

# 鸡 干扰素基因的克隆、原核表达及抗病毒活性测定

陈红英<sup>1,2</sup>, 宋凌云<sup>1,2</sup>, 崔保安<sup>1,2</sup>, 胡功政<sup>1,2</sup>, 贾艳艳<sup>1</sup>, 郭显坡<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002)

**摘要:**通过 PCR 技术从罗曼鸡肝脏基因组中扩增鸡 干扰素 (*ChIFN*) 全基因, 并克隆和测序。序列分析表明, *ChIFN* 基因全长为 582 bp, 亚克隆其成熟蛋白编码基因 489 bp, 利用基因重组技术构建了重组质粒, 使 *ChIFN* 置于原核表达载体 pQE30 的 T5 启动子下并同 6 × His(多聚组氨酸标签)-Tag 融合。经酶切和 PCR 鉴定, DNA 测序证实重组质粒 pQEChIFN 构建正确; 将 pQEChIFN 转化大肠杆菌 M15 感受态细胞, 用 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 证实表达出分子质量为 19.80 kDa 的融合蛋白。表达的蛋白以包涵体形式存在, 经变性、复性处理后, 在 Vero 细胞上抗水泡性口炎病毒的活性为  $1.16 \times 10^3$  U/mg。本研究成功表达了 *ChIFN*, 表达的重组蛋白具有一定的生物活性。

**关键词:**鸡; 干扰素; 克隆; 原核表达; 抗病毒活性

**中图分类号:** Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)01-0040-04

## Cloning, Prokaryotic Expression and Antiviral Activity of Chicken Interferon- Gene

CHEN Hong-ying<sup>1,2</sup>, SONG Ling-yun<sup>1,2</sup>, CUI Bao-an<sup>1,2</sup>, HU Gong-zheng<sup>1,2</sup>,  
JIA Yan-yan<sup>1</sup>, GUO Xian-po<sup>1</sup>

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Animal Food Safety Key Laboratory of Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The full length of chicken interferon alpha (*ChIFN*) gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the genome DNA of Luoman chicken liver, and then sequenced. The amplified gene fragment was 582 bp, of which the 489 bp coding region was subcloned into prokaryotic expression vector pQE30. The recombinant plasmid pQEChIFN was identified by PCR, enzyme digestion and DNA sequencing. SDS-PAGE and Western blot showed that a 19.80 kDa fusion protein was expressed in the form of inclusion body with good immunity. After being denatured and re-natured, the activity of inclusion body was detected by inhibiting the cytopathic effect. The activity of recombinant *ChIFN* against vesicular stomatitis virus at Vero cell is  $1.16 \times 10^3$  U/mg.

**Key words:** Chicken; *IFN*; Clone; Prokaryotic expression; Antiviral activity

干扰素 (Interferon, IFN) 是由脊椎动物细胞产生的一类分泌型多功能糖蛋白, 是一种具有广谱抗病毒、抗肿瘤和增强免疫功能的细胞因子。干扰素分为  $\alpha$  型和  $\beta$  型两类。 $\alpha$  型干扰素包括  $\text{IFN-}\alpha_1$  和  $\text{IFN-}\alpha_2$  等,  $\beta$  型干扰素又称免疫干扰素即  $\text{IFN-}\beta$ 。干扰素是由能在脊椎动物各种类型细胞增殖的病毒诱导白细胞产生的<sup>[1]</sup>, 其主要活性是抗病毒。鸡 干扰素 (Chicken interferon-alpha, *ChIFN*) 全基因为 582 个碱基, 编码 193 个氨基酸, 其中前 31 个氨基酸为信号肽, 后 162 个氨基酸为成熟蛋白, 蛋白分子量约为

19 kDa。Sekkelick 等<sup>[2]</sup>于 1994 年首次成功克隆和表达了 *ChIFN* 基因, 并进行了结构分析。国内学者汪明等 2000 年克隆表达了肉鸡 *IFN* 基因<sup>[3]</sup>; 同年, 夏春等克隆了惠阳胡须鸡<sup>[4]</sup>和丝羽乌骨鸡 *IFN*-基因<sup>[5]</sup>。

