

融合蛋白 IFN-IgG Fc 在乳酸乳杆菌中的表达及其生物学活性研究

高绪文^{1,2}, 陈 辉³, 贾润清², 姚立红², 马长伟¹, 张智清^{2,*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083;

2. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 北京 100052; 3. 首都医科大学 北京 100069)

摘 要: 用乳酸菌表达有药用价值的生物学活性多肽, 是当前国际上的研究热点之一, 对开发新的功能性食品具有广阔的前景。本文应用 PCR 方法将人干扰素 IFN- γ 基因与 IgG Fc 基因连接, 并引入一段柔性连接肽, 构建了融合蛋白基因 IFN-IgG Fc, 将融合蛋白基因克隆到原核表达载体 pSC111 AE 中, 转化乳酸乳杆菌 ATCC393 进行诱导表达及鉴定, 并研究了融合蛋白的生物学活性。结果表明, 通过 Western-Blot 方法在表达上清液检测出干扰素融合蛋白, ELISA 测定表明两段多肽能够保持各自的构象, 基因工程乳酸菌表达的上清液可以诱导 WISH 细胞产生明显的抗 VSV 病毒的活性, 其活性为 1.71×10^3 IU/ml。本文首次构建并在大肠杆菌和乳酸菌表达了 IFN-IgG Fc 融合蛋白, 获得了能产生人干扰素的乳酸菌株, 为基因工程乳酸菌及相关药物的开发研究奠定了基础。

关键词: 乳酸菌; 干扰素; 融合蛋白; 抗病毒

Expression and Bioactivities Study on IFN-IgG Fc Fusion Protein in *Lactobacillus casei*

GAO Xu-wen^{1,2}, CHEN Hui³, JIA Rui-qing², YAO Li-hong², MA Chang-wei¹, ZHANG Zhi-qing^{2,*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Institute for Virus Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China;

3. Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Expressing bioactive polypeptide by using gene modified LAB is one of the most popular researches in the world. It has a good potential to develop new functional food. IFN- γ and IgG Fc gene were PCR amplified and linked by a flexible hinge to code for a fusion protein IFN-IgG Fc. The fusion gene was cloned to pSC111 AE vector and electro-transformed into *Lactobacillus casei* ATCC393. We studied the biological activities of the expression product *in vitro*. The results showed that we can detect the fusion protein in the supernatant by Western-Blot. The results of ELISA showed that there is no effect on conformation and biological activity between the two proteins. We found that supernatant of recombinant LAB can introduce the antiviral activity in WISH cells and the anti-viral activity of the product is about 1.71×10^3 IU/ml. The study laid a foundation for further use of modified LAB in the domains of food technology and drug development.

Key words: lactic acid bacteria; interferon; fusion protein; antiviral

中图分类号: 0786

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0205-04

几个世纪以来, 乳酸菌作为主要的食品工业菌株已广泛应用于食品及饲料加工业, 如乳制品、肉制品、蔬菜制品、软饮料等食品的加工和保鲜, 被公认为是安全的食品微生物(GRAS generally recognized as safe)。同时, 随着对乳酸菌的生理作用的深入研究, 人们逐渐认识到乳酸菌对人体健康有益的生理功能^[1]。国内外对乳酸菌的研究开发虽然进展迅速, 但在食品和医药领域主要还是集中在天然野生菌株。到 20 世纪 90 年代,

随着分子生物学和分子遗传学的发展, 应用基因工程的方法研究开发具有新型功能的基因工程乳酸菌是食品生物工程和微生物学的一个新的研究热点。在基因水平上进行遗传性状的改善, 从而研制开发出更为优良的基因工程工业菌株和益生菌株^[2-3]。

目前, 基因工程乳酸菌的研究工作主要集中在两个方面, 一是对乳酸菌染色体基因组的完全测序, 并利用蛋白质组学(proteomics)、全局转录分析(global tran-

