

# 犬 干扰素基因的高效表达及其活性测定

王 艳,王海震,曹瑞兵,陈溥言\*\*

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室,江苏南京 210095)

## High Level Expression and Activity Assay of Canine Interferon $\alpha$ Gene

WANG Yan, WANG Hai-zhen, CAO Rui-bing, CHEN Pu-yan\*\*

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

**Abstract:** With the reverse transcription chain reaction (RT-PCR), the gene of Canine  $\alpha$  interferon ( $\text{CaIFN-}\alpha$ ) was amplified and cloned, from the total RNA in the lymphocytes stimulated with concanavalin A from the peripheral blood of dog. The amplified fragment was inserted into the prokaryotic expressing vector pBV220 and then sequenced. Sequencing result showed that the homology was 100% between the gene we cloned and the one published in GenBank. SDS-PAGE assay showed that the target protein, with the molecular weight of 19kDa, could be expressed in a high level and up to 27.6% of the total protein in *E. coli* cell, in the form of inclusion bodies. The target protein was added to MDCK cells, which were subsequently infected by the 100 TCID<sub>50</sub> VSV. The result showed good cytokine activity. The recombinant  $\text{CaIFN-}\alpha$  activity was up to  $5.11 \times 10^6$  U/2.

**Key words:** Canine interferon- $\alpha$  gene; Prokaryotic expression; Recombinant interferon

**摘要:**以伴刀豆球蛋白 A(ConA)诱导的犬外周血淋巴细胞中提取的总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 的方法克隆扩增出犬 干扰素基因,将所扩增基因克隆于原核表达载体 pBV220 并进行测序,结果显示该基因与 GenBank 上所公布的犬 干扰素基因同源性为 100%。将重组表达载体转入宿主菌进行温敏诱导表达,表达产物经 SDS-PAGE 分析,证明目的蛋白以包涵体的形式存在,大小约为 19kDa。将表达产物变性、复性、透析、纯化处理后加入犬肾细胞上,用水泡性口炎病毒攻毒,测出重组的  $\text{CaIFN-}\alpha$  具有较高的抗病毒作用,生物活性达到  $5.11 \times 10^6$  U/2,重组蛋白质的含量约为 13%。

**关键词:**犬 干扰素基因;原核表达;重组干扰素

中图分类号:Q789

文献标识码:A

文章编号:1003-5125(2005)02-0189-04

干扰素(Interferon, IFN)是由脊椎动物细胞产生的一类分泌型糖蛋白,它具有广谱抗病毒和增强免疫应答的作用<sup>[1]</sup>。干扰素按理化性质可分为  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  三个型,干扰素是由能在脊椎动物的各种类型的细胞增殖的病毒诱导白细胞产生的<sup>[2]</sup>,其主要活性是抗病毒。犬的 干扰素( $\text{CaIFN-}\alpha$ )全基因为 561 个碱基,编码 187 个氨基酸,其中前 23 个氨基酸为信号肽,后 164 个氨基酸为成熟蛋白,蛋白分子量约为 19kDa。

Hiummler 等于 1987 年首先开始了犬 IFN-

基因的研究<sup>[3]</sup>,报道了 IFN- $\alpha$  基因序列并专利控制了该基因的使用;国内夏春等克隆报道了拉布拉多犬和德国牧羊犬的 IFN- $\alpha$  基因序列<sup>[4]</sup>,杨琪等进行了犬干扰素- $\alpha$  cDNA 的克隆及其在鼠骨髓瘤细胞中的表达<sup>[9]</sup>,但是国内至今尚未见有关犬 干扰素的表达及其应用的报道。

近年来,养犬业在我国发展迅速,犬作为宠物饲养已成为人们生活的一部分,而病毒病却严重危害着犬的健康和生存。为了研制和开发犬重组干扰素生物制剂,本文对  $\text{CaIFN-}\alpha$  的成熟蛋白基因进行了

收稿日期:2004-09-27,修回日期:2004-11-22

作者简介:王艳(1980-),女,山东省滕州籍,硕士研究生,研究方向为动物疫病诊断与防治。

\*\* 通讯作者:陈溥言(1942-),男,江苏省籍,教授。Corresponding author. Tel.:025-84396028, E-mail:aid@njau.edu.cn