临床应用上, 干扰素有着抗生素无法替代的作用, 激活后能迅速分布于全身, 几天内很快达到高峰浓度。细胞接触干扰素只需几分钟就能产生抗病毒作用, 可适用于不同品种的鸡, 对生产性能影响小。病毒性病害一直困扰着养殖业, 迫切需要广谱抗病

收稿日期: 2008-12-15

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划专项 (2006BAD06A08)

作者简介: 陈红英 (1965-), 女, 四川仁寿人, 副研究员, 博士, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

通讯作者: 崔保安 (1948-), 男, 河南荥阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

毒生物制剂来治疗和加强免疫效果<sup>[6-8]</sup>。本研究应用 PCR 技术从河南大面积饲养的罗曼鸡肝脏组织中克隆了 *IFN*<sup>-</sup> 基因,并在大肠杆菌中获得了高效表达,为重组干扰素作为新型广谱抗病毒生物制剂奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 原核表达载体 pQE30、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 和 M15 由河南省动物性食品安全重点实验室保存。

1.1.2 细胞与病毒 Vero 细胞由河南省动物性食品安全重点实验室保存;水泡性口炎病毒 (VSV) 由南京农业大学陈溥言教授惠赠。

1.1.3 主要试剂 动物组织基因组 DNA 小量制备试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州维特洁生化技术有限公司。pGEM-T Easy 载体和 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶均购自 Promega 公司 (Madison, USA)。Ex Taq DNA 聚合酶、IPTG 和 X-gal,限制性内切酶 *Sal*、*Sph* 等购自 TaKaRa 生物工程公司。

### 1.2 引物设计

参照 GenBank 中已发表鸡 干扰素基因序列 (U07868),利用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 对引物,用于扩增鸡 *IFN*<sup>-</sup> 全基因和去掉信号肽的成熟蛋白编码基因。引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

P1: 5'-TATCCACCATGGCTGTGCC-3';

P2: 5'-CTAAGTCCCGTGTGCGTGT-3';

P3: 5'-TGCCATGCTGCAACCACCTTCG-3', 引入酶切位点 *Sph*;

P4: 5'-CTGTCGACCTAAGTCCCGTGT-3', 引入酶切位点 *Sal*。

### 1.3 鸡 干扰素全基因的 PCR 扩增、克隆与序列测定

参照动物组织基因组 DNA 小量制备试剂盒使用说明从罗曼鸡肝脏组织中提取基因组 DNA。以提取的 DNA 为模板,采用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。反应程序为:94 预变性 5 min;94 30 s,56 30 s,72 1 min 进行 36 个循环;最后 72 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,参照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收 582 bp 处 DNA 带,回收的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。挑取数个菌落分别接种于 3 mL 含 Amp<sup>+</sup> 的 LB 液体培养基中,37 过夜振荡培养。提取重组质粒进行 PCR 和酶切鉴定,阳性质粒命名

为 pGEM-ChIFN<sup>-</sup>,并送 TaKaRa 生物工程公司测序。

### 1.4 原核表达载体 pQEChIFN<sup>-</sup> 的构建与鉴定

利用特异引物 P3 和 P4,以 pGEM-ChIFN<sup>-</sup> 为模板,扩增鸡 干扰素成熟蛋白基因。反应程序同 1.3。扩增后用 10 g/L 琼脂糖电泳检测,回收特异的 DNA 条带。用 *Sph* 和 *Sal* 双酶切回收的 PCR 产物,电泳、分离和回收 *IFN*<sup>-</sup> 片段。将 *IFN*<sup>-</sup> 片段定向插入到同样处理的原核表达载体 pQE30 中,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,选单个菌落进行 PCR 鉴定及用 *Sph* 和 *Sal* 进行双酶切鉴定,阳性质粒命名为 pQEChIFN<sup>-</sup> 并送 TaKaRa 生物工程公司进行序列测定。

