat and acid-stable and the dithiolate-bond was crucial to the protein activity. No glycosylation were found on the target protein.

Key words recombinant porcine α -interferon (PoIFN- α), affinity chromatography, ion-exchange chromatography, glycosylation, biochemical characteristics

干扰素 (Interferon, IFN) 是一类重要的细胞因子, 具有种属特异性, 在同种细胞上具有广谱的抗病毒、抗细胞增殖、免疫调节等多种生物活性. 根据干扰素的来源和性质可分为 I 型干扰素和 II 型干扰素^[1,2]. 猪干扰素 (PoIFN) 也可分为 I 型和 II 型, I 型包括 α 、 β 、 ω 和 τ 4 种, II 型仅有 γ 1 种. I 型猪干扰素基因无内含子, 基因组中一般含有多个 I 型猪干扰素基因^[3]. 猪 IFN- α (PoIFN- α) 基因家族分为二类同源的、但明显不同的基因类型: PoIFN- α 1 和 PoIFN- α 2. 目前, PoIFN- α 1 基因已经在真核和原核细胞中得到表达, 但相关的分离纯化报道很少. 通过研究表明, PoIFN- α 可被用作动物疫苗的免疫增强剂和猪病毒病的治疗剂^[4,5], 因此, 在获得较高水平表达产物的基础上, 探索重组 PoIFN- α 的分离纯化工艺, 具有重要的理论意

收稿日期: 2007-07-02

基金项目: 上海市农业科学院青年科技发展基金 (农青年科技 2005-02) 资助项目.

通讯联系人: 李震, 研究员, 研究方向: 动物生物技术, E-mail: zhenli@sh163.com

义和实践价值.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、Tris 甲醇、氯化钠、三氟甲基磺酸、苯酚、脱氧胆酸钠和三氯乙酸购自上海国药生物公司, 辣根过氧化物酶、PVDF 膜和咪唑购自上海西唐生物公司, BCA 试剂盒购自 Pierce 公司.

1.1.2 设备及仪器

高速离心机 (Sigma), 凝胶电泳仪 (Bio-rad), 凝胶图像处理系统 (上海 Tanon), pH 计 (Millipore), Millipore 0.2 μ m 滤器 (Pall), 截留相对分子质量 3500 的透析袋 (上海华美), FPLC 分离纯化系统和 HisTrap HP Kit 亲和预装柱 (安玛西亚), HisTrap DEAE FF 离子交换预装柱 (GE Healthcare), 真空干燥器 (Savant).

1.2 方法

1.2.1 纯化

发酵液于 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min 收集上清液; 上清液用 pH 8.0 PO_4^{3-} 20 mmol/L, NaCl 500 mmol/L 透析 24 h 后, 于 4℃ 10 000 r/min 离心 15 min 再次收集上清液; 上清液经过 0.2 μ m 微孔滤器过滤后上样金属 Ni^{2+} 亲和预装柱 (1 mL), 通过不同浓度的咪唑进行阶段洗脱, 收集流出峰并测其活性; 活性峰用 pH 7.6 Tris 20 mmol/L 透析 24 h 后, 上样 DEAE FF 离子交换预装柱 (1 mL), 通过不同浓度的 NaCl 阶段洗脱, 收集流出峰并测其活性.

1.2.2 活性检测

猪 α -干扰素的活性检测采用 WISH 细胞 (人羊膜传代细胞株) - VSV (滤泡性口炎病毒) 抗病毒系统^[6]. IFN 抗病毒活性单位的定义是指能抑制 50% 细胞病变或 50% 病毒空斑形成效应的 IFN 最高稀释度的倒数.

1.2.3 纯度检测

SDS-PAGE 银染电泳鉴定纯度^[7].

1.2.4 蛋白浓度测定

蛋白浓度用 BCA 试剂盒, 具体步骤见盒中说明书.

1.2.5 蛋白质免疫印迹

样品先进行 SDS-PAGE 电泳, 结束后切下含有目的蛋白的胶; 将 NC 膜和 3 mm 滤纸按海绵垫—滤纸 (3 张)—凝胶—NC 膜—滤纸 (3 张)—海绵垫的结构放入转印电泳槽, 冰浴下 200 mA 恒流转印 3 h 结束后将 NC 膜依次置于: 封闭液中振摇 1 h 用封闭液稀释为 1:6000 的鼠抗 $\text{PoIFN}\alpha$ 一抗中振摇 1 h; PBST 中洗 3 次, 每次 10 min 用封闭液稀释为 1:5000 的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 的二抗中振摇 1 h; PBST 洗 3 次, 每次 10 min 最后将膜浸入底物溶液中直至适中的颜色出现, 用去离子水冲洗终止反应.

