

奶牛 γ 干扰素基因的高效表达及活性测定

李学仁, 王海震, 葛菲菲, 王旭东, 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)

Expression and Activity Determination of Bovine Interferon-gamma Gene

LI Xue-ren, WANG Hai-zhen, GE Fei-fei, WANG Xu-dong, CAO Rui-bing, CHEN Pu-yan**

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

Abstracts: With the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the DNA sequence encoding the cattle's interferon-gamma (BovIFN- γ) and the signal peptide was amplified, from the total RNA of the lymphocytes stimulated with concanavalin A in the peripheral blood of bovine, which was then cloned into vector pMD18-T and sequenced. The sequencing result showed that there is 100% homology among the documented sequences and sequence reported here, which was successfully inserted into the expressing plasmid pRLC and was highly expressed in *E.coli*. SDS-PAGE result showed that the cloned recombinant protein was expressed in the form of inclusion bodies in the *E.coli* cell with molecular weight of 16kDa and was amount to 42% of the whole protein in the *E.coli* cell, which was subsequently dissolved in 7mol/L guanidine chloride and renatured with dilution in refolding buffer containing 0.5mol/L guanidine chloride. In order to obtain pure protein, the renatured boIFN- γ was desalting by Hiprep 26/10 and purified by Hiprep Sephacryl S-200 chromatography. The purified product could inhibit the cytopathic effect, which verified it has the high cytokine activation.

Key word: Bovine; Interferon-gamma; Prokaryotic expression; Detection for activation

摘要: 经刀豆素 (conA) 刺激诱导奶牛外周血淋巴细胞, 应用 RT-PCR 方法从其总 RNA 中对奶牛 γ 干扰素基因 cDNA 进行扩增, 然后将特异性片段连接到 pMD18-T 载体, 测序结果表明, 与已知序列同源性为 100%。然后将特异性片段连在 pRLC 载体上进行表达, 经 SDS-PAGE 分析, 原核表达产物为 16kDa 的重组蛋白, 占菌体总蛋白的 42%, 表达产物以包涵体形式存在。经 7mol/L 盐酸胍的变性液溶解及 0.5mol/L 盐酸胍复性液处理, 表达产物进行脱盐、凝胶层析纯化, 细胞病变抑制法结果表明, 重组牛 IFN- γ 具有较高的干扰素活性, 约为 6.0×10^5 U/mg。

关键词: 奶牛; γ -干扰素基因; 原核表达; 活性测定

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)04-0356-04

γ 干扰素是由激活的 T 细胞和 NK 细胞产生的一种细胞因子^[1], 它不仅具有 I 型 IFN (α 干扰素、 β 干扰素) 的抗病毒和抗肿瘤活性, 更重要的是它还具有促进 MHC II 类抗原表达、增强 APC 细胞与 T 细胞的相互作用、增强 T 细胞辅助抗体产生和细胞毒性 T 细胞产生的能力等诸多免疫调节活性。奶牛 γ 干扰素 boIFN- γ 全基因为 501 个碱基, 编码 166 个氨基酸, 前 23 个氨基酸为信号肽, 后 143 个氨

基酸为活性成熟蛋白。对牛 γ 干扰素的研究始于 20 世纪 80 年代中期, Cerrettit 等 1986 年以人 IFN- γ 基因为探针从牛的 cDNA 文库中克隆了牛 γ 干扰素基因^[2], 以后国外学者在利用基因工程技术生产重组牛 IFN- γ (rboIFN- γ) 的研究也开始兴起。国外研究表明, 牛 γ 干扰素在抗水泡性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV)、口蹄疫病毒 (Foot and mouth disease virus, FMDV)、牛病毒性腹泻病毒 (Bovine

收稿日期: 2003-12-15, 修回日期: 2004-02-12

作者简介: 李学仁 (1978-), 男, 湖北省籍, 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, 研究方向为动物传染病与预防兽医学。Corresponding author.
Tel: 025-84396028, E-mail: aid@njau.edu.cn

viral diarrhea-mucosal disease virus, BVDV)、牛呼吸合胞体病毒 (*Bovine respiratory syncytial virus*, BRSV)、以及副流感-3 型(*Parainfluenza virus 3*, PIV-3) 等试验中均取得了良好的效果^[3-4]。

