

鸡  $\gamma$  干扰素成熟蛋白基因的表达及其产物抗病毒活性测定蔡梅红<sup>1</sup>, 曹瑞兵<sup>1</sup>, 周斌<sup>1</sup>, 谈国蕾<sup>1</sup>, 杨松<sup>2</sup>, 陈溥言<sup>1\*\*</sup>

(1. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095; 2. 沈阳农业大学动物医学院, 辽宁沈阳 110161)

**Expression of the Mature Protein Gene of Chicken  $\gamma$ -Interferon and the Detection for the Antiviral Activity of the Purified Expression Product**CAI Mei-hong<sup>1</sup>, CAO Rui-bing<sup>1</sup>, ZHOU Bin<sup>1</sup>, TAN Guo-lei<sup>1</sup>, YANG Song<sup>2</sup>, CHEN Pu-yan<sup>\*\*</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Diseases Diagnosis &amp; Immunology of China's Department of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Department of Veterinary medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** Using the total mRNA in the lymphocyte in chicken blood as the template, the mature protein gene of interferon  $\gamma$ -interferon was cloned and amplified through the reverse transcription polymerase chain reaction. The gene was then ligated to pRLC to establish the gene's non-fusion expressing vector. The best inducing time for the expression of this recombinant protein was tested through inducing the expression of positive selected plasmid with different time span. This expressed product was then denatured and renatured and was added to the culture medium with CEF, which were attacked by the 100 TCID<sub>50</sub> VSV. The result showed that the activity of the recombinant protein was up to  $1.0 \times 10^6$  U/mg.

**Key words:** Chicken  $\gamma$ -interferon mature protein gene; Non-fusion expression; Inhibition of virus; CEF

**摘要:** 以血淋巴细胞提取的总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 的方法克隆出鸡  $\gamma$  干扰素成熟蛋白的基因, 把它与非融合表达载体 pRLC 相重组。通过对阳性宿主菌的不同时间的诱导摸索出最佳表达时间。把表达产物进行变性, 复性, 纯化后加入鸡胚成纤维细胞上, 用水疱性口炎病毒进行攻毒, 测出鸡重组  $\gamma$  干扰素的活性单位为  $1.0 \times 10^6$  U/mL, 获得了满意结果。

**关键词:** 鸡  $\gamma$  干扰素成熟蛋白基因; 非融合性表达; 病毒抑制; 鸡胚成纤维细胞

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0032-04

鸡的  $\gamma$  干扰素开放性阅读框有 495 个碱基, 包括一个起始密码子, 19 个氨基酸的信号肽和 145 个氨基酸的成熟蛋白, 其成熟蛋白大小为 16kDa<sup>[1-3]</sup>。鸡的  $\gamma$  干扰素是一种由被激活的鸡 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞分泌的糖蛋白, 它对某些病毒(腺病毒, 流感病毒, 水疱性口炎病毒<sup>[4]</sup>)的生长及繁殖有较强的抑制作用, 因此基因工程生产出鸡的干扰素在兽医临床实践中具有深远的意义。

2001 年, Kogut MH 等的研究表明大肠杆菌表达的鸡  $\gamma$  干扰素重组蛋白可增加异嗜细胞的数量,

能增强雏鸡的非特异性免疫力<sup>[5]</sup>。近年来关于重组鸡  $\gamma$  干扰素的研究非常活跃, 国内报道其原核表达主要采用的是融合表达<sup>[6]</sup>或对鸡  $\gamma$  干扰素全基因进行表达的方式, 据文献报道用原核载体表达真核基因, 真核基因中信号肽的存在可能会在一定程度上影响其表达产物的生物活性<sup>[7]</sup>。本研究探索使用在  $\gamma$  干扰素成熟蛋白基因的两侧(包括了 3'端的部分非编码区)设计引物而扩增所得的基因与非融合性表达载体相重组, 通过非融合性载体来表达鸡的  $\gamma$  干扰素, 试验结果表明重组鸡  $\gamma$  干扰素表达产量高,

收稿日期: 2003-08-11, 修回日期: 2003-10-27

作者简介: 蔡梅红 (1973-), 女, 安徽天长籍, 硕士研究生, 研究方向为分子免疫及分子病毒学。

\*\* 通讯作者。Corresponding author. Tel: 025-4396028, E-mail: aid@jau.edu.cn

生物学活性好, 在鸡胚成纤维细胞上具有明显的抗病毒活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

两周龄雏鸡, 由江苏省农科院试验动物中心提供。水泡性口炎病毒 (VSV) 为南京市军事医学研究所王永山博士惠赠。DH5 $\alpha$  菌, 为本室保存。pRLC 非融合性表达载体由本实验室保存。pMD18.T 载体购自大连宝生物工程技术有限公司。M-MLV 反转录酶, Rnasin 购自冷泉港中国科技公司。TaqDNA 聚合酶, T<sub>4</sub>DNA 连接酶, 所用一切限制性内切酶, 均购自大连宝生物工程技术有限公司。RPIM1640 营养粉购于 GIBCO 公司。

