

# 鸡 $\alpha$ 干扰素基因的克隆、原核表达及抗病毒效果研究 Cloning , Prokaryotic Expression of Chicken Interferon- $\alpha$ Gene and Study on Antiviral Effect of Recombinant Chicken Interferon- $\alpha$

韦 琴 彭贵青 金梅林\* 朱裕东 周红波 郭红燕 陈焕春

WEI Qin ,PENG Gui-Qing ,JIN Mei-Lin\* ,ZHU Yu-Dong ,ZHOU Hong-Bo ,GUO Hong-Yan and CHEN Huan-Chun

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室动物病毒室,武汉 430070

Lab of Animal Virus , State Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China

**摘 要** 通过 PCR 从三黄肉鸡的肝脏基因组中扩增了鸡  $\alpha$  干扰素 ( ChIFN- $\alpha$  ) 全长基因。序列分析表明 ChIFN- $\alpha$  基因全长 582bp, 亚克隆其成熟蛋白编码基因 ( 489bp ) , 利用基因重组技术构建了 *E. coli*/pET-28a( + )-IFN $\alpha$  , 使 IFN- $\alpha$  置于 pET-28a 的 T7 启动子下游并同 6  $\times$  His( 多聚组氨酸标签 )-Tag 融合。经酶切鉴定 , DNA 测序证实重组质粒构建正确 , 将重组质粒转化大肠杆菌 BL21( DE3 ) , IPTG 诱导表达 , SDS-PAGE , Western-blot 分析证实表达出 22kD 左右的融合蛋白 , 表达的蛋白以不溶性的包涵体形式存在并且具有良好的免疫学活性。提纯的包涵体纯度可达 70% 以上 , 用镍亲和和层析方法纯化蛋白则可达到 95% 。经透析复性后的蛋白在鸡胚成纤维细胞上能够抑制 H9N2 禽流感病毒的复制。鸡胚试验中重组干扰素抗病毒效果好 : 在 H9N2 禽流感病毒攻毒组中 , 能保护鸡胚并使其孵出率达到 100% 的重组干扰素最小蛋白含量为 2 $\mu$ g , 重组干扰素对新城疫病毒复制也有一定的抑制能力 , 延迟该病毒复制时间为 12h 至 48h , 雏鸡试验表明重组干扰素也能较好地抵抗 H9N2 禽流感病毒对雏鸡的感染。两组试验均表明 , 亲和层析纯化蛋白是包涵体蛋白活性的 20 倍左右。

**关键词** ChIFN- $\alpha$  基因 抗病毒效果 H9N2 禽流感病毒 新城疫病毒

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0737-07

**Abstract** The full length of chicken interferon alpha ( ChIFN- $\alpha$  ) gene was amplified by the polymerase chain reaction ( PCR ) from total liver genome of Sanhuang meat-chicken and sequenced. The amplified gene was about 582bp. The coding region for mature protein ( 489bp ) was subcloned into pET-28a( + ). The recombinant plasmid pET-28a( + )-IFN $\alpha$  was identified by enzyme digestion and DNA sequencing. Data of SDS-PAGE and Western-blot indicated that a 22kD fusion protein was expressed in the form of inclusion bodies with good immunity. The purity of inclusion bodies was above 70% and that of protein purified by nickel affinity chromatography was 95%. The recombinant protein could inhibit H9N2 avian influenza virus ( H9N2 AIV ) replication on chick embryo fibroblast. 2 $\mu$ g of recombinant IFN- $\alpha$  could completely protect Chick embryo from H9N2 AIV infection. The recombinant IFN- $\alpha$  can also delay Newcastle disease virus ( NDV ) replication on chick embryo for 12 ~ 48h. Chicken administered recombinant IFN- $\alpha$  can resist the H9N2 AIV infection. The bioactivities of recombinant IFN- $\alpha$  purified by affinity chromatograph were 20 times higher than that of inclusion bodies.