1.2.6 蛋白质 N 端氨基酸序列、等电点 (pI) 的测定

委托上海中科院生化与细胞所测试中心检测.

1.2.7 对酸、热、巯基乙醇稳定性的检测

①猪 α -干扰素对酸的稳定性: 将 1 mL 纯化的蛋白样液在 4℃ 下置于 pH 2.0 20 mmol 的磷酸二氢钠溶液中透析 24 h.

②猪 α -干扰素对热的稳定性: 将 1 mL 纯化的蛋白样液放入 Eppendorf 离心管中, 置于 56℃ 水浴锅内 1 h.

③猪 α -干扰素对巯基乙醇的稳定性: 将 200 mmol β -巯基乙醇加入纯化的蛋白样液中, 在 4℃ 下置于 pH 7.4 的磷酸二氢钠溶液中透析 24 h.

通过抗病毒系统检测猪 α -干扰素的活性^[8].

1.2.8 糖基化修饰的初步鉴定

(1)辣根过氧化物酶 (HRP) 的糖链切割: 取一定量 HRP 于 Eppendorf 离心管中, 依次加入 100 μ L 三氟

甲基磺酸和 50 μ L 苯酚,于 0 $^{\circ}$ C 1 000 r/m in 旋转 1 h,加 100 μ L 20mmol/L Tris 终止反应,并于 4 $^{\circ}$ C pH 7.4 20 mmol/L 磷酸缓冲液内透析 24 h,用三氯乙酸沉淀法沉淀,加入适量的样品缓冲液后进行 SDS- PAGE 电泳^[9-10].

(2)猪 α -干扰素的糖链切割:先通过三氯乙酸沉淀法将目的蛋白沉淀,冷冻抽干后,按方法 (1) 对目的蛋白进行糖链切割.

2 结果与分析

2.1 纯化

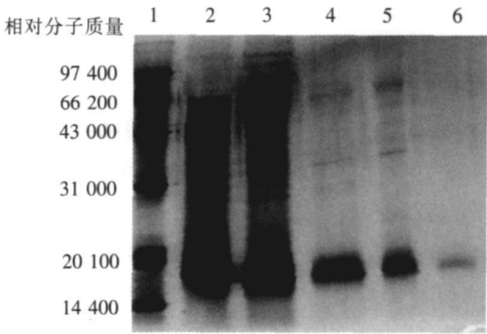
图 1 显示亲和层析后 (泳道 4) 的杂蛋白量已经大幅减少,再经离子交换层析分离纯化后 (泳道 6),可以获得较为单一的目的蛋白.表 1 显示了这一纯化路线的纯化效果,最终的蛋白比活为 1.5×10^4 IU/mg 蛋白回收率为 1.33%,纯化倍数为 0.27.

表 1 猪 α -干扰素的分离纯化的效果
Table 1 Purification efficiency of PoIFN- α

样品	蛋白浓度 / (mg/mL)	蛋白活力 / ($\times 10^4$ IU/mL)	蛋白比活 / ($\times 10^4$ IU/mg)	蛋白收率 /%	纯化因子
上样前发酵液	3.00	23	7.67	100	—
亲和上样前透析液	1.64	6.18	3.77	54.67	0.49
亲和上样收集的峰	0.73	2.06	2.82	24.33	0.75
离子交换前透析液	0.11	0.61	5.55	3.67	1.97
离子交换收集的峰	0.04	0.06	1.50	1.33	0.27

2.2 Western blot 蛋白质 N 端氨基酸序列和等电点 (pI) 的测定

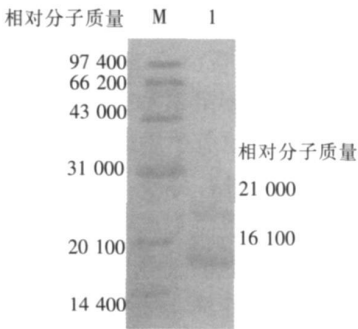
检测发现相对分子质量 16 100 和 21 000 2 条蛋白的 N 端前 5 个氨基酸序列均是 E-A-E-A-X,对照猪 α -干扰素 N 端前 5 个氨基酸序列 (C-D-L-P-Q) 和载体 α 信号肽最后 5 个氨基酸序列 (R-E-A-E-A) 发现,所测的前 4 个氨基酸序列是载体 α 信号肽末端未切除的部分;X 在一般情况下是 C,正好是目的蛋白的第一个氨基酸,这样连同 Western blot 分析结果 (图 2) 均证明,在 16 100 和 21 000 出现的 2 条蛋白 N 端保持完好,且均是猪 α -干扰素.另外,相对分子质量 16 100 的目的蛋白等电点为 4.5~4.8 而用软件分析猪 α -干扰素裸蛋白的等电点为 6.4.



