

猪 β -干扰素的原核表达及其对猪流行性腹泻病毒的抑制作用研究

曹瑞兵, 包晶晶, 周海霞, 郑其升, 周 斌, 陈溥言**

(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)

Prokaryotic Expression of Porcine Interferon - β and Its Inhibition Effect on Porcine Epidemic Diarrhea Virus

CAO Rui-bing, BAO Jing-jing, ZHOU Hai-xia, ZHENG Qi-sheng, ZHOU Bin, CHEN Pu-yan*

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The porcine IFN- β gene was amplified by polymerase chain reaction. The amplified fragment was cloned into pGEM-T-easy vector and then sequenced. The result indicated that the cloned gene was a complete porcine IFN- β gene with the codes for signal peptide, which had the identities of 100% with the poIFN- β gene published in the GenBank. Another pair of primers was designed to sub-clone the gene coding porcine IFN- β mature protein and one rare codon near 5' terminus was modified to the biased codons of *E.coli*. After sequencing, the sub-cloned IFN- β gene was successfully inserted to expression vector pRLC and expressed in *E.coli*, the expressed protein was about 17.3% of the total cell protein. Recombinant porcine IFN- β expressed as inclusion body, which was dissolved in 6 mol/L guanidine chloride and subsequently re-natured by diluting with refolding buffer containing GSH and GSSG. In order to obtain pure protein, the re-natured poIFN- β was purified by SephacrylS-200 chromatography. As a result, the purified product was verified to be of high cytokine activity by inhibiting the cyto-pathogenic effect, which is about 5.6×10^5 U/mg. In addition, the inhibition effect of recombinant poIFN- β on PEDV was determined using CPE₅₀ method. The results indicated that high concentration of recombinant poIFN- β could completely inhibit PEDV on PK-15 cell line.

Key words: Porcine interferon- β ; Prokaryotic expression; Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV)

摘要: 本研究通过 PCR 技术克隆了猪 β 干扰素全基因, 设计引物亚克隆猪 β 干扰素成熟蛋白编码基因并对, 5' 端 1 个稀有密码子进行了大肠杆菌偏嗜性改造。构建了猪 IFN- β 原核单纯表达载体 pRLC-poIFN β , 实现了 poIFN- β 在大肠杆菌中的表达, 表达产物约占菌体总蛋白的 17.3%。表达产物以包涵体形式存在, 用含 6mol/L 盐酸胍的变性液溶解及含 GSH-GSSG 复性液复性处理, 复性后的表达产物经凝胶层析纯化后, MDBK 细胞-VSV 病变抑制法测定结果表明, 重组猪 β 干扰素具有良好的抗病毒活性, 约为 5.6×10^5 U/mg。用重组猪 β 干扰素处理猪肾传代细胞 PK-15 后, 细胞病变抑制法(CPE₅₀)测定结果表明: 重组猪 β 干扰素可显著抑制猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 的感染。