收稿日期: 2006-09-14

*通讯作者

作者简介: 高绪文(1975-), 男, 讲师, 硕士研究生, 主要从事基因工程乳酸菌的研究及相关产品开发。

scription analysis)、比较基因组学(comparative genomics)等新的方法对基因组序列进行比较分析,这些工作对我们认识乳酸菌的遗传学、生理学特性有重要的意义,也对如何开发新型乳酸菌提供了更好的平台^[4]。另一方面是构建高效的食品级克隆及表达载体,通过基因重组技术将外源基因,如某种营养因子基因、功能基因、酶基因等,转入正常乳酸菌,构建能够表达外源蛋白或体现新功能的基因工程菌株^[5]。该菌株可以直接用于发酵食品的生产,提高产品的质量,或者让构建的菌株再回到肠道内,在肠道内生长繁殖,除发挥原有的益生功能,还能发挥特殊基因的功能。因此,利用基因工程方法对乳酸菌进行遗传修饰和改造,使其在食品加工及人类疾病预防治疗中发挥特定的作用^[6-8],今后对于益生菌分子生物学的研究以及益生菌基因工程菌的开发和利用将是一个十分重要的研究方向。本文以乳酸乳杆菌 ATCC393 位宿主菌^[9],将人干扰素 IFN- γ 2b 基因^[10]与 IgG Fc 基因连接,并引入一段柔性连接肽,构建了融合蛋白基因 IFN-IgG Fc,将融合蛋白基因克隆到原核表达载体 pSC111 AE 中,转化乳酸乳杆菌 ATCC393 并诱导表达,获得了分泌性表达融合蛋白的菌株,为开发新型食品微生物产品进行了有益的尝试。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞和病毒

大肠埃希菌 DH5 α 、TG1、人传代羊膜细胞(WISH)、滤泡性口膜炎病毒(VSV) 中国疾病预防控制中心病毒病所病毒基因工程国家重点实验室;干酪乳杆菌 ATCC393 美国 Symbi gene 公司。

1.1.2 质粒

质粒 pSC111AE 美国 Symbi gene 公司;pGEMT 载体 Promega 公司;pBlue/IFN- γ 2b、T/TNFR-IgG Fc 质粒 本室保存。

1.1.3 工具酶

Pfu DNA 聚合酶 Sangon 公司;T4 DNA 连接酶 Invitrogen 公司;Taq DNA 聚合酶 Golden 公司;其它核酸内切酶 Biolabs 公司。

1.1.4 试剂

dNTP、ATP、IPTG、X-gal 华美公司;核酸分子量标准 Takara 公司;蛋白分子量 Marker Sigma 公司;质粒提取试剂盒 Vi tagene 公司;DNA 凝胶回收试剂盒 QIAGEN 公司;干扰素标准品 中国药品生物制品检定所;鼠抗人干扰素- γ 2b 单抗 北京远策公司;羊抗鼠 IgG/HRP、羊抗人 IgG-Fc 多抗、兔抗羊 IgG/HRP 北京中山公司;胎牛血清 Hyclone 公司;其它

试剂 Sigma 公司或国产。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 T1/IFN-IgG Fc 的构建与鉴定

根据 IFN- γ 2b 和 IFN-IgG Fc 的基因序列,分别合成四条引物:引物1:5'-a tga att cat atg tgt gac ctg ccg cag acc -3';引物2:5'-ac gga tcc acc gcc acc ttc ttt aga acg cag -3';引物3:5'- tag gcc cag ccg gcc tgt gac ctg ccg cag acc-3';引物4:5'-tt ggc ggc cct tac tac tgc gtg tag tgg ttg-3'。引物由上海博亚生物技术公司合成。

以 pBlue/IFN- γ 2b 质粒为模版,PCR 扩增 IFN- γ 2b 基因。将回收的 PCR 产物加 A 后与 pGEM-T 载体连接,PCR 及酶切鉴定阳性克隆,将测序正确的重组克隆命名为 T1/IFN- γ 2b。分别用 EcoR I、BamH I 双酶切 T1/TNFR-IgGFc 及 T1/IFN- γ 2b,回收目的片段。将回收的 T1/IgG Fc 和 IFN- γ 2b 连接,PCR 及酶切鉴定阳性克隆,重组克隆命名为 T1/IFN-IgG Fc。

1.2.2 重组表达质粒 pSC111 AE/IFN-IgG Fc 的构建

以 T1/IFN-IgG Fc 质粒为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物纯化回收后末端加 A 与 pGEM-T 载体连接,PCR 及酶切鉴定阳性克隆,将测序正确的质粒命名为 T2/IFN-IgG Fc。

将质粒 pSC111 AE 和 T2/IFN-IgG Fc 分别以 Sfi I 和 Asc I 双酶切,回收纯化目的片段后,连接产物电转化大肠杆菌 TG1、PCR 及酶切鉴定阳性克隆,构建表达 IFN-IgG Fc 融合蛋白的表达质粒,重组克隆命名为 pSC111 AE/IFN-IgG Fc。

1.2.3 重组质粒 pSC111 AE/IFN-IgG Fc 电转化干酪乳杆菌 ATCC393 及蛋白表达

质粒 pSC111 AE/IFN-IgG Fc 电转化干酪乳杆菌 ATCC393,挑取转化子阳性克隆,进行 PCR 鉴定。将阳性克隆在含 2% 乳糖的培养基中培养诱导表达 36h 后,取上清液做检测。