1.标准蛋白,2.上样前发酵液,3.亲和上样前经过透析的发酵液,4.亲和层析分离后收集的峰(4%),5.离子交换层析上样前经过透析的样品,6.经离子交换层析后收集的峰(15%)
其中 4% 为咪唑浓度百分数,15% 为 NaCl 浓度百分数

图 1 猪 α -干扰素纯化电泳图谱

Fig.1 The purification electrophoresis of porcine α -interferon



泳道 M:蛋白预染 Marker
泳道 1:重组毕赤酵母表达的猪 α -干扰素

图 2 猪 α -干扰素的 Western blot

Fig.2 Western blot analysis of PoIFN- α

表 2 猪 α -干扰素对酸、热、巯基乙醇的稳定性

Table 2 The stability of PoIFN- α in face of acid, heat and mercaptoethanol

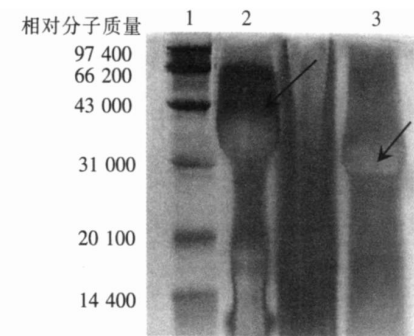
条件活性	未经处理	酸 (pH2.0)	热 (56 $^{\circ}$ C, 1 h)	巯基乙醇 (200mmol/L)
干扰素滴度 / (IU/mL)	628	503	312	0

2.3 对酸、热、巯基乙醇稳定性的检测

表 2 说明在酸、热和巯基乙醇存在的条件下: 猪 α -干扰素在 pH2.0 时基本稳定, 在 56℃ 1 h 内具有一定的稳定性, 而它对巯基乙醇则十分敏感, 表明二硫键对维持其活性有着非常重要的作用.

2.4 糖基化修饰的初步鉴定

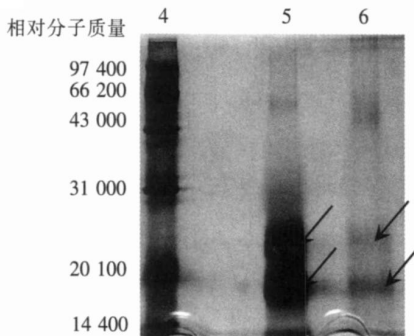
图 3 显示 HRP 经 TMS 切割后相对分子质量由 40 000 左右移至 30 000 附近, 说明 TMS 法确实能够切除糖蛋白的糖链. 图 4 显示 16 100 和 21 000 这 2 条带经 TMS 法切割后, 并没有出现位置上的明显变化, 所以初步认为表达的猪 α -干扰素没有发生糖基化.



1.标准蛋白,2.糖链切割前的辣根过氧化物酶(箭头所指),
3.糖链切割后的辣根过氧化物酶(箭头所指)

图 3 辣根过氧化物酶糖链切割电泳图谱

Fig.3 Electrophoresis of HRP glycosidic incision



4.标准蛋白,5.糖链切割前的猪 α 干扰素(箭头所指),
6.糖链切割后的猪 α 干扰素(箭头所指)

图 4 猪 α 干扰素糖链切割电泳图谱

Fig.4 Electrophoresis of PolIFN- α glycosidic incision

3 讨论

在金属螯合亲和层析纯化过程中, 本文选用咪唑为竞争性物质, 通过改变咪唑浓度来洗脱目的蛋白. 实验中目的蛋白洗脱下的咪唑浓度较低, 显示目的蛋白结合不很牢固, 可能与蛋白质的空间结构有关, 也可能与目的蛋白 C 末端 His 的降解有关; 在离子交换层析纯化过程中, 缓冲液的 pH 值是影响分离效果的关键因素之一, 实验中选用的 pH 7.6 缓冲液可以较好地达到分离纯化重组猪 α -干扰素的目的.

从整个纯化效果来看, 蛋白回收率、比活和纯化因子都不理想, 可能的原因是: 在纯化过程中, ① 一些含有目的蛋白组分较高、但纯度不是很高的样品不得不被放弃; ② 有相当一些目的蛋白可能因为外界条件的变化而改变了其空间构象, 造成目的蛋白的失活.