### 1.2 引物

根据 GenBank 提供的鸡  $\gamma$  干扰素基因序列, 在其编码成熟蛋白基因的两侧设计了一对引物, 由宝生物大连生物工程技术有限公司 (大连) 合成。其两端分别设计了 *EcoR* I 和 *Pst* I 两个酶切位点。

引物 1: 5'-ccggaattcatgcatactgcaattagtcta-3

引物 2: 5'-taactgcaggagcacaggcgggtcataa-3

### 1.3 鸡外周血淋巴细胞的分离及培养

两周龄鸡, 翅静脉无菌采血 3mL (适量肝素抗凝)。将采得的抗凝血在无菌状态下缓慢加入 2 倍 Ficoll 淋巴细胞分离液上层, 2000r/min $\times$ 10min, 取云雾状的单核细胞层<sup>[8]</sup>。用含 15% 小牛血清的 RPIM1640 营养液稀释成  $0.5 \times 10^6$  个/mL, 每孔 2 mL, 然后加入 ConA 使每孔终浓度为 15-20 $\mu$ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4~10h。

### 1.4 目的基因的扩增及序列的测定

以 ConA 刺激的不同时段的细胞提出的总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR, RT 反应条件: 65 $^{\circ}$ C 15 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min; PCR 条件 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增出目的片段。用上海华舜公司的胶回收试剂盒进行回收 1% 琼脂糖的电泳产物, 并将其与 pMD18.T 载体相连接, 并进行测序以确定序列的正确性。

### 1.5 表达载体的构建

用 *EcoR* I 和 *Pst* I 把目的片段从 pMD18.T 载体上酶切下来, 连接到 pRLC 原核非融合性表达载体上, 表达载体的构建成功与否, 通过酶切后条带的大小来鉴定。

### 1.6 大肠杆菌重组蛋白的诱导表达

把构建好的阳性表达载体 pRLC-Chy, 转化宿主菌 DH5 $\alpha$ , 挑含重组阳性质粒的单菌落到含有浓

度为 50 $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素的 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 摇床过夜, 12h 后按 2% 的接种量接种于 500 mL 的 2 $\times$ YT 的培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养 3~4h 后, 待菌液光密度至 0.5~0.6 时马上放入 42 $^{\circ}$ C 的摇床进行诱导表达, 分不同时段取样用于确定最佳诱导时间。

### 1.7 包含体的制备、变性与复性及纯化

将 500mL 诱导菌离心后收集的菌体用 pH7.2 的 PBS 洗涤后用 20mL 的 PBS 悬起, 超声波裂解 12min (3S,3S) 后, 4 $^{\circ}$ C, 8 000 r/min 15min, 然后分别用含 1% TritonX-100 的 STE 反复洗涤使含目的蛋白的包含体得到初步纯化, 再加入含有 7mol/L 盐酸胍的变性液进行匀速搅拌 2h 以上。再取适量含目的蛋白的变性液在含有 0.5mol/L 盐酸胍的透析液中进行 4 $^{\circ}$ C 搅拌透析复性 24h 后, 经 Sephdex-200 柱进一步纯化。

### 1.8 重组 $\gamma$ 干扰素生物活性的测定

取孵化 9-10d 的 SPF 鸡胚, 去头、四肢及内脏, 无菌状态下用 PBS 洗三遍后, 剪碎。吹打成单个细胞后上 96 孔板, 生长约 12h 使细胞全部贴壁生长后, 去除生长液, 每孔加入 10 倍倍比稀释的干扰素, 用 100TCID<sub>50</sub> 的剂量的水泡性口炎病毒 (VSV) 进行攻毒, 细胞对照则加无病毒的营养液, 同时设定标准干扰素作为对照, 在倒置显微镜下观察待对照孔出现 75% 以上病变的时候, 判断结果。

## 2 结果

### 2.1 鸡 $\gamma$ 干扰素基因的扩增

以 ConA 刺激 4~10h 的鸡全血淋巴细胞中提取的总 RNA 为模板, 通过逆转录-聚合链式反应 (RT-PCR) 技术, 扩增出一条大小为约为 500bp 的特异性目的条带。见图 1。

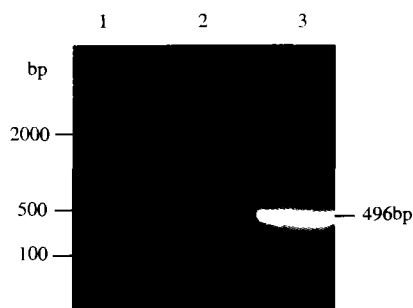


图 1 反转录 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 The agarose gel analysis of RT-PCR product

1. 20000DL DNA marker; 2. Negative control; 3. RT-PCR product.