### 1.5 重组质粒 pQEChIFN<sup>-</sup> 在大肠杆菌中的诱导表达

将测序正确的 pQEChIFN<sup>-</sup> 转化 *E. coli* M15 感受态细胞,挑取单菌落接种于 3 mL 含 Amp<sup>+</sup> 的 LB 液体培养基中。取过夜培养物 3 mL 接种于 300 mL LB 液体培养基中,37 快速振荡培养。培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6 ~ 1.0,加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L),37 诱导 5 h,同时用未诱导的菌液和空载体作为阴性对照。制备 15% 分离胶和 5% 浓缩胶,SDS-PAGE 电泳检查目的蛋白表达情况。

### 1.6 Western blot 分析

SDS-PAGE 电泳结束后,将凝胶上的蛋白转印至硝酸纤维素膜 (NC) 上,用鼠抗鸡 *IFN*<sup>-</sup> 单克隆抗体 (1 5 000) 作一抗,用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 (1 10 000) 作二抗,进行 Western blot 反应。

### 1.7 重组鸡 IFN<sup>-</sup> 的纯化与复性

挑取单个阳性重组菌接种于 50 mL 含有 Amp 的 LB 培养基中,按 1.5 方法重新诱导。OD 值不再增长时,5 000 r/min 离心 5 min,收获菌体沉淀按常规方法进行蛋白质的纯化与复性。将复性的蛋白溶液适当稀释,用 UV754 紫外分光光度计分别测定在 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值,根据公式计算蛋白质浓度。计算公式为:蛋白质浓度 (mg/mL) = (1.45 × OD<sub>280</sub> - 0.74 × OD<sub>260</sub>) × 稀释倍数。

### 1.8 重组鸡 IFN<sup>-</sup> 抗病毒活性测定

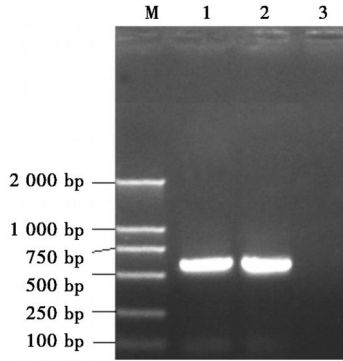
采用微量细胞病变抑制法<sup>[9]</sup>,在 Vero 细胞-水疱性口炎病毒 (Vero-VSV) 系统上测定表达产物的抗病毒活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡 干扰素全基因的克隆

利用特异引物,采用 PCR 技术,从罗曼鸡肝组织基因组中扩增出 1 条约 582 bp 的条带 (图 1)。将

回收的 PCR 产物插入到 pGEM-T 载体质粒的外源基因插入位点。测序表明,克隆的罗曼鸡 *IFN* $\gamma$  基因大小为 582 bp,编码 193 个氨基酸残基,其中前 31 个氨基酸为信号肽,后 162 个氨基酸为成熟蛋白,与预期结果吻合。与 GenBank 中查得的鸡 *IFN* $\gamma$  基因进行比较发现,罗曼鸡 *IFN* $\gamma$  基因与 Sekellick 报道的鸡 *IFN* $\gamma$  基因序列完全一致。



M. DNA 标准 DL2000;1,2. PCR 产物;3. 阴性对照。

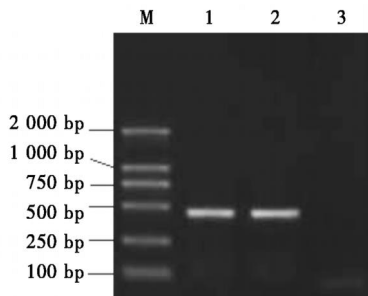
M. DNA marker DL2000;1,2. PCR products;3. Negative control.