本文中笔者对牛 IFN- γ 基因进行克隆、原核表达, 并对重组牛 IFN- γ 进行提取、变性、复性和纯化等研究, 为我国重组牛 IFN- γ 的规模化生产及在养牛业中的应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

pMD18-T 载体购自大连 Takara 公司, 大肠杆菌 DH5 α 与原核表达载体 pRLC 由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保存, pRLC 带有 PR 和 PL 启动子, 温敏诱导表达。牛肾细胞 MDBK 细胞购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 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, conA 和淋巴细胞分离液为上海生物工程公司产品。M-MLV 反转录酶、rTaq 酶购自 Promega 公司, 限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*T₄*DNA 连接酶购自 Takara 公司。脱盐柱 Hiprep 26/10 Desalting 和分离柱 Hiprep Sephacryl S-200 为 Pharmacia 公司产品。

1.2 boIFN- γ cDNA 片段的克隆及测序

根据 GeneBank 上已有的 boIFN- γ cDNA 序列 (NM-174086); 设计了两条 PCR 引物, 5' 引物在编码 boIFN- γ 成熟蛋白的第一个密码子之前加入了一个 *EcoR* I 酶切位点和 ATG 起始密码子, 3' 引物与 cDNA 3' 端互补, 并设计了一个 *Sal* I 酶切位点。从经 conA 诱导的奶牛外周血淋巴细胞总 RNA 中用 RT-PCR 方法进行扩增。逆转录反应条件为: 65 $^{\circ}$ C 15min, 42 $^{\circ}$ C 1h, 94 $^{\circ}$ C 5min, PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 53 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1.5min, 共进行 35 个循环的 PCR 扩增, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸反应。反应产物用 1% 琼脂糖电泳鉴定, 回收和纯化 PCR 产物, 连接在 pMD18-T 载体上, 命名为 pMD18-T- γ , 将 pMD18-T- γ 质粒送 Takara 公司测序。

1.3 牛 γ 干扰素原核表达载体的构建

参考分子克隆第三版^[5], 将原核表达载体 pRLC 和牛 γ 干扰素成熟蛋白基因用 *EcoR* I+*Sal* I 双酶切, 回收片段用 *T₄*DNA 连接酶 4 $^{\circ}$ C 连接过夜, 将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑菌培养, 提取质粒, 用 *EcoR* I+*Sal* I 双酶切鉴定阳性克隆。

1.4 菌株的诱导表达

阳性工程菌在含氨苄青霉素(50 μ g/mL)的 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡过夜, 次日以 2% 量扩大培养, 30 $^{\circ}$ C 继续培养 3~4h, 当 OD₆₀₀ 约等于 0.4~0.6 时, 快速变温至 42 $^{\circ}$ C, 诱导表达 5h。

1.5 表达产物的提取、复性和纯化

1.5.1 包涵体的制备: 将 1L 诱导表达菌液 5000r/min 离心 15min 收集菌体, 用 PBS 洗涤两次后用生理盐水重悬, 冰浴超声破菌, 每次超声 30s 静置 30s, 反复共 16min。500r/min 离心 5min, 弃上清得包涵体, 再用包涵体洗液 (1% Triton X-100, 50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 10mmol/L EDTA, 0.15mol/L NaCl) 洗涤 3 次, 得到初步纯化的包涵体。

1.5.2 表达产物的变性、复性和纯化: 上述洗涤的包涵体溶于包涵体裂解液(7mol/L 盐酸胍, 50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.2mmol/L EDTA)室温搅动 2h, 离心取上清, 经蛋白浓度测定后以包涵体裂解液将浓度调整至 100mg/mL。在冰浴条件下分别将包涵体裂解液分两次注入搅动的复性液, 至蛋白质终浓度为 0.2 mg/mL, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜。复性液基本成份是 100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、0.2mmol/L EDTA、0.5mmol/L L-精氨酸。再将复性液置于透析袋内透析 24h, 离心 10000r/min 15min, 收集上清待用, 浓缩后用 Sephacryl S-200 层析柱分离纯化干扰素, 洗脱液为 PBS(pH7.4), 收集主峰。