**Key words** chicken IFN- $\alpha$  gene , antiviral effect , H9N2 AIV , NDV

我国是最大的养禽国,然而病毒病一直困扰着我国养禽业,造成养禽业巨大的经济损失。目前一些禽类病毒性疾病仍然缺乏有效的治疗手段。化学药物的使用易造成耐药性,而且容易引起动物体内药物残留,影响人类健康,疫苗的研制则须考虑病毒变异和多样性。干扰素则是通过对自身免疫系统的调节来达到抗病毒的目的,没有耐药性和药物残留的风险,并且以其广谱的抗病毒活性,受到了广泛的青睐。

干扰素(Interferon, IFN)是一类能诱导动物细胞产生多种广谱抗病毒蛋白的细胞因子,具有抑制病毒繁殖、调节机体免疫反应的功能。IFN 基因分为 I 型和 II 型, I 型 IFN 又分为  $\alpha$  和  $\beta$  等型,均为无内含子的单拷贝或多拷贝基因。 $\alpha$  干扰素(IFN- $\alpha$ )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>[1]</sup>,其主要活性是抗病毒。鸡  $\alpha$  干扰素(ChIFN- $\alpha$ )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 19kD。1994 年, Sekellick<sup>[2]</sup> 等首次成功克隆和表达了 ChIFN- $\alpha$  基因,并进行了结构分析。Sick<sup>[3,4]</sup> 等也报道了红色原鸡 IFNA1、IFNA2 和 IFNA3 基因序列并广泛开展了 ChIFN- $\alpha$  生物学功能的研究。本研究克隆和表达了 ChIFN- $\alpha$ , 并实现了蛋白的高效表达和纯化,在鸡胚试验和雏鸡试验中探讨了重组干扰素抗禽类病毒的活性,为新型抗病毒生物制剂的研制奠定了基础。

## 1 材料

### 1.1 菌种与病毒

*E. coli*/DH5 $\alpha$ 、BL21( DE3 )为本室保存,鸡 H9N2 亚型禽流感病毒由本室分离并保存,经国家流感中心鉴定为 H9N2 亚型。新城疫病毒为本室分离并保存。

### 1.2 质粒及相关试剂

pET-28a( + )均由本室保存, pMD-18T 购自 TaKaRa 公司,限制酶 *Eco*R I、*Nco* I、*Sal* I 及 T4DNA 连接酶等为 TaKaRa 产品。DNA 片段快速回收试剂盒购于北京原平皓生物技术公司。HisBind Kit 购于 Novagen 公司。其他试剂均为分析纯试剂。

### 1.3 血清和酶标抗体

兔抗鸡 IFN- $\alpha$  多抗血清由本室制备,HRP 抗兔二抗为华美公司产品。

### 1.4 SPF 鸡胚及雏鸡

SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物中心,

SPF 雏鸡由购买的 SPF 鸡胚孵化。

## 2 方法

### 2.1 引物设计

根据 NCBI 上基因序列号为 AB021154 的鸡 IFN- $\alpha$  基因序列,设计两对引物,分别用于鸡 IFN- $\alpha$  全基因( P1 和 P2 )的克隆和去掉信号肽的成熟蛋白编码基因的亚克隆( P3 和 P4 ),由宝生物工程公司合成,其序列如下:

P1 :5'-CCATGGCTGTGCCTGCAAGCCCACAGC-3' 引入酶切位点 *Nco* I ;

P2 :5'-TTGTCGACCTAAGTGC CGCTGTTGCCTGT-3' 引入酶切位点 *Sal* I ;

P3 :5'-TTGAATTTGCAACCACCTTCGCCCCAG-3' 引入酶切位点 *Eco*R I ;

P4 与 P2 同。

### 2.2 基因组 DNA 的提取

参照《分子克隆实验指南》从三黄肉鸡肝组织中提取基因组 DNA。

### 2.3 基因克隆和测序

以三黄肉鸡鸡肝细胞基因组为模板,PCR 反应系统包括模板 1 $\mu$ g,上下游引物各 50mmol/L,总体积为 20 $\mu$ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C、4min,1 个循环;94 $^{\circ}$ C、1min,55 $^{\circ}$ C、1min,72 $^{\circ}$ C、1min,30 循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。鸡 IFN- $\alpha$  成熟蛋白编码基因的亚克隆反应条件同上,引物为 P3 和 P4。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,回收 489bp 处 DNA 带,纯化后连 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,选单个菌落酶切鉴定,阳性质粒命名为 pIFN- $\alpha$  并送 TaKaRa 生物工程公司测序。

### 2.4 重组表达质粒的构建

PCR 产物经 *Eco*R I、*Sal* I 双酶切回收,连 pET-28a( + )载体。构建重组表达质粒 pET-28aIFN $\alpha$  并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,氨苄青霉素抗性筛选,酶切鉴定。

### 2.5 重组表达质粒的转化和鉴定

将 pET-28aIFN $\alpha$  重组子转化 BL21( DE3 )感受态细胞,氨苄青霉素抗性筛选,*Eco*R I、*Sal* I 双酶切,证明插入片段为目的基因。

