人 αD 型干扰素基因在原核细胞中的表达

侯云德 李应霞 周建华 杨新科 张智清

（中国医学科学院病毒学研究所，北京）

刘 新 垣

（中国科学院上海生物化学研究所，上海）

干扰素系统是脊椎动物细胞功能自我稳定的重要系统。近 10 年来临床应用的初步结果也已表明，干扰素对多种病毒病和某些恶性肿瘤有一定疗效[1]。因此，采用 DNA 重组技术，大量生产干扰素，具有较大的经济效益。早在 1974 年我们就发现人脐血白细胞的干扰素诱生能力明显地高于成人血白细胞，并又选育出干扰素高诱生性能的病毒株——新城疫病毒 F 株[2]。我们以此系统提取了 12S 聚（A）RNA，制备 dsRNA，以 pBR322 为载体，建立了人干扰素（IFN）cDNA 的无性繁殖系，在大肠杆菌中有低效表达，平均产量为 2 万单位/升菌液。经血清学和理化鉴定，表达的多肽为人 α 干扰素[3]。本文进一步采用 lac 启动基因使干扰素的平均产量大约提高了 100 倍左右。

一、材料和方法

pUR222 及大肠杆菌 K12 BMH71-18（Δ[lac, pro], F′ lac $I^qZ\Delta M15pro^+$）由加拿大 Calgary 大学汪大建博士惠赠，选择培养基采用 5% McConkey 琼脂，内含 5×10^{-4} M IPTG（Isopropyl-thiogalactoside）及氨苄青霉素 25μg/ml。DNA 片段的切割，用碱性磷酸酶处理及连接技术见文献[4]；[α^{32}p] dATP（3000Ci/mmol，Amersham）缺口翻译技术、菌落杂交技术、干扰素活性的测定及血清型别鉴定见文献[3]；快速质粒提取方法见文献[5]。

二、结果和讨论

在用病毒诱生的人脐血白细胞中提取的 12S 聚（A）RNA 逆转录 cDNA 所克隆的基因库中，菌落杂交阳性或可疑阳性的菌落共 15 个，其中 Pst-1 的插入片段由 0.1—4.0 Kb 大小不等，0.8Kb 以上并有表达的有 5 个。经多种内切酶单解和双解试验表明 p8218-Pst-1 片段中

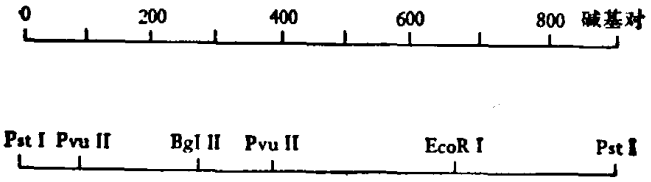


图 1 p8218-Pst-1 片段内切酶图

本文 1983 年 3 月 24 日收到。

EcoR$_I$ 和 Bgl II 各有一个切点，Pvu II 有 2 个切点，全长为 0.9Kb。Hind III、Bam H$_I$、Pst-1、Sal I、Sma 1、Xho 1、Hpa 1、Xba 无切点。经酶切分析，它们的切点位置如图 1 所示。这说明 p8218 中 Pst-1 插入片段属人类 αD 型干扰素基因。

另一个阳性杂交质粒（p8212），经酶谱分析不属于 Goeddel 报道[6]的 IFN-α 8 个亚种中任何一个。其 Pst-1 插入片段约 0.8Kb。

上述 pBR322—Pst-1 切点处插入片段的表达是利用了抗青霉素基因的启动子，表达效率不高。我们又采用 pUR222，把 p8218-Pst-1 片段连接在该质粒中乳糖启动基因的下流(图 2)，转化 E. Coli HB101，共得转化菌落约 300 多个。经快速提取质粒、酶切分析及表达检查，大约仅 1/8 的菌落可以表达。如果转化 E. Coli K12 BMH71-18，在含有氨苄青霉素、IPTG 的 McConkey 琼脂平皿上进行选择，共获得转化菌 209 个，其中红色菌落共 153 个，无插入片段，无表达；白色菌落 56 个，表示有插入片段。经菌落杂交试验表明，白色菌落中确含有 α 干扰素基因（图 3）。该杂交质粒以 pBV 表示之，其中 B 表示北京，V 表示病毒学研究所。在白色菌落中我们用快速方法提取了 12 个菌落的质粒，用 Pst-1 水解后获得 0.9Kb 片段，与 p8218-Pst-1 片段的大小完全相当(图 4)。