关键词: 猪 β 干扰素, 原核表达, 猪流行性腹泻病毒

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)04-0364-05

干扰素 (Interferon, IFN) 是一类具有抗病毒、调节细胞生长和免疫调节功能的细胞因子。近年来

猪瘟、猪繁殖与呼吸综合症以及等流行性腹泻等病毒性疾病严重危害着我国养猪业的发展, 急需开发

收稿日期: 2003-12-26, 修回日期: 2004-02-24

作者简介: 曹瑞兵 (1976-), 男, 江苏海安籍, 博士生, 研究方向为动物分子病毒学及免疫学。

** 通讯作者: Corresponding author. Tel: 025-84396028, E-mail: puyanchen@yahoo.com.cn

出新型抗病毒和免疫增强药物, 猪干扰素成为近年来的研究热点^[1-3]。目前已知的猪干扰素有 α 、 β 和 γ 三种, 其中 α 、 β 属于 I 型, 具有较强的抗病毒功能, γ 属于 II 型, 除具有抗病毒作用外, 还有较强的免疫调节功能。有关猪 α 、 γ 干扰素基因克隆、表达及抗病毒作用的研究已取得了可喜的进展^[4-6]。在猪 β 干扰素的方面, Artursson 和夏春等分别早在 1992 年和 2000 年就已克隆了猪 β 干扰素基因^[7,8], 阐明猪 β 干扰素全基因为 561bp, 编码 186 个氨基酸, 其中前 21 个氨基酸为信号肽, 后 165 个氨基酸为成熟蛋白。Derbyshire 应用聚肌胞 (poly I:C) 处理 PK-15 获得的猪 β 干扰素进行的抗病毒实验结果表明猪水疱性口炎病毒、猪流感病毒和猪轮状病毒对其高度敏感^[9]。但至今仍未见有猪 β 干扰素在原核或真核系统中表达的研究报道。本研究克隆、改造猪 β 干扰素基因并在大肠杆菌中表达, 通过提取、加工获得有活性的重组猪 β 干扰素并研究其对猪流行性腹泻病毒的抗病毒作用。

1 材料及方法

1.1 材料

原核单纯表达载体 pRLC, 含 pR、pL 复合启动子, 温敏诱导表达, 由本室构建保存。蛋白质分子量标准购自中科院上海生物化学与生物细胞研究所。限制性核酸内切酶、连接酶、聚合酶、核酸分子量标准均购自 TaKaRa 公司。层析介质购自发玛西亚公司。二硫苏糖醇 (DTT)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 购自上海生工, 其它试剂均为分析纯。

E.coli DH5 α 、MDBK 细胞和 PK-15 细胞为本室保存, 水疱性口炎病毒 (VSV) 由南京军事医学科学院王永山博士惠赠。猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 由青岛动检所王君伟研究员惠赠。鲜新猪肝由江苏省农业科学院兽医研究所提供。

1.2 基因组 DNA 提取

参照 Sambrook^[10]等方法从鲜新的猪肝组织中提取基因组 DNA。

1.3 引物设计

根据 GenBank 上发表猪 β -干扰素的基因序列 (S41178), 采用 premier premier 5.0 软件, 设计两对引物分别用于扩增猪 β -干扰素全基因 (P1 和 P2) 和成熟蛋白编码基因的亚克隆和改造 (P3 和 P4)。其序列如下:

P1: 5' -TTATGAATTCTTCCCAATGGCCCCAACC-3' (*Bam*H I)

P2: 5' -CGCGAAGCTTAGAATGGGCTTGTTAGTC-3' (*Hind* III)

P3: 5' -GCAGAATTCATGTATGATGTGCTTCGTTA-3' (*Eco*R I)

P4: 5' -GGAGTCGACGGGAGATGTTTCAGTTC-3' (*Sal* I)

1.4 PCR 扩增

采用 rTaq PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行 PCR 扩增。PCR 反应中模板为约 2 μ g 的猪肝细胞基因组 DNA, 引物 P1、P2 各 20pmol, 总体积为 50 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 5min; 94 $^{\circ}$ C、1min, 54 $^{\circ}$ C、1min, 72 $^{\circ}$ C、90s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C、10min。猪 β -干扰素成熟蛋白编码基因的亚克隆 PCR 反应条件同上, 引物为 P3 和 P4。

1.5 产物克隆及测序

猪 β -干扰素 PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后, 用胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司产品) 回收。取回收产物 32.5ng 与 50ng 的 PGEM-T-easy 载体于 4 $^{\circ}$ C 过夜连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 在含有 X-gal 和 IPTG 的平板上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 筛选白色菌落酶切鉴定。阳性质粒命名为 pTIFN β 送 TaKaRa 生物工程公司测序。

1.6 猪 β -干扰素原核表达载体的构建

为了获得非融合表达的猪 β -干扰素。将扩增的猪 β -干扰素成熟蛋白基因和表达载体 pRLC 用 *Eco*RI 和 *Sal*I 进行双酶切, 回收酶切片段, β -干扰素基因和 pRLC 载体按 3:1 的摩尔比 4 $^{\circ}$ C 过夜连接。转化氯化钙法制备的 DH5 α 感受态大肠杆菌。挑菌, 提质粒用 *Eco*R I 和 *Sal* I 进行双酶切鉴定, 将阳性表达载体命名为 pRLC-IFNB。