克隆,测序,在大肠杆菌 BL21(改造菌株)中非融合性表达,并对提取纯化的 CaIFN- $\alpha$  在犬肾细胞(MDCK)上进行了生物活性鉴定研究,为重组犬干扰素的应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

pBV220 表达载体由本实验室保存;pMD18-T 载体,限制性内切酶 *EcoR*、*Sal*I, T<sub>4</sub>DNA 连接酶购至 TaKaRa 公司。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 由本实验室保存;犬肾细胞(MDCK)由南京警犬研究所馈赠;水泡性口炎病毒(VSV)由南京军事医学研究所馈赠;PRIM1640 为 GIBCO 公司产品;伴刀豆球蛋白 A(ConA)和淋巴细胞分离液为上海生物工程公司产品;RNA 提取试剂盒购自宝灵曼公司;M-MLV 反转录酶,rTaq 酶购自 Promega 公司。实验仪器均为本实验室现有仪器。

### 1.2 引物设计

根据 GenBank 中所公布的犬 IFN- $\alpha$  的基因序列(M28624),在编码成熟蛋白基因的两端设计引物,为方便基因的操作在 5' 和 3' 端分别加上 *EcoR*I、*Sal*I 酶切位点。上下游引物序列分别为 5'-tagaatt catggccaccagcccgaca-3', 5'-agagtcgacggcgggtctcatt tcct-3', 由上海博亚生物技术公司合成。

### 1.3 犬外周血淋巴细胞的分离培养及总 RNA 的提取

用淋巴细胞分离液按常规方法分离犬外周静脉血淋巴细胞,再用含 15 $\mu$ g/mL ConA 的 PRIM1 640 培养液在 5%CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 中培养 6~12h,按 RNA 提取试剂盒说明提取细胞总 RNA 作为 RT-PCR 的模板。

### 1.4 CaIFN $\alpha$ cDNA 片段的克隆与测序

从经 ConA 诱导的犬外周血淋巴细胞中提取的总 RNA 为模板,用 RT-PCR 扩增 CaIFN- $\alpha$  的 cDNA,RT 条件为:65 $^{\circ}$ C、15min,42 $^{\circ}$ C、60min,94 $^{\circ}$ C、5min。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C、5min,94 $^{\circ}$ C、1min,55 $^{\circ}$ C、1min,72 $^{\circ}$ C、1min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C、10min 延伸。反应产物经 1% 的琼脂糖电泳鉴定,回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5 $\alpha$  感受态,挑选阳性菌,提取质粒后用 *EcoR*I、*Sal*I 酶切鉴定,命名为 pTCaIFN- $\alpha$ ,送 TaKaRa 公司进行测序以确定序列的正确性。

### 1.5 表达载体的构建

参考文献,将 pBV220 载体和 pTCaIFN- $\alpha$  分别用 *EcoR*I、*Sal*I 双酶切,回收纯化目的片段并用

T<sub>4</sub>DNA 连接酶于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态,挑选菌落培养提质粒,用 *EcoR*I、*Sal*I 双酶切鉴定阳性克隆<sup>[5]</sup>。阳性质粒命名 pBV220-CaIFN- $\alpha$ 。

### 1.6 工程菌的诱导表达

将 pBV220-CaIFN- $\alpha$  转化 BL21 感受态细胞中,挑选阳性克隆菌于含氨苄青霉素(50 $\mu$ g/mL)的 LB 培养液,30 $^{\circ}$ C 过夜培养,次日将 2% 的菌液接种于含氨苄青霉素(50 $\mu$ g/mL)的 2 $\times$ YT 培养液,30 $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.4,快速升温 42 $^{\circ}$ C,继续诱导培养 7h。

### 1.7 表达产物的提取和纯化

1.7.1 包涵体的获得<sup>[6]</sup>:将诱导表达菌液离心收集菌体,用 PBS 洗涤两次后用生理盐水重悬,冰浴超声波破菌离心,弃上清得包涵体,再用包涵体洗液洗涤,得到初步纯化的包涵体。

1.7.2 表达产物的变性、复性和纯化:将上述洗涤的包涵体溶于变性液(7mol/L GdmCl,50mmol/L Tris-HCl pH8.0,0.2mmol/L EDTA)室温搅动 2h,离心取上清,经蛋白浓度测定后,在冰浴条件下将蛋白质变性液分两次注入搅动的复性液(100mmol/L Tris-HCl pH8.0,0.2mmol/L EDTA,0.5mol/L L-精氨酸),4 $^{\circ}$ C 静置过夜,再透析 36h,离心收集上清,浓缩后用 Sephacryl S-200 层析柱分离纯化干扰素,洗脱液为 PBS。