图1 鸡 干扰素全基因的 PCR 扩增

Fig.1 The amplification of chicken interferon-alpha gene

## 2.2 重组质粒 pQEChIFN $\gamma$ 的鉴定结果

重组质粒 pQEChIFN $\gamma$  进行 PCR、电泳,出现 1 条长约 500 bp 的特异条带,与预期大小相符(图 2);经 *Sph* 和 *Sal* 双酶切、电泳,出现 2 条带:其中一条带为载体质粒,约 3 400 bp,另一条带为所克隆的 *IFN* $\gamma$  片段,约 500 bp,与预期结果相符(图 3)。将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的重组质粒 pQEChIFN $\gamma$  进行测序,测序结果表明,鸡 干扰素基因与 pQE30 表达载体连接正确,且未发生任何位点变异。



M. DNA 标准 DL2000;1,2. PCR 产物;3. 阴性对照。

M. DNA marker DL2000;1,2. PCR product;3. Negative control.

图2 重组质粒 pQEChIFN $\gamma$  的 PCR 鉴定

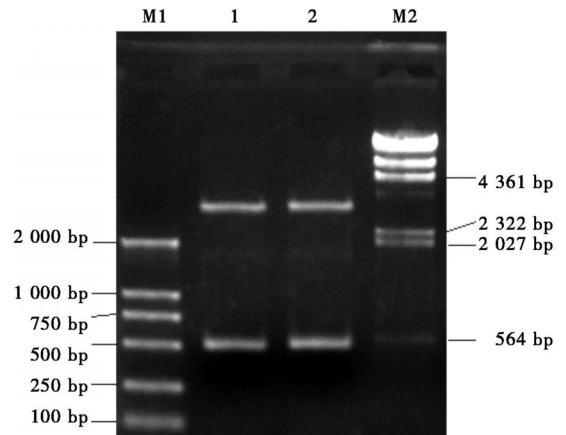
Fig.2 Identification of recombinant

plasmid pQEChIFN $\gamma$  by PCR

## 2.3 重组 IFN $\gamma$ 的鉴定

SDS-PAGE 检测结果显示,诱导重组菌出现 1 条相对分子质量约为 19.80 kDa 的特异蛋白带,与预期大小的融合蛋白一致。而只含空载体 pQE30 的 M15 菌及未含质粒的 M15 菌,没有出现这一条带。

表明重组质粒 pQEChIFN $\gamma$  在宿主菌 M15 中可表达含鸡 干扰素的融合蛋白(图 4 - A)。



M1. DNA 标准 DL2000;1,2. *Sph* I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒

pQEChIFN $\gamma$ ;M2. DNA 标准 - *Hind* III digest.

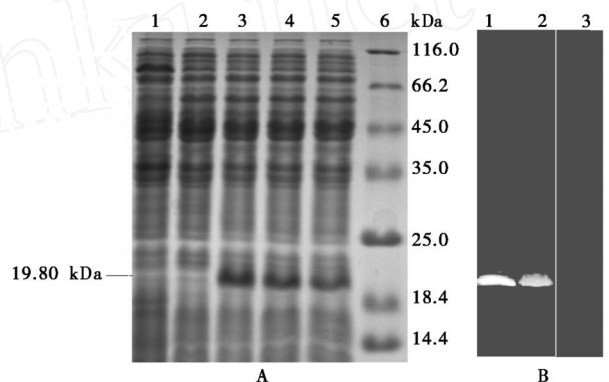
M1. DNA marker DL2000;1,2. Recombinant plasmid pQEChIFN $\gamma$

digested by *Sph* I + *Sal* I;M2. DNA marker - *Hind* III digest.

图3 重组质粒 pQEChIFN $\gamma$  的 *Sph* 和 *Sal* 双酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid

pQEChIFN $\gamma$  by *Sph* I and *Sal* I digestion



A. SDS-PAGE:1. pQE30 对照;2. M15 对照;3~5. ChIFN $\gamma$  在 M15 中的表达;6. 低分子量蛋白 marker. B. Western blot 分析:

1,2. 重组 ChIFN $\gamma$ ;3. 阴性对照。

A. SDS-PAGE analysis:1. Indicates cell lysates of bacteria transformed with empty pQE30 vector;2. Reveals cell lysates of *E. coli* M15 alone;3-5. Cell lysates of *E. coli* M15 transformed with pQEChIFN $\gamma$ ;6. Represents molecular weight marker. B. Western Blot analysis:1,2. Reveal the IFN $\gamma$  protein recognized by anti-IFN $\gamma$  mAb;3. Negative control.