1.7 诱导表达

将猪 β -干扰素单纯表达载体 pRLC-IFNB 阳性转化菌体接种于含氨苄青霉素浓度为 50 μ g/mL 的 LB 培养液, 30 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日将 2% 的菌液接种于 2 \times YT 培养液, 30 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600nm} 约为 0.4~0.5, 迅速升温到 42 $^{\circ}$ C, 继续诱导培养 4h。

1.8 表达产物的提取与溶解

将菌体用生理盐水洗涤后超声波裂解, 将裂解液 1000 r/min \times 10min 离心去杂质, 取上清液作 10000 r/min 离心 10min, 收集沉淀即初制干扰素包涵体。将初制包涵体用洗涤液 (0.5% Triton X-100、50mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)、10 mmol/L EDTA、0.15 mol/L NaCl) 搅拌洗涤两次, 每次 1h, 得到初步纯化的包涵体, 加入变性液 [6mol/L Guanidine hydrochloride、30mmol/L DTT、100mmol/L Tris-HCl (pH8.5)、2mmol/L

EDTA]溶解包涵体,置摇床中 30℃、120r/min 反应 1h,离心取上清液。

1.9 表达产物的复性与纯化

在冰浴条件下,将包含体裂解液注入搅动的含 0.5mol/L 盐酸胍的复性液(3mmol/L Glutathione reduced、1mmol/L Glutathione oxidized、50mmol/L Tris-HCl(pH8.5)、2mmol/L EDTA、0.15mol/L NaCl)至蛋白质终浓度约为 0.2mg/mL,4℃静置过夜。0.45μm 滤膜过滤后测定蛋白含量及其比活。

蛋白含量的测定按 2000 年版《中国生物制品规程》中微量法(Lowry)的要求进行。

将复性产物过 Hiprep 26/10 Desalting 柱脱盐,洗脱液为 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、0.2 mmol/L EDTA,冷冻浓缩后用 SephacrylS-200 层析柱分离纯化干扰素,洗脱液为 PBS(pH7.4),收集主峰,测定活性。

1.10 重组 poIFN-β 的活性测定

微量细胞病变抑制法测定重组猪 β-干扰素生物学活性,采用牛肾细胞 MDBK-VSV 系统测定^[8]。将抑制 50% VSV 产生的细胞病变(CPE₅₀)的干扰素的最高稀释度定为 1 个干扰素单位(U)。

1.11 重组 poIFN-β 对猪流行性腹泻病毒(PEDV)的抑制作用

在 96 空细胞培养板上常规培养猪肾细胞系 PK-15 至单层后,每孔加入 1×10⁴U/mL 至 1U/mL 连续 10 倍稀释的重组 poIFN-β 100μL,稀释液为含 10% 小牛血清的 MEM 培养液,每浓度设 8 孔。37℃作用 24h 后,每孔加入 100TCID₅₀/mL 的 PEDV 病毒液 100μL 进行攻毒。48h 后观察细胞病变抑制效果。对照为未经重组 poIFN-β 处理细胞。

2 结果

2.1 猪 β-干扰素基因克隆及亚克隆

以提取鲜新猪肝细胞总 DNA 为模板,应用引物 P1 和 P2,RT-PCR 产物电泳后可见一条约 650 bp 大小的条带与预期一致。以克隆的 poIFN-β 为模板,应用引物 P3 和 P4,PCR 产物电泳后可见一条约 520 bp 大小的条带,与设计相符。

2.2 猪 β-干扰素测序结果分析

测序结果表明,克隆产物大小为 648 bp,含有一个完整 ORF,与 GenBank 上发表的猪 β 干扰素基因同源率为 100%。在 27~587 位含有一个 ORF,共编码 186 个氨基酸。其中前 21 个氨基酸为信号肽,后 165 个氨基酸为 poIFN-β 成熟肽链,成熟肽链内含 3 个半胱氨酸,含有 3 个 N 糖基化位点。亚克