### 1.8 微量细胞病变抑制法<sup>[7]</sup>测犬重组干扰素抗病毒活性

将犬肾细胞(MDCK)接种于 96 孔板,5%CO<sub>2</sub>,37 $^{\circ}$ C 培养成单层,加入倍比稀释的重组干扰素作用 18h,每孔再加入含 100TCID<sub>50</sub> 的 VSV 病毒,同时设置阴性对照组,24h 后观察细胞病变结果。

## 2 结果

### 2.1 cDNA 扩增与测序

RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,在 520bp 处有一特异的目的条带。测序结果表明克隆的基因大小为 523bp,含犬干扰素成熟蛋白基因,应用 DNASTAR 分析软件分析表明与 GenBank 上登录号为 M28624 的基因的同源性为 100%。

### 2.2 重组表达载体的鉴定

将 pBV220 载体和 pTCaIFN- $\alpha$  分别用 *EcoR*I、*Sal*I 双酶切,将回收纯化的大小片段连接后转化 DH5 $\alpha$ ,提取的质粒经酶切鉴定分离出约 520bp 的小片段即为 pBV220-CaIFN- $\alpha$ ,电泳结果如图 1 所示。

### 2.3 阳性工程菌的诱导表达

收集诱导不同时间的工程菌,处理后进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色鉴定,表达产物的相对分子量约为 19kDa,不同诱导时间的目的蛋白表达量不同,光密度扫描结果显示诱导 4h 时目的蛋白较多,约占菌体总蛋白的 27.6%,如图 2 所示。

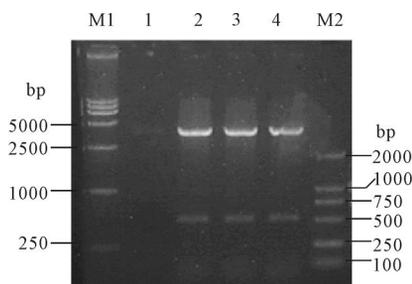


图 1 表达载体酶切电泳

Fig. 1 Restriction enzyme assay of expression vector

M1, DL15000 Marker; 1, control vector; 2~4, pBV220-CaIFN- $\alpha$ ; M2, DL2000 Marker.

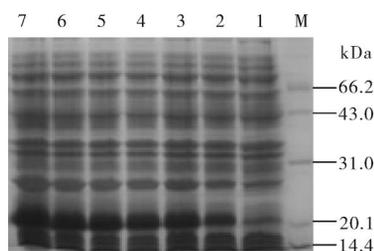


图 2 pBV220-CaIFN- $\alpha$  受体菌表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 2 The expression of recombinant pBV220-CaIFN- $\alpha$

1-7, The induced total cell inclusion of pBV220-CaIFN- $\alpha$  at 1~7 hours; M, Protein Weight Marker.

### 2.4 包涵体的分离

将诱导表达 4h 的菌体按方法 1.7.1 作裂菌处理,裂解液的上清和沉淀作 SDS-PAGE 电泳分析,结果显示目的蛋白存在于沉淀中,用包涵体洗涤液洗涤后,目的蛋白仍存在于沉淀中,说明产物是以包涵体的形式存在的。

### 2.5 重组犬 干扰素的纯化

按方法 1.7.2 所述对表达产物进行变性、复性和透析后,再用凝胶层析纯化,产物经浓缩后经 SDS-PAGE 电泳后染色,结果显示杂蛋白很少,纯化效果良好,结果如图 3 所示。

### 2.6 犬重组 干扰素的活性测定

应用 MDCK-VSV 系统微量细胞病变抑制法测定经稀释复性,透析复性,和层析纯化的表达产物,结果显示重组的犬 干扰素的抗病毒活性分别约为  $5.72 \times 10^5 \text{ U/L}$ ,  $6.81 \times 10^5 \text{ U/L}$ ,  $5.11 \times 10^6 \text{ U/L}$ ,纯化的抗病毒活性最好,蛋白质的含量约为  $13 \text{ g/L}$ 。

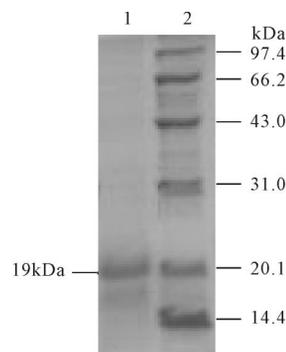


图 3 重组蛋白纯化结果

Fig. 3 Result of the purified recombinant protein

1, Purified recombinant protein; 2, Protein Weight Marker.