图4 融合蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

Fig.4 SDS-PAGE and Western blot analysis of

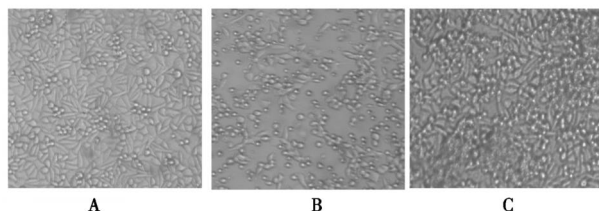
IFN $\gamma$  fusion protein expressed in *E. coli*

用鼠抗鸡 *IFN* $\gamma$  单克隆抗体对融合蛋白进行 Western blot 检测,结果表明,重组菌诱导后的融合蛋白与鼠抗鸡 *IFN* $\gamma$  单克隆抗体反应后,融合蛋白在大小约 19.80 kDa 处出现 1 条清晰的抗原 - 抗体结合带,而只含空载体 pQE30 的 M15 菌培养物无此条带(图 4-B)。表明表达的融合蛋白可被鼠抗鸡 *IFN* $\gamma$  单克隆抗体所识别,具有良好的免疫反应性。

重组蛋白经变性、复性后,融合蛋白的最终浓度为 0.424 mg/mL。

## 2.4 重组 IFN $\gamma$ 抗病毒活性测定

在 Vero 上的多次活性检测表明,重组干扰素表现出了明显的抗病毒活性,能有效抑制 VSV 病毒对细胞的破坏作用(图 5)。测得纯化后的重组鸡 干扰素活性为  $4.9 \times 10^2$  U/ mL,因其蛋白浓度为 0.424 mg/ mL,因此,重组鸡 干扰素活性为  $1.16 \times 10^3$  U/ mg。



A. 未感染 VSV 的正常 Vero 细胞;B. 未经 IFN 作用的 Vero 细胞直接感染 VSV 出现的细胞病变;C. 经 IFN 作用后的 Vero 细胞感染 VSV 出现的细胞病变。

A. Normal Vero cells;B. Cytopathic effect on the Vero cells infected by VSV but not treated with ChIFN- $\gamma$ ;C. Cytopathic effect on the Vero cells infected by VSV and ChIFN- $\gamma$ .

图 5 ChIFN $\gamma$  对 VSV 的抑制作用

Fig. 5 Inhibition effect of vesicular stomatitis virus cytopathic effect by ChIFN- $\gamma$  on the Vero cells

## 3 讨论

干扰素是一类重要的细胞因子,由生物体细胞受到病毒或其他诱生剂的作用而产生的分泌性蛋白,具有抗病毒、抗细胞增殖、免疫调节等多种生物学活性<sup>[6-8,10]</sup>。自 1986 年以来,各型重组干扰素相继投放市场,在医学临床治疗过程中发挥了巨大作用,而且副作用较轻。与人医相比,禽类干扰素分子生物学研究相对滞后。本试验应用 PCR 技术从河南大面积饲养的罗曼鸡肝脏组织中克隆了鸡 IFN- $\gamma$  基因,构建原核表达载体 pQEChIFN $\gamma$ ,鸡 IFN $\gamma$  获得了成功表达,为该基因的免疫学和生物学研究奠定了基础。