隆基因中对 5'端的 1 个大肠杆菌稀有密码子 Arg⁷(CGA-CGT)进行了改造。

2.3 表达载体的构建

用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 pTIFNB,用 Gel Extraction Mini Kit 回收 poIFN-β m 片段,插入表达载体 pRLC 的 *EcoR* I 和 *Sal* I 位点之间,转化 *E. coli* DH5 α,挑取转化菌单克隆培养,提取质粒,分别用 PCR 方法和 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切鉴定,结果与设计一致(图 1)。

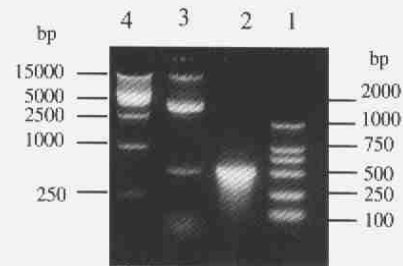


图 1 PCR 产物及表达载体酶切电泳

Fig. 1 PCR product and restriction enzyme assay of expression vector

1, DL-2000; 2, gene of PoIFN-β; 3, pRLC-poIFNB/*EcoR* I + *Sal* I; 4, DL-15000.

2.4 重组蛋白的表达

表达质粒 pRLC-IFNB 的启动子为 PR、PL 启动子,以 42℃热诱导表达。取诱导 1~4 h 的菌体,用加样缓冲液煮沸 3min 后作 SDS-PAGE 电泳鉴定。在电泳图谱上出现一条约 18 kDa 的新带(图 2),光密度扫描结果显示 18 kDa 的条带约占细菌总蛋白的 17.3%。

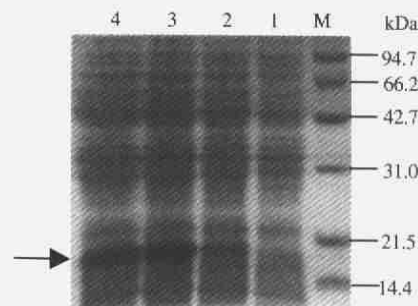


图 2 SDS-PAGE 分析 poIFN-β 在大肠杆菌中的表达

Fig. 2 Expression of poIFN-β in *E. coli* analyzed by SDS-PAGE

1-4, Expression of pRLC-poIFNβ at 1-4-hour; M, MW marker.

2.5 包涵体的提取、变性、复性与纯化

收集诱导表达后的菌体按方法 1.8 作裂菌处理。分别取细菌裂解物的上清液和离心后的沉淀作

SDS-PAGE 分析, 18kDa 的条带存在于沉淀中。包涵体用含 Triton X-100 的洗涤液洗涤, 得到初步纯化的包涵体。包涵体在含 6 mol/L 盐酸胍的变性液中较快地溶解至澄清。

变性蛋白在不含盐酸胍的复性液中溶解度较低, 在 0.1mg/mL 时就会出现蛋白聚集、析出。在含 0.5mol/L 盐酸胍的复性液中溶解度增大, 溶解蛋白浓度可达 0.2 mg/mL。

复性后重组蛋白经脱盐、浓缩, SephacrylS-200 层析柱纯化, 洗脱液为 PBS (pH7.4) 收集主峰。SDS-PAGE 电泳结果表明, 复性的重组猪 β -干扰素得到了较好的纯化 (图 3)。

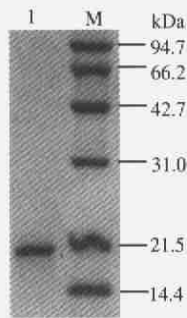


图 3 纯化重组 poIFN- β 的鉴定

Fig. 3 Identification of purified poIFN- β

1, Purified poIFN- β ; M, MW marker.