## 3 讨论

犬细小病毒病、犬瘟热、犬腺病毒等病毒病严重危害着犬的健康和生存,病毒病的预防和治疗显得尤为重要,因此研制安全高效的干扰素抗病毒制剂具有重大意义。

本文应用 RT-PCR 克隆的犬 干扰素成熟蛋白基因与 GenBank 上相同部位基因的同源性为 100%,说明该基因比较保守。在分析其序列时发现存在较多的大肠杆菌稀有密码子且有些密集分布,占犬 干扰素成熟蛋白基因的 17%之多,仅 Arg 稀有密码子 A GA, A GG, CGG 就有 14 个之多。在大肠杆菌中密集的 A GG/ A GA 密码子对蛋白的表达起抑制作用,因此在本研究中目的基因曾不在原核系统中表达或表达量很少,笔者分析其原因,根据分子克隆第二版的提高真核基因在原核表达系统的表达量的方法<sup>[8]</sup>,更换表达宿主菌以期得到比较满意的表达结果,尝试了 DH5、HB101、JM109、JC<sub>4588</sub>、M<sub>5248</sub>、BL21 等菌株,在 BL21 的改造菌株中获得表达,且表达量较高。

本研究首次采用了犬肾细胞(MDCK)测定了犬重组 干扰素的生物活性,其纯化产物达到  $5.11 \times 10^6 \text{ U/L}$ ,而且试验重复性较好。另外,笔者也用了牛肾细胞(MDBK)即 MDBK-VSV 系统测定了纯化产物的生物活性<sup>[9]</sup>,其抗病毒活性约为  $2.86 \times 10^5 \text{ U/L}$ ,表明该犬重组 干扰素不仅种属特异性好,而且抗病毒活性比较稳定。根据 MDCK 的细胞病变抑制结果,层析纯化的重组犬 干扰素的生物活性高于稀释复性和透析复性的,而透析复性的重组犬 干扰素的生物活性又稍好于稀释复性的,这表明目的蛋白纯度越高,其抗病毒活性就越好。目前,该纯化的重组犬 干扰素已进一步应用于临床动物实验中。

另外,在蛋白质变性液的复性过程中,笔者尝试用了含 0.5 mol/L 盐酸胍的复性液<sup>[10]</sup>和含 0.5 mol/L L-精氨酸的复性液复性,结果显示用后者复性的效果比较好,测得的犬重组干扰素的生物活性是前者复性的 2~4 倍。

本研究为进一步研究犬干扰素的生物学特性,发掘其药物价值以及犬干扰素生物制剂的生产奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Minagawa T, Ishiwata K, Kajimoto T. Feline interferon-omega treatment on canine parvovirus infection [J]. *Vet Microbiol*, 1999, 69(1-2): 51-53.
- [2] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 452.
- [3] Himmler A, Hauptmann R, Adolf G R. Structure and expression in *Escherichia coli* of canine interferon-alpha genes [J]. *J Interferon Res*, 1987, 7: 173.
- [4] 夏春, 汪明, 夏兆飞. 拉布拉多犬和德国牧羊犬干扰素 alpha 基因克隆及测序[J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(3): 245-247.
- [5] Sambrook, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M], 3<sup>rd</sup>. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 103-105.
- [6] 李学仁, 王海震, 葛菲菲, 等. 奶牛干扰素基因的高效表达及活性测定[J]. *中国病毒学*, 2004, 19(4): 356-357.
- [7] 张德震, 吴淑华, 侯云德, 等. 重组人干扰素的纯化[J]. *病毒学报*, 1989, 5(1): 3-8.
- [8] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. *分子克隆实验指南* [M], 第二版. 科学出版社, 2002. 844-845.
- [9] 杨琪, 夏春, 赵德明, 等. 犬干扰素 cDNA 的克隆及其在鼠骨髓瘤细胞 (SP2/O) 中表达[J]. *生物工程学报*, 2002, 5(3): 365-368.
- [10] 蔡梅红, 曹瑞兵, 周斌, 等. 鸡干扰素成熟蛋白基因的表达及其产物抗病毒活性测定[J]. *中国病毒学*, 2004, 19(1): 32-35.
- [11] Nishiawa Y, Iwata A, Katsushi K, *et al.* Expression of canine interferon by a recombinant vaccinia virus and its antiviral effect[J]. *Virus Research*, 2001, 75: 113-121.