1.6 微量细胞病变抑制法测干扰素抗病毒活性

牛肾细胞株 MDBK 为测定细胞, VSV 病毒为攻击病毒, 同时设牛 γ 干扰素标准品为对照。

2 结 果

2.1 牛 γ 干扰素成熟蛋白 boIFN- γ 基因的克隆及测序

以 conA 诱导培养牛外周血淋巴细胞总 RNA 作模板, 经 RT-PCR 获得 boIFN- γ 基因, 测序结果表明, 克隆 boIFN- γ 基因大小为 467bp, 含奶牛 γ 干扰素成熟蛋白编码基因, 5' 端添加的起始密码子 ATG 及两侧酶切位点, 与设计一致。

2.2 IFN- γ 表达质粒的构建

将 pMD18-T- γ 用 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切后回收小片段, 将之与同样酶切的 pRLC 载体大片段相连接, 转化 DH5 α 菌株, 经酶切鉴定分离出一约 460bp 小片段的即为重组子 pRLC-IFN- γ , 电泳结果如图 1。

2.3 牛 γ 干扰素的诱导表达鉴定

收集不同诱导培养时间的工程菌, 处理后 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 16kDa, 光密度扫描结果显示 16kDa 蛋白条带约占菌体总蛋白的 42%, 如图 2。

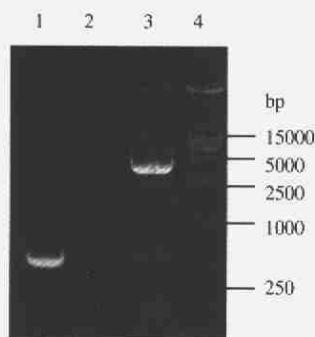


图 1 PCR 产物及表达载体酶切鉴定

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

1, boIFN- γ ; 2/4. DNA Marker DL2 000 and DL15 000; 3, pRLC-boIFN- γ .

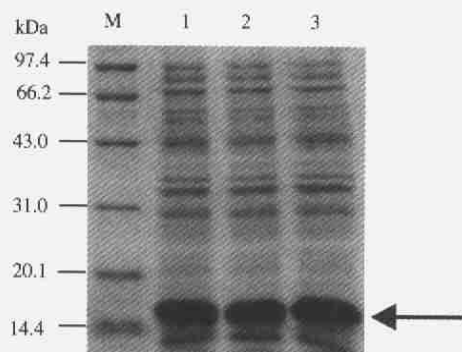


图 2 pRLC- γ IFN 受体菌的表达产物分析

Fig.2 The expression of the recombinant pRLC- γ IFN in *E. coli* 1-3, The induced total cell inclusion of pRLC- γ IFN at 4, 5, 6 hours; M, protein Weight Marker

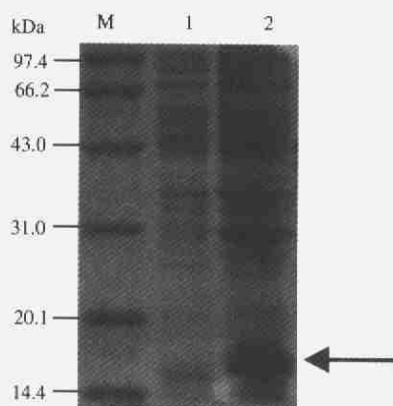


图 3 pRLC- γ IFN 在 *E. coli* 中的表达

Fig.3 Characteristics of pRLC- γ IFN in *E. coli*.

1, Pellet of the bacteria lysate; 2, Supernatant of the bacteria lysate; M, protein Weight Marker.