本实验中的目的蛋白 C 端理论上带有 15 个氨基酸残基的抗原表位和 6 个组氨酸残基, 如果表达完整, 相对分子质量应该在 21 000 左右. 实验结果显示相对分子质量在 16 100 和 21 000 的 2 条蛋白均是目的蛋白, 造成两者相对分子质量差异的原因可能是: 大部分目的蛋白 C 末端的 6 个 His 甚至 15 个抗原表位氨基酸残基已经降解. 另外, 目的蛋白理论等电点应在 6.4 左右, 这与所测的 4.5~4.8 也有明显差异, 可能的原因是: 目的蛋白 C 端的 15 个抗原表位氨基酸序列 (E-Q-K-L-I-S-E-E-D-L-N-S-A-V-D) 中有 5 个是酸性氨基酸, 只有 1 个是碱性氨基酸, 这也说明目的蛋白 C 末端 6 个 His 可能已经部分或全部降解, 从而导致整个蛋白的电负性增加.

三氟甲基磺酸法 (TMS) 可以切除与肽链直接相连的单糖以外的所有糖基, 而肽键则在同样的条件下保持稳定, 最后通过电泳比较糖链切割前后蛋白相对分子质量的变化来判断某一蛋白是否糖基化. 该法反应温和, 速度很快, 对糖基化类型没有选择性, 可以作用于所有类型的糖链. 经过 TMS 法切割后的目的蛋白 (图 3 图 4) 相对分子质量未发生明显变化, 故初步判断目的蛋白没有糖基化.

(下转第 104 页)

- [9] Nadlong L Sepueira L Increase in perox idase activities are not directly involved in induced resistance in tobacco[J]. Physi-
ol Plant Pathol 1980(16): 1-8
- [10] 宋平,曹显祖,吴永宏,等. 水稻矮秆基因对 GA3敏感性的酶学基础[J]. 江苏农学院学报, 1994, 15(4): 10-13
- [11] Giannopolitis C N, Rice S K. Superoxide dismutase Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in
breeding[J]. Plant Physiol 1977(59): 315-318
- [12] 刘惕若,陈洁敏,郭彦太,等. 小麦品种对赤霉病的抗性研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 1995(1): 1-5
- [13] 刘道宏. 植物叶片的衰老[J]. 植物生理学通讯, 1983(2): 14-19
- [14] 林植芳,李双顺,林桂珠,等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J]. 植物学报,
1984, 26(6): 605-615
- [15] 任泽堂. 超氧自由基与叶片衰老时叶绿素破坏的关系[J]. 植物生物学通讯, 1991, 27(4): 277-279
- [16] 王维平,刘伊强. 小麦对赤霉病抗性不同品种的 SOD 活性[J]. 植物生理学报, 1993 19(4): 353-358
- [17] 郭海军,黄国存. 黄萎病对棉花叶片 SOD、POD 酶活性和光合特性的影响[J]. 中国农业科学, 1995, 28(6): 40-46
- [18] 李犁,余叔文. 超氧化物歧化酶活性与小麦对 HSO₃-NO₂抗性之间的关系[J]. 植物生理学报, 1989 15(1): 57-61
- [19] 靳华芬. 小麦抗感白粉病的不同品种过氧化物酶的比较研究[J]. 植物学报, 1985, 27(2): 222-224

[责任编辑: 孙德泉]

(上接第 100 页)

[参考文献]

- [1] C Sen Ganes Lengyel Peter The interferon system: A bird' s eye view of its biochemistry [J]. The Journal of Biological
Chemistry, 1992, 267(8): 5 017.
- [2] Gong Cheng Weizao Chen Zuofeng Li et al Characterization of the porcine alpha interferon multigene family[J]. Gene
2006(1), 382-28
- [3] F Lefevre, C La Bonnaardiere Molecular cloning and sequencing of a gene encoding biologically active porcine alpha-interfer-
on[J]. Interferon Res 1986, 6(4): 349-360
- [4] J Brian Derbyshire The interferon sensitivity of selected porcine virus[J]. Can J Vet Res 1989 53(1): 52-55
- [5] J Chinsangaran, M E Picone, M J Gubman Ability of foot and mouth disease virus to form plaques in cell culture is associ-
ated with suppression of alpha/beta interferon[J]. J virol 1999 73(12): 9891-9898
- [6] S Pesika, A Mesger Interferon standardization and designations[J]. J Interferon Cytokine Res 1997, 17(suppl11): 9-14
- [7] 牛敏, 颜英俊, 尹一兵. 蛋白质凝胶电泳银染色法的改进[J]. 医学检验进修杂志, 1999, 6(3): 13-15
- [8] Hana M Weingart, J Brian Derbyshire The induction and characterization of natural porcine interferons alpha and beta[J].
Can J Vet Res 1990 54(3): 349-354
- [9] Tans JW, Welinder K G. Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme
[J]. Anal Biochem, 1995, 228(1): 48
- [10] Edge A S B. Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulfonic acid: elucidation of molecular structure and
function[J]. Biochem J 2003, 376(Pt2): 339

[责任编辑: 孙德泉]