### 2.2 鸡 $\gamma$ 干扰素基因序列的测定

将目的片段连到 pMD<sub>18</sub>-T 载体上,把 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定为阳性的菌进行测序,结果与 GenBank 上提供的相同部位基因的同源性为 100%。把含阳性克隆菌落经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切,回收目的条带与经相同的两种酶切过的非融合表达载体 pRLC 相重组,转化 DH5  $\alpha$  宿主菌,双酶切鉴定阳性菌(图 2)。

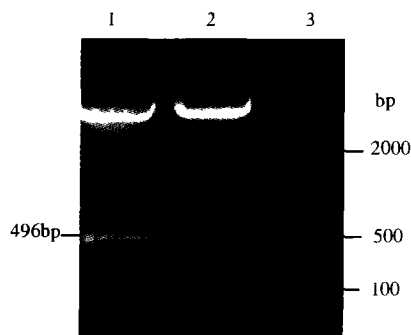


图 2 表达载体的阳性鉴定

Fig. 2 identification of the positive expression vector

1, 20000DL DNA marker; 2/3, Recombinant expression plasmid digestion by *ECOR* I and *PST* I

### 2.3 目的蛋白的诱导

将鉴定为阳性的重组单菌落接入 AMP/LB 液体中,30℃活化过夜后按 1:50 的稀释比例转接 AMP/2×YT 培养液中,继续在 30℃摇床培养 3-4h,至其对数生长期,迅速转入 42℃摇床继续进行诱导培养 6h,取不同时间的诱导菌 10 000r/min×30s,收集菌体弃上清,加入 2×上样缓冲液后煮沸 3-5min,用 15%分离胶的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来判定其分子量大小,用中分子量的 Marker 作为标准,结果发现在诱导 4h 的性目的蛋白浓度表达量最高。SDS-PAGE 电泳在 14.4kDa 条带和 31kDa 之间接近前者的地方有一条粗宽的目的条带。结果见(图 3)

### 2.4 目的蛋白的变性与复性

含重组鸡  $\gamma$  干扰素的变性液经复性,纯化后,用 PEG8000 浓缩后经 SDS-PAGE 电泳,结果见(图 4)。

### 2.5 表达的目的蛋白生物活性的测定

对复性后的包涵体蛋白进行复性后,采用病毒抑制法测定其抗病毒活性。取 SPF 鸡胚的成纤维细胞于 96 孔板上生长 24h,待其全部贴壁后,弃去生长液每孔加入 10 倍倍比稀的复性后的重组鸡  $\gamma$  干扰素 100 $\mu$ L,每个稀释度接 6 孔,不加重重组鸡  $\gamma$  干

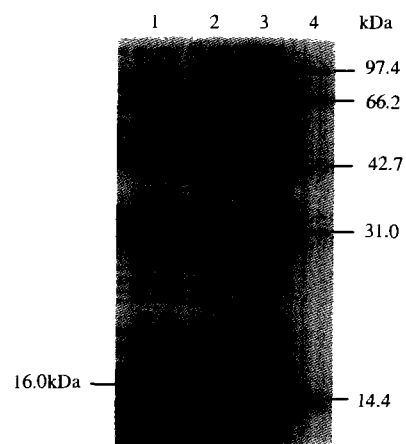


图 3 重组蛋白诱导 SDS-Page 电泳

Fig.3 SDS-Page gel of the induced recombinant protein

1, Result in the best time (4h, 1. 5mL induced bacteria); 2/3, Result of the hollow bacteria (4h, 15mL induced bacteria); 4, Middle molecular weight marker.



图 4 重组蛋白纯化结果

Fig.4 result of the purified recombinant protein

1, Purified recombinant protein; 2, Low molecular weight marker.

扰素的细胞孔设 6 孔(对照孔)5%CO<sub>2</sub>培养箱 37℃ 孵育过夜,加入 100TCID<sub>50</sub> 的 VSV 病毒进行攻毒,24h 后观察可见对照孔完全出现严重病变,而将复性后干扰素进行 10<sup>-5</sup> 稀释后所加入的细胞孔才有 20%病变,在其孔中发现水疱性口炎病毒在鸡胚成纤维细胞上的典型病变(图 5A),而对照孔细胞病变严重(图 5B),已看不到典型的病变,在加入高于 10<sup>-5</sup> 浓度干扰素的细胞孔,细胞状态良好(图 5C)。在同等蛋白量的情况下实验组的检测终点与标准对照空(1.0×10<sup>6</sup>U/mg)接近,因此重组鸡干扰素的比活性约为 1.0×10<sup>6</sup>U/mg。