2.4 包涵体的分离

诱导表达后的菌体按方法 1.5 作裂菌处理, 裂

菌后的上清和沉淀作 SDS-PAGE 分析, 16kDa 带主要存在于沉淀中。用含 Triton X-100 的包涵体洗涤液洗涤, 表达产物仍存留于沉淀中, 说明产物是以包涵体的形式存在的。

2.5 牛重组 γ 干扰素的纯化

表达产物经变性、复性脱盐处理后, 再用凝胶层析纯化, 产物经 SDS-PAGE 后染色, 光密度扫描结果表明, 重组牛 γ 干扰素得到较好的纯化, 其纯度在 90% 以上。

2.6 牛重组 γ 干扰素的活性测定

应用 MDBK-VSV(水泡性口炎病毒)系统微量细胞病变抑制法测定纯化产物, 结果显示纯化的重组牛 γ 干扰素的比活约为 6.0×10^5 U/mg。蛋白浓度结果表明, 纯化的重组牛 γ 干扰素最终得率为 18mg/L。图 4 显示了细胞培养板中接种相同病毒后 24h 的形态。

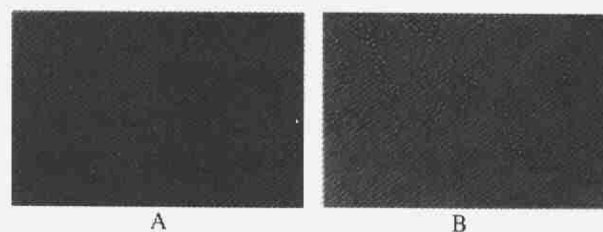


图 4 重组干扰素对 VSV 增殖的抑制作用

Fig.4 Inhibition effect for the recombinant boIFN- γ on replication of VSV

A, MDBK cells pretreated with the recombinant boIFN- γ (diluted by 10^5); B, Control MDBK cells.

3 讨论

γ -IFN 基因在正常情况下处于封闭状态, 必须在各种特异性或非特异性刺激因子的刺激下才能表达, 且纯化困难, 产量低, 成本较高, 因此要获得高效价廉的 γ -IFN, 必须通过基因工程技术大量制备和生产^[6]。本研究应用 RT-PCR 技术以 conA 诱导培养的牛外周血淋巴细胞总 RNA 中扩增出 boIFN- γ 的成熟蛋白基因, 测序结果与 GeneBank 上发表的序列同源性为 100%, 说明牛 γ 干扰素基因较为保守。

由于 boIFN- γ 既可以单独作为生物制剂用于奶牛疾病如乳房炎的预防控制^[7], 也可以作为免疫佐剂增强疫苗如乳房炎疫苗的免疫效果^[9]。利用基因工程技术生产高效价廉的 γ -IFN 已成为一大热点。本实验室也尝试用原核系统、酵母系统表达 boIFN- γ , 并获得了成功, 生物活性较高。目前, 笔者想进一步尝试用 boIFN- γ 治疗奶牛乳房炎的工作。

参考文献

- [1] Williams J G, Jurkovich G J, Maier R V. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine[J]. *J Surg Res*, 1993, 54(1):79-93.
- [2] Cerretti D P, Mckereghan K, Larsen A, *et al.* Cloning, sequence, and expression of bovine interferon-gamma[J]. *J Immunol*, 1986, 136(12): 4561-4564.
- [3] Perler L, Schweizer M, Jungi T, *et al.* Bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and independent pathways[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81:881-887.
- [4] Inmaculada E, Juan C, Eladio V. Effect of Interferon- α , interferon- γ and Tumour Necrosis Factor on African Swine Fever Virus Replication in Porcine Monocytes and Macrophages[J]. *J Virol*, 1998, 69: 2973-2980.
- [5] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M], 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.103-105.
- [6] 许金俊, 秦爱建, 刘岳龙, 等. 奶牛干扰素基因克隆及其在大肠杆菌中表达[J]. *扬州大学学报*, 2003 24(1): 5-9.
- [7] 张德震, 吴淑华, 侯云德, 等. 重组人 γ 干扰素的纯化[J]. *病毒学报*, 1989, 5(1): 3-8.
- [8] Sordillo L M, Babiuk L A. Controlling acute Echerichia coli mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon gamma[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(11): 2665-2673.
- [9] Pighetti G M, Sordillo L M. Specific immune responses of dairy cattle after primary inoculation with recombinant bovine interferon-gamma as an adjuvant when vaccinating against mastitis[J]. *Am J Vet Res*, 1996, 57(6): 819-824.