### 2.6 在大肠杆菌中的表达

将鉴定好的 pET-28aIFN $\alpha$ /BL21( DE3 )经氨苄青霉素抗性筛选为阳性后再接种于液体 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 震荡培养,OD 值为 0.6 时加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 诱导表达,BL21/pET-28aIFN $\alpha$  继续培养 3h

之后,离心收集菌体,SDS-PAGE 分析,确定最佳诱导时间。

## 2.7 SDS-PAGE

参照《分子克隆实验指南》,采用 12% 的分离胶鉴定表达产物。

## 2.8 表达产物 Western-blot 鉴定

将 SDS-PAGE 凝胶电泳的蛋白带通过半干法转移至硝酸纤维素膜上,用含 0.5% BSA 的 TBS-T 封闭 2h,兔抗鸡 IFN- $\alpha$  多抗作为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗,DAB 作为底物进行显色。

## 2.9 表达蛋白的纯化

**2.9.1 提取包涵体法**<sup>[5]</sup>:将诱导表达 3h 的细菌培养物 8000r/min 离心 8min,弃上清,沉淀用缓冲液 A (1/10 体积)重悬,超声波破碎。8000r/min 离心 10min,弃上清,沉淀用 PBS 洗涤 2 次,加 19.7mL 缓冲液 A 及 0.3mL 20% SKL 贮存液,剧烈搅动,使其溶解,静置 30min 至 2h 4℃ 12000r/min 离心 10min,弃沉淀,取上清。用 PBS 稀释蛋白质浓度至 1 mg/mL,内加终浓度为 0.2% 的 PEG4000 与 1mmol/L 氧化型:还原型谷胱甘肽(摩尔比为 1:4)帮助变性的肽键依天然构象复性,用大于 20 倍体积的 PBS 共装入透析袋 4℃ 磁力搅拌器搅拌透析复性,每 5h 换液一次,换液 6 次后收集蛋白液,分装 -20℃ 保存。

**2.9.2 镍亲和层析法**:将诱导表达的细菌进行超声波裂解后以镍亲和层析柱纯化回收目的蛋白。方法按 HisBind Kit 说明书操作并参照文献[6]。

## 2.10 重组鸡 $\alpha$ 干扰素的抗病毒效果分析

**2.10.1 细胞病变抑制法分析干扰素抗病毒活性**<sup>[7-11]</sup>:将鸡胚成纤维细胞接种于 96 孔细胞培养板,在 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 的饱和二氧化碳水汽培养箱中培养到细胞长成单层。每列加入 4 倍系列稀释的重组干扰素,各 100 $\mu$ L/孔,同时设病毒对照和细胞对照,培养 24h 后,每孔加入维持液(含 0.5% 胰酶)稀释的 H9N2 禽流感病毒(100TCID<sub>50</sub>),最后一列加维持液作为细胞对照。24h 后开始观察细胞病变。

**2.10.2 鸡胚试验分析干扰素抗病毒效果**:设计两个攻毒组,H9N2 禽流感病毒攻毒组(group 1)和新城疫病毒攻毒组(group 2)。试验对象:9 日龄鸡胚。具体方法:给与不同剂量的干扰素使鸡胚建立抗病毒状态,在包涵体蛋白组中,设 5 $\mu$ g,10 $\mu$ g,20 $\mu$ g,40 $\mu$ g,80 $\mu$ g,160 $\mu$ g 和 3204 $\mu$ g 蛋白组及空白对照组共 8 组,每组 6 枚;在亲和层析纯化蛋白组中,设 0.5 $\mu$ g,1 $\mu$ g,2 $\mu$ g,4 $\mu$ g 和 8 $\mu$ g 蛋白组及空白对照组共 6 组,每组 6 枚。24h 后接种病毒 300 $\mu$ L(100 个

EID<sub>50</sub>)逐日观察鸡胚死亡情况。

**2.10.3 雏鸡试验分析干扰素抗病毒效果**:设计一个攻毒组:H9N2 禽流感病毒攻毒组(group 3)。试验对象:2 日龄雏鸡。在包涵体蛋白组中,设 10 $\mu$ g,20 $\mu$ g,40 $\mu$ g 和 80 $\mu$ g 蛋白组及空白对照组共 5 组,每组 5 只;在亲和层析纯化蛋白组中,设 1 $\mu$ g,2 $\mu$ g,4 $\mu$ g 和 8 $\mu$ g 蛋白组及空白对照组共 5 组,每组 5 只。接种病毒 200 $\mu$ L(100 个 LD<sub>50</sub>)。试验方法同 2.10.2。