## 3 讨论

改变了过去对鸡  $\gamma$  干扰素基因开放阅读框的在原核生物中的全表达,因为真核生物开放阅读框

常含有能使蛋白质分泌到细胞外的信号肽, 而信号肽在协助目的蛋白分泌到细胞外后, 信号肽就会在高尔基体中与分泌出来的活性蛋白相分离, 因而不影响活性蛋白生物活性的发挥。真核生物的信号

肽基因在原核生物中进行表达时大部分不具有分泌功能, 且当信号肽与活性蛋白一起被翻译出来后, 它不能被切除仍然与活性蛋白融合在一起, 从而在一定程度上影响了其生物活性的正常发挥。

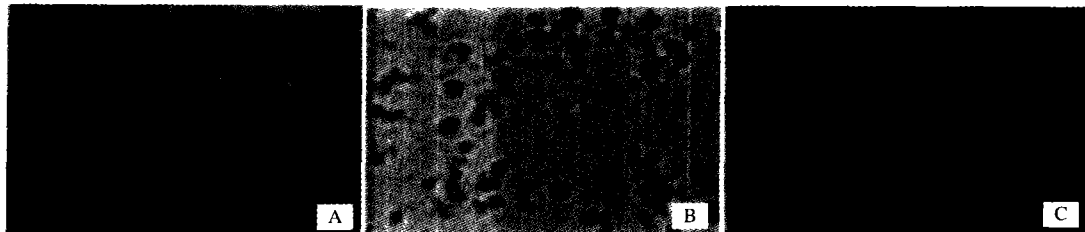


图5 复性重组鸡的  $\gamma$  干扰素处理的鸡成纤维细胞

Fig.5 CEF disposed by the recombined chicken gamma interferon

A, Cell disposed by  $10^5$  renatured recombinant  $\gamma$  interferon; B, Severe CPE in the control; C, Cell disposed by over  $10^5$  renatured recombinant chicken gamma interferon.

在对含有阳性质粒的 DH5 $\alpha$  菌进行温控诱导处理时, 我们发现携带有外源片段的细菌较含空载体的对照菌要慢, 在诱导 4h 时把二者各取 1.5mL, SDS-PAGE 电泳显示对照孔中大肠杆菌表达的自身蛋白比含阳性质粒的细菌孔要浓得多 (图 3)。出现这种结果的原因可能是外源基因的引入给细菌本身的生长带来了一定的负担, 所以生长较慢。

在鸡胚成纤维细胞上测定鸡  $\gamma$  干扰素的生物学活性, 不同细胞孔中的细胞的生长状态的差异会在一定程度上影响测定结果, 生长状态不好的细胞孔中在用同样剂量干扰素处理情况下抵抗病毒的能力不如生长状态良好的细胞。这可以说明细胞或组织乃至动物机体自身的生理状态对其抵抗外来有害物质的侵袭也起重要作用。

随着我国养鸡业向集约化和商品化方向发展, 病毒性疾病的预防与治疗显得尤为重要。而已有报道和实验证实干扰素对流感病毒, 腺病毒, 水泡性口炎病毒等等病毒有明显的抑制作用, 而动物体内活性蛋白的提取量少且提取程序麻烦, 成本高。因此在体外通过基因工程的方法来大量生产具有生物活性的鸡  $\gamma$  干扰素为养鸡业健康发展打下了坚实的基础。

## 参考文献

- [1] Sekellick M J, Ferrandion A F, Hopkins S A. Chicken interferon gene Cloning, expression and analysis [J]. J Interferon Res, 1994, 14: 71.
- [2] Digby M R, Lowenthal J W. Cloning and expression of the chicken interferon- $\gamma$  gene [J]. J Interferon Res, 1995, 15: 939-934.
- [3] Hester P K, Wain M, Lisa R. Structure of the Chicken Interferon- $\gamma$  Gene and Comparison to Mammalian Homologues [J]. Gene, 1998, 07: 25-32.
- [4] 金 奇. 医学分子病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 107-117.
- [5] Kogut M H, Pishko E J, Kaspers B, Weining K C. Modulation of functional activities of chicken heterophils by recombinant chicken IFN- $\gamma$  [J]. Interferon Cytokine Res, 2001, Feb; 21(3): 85-92.
- [6] 吴志光, 夏 春, 汪 明. QIAexpress 系统高效表达鸡  $\gamma$  干扰素 cDNA 的研究 [J]. 中国农业大学学报, 2002, 7 (3): 89-93.
- [7] 卢圣栋. 现代分子生物实验技术. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [8] 黄培堂. 细胞实验指南 (下册) [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南 [M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] 张耀东, 张丽华. 人干扰素- $\gamma$  基因工程大肠杆菌的培养及其产物的纯化与复性 [J]. 生物工程学报, 1999, 4: 240-243.