1.2.4 ELISA 鉴定表达产物 IFN-IgG Fc 融合蛋白

取相同培养条件的表达菌 ATCC393/pSC111 AE/IFN-IgG Fc 和对照菌 ATCC393/pSC111 AE 的菌液上清,包被 96 孔酶标板,干扰素标准品做阳性对照。分别加入 1%BSA 封闭、鼠抗人 IFN- γ 2b 一抗以及羊抗鼠 IgG/HRP 二抗作用,显色后在 490nm 处比色测定,IgG Fc 多抗检测方法同上。

1.2.5 Western-Blot 鉴定表达产物 IFN-IgGFc

分取表达菌 ATCC393/pSC111 AE/IFN-IgG Fc 和对照菌 ATCC393/pSC111AE 的表达上清液,用三氯乙酸法浓缩上清蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳及 Western-Blot。

1.2.6 乳酸菌表达上清液的抗病毒活性测定

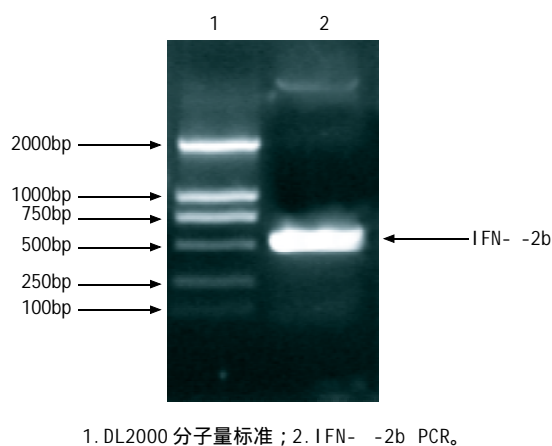
将生长状态良好的 WISH 细胞消化后用,接种 96 孔细胞培养板(2×10^4 个/ml 孔),镜下观察细胞培养至单

层后加入 4 倍稀释的表达上清液和干扰素标准品, 培养 24h, 加入 VSV 病毒攻击, 待对照孔的细胞 75% 以上发生明显病变时记录结果, 计算抗病毒活性效价。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 T1/IFN-IgG Fc 的鉴定

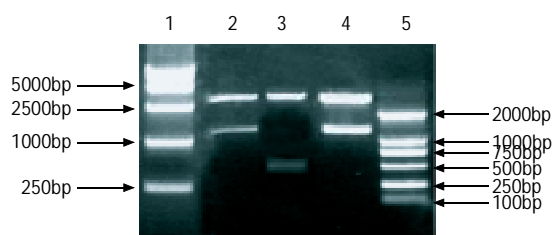
以 pBlue/IFN- γ -2b 质粒为模板进行 PCR 扩增, 获得约 500bp 的基因片段(图 1), 测序结果表明扩增的 IFN- γ -2b 基因与模板中的序列完全一致。分别用 EcoRI & BamHI、SalI & ApaI、EcoRI & XhoI 双酶切鉴定, 电泳结果表明 T1/IFN-IgG Fc 构建正确(图 2)。



1. DL2000 分子量标准; 2. IFN- γ -2b PCR。

图 1 PCR 扩增 IFN- γ -2b 基因电泳结果

Fig.1 PCR amplification of IFN- γ -2b gene



1. DL15000 分子量标准; 2. SalI & ApaI 酶切; 3. EcoRI & BamHI 酶切; 4. EcoRI & XhoI 酶切; 5. DL2000 分子量标准。

图 2 酶切 T1/IFN-IgGFc 质粒电泳结果

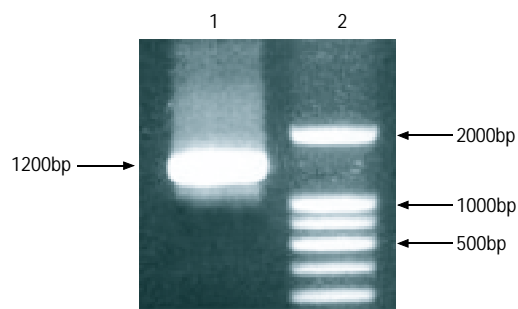
Fig.2 Analysis of plasmid of T1/IFN-IgGFc by enzyme digestion

2.2 重组表达载体 pSC111 AE/IFN-IgG Fc 的鉴定

以 T1/IFN-IgG Fc 质粒为模板进行 PCR 扩增, 电泳结果显示得到 1200bp 的基因片段, 与理论值相符(图 3)。测序结果表明扩增的基因测序结果表明扩增的基因序列完全正确。分别经 PstI、SfiI & AscI 酶切鉴定, 结果表明表达载体 pSC111AE/IFN-IgG Fc 构建正确(图 4)。