2.7 重组猪 β -干扰素活性的测定

重组猪 β -干扰素的活性测定采用目前国内外已经建立的 MDBK 细胞-VSV (水泡性口炎病毒) 系统微量细胞病变抑制法。多次活性检测结果表明, 复性后的重组蛋白在 MDBK 细胞上表现出较高的抗病毒活性, 能够有效地抑制 VSV 病毒对细胞的破坏作用。将抑制 50% 细胞病变 (CPE) 的干扰素的最高稀释度定为 1 个干扰素单位。测得纯化后的重组猪 β -干扰素的比活约为 3.67×10^4 U/mL, 测定其蛋白浓度为 0.152 mg/mL, 因此其活性约为 5.6×10^5 U/mg。

2.8 重组猪 β -干扰素对猪流行性腹泻病毒(PEDV) 的抑制效果

在 96 孔板上用 1×10^4 U/mL 至 1U/mL 连续 10 倍稀释的重组 poIFN- β 100 μ L 作用于猪肾细胞系 PK-15 24h 后, 每孔用 10TCID₅₀ 的 PEDV 病毒攻毒。48h 后观察结果见表 1。未用干扰素处理以及用 10U/mL 和 1U/mL 重组猪 β -干扰素处理的细胞全都出现了病变 (见图 4-A); 用 100U/mL 重组猪 β -干扰素处理的细胞 8 个孔中有 6 孔出现病变; 而用 10000U/mL 和 1000U/mL 重组猪 β -干扰素处理的

细胞都未出现病变 (见图 4-B)。重组猪 β -干扰素对 PEDV 的抗病毒活性约为 1.13×10^3 U/mg。

表 1 重组 poIFN- β 抗 PEDV 病毒结果

Table 1 Anti-PEDV activity of recombinant Porcine IFN- β

Group	1	2	3	4	5	6	7
Treated with rPoIFN- β (100 μ L) U/mL	10000	1000	100	10U/ mL	1	-	-
Challenged by PEDV(10 TCID ₅₀)	+	+	+	+	+	+	-
CPE	0/8	0/8	6/8	8/8	8/8	4/4	0/4

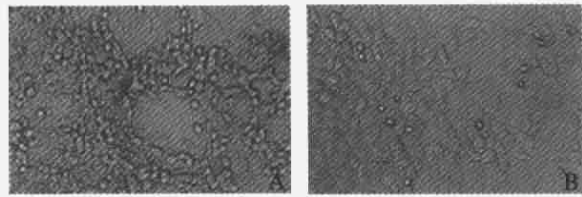


图 4 重组猪 β 干扰素对猪流行性腹泻病毒的抑制作用

Fig. 4 Inhibition effect of recombinant porcine poIFN- β on porcine epidemic diarrhea virus on PK-15 cells

A, Cyto-pathogenic effect of porcine epidemic diarrhea virus on PK-15 cells; B, After inoculated with porcine epidemic diarrhea virus None Cell pathogene was observed on PK-15 cells which have been previously treated with high concentration of recombinant poIFN- β .

3 讨论

本研究应用 PCR 技术从猪肝细胞基因组中克隆出猪 β 干扰素全基因。测序结果表明本研究克隆的猪 β 干扰素基因与 GenBank 上发表的猪 β 干扰素基因同源率为 100%, 全基因为 561bp, 编码 165 个氨基酸的成熟蛋白和 21 个氨基酸的信号肽。猪 β 干扰素成熟蛋白部分含有 3 个半胱氨酸和 3 个 N-糖基化位点。在氨基酸水平上, 猪 β 干扰素与人类 β 干扰素的同源率为 63%, 而与猪 α -干扰素的同源率只有 32%。

考虑到猪 β 干扰素的信号肽蛋白和载体中自带的融合蛋白可能会影响到重组干扰素的生物学活性及在猪体中的抗原性, 本研究亚克隆了 poIFN- β 成熟蛋白编码基因。为提高 poIFN- β 的表达产量, 选择了高效单纯表达载体 pRLC, 并对 poIFN- β 成熟蛋白编码基因 5' 段前 1 个稀有密码子进行大肠杆菌偏嗜性改造。工程菌经热诱导发酵后, 获得的重组猪 β 干扰素约为细菌总蛋白的 17.3%。

重组猪 β 干扰素具有较强的疏水性, 在不含变性剂的复性液中容易聚集形成沉淀并析出。Hagihara 等认为高浓度的盐酸胍可使天然蛋白质的高级结构发生破坏, 常用作蛋白质变性剂, 而低浓

度的盐酸胍能够保护伸展肽链和部分折叠片段的疏水基团,可辅助蛋白质复性^[11]。本研究在复性液中加入终浓度为 0.5mol/L 的盐酸胍可较好提高重组蛋白在复性液中的溶解度并促进其复性。