## 3 结果

### 3.1 鸡 IFN- $\alpha$ 的克隆及亚克隆

以鸡肝细胞基因组 DNA 为模板,按上述方法进行扩增,PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,约在 582bp 有一条特异带,去掉信号肽的 IFN- $\alpha$  基因 PCR 扩增产物为 489bp(图 1),两者均与预期片段大小相符。克隆序列全长 582bp,编码 193 个氨基酸,其中成熟蛋白含 162 个氨基酸,有 4 个糖基结合位点。核苷酸序列与 GenBank 上基因序列号为 AB021154 的鸡的 IFN- $\alpha$  基因序列同源性为 99%,氨基酸序列同源性为 98%。

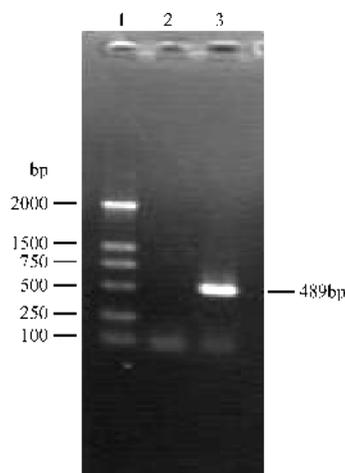


图 1 鸡  $\alpha$  干扰素基因亚克隆的扩增结果

Fig.1 Identification of subcloning PCR productions

1:DNA marker DL2000 2: Negative control 3: subcloning PCR product (489bp).

PCR 回收产物与 pMD18-T 载体连接后,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑单个菌落提取质粒后,用 EcoR I 和 Sal I 酶切,得到 2.6kb 和 495bp 两条带与预期结果一致,表明已将目的基因成功地克隆到 pMD18-T 载体中(图 2)。

### 3.2 表达质粒 pET28a-IFN $\alpha$ 的鉴定

PCR 回收产物与 pET-28a 载体连接后,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑白色菌落少量提取重

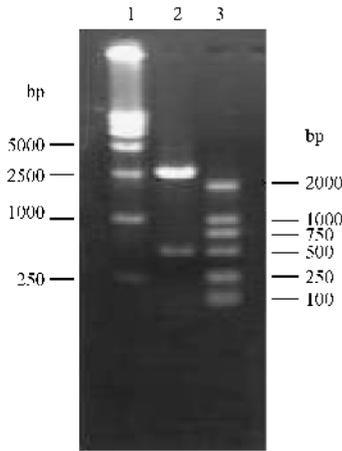


图2 pMD-IFN $\alpha$  的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pMD-IFN $\alpha$

1: DNA marker ( DL2000 ); 2: pMD-IFN $\alpha$ /Sal I + EcoR I ; 3: DNA marker ( DL15000 ).

组质粒,用 Sal I 和 EcoR I 酶切,得到 5.3kb 和 495bp 两条带与预期结果一致(图 3),表明目的基因已成功克隆到 pET-28a 载体中,命名为 pET28a-IFN $\alpha$ 。

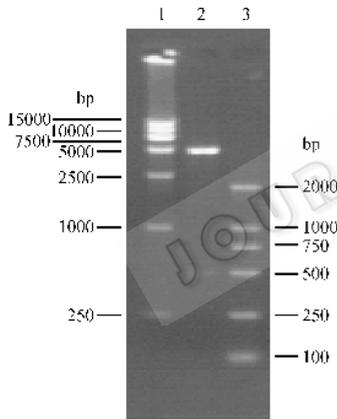


图3 pET28a-IFN $\alpha$  重组质粒的双酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pET28a-IFN $\alpha$

1: DNA marker ( DL15000 ); 2: pET28a-IFN $\alpha$ /Sal I + EcoR I ; 3: DNA marker ( DL2000 ).