2.3 融合蛋白 IFN-IgGFc 免疫学活性的检测

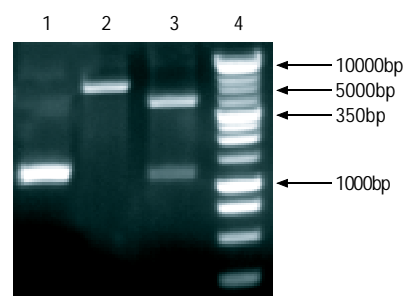
在乳酸菌诱导表达至 36h 后, 取上清液做免疫学检测。Western-Blot 鉴定结果表明, 融合蛋白对 IFN- γ -



1. IFN-IgG Fc PCR; 2. DL2000 分子量标准。

图 3 PCR 扩增 IFN-IgG Fc 基因电泳结果

Fig.3 PCR amplification of IFN-IgG Fc

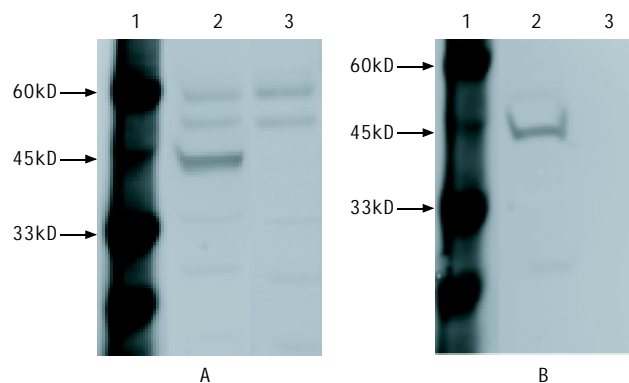


1. PCR 结果; 2. PstI 酶切; 3. SfiI and AscI 酶切结果; 4. DL10000 分子量标准。

图 4 质粒 pSC111 AE/IFN-IgG Fc 的酶切鉴定图谱

Fig.4 Analysis of plasmid of pSC111 AE/IFN-IgG Fc by enzyme digestion

2b 单抗和 IgG Fc 多抗有免疫反应性, 证明重组蛋白 IFN-IgG Fc 具有免疫学活性(图 5)。



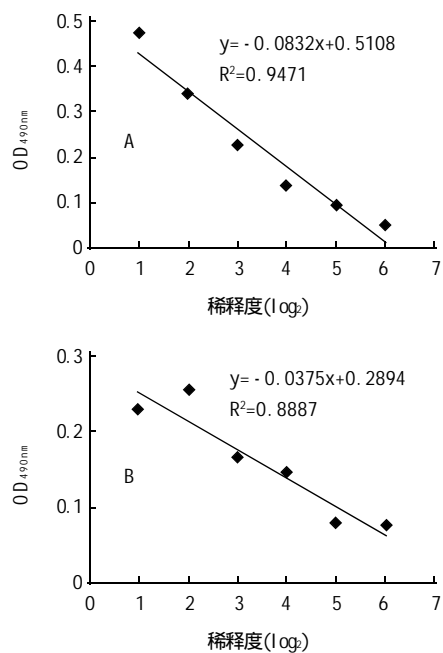
A. IFN-2b 抗体: 1. 蛋白分子量标准; 2. 乳酸菌表达上清; 3. 空质粒对照。

B. IgG Fc 抗体: 1. 蛋白分子量标准; 2. 乳酸菌表达上清; 3. 空质粒对照。

图 5 乳酸菌表达上清产物的 Western-Blot 分析

Fig.5 Western-Blot analysis of pSC111 AE/IFN-IgGFc expressed in LAB

表达菌和对照菌培养液上清倍比稀释后 ELISA 检测结果表明, 乳酸菌表达的融合蛋白 IFN-IgG Fc 与 IFN- γ 单抗和 IgG Fc 多抗有特异结合, 且呈现线性关系(图 6), 说明两个蛋白都保持各自独立的构象。



A. 一抗为鼠抗人 IFN- γ 2b; B. 一抗为羊抗人 IgG Fc。

图6 重组菌表达菌上清液的ELISA检测结果

Fig.6 ELISA results of gene modified LAB supernatant

2.4 融合蛋白 IFN-IgGFc 的抗病毒活性测定

分别挑取 6 个重组乳酸菌和 6 个带有空质粒 pSC111AE 的对照菌, 相同的条件下进行诱导表达, 取上清液作抗病毒活性检测, 结果如表 1 所示, 重组乳酸菌表达上清的比活性为 1.71×10^3 IU/ml, 空载体对照组的比活性为 30.06 IU/ml, 重组乳酸菌表达上清值明显高于病毒对照和空白对照, 表明重组乳酸菌表达的融合蛋白具有一定的抗病毒活性。