重组蛋白 PoIFN- β 经 SephacrylS-200 层析柱纯化,得到了纯度较好的重组猪 β -干扰素。应用 MDBK 细胞-VSV 系统微量细胞病变抑制法测得重组猪 β -干扰素的活性为 5.6×10^5 U/mg。在 huIFN- β 中存在 Cys¹⁷、Cys³¹、Cys¹⁴¹ 三个半胱氨酸, Cys³¹ 和 Cys¹⁴¹ 形成分子内二硫键,将 Cys¹⁷ 突变为 Ser,大肠杆菌表达 huIFN- β 活性提高 10 倍,可能是减少分子内的错误折叠或无活性寡聚体形成^[12]。而猪 β -干扰素成熟蛋白中也存在 Cys¹⁷、Cys³¹、Cys¹⁴⁰ 三个半胱氨酸,突变 Cys¹⁷ 是否具有相似的作用值得研究。

为了研究获得的重组猪 β 干扰素的抗病毒特性,本研究选取一种可致仔猪严重腹泻的冠状病毒——猪流行性腹泻病毒为实验对象,在其易感细胞系 PK-15 上研究重组猪 β 干扰素对其的抗病毒作用。100U/mL 重组猪 β -干扰素处理的 PK-15 细胞与未处理细胞相比出现病变明显减轻或不出现病变;1000U/mL 的重组猪 β -干扰素可以完全抑制猪流行性腹泻病毒在 PK-15 细胞上产生病变。表明重组猪 β 干扰素对猪流行性腹泻病毒有较强的抗病毒作用。

参考文献

- [1] Lefevre F, L'haridon R, Borrás-Cuesta F, *et al.* Production, purification and biological properties of an Escherichia coli-derived recombinant porcine alpha interferon [J]. *J Gen Virol*, 1990, 71: 1057-1063.
- [2] Weingartl H M, Derbyshire J B. Antiviral activity against transmissible gastroenteritis virus, and cytotoxicity, of natural porcine interferons alpha and beta [J]. *Can J Vet Res*, 1991, 55(2): 143-149.
- [3] Kishko I H, Vasylenko M I. The use of gamma-interferon for the prevention and treatment of infectious diseases in piglets and calves [J]. *Mikrobiol Z*, 1999, 61(5): 28-32.
- [4] 陈涛,于瑞嵩,刘惠莉,等.重组猪 α 干扰素基因定点突变及在大肠杆菌中的表达[J]. *生物工程学报*, 2002, 18(3):339-342.
- [5] 曹瑞兵,周斌,陈溥言,等.猪 γ -干扰素的基因克隆、改造、表达及其活性测定[J]. *南京农业大学学报*, 2003, 26(2): 71-75.
- [6] 万建青,吴文学,夏春,等.毕赤酵母表达猪干扰素- γ 基因及其抑制蓝舌病病毒效果[J]. *生物工程学报*, 2002, 18(6): 683-686.
- [7] Artursson K, Gobl A, Lindersson M, *et al.* Molecular cloning of a gene encoding porcine interferon-beta [J]. *J Interferon Res*, 1992, 12(3): 153-60.
- [8] 夏春,刘津,杨琪,等.猪干扰素- β 基因的分子克隆与测序[J]. *中国兽医杂志*, 2000, 6: 6-7
- [9] Derbyshire J B. The interferon sensitivity of selected porcine viruses [J]. *Can J Vet Res*. 1989, 53(1):52-55.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. 2nd edition, cold spring harbor laboratory. NY :Cold Spring Harbor, 1989, 26-27.
- [11] Hagihara Y, Aimoto S, Fink A L, *et al.* Guanidine hydrochloride induced folding of proteins [J]. *J Mol Biol*, 1993, 231:180-184.
- [12] Shekhter II, Beiko VP, Bulenkov MT, *et al.* Obtaining human recombinant (serine-17) beta-interferon by the method of oligonucleotide-directed mutagenesis and its expression in Escherichia coli [J]. *Antibiot Khimioter*, 1991, 36(8): 25-8.