为了制备安全、经济、高效并具有生物学活性的重组干扰素,不仅要求表达载体具有较清楚的遗传背景,容易进行遗传操作,而且还要求容易导入载体 DNA 并能够进行高密度培养。因此,本研究选用了具有“双操纵子”系统的大肠杆菌表达系统,将 pGEM $\gamma$ -ChIFN $\gamma$  重组质粒中的 ChIFN $\gamma$  基因亚克隆到表达质粒 pQE30 上,构建了重组表达质粒 pQEChIFN $\gamma$ 。该系统的 pQE30 表达载体是一种建立在噬菌体 T5 启动子转录翻译系统上的高效表达载体,含有 2 个 lacZ 操纵子序列以及重组蛋白 N 端含 6 个组氨酸序列,前者可以增加 lacZ 抑制因子的结合能力,确保 T5 启动子的有效表达,后者可以使表达产物带有组氨酸尾,有利于重组蛋白的纯化,但并不影响蛋白的分泌、重折叠以及融合蛋白的结构和

功能。由此可见,pQE30 表达载体这种独特的“双操纵子”系统确保了在转录水平上的有效调控,从而可以实现重组蛋白表达的人工控制。

猪水泡性口炎病毒(VSV)不仅可在多种动物的细胞内繁殖,而且对大多数动物的各种干扰素均敏感,有利于比较各种干扰素的抗病毒活性。目前干扰素效价即国际单位是根据干扰素抗 VSV 活性来测定的。因人羊膜细胞(WISH)的干扰素受体非常丰富<sup>[11]</sup>,VSV-WISH 系统是公认的干扰素抗病毒活性测定系统<sup>[12]</sup>。本试验利用河南省动物性食品安全重点实验室现有的细胞初步测定了重组鸡 干扰素在 Vero 细胞上抗 VSV 的效价,结果显示其效价为  $1.16 \times 10^3$  U/ mg。与其他报道相比,其活性相对较低,这可能是本试验过程中反复冻溶引起的,也可能是由于干扰素的相对种属特异性引起的。

## 参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物[M]. 北京:中国农业出版社,2001:452.
- [2] Sekellick M J, Ferrandino A F, Hopkins D A, *et al.* Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis[J]. Journal of Interferon and Cytokine Research, 1994, 14(2): 71 - 79.
- [3] 汪明, 吴志光, 夏春. 肉鸡 IFN- $\alpha$  基因的克隆、序列分析以及在大肠杆菌中的表达[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(4): 337 - 381.
- [4] 夏春, 汪明, 朱凌云, 等. 惠阳胡须鸡 IFN $\gamma$  基因克隆和序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(6): 563 - 565.
- [5] 夏春, 汪明, 杨琪, 等. 丝羽乌骨鸡 IFN 基因克隆和序列分析[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(9): 508 - 513.
- [6] Takehara K, Kobayashi K, Ruttanapunma R, *et al.* Adjuvant effect of chicken interferon-gamma for inactivated Salmonella Enteritidis antigen[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2003, 65(12): 1337 - 1341.
- [7] Xia C, Liu J, Wu Z G, *et al.* The interferon-alpha genes from three chicken lines and its effects on H9N2 influenza viruses[J]. Animal Biotechnology, 2004, 15(1): 77 - 88.
- [8] Rauw F, Lambrecht B, van den Berg T. Pivotal role of ChIFN $\gamma$  in the pathogenesis and immunosuppression of infectious bursal disease [J]. Avian Pathology, 2007, 36(5): 367 - 374.
- [9] Rubinstein S, Familletti P C, Pestka S. Convenient assay for interferons [J]. Journal of Virology, 1981, 37(2): 755 - 758.
- [10] Haghighi H R, Abdul-Careem M F, Dara R A, *et al.* Cytokine gene expression in chicken cecal tonsils following treatment with probiotics and Salmonella infection[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 126(1 - 3): 225 - 233.
- [11] Pfeffer L M, Dinarello C A, Herberman R B, *et al.* Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons [J]. Cancer Research, 1998, 58(12): 2489 - 2499.
- [12] Pestka S, Trotta P P. Recombinant alpha-interferons from naturally occurring genes[J]. Introduction Seminars in Oncology, 1997, 24(3 Suppl 9): 1 - 3.