### 3.3 IFN- $\alpha$ 的表达及 Western-blot 鉴定

SDS-PAGE 检测结果显示,在 22kD 处有有一条明显蛋白表达带,占菌体总蛋白的 23%,并且表达产物主要为不溶性的包涵体。鸡 IFN- $\alpha$  蛋白约 19kD,与载体上一段氨基酸表达的蛋白融合后约为 22kD,并且表达蛋白最佳诱导时间为 3h(图 4A)。经 Western-blot 分析确证表达产物有良好的免疫学活性(图 4B)。

### 3.4 IFN- $\alpha$ 蛋白的纯化

将表达的目的蛋白进行纯化:提纯的包涵体纯

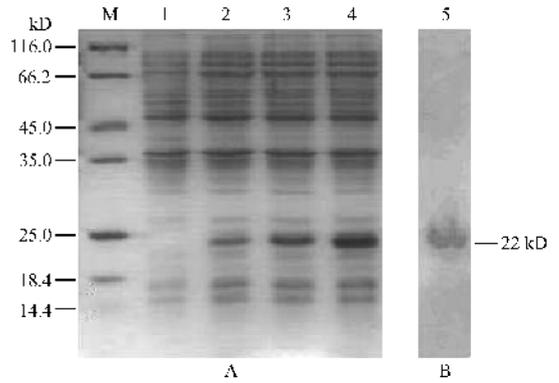


图4 BL21/pET28a-IFN $\alpha$  SDS-PAGE 及 Western-blot 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of pET28a-IFN $\alpha$  expressed in BL21

1: sample of BL21/pET-28a-IFN $\alpha$  induced by IPTG for 0h ; 2: sample of BL21/pET28a-IFN $\alpha$  induced by IPTG for 1h , 3: sample of BL21/pET28a-IFN $\alpha$  induced by IPTG for 2h , 4: sample of BL21/pET28a-IFN $\alpha$  induced by IPTG for 3h ; M: protein marker.

度为 70% 以上,蛋白含量为 488.1mg/L(图 5A)表达产物经过进一步纯化,镍亲和层析后透析复性,纯度可达 95%,蛋白含量为 96.4mg/L(图 5B)。

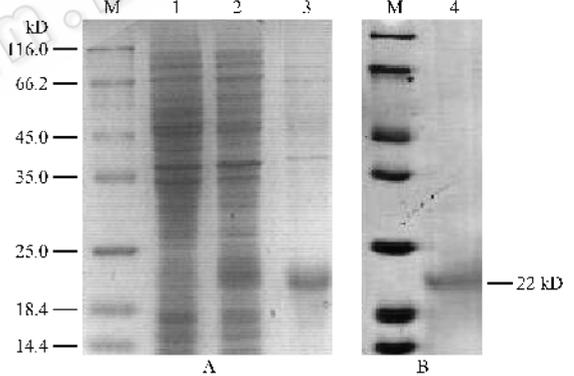


图5 BL21/pET28a-IFN $\alpha$  表达产物提纯的包涵体以及用镍亲和层析纯化的蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of pET-28a/IFN $\alpha$  inclusionbodies and the expressions purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatograph

1: sample of BL21/pET-28a induced by IPTG ; 2: sample of BL21/pET-28a-IFN $\alpha$  induced by IPTG ; 3: inclusionbodies ; 4: the expressions purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatograph ; M: protein marker.

### 3.5 鸡重组 $\alpha$ 干扰素的抗病毒效果分析

3.5.1 细胞病变抑制法分析干扰素抗病毒活性:在鸡胚成纤维细胞上分析经镍亲和层析透析复性的重组干扰素蛋白抗病毒活性,结果显示空白对照孔细胞生长良好,阳性对照孔细胞病变严重, A<sup>6</sup> 稀释后所加的细胞孔生长状态良好, A<sup>7</sup> 稀释后所加的细胞孔 25% 的病变, A<sup>8</sup> 稀释后所加的细胞孔 80% 的病变。证明重组干扰素能够抑制 H9N2 禽流感病毒的复制。

3.5.2 鸡胚试验分析干扰素抗病毒效果：

(1) H9N2 禽流感病毒攻毒组(图 6 group 1)：

攻毒后 48h 对照组鸡胚全部死亡。

在包涵体蛋白试验组中：攻毒后 48h 给与  $10\mu\text{g}$  和  $20\mu\text{g}$  蛋白组鸡胚也全部死亡，给与  $40\mu\text{g}$ 、 $80\mu\text{g}$  及  $160\mu\text{g}$  蛋白组存活率为 100%，给与  $320\mu\text{g}$  蛋白组存活率为 50%，其中给与  $160\mu\text{g}$  蛋白组抗病毒活性相对最高，鸡胚孵出率为 33.3%。