表1 乳酸菌分泌的融合蛋白的抗病毒活性测定

Table 1 Detection of antivirus activity of the fusion protein expressed in LAB

菌株序号	抗病毒活性	
	ATCC393/pSC111AE/IFN-IgGFc (IU/ml)	ATCC393/pSC111AE (IU/ml)
1	1.47×10^3	11.03
2	2.02×10^3	62.40
3	1.93×10^3	12.05
4	1.67×10^3	34.81
5	1.30×10^3	28.65
6	1.87×10^3	31.42
$\bar{X} \pm S D$	$(1.71 \pm 0.26) \times 10^3$	30.06 ± 18.76

3 结 论

目前, 经大肠杆菌和中国仓鼠卵细胞表达的重组 IFN- γ 2b 在临床上得到广泛应用, 主要用于治疗由病毒引起的白血病、乙型、丙型肝炎等。重组干扰素蛋白分子量很小, 不具有天然干扰素的糖基化结构或糖化后

的糖蛋白与人类不同, 因此与人体自身产生的干扰素相比, 专一性不高且在血液中容易被降解, 需要每天注射高剂量连续给药才能达到治疗效果, 易产生副作用, 还可能产生中和抗体, 因此临床上使用的第一代基因工程蛋白药物, 大多数存在半衰期短、生物利用度低等问题, 从某些方面来说限制了其临床应用。因此研究开发新型的给药方式, 提高干扰素在体内的作用, 延长在体内的半衰期和降低免疫原性, 仍然是目前研究的一个主要方向。

本文第一次报道了将人干扰素 IFN- γ 2b 基因进行修饰, 用一段柔性链基因与人 IgG1 的 Fc 部分相连, 将载体转化到原核细胞中表达。融合蛋白使干扰素细胞因子的分子量从 21kD 增加到 45kD, 同时利用 IgG Fc 蛋白形成天然的二聚体结构, 增加了整个蛋白的空间结构。本文未做融合蛋白血浆半衰期的研究, 但有文献报道, 体内动物实验结果表明, 由 IgG Fc 连接的融合蛋白可以显著的延长其血浆半衰期, 如白介素-10-Fc 的血浆半衰期由 31min 提高到 31h。本研究中检测乳酸杆菌表达的上清液抗病毒比活性为 1.71×10^3 IU/ml, 与单纯表达干扰素的上清液相比, 仅为 1%。融合蛋白全长共有 400 个氨基酸, 由于蛋白过大, 表达质粒中的分泌信号肽不能将所有的蛋白分泌到细胞外, 大量的蛋白滞留在细胞质内(实验数据未列出), 影响了上清液的抗病毒活性。

参考文献:

[1] REID G J, SEBULSKY M T, et al. Potential uses of probiotics in clinical practice[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16 (4): 6582-6721.

[2] BOLOTIN A B, WINCKER P, MAUGER S, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IL1403[J]. Genome Res, 2001, (11): 731-753.

[3] GASSON M J. *In vivo* genetic systems in lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 1990, 87: 43-60.

[4] VOS W M. Safe and sustainable systems for food-grade fermentation by genetically modified lactic acid bacteria[J]. Int Dairy, 1999(9): 3-10.

[5] VOS W M. Gene expression systems for lactic acid bacteria[J]. Current Opinion in Microbiology, 1999(2): 289-295.

[6] MARTIN M C, ALONSO J C, SUAREZ J E, et al. Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 2599-2604.

[7] LEENHOUTS K, BOLHUIS A, VENEMA G, et al. Construction of a food-grade multiple-copy integration system for *Lactococcus lactis*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 417-423.

[8] MACCORMICK C A, GRIFFIN H G, GASSON M J. Construction of a food grade host/vector system for *Lactococcus lactis* based on the lactose operon[J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 127: 105-109.

[9] 吕晓英, 张朝武, 裴晓方, 等. 作为宿主系统的几株乳酸菌的表型特征[J]. 中国微生物学杂志, 2001, 13(5): 265-266.

[10] CORSMIT E P M, METZ J De, SAUERWEIN H P, et al. Biological responses to IFN- γ 2 administration in humans[J]. J Interferon and Cytokine Res, 2000, 20: 1039-1047.

[11] 贾士芳, 王荫榆, 郭兴华, 等. 乳杆菌电转化条件的研究[J]. 生物工程学报, 1998(4): 79-83.