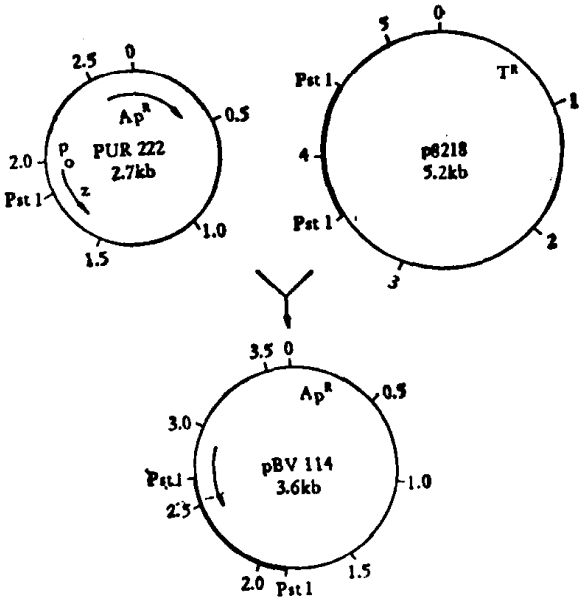


图 2　pBV114 改建示意图

我们又检查了 36 个白色菌落的浸出液的干扰素活性。其中 10 个有高滴度的表达（表 1）。25 份次的平均滴度高达 1.54 × 10^6 单位/升菌液。比 p8218 的表达水平高约 2 个数量级。由 pBV-114 生产的干扰素的抗原性，经与美国 NIH 提供的标准抗血清中和试验表明仍属于 α 人干扰素(表 2)。关于无表达的白色菌

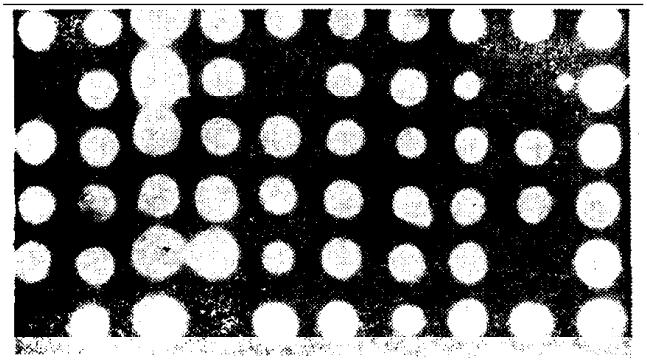


图 3　pBV 白色转化菌落的菌落杂交图
(以 [α^{32}p] dATP 标记的 p8218-Pst-1 片段为探针)

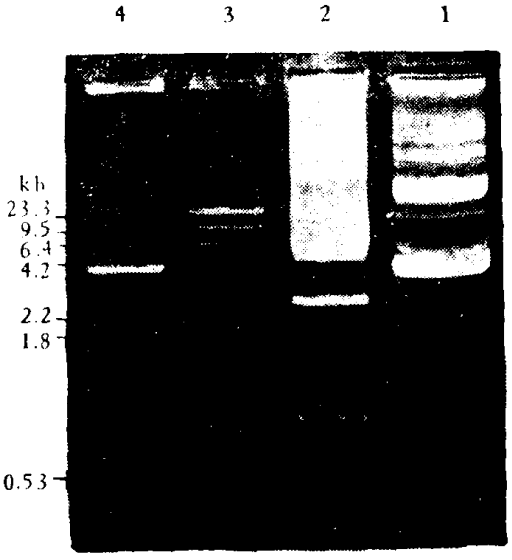


图 4　pBV114 以 Pst-1 水解电泳图
1. pBV114 快速粗提；2. pBV114 + Pst-1，显示 0.9 及 2.7Kb 二个片段；3. λDNA-Hind III 分子量标记；4. p8218 + Pst-1，显示 0.9 及 4.3Kb 二个片段

表 1　pBV 转化的大肠杆菌浸出液的干扰素活性

样　本	传代数	干扰素滴度（单位/升）
pBV-114	3	868,640
	5	1,959,280
	10	1,271,398
	11	3,305,520
	11	2,092,080
pBV-131	3	1,316,640
	5	4,439,360
pBV-184	3	2,596,960
	5	2,219,200
	6	2,005,360
pBV-177	3	383,360
	5	1,109,840
pBV-176	3	589,200
	5	392,320
pBV-130	3	686,240
	5	2,042,480
pBV-182	3	512,880
	5	655,360
	10	3,497,727
pBV-128	3	512,880
	5	3,227,360
pBV-125	3	905,520
	5	852,800
pBV-118	3	492,000
	5	655,360
	$n=25$	$\bar{X}=1.54\times10^6\pm0.22\times10^6$ 单位

表 2　pBV 生产的干扰素的抗原性

干扰素	干扰素抗血清 (NIH)	干扰素滴度 (单位/0.1 ml)
IFN-α(NIH)	抗 IFN-α ^{0} 10单位	220 <4
IFN-pBV-184	抗 IFN-α ^{0} 10单位	212 <4
IFN-β(NIH)	抗 IFN-β ^{0} 10单位	62 <4
IFN-pBV-184	抗 IFN-β ^{0} 10单位	47 40

落，经快速提取质粒的酶谱分析，均为反方向的。正反方向的比率为 1:3.6。pBV114 利用 lac 启动基因高效表达，说明片段插入的方向与框架是合适的。它生产的干扰素是单一型别的 IFN-αD，是一种融合蛋白，融合蛋白的优点是在菌体内比较稳定。pBV-114 可供大量制备干扰素及纯化分析之用。

参　考　文　献

[1] 侯云德，干扰素及其临床应用，江苏科技出版社，1981。
[2] 吴淑华等，微生物学报，18 (1978)，3: 225。
[3] 侯云德等，中国医学科学院学报，4(1982)，6: 327。
[4] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, A. Laboratory Manul*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
[5] Holmes, D. S. et al., *Anal. Biochem.*, 1981, 114: 193.
[6] Boeddel, D. V. et al., *Nature*, 290(1981), 20.