在亲和层析纯化蛋白试验组中：攻毒后 48h 所有组的存活率为 100%，给与  $1\mu\text{g}$  蛋白组鸡胚孵出率为 50%，给与  $2\mu\text{g}$ 、 $4\mu\text{g}$  及  $8\mu\text{g}$  蛋白组孵出率均为 100%。表明重组干扰素对 H9N2 禽流感病毒有 100% 的抵抗能力，能保护鸡胚并使其孵出率达到 100% 的重组干扰素最小蛋白含量为  $2\mu\text{g}$ 。

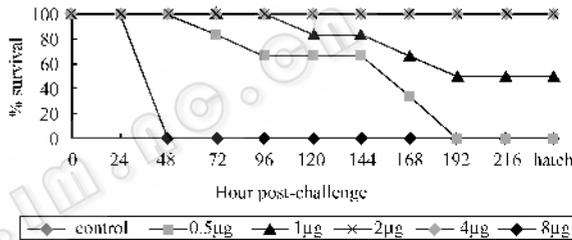
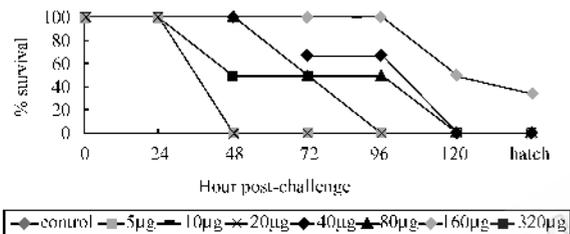
(2) 新城疫病毒攻毒组(图 6 group 2)：

攻毒后 72h 对照组鸡胚全部死亡。

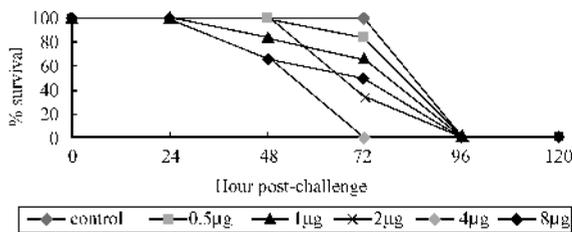
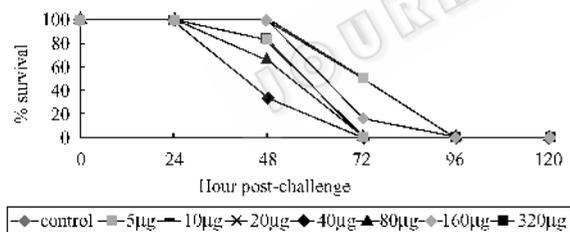
在包涵体蛋白试验组中：攻毒后 72h 给与  $10\mu\text{g}$ 、 $20\mu\text{g}$ 、 $40\mu\text{g}$  蛋白组鸡胚也全部死亡，给与  $80\mu\text{g}$  及  $160\mu\text{g}$  蛋白组存活率为 50%，给与  $320\mu\text{g}$  蛋白组存活率为 16.7%。

在亲和层析纯化蛋白试验组中：攻毒后 72h 所有的组均有存活率，其中给与  $8\mu\text{g}$  蛋白组鸡胚存活率为 100%。由于所用的新城疫病毒致病性很强，攻毒后 96h 所有组鸡胚均死亡。表明重组鸡干扰素在鸡胚内能够延迟和减少该新城疫病毒(NDV)的后代病毒增殖，延迟时间为 12h 至 48h。

以鸡胚的存活率对攻毒后的时间作曲线，分析干扰素抗病毒效果，如图(8)所示。两组试验均表明，在鸡胚存活率相同的情况下，亲和层析纯化蛋白是包涵体蛋白活性的 20(  $160\mu\text{g}$   $8\mu\text{g}$  )倍左右。



Group1



Group2

图 6 pET28a-IFN $\alpha$  对鸡胚攻毒( H9N2 禽流感病毒和新城疫病毒)后的保护率

Fig.6 Efficacy of pET28a-IFN $\alpha$  resistant to H9N2 AIV and NDV on chick embryo

group1 : the group challenged with H9N2 AIV on chick embryo ; group2 : the group challenged with NDV on chick embryo . a : the hours of the chicken break out from chick embryo post challenged .

3.5.3 雏鸡试验分析干扰素抗病毒效果

H9N2 禽流感病毒攻毒组(图 7 group 3)：

攻毒后 108h 对照组雏鸡全部死亡。

在包涵体蛋白试验组中：攻毒后 108h，给与  $10\mu\text{g}$   $20\mu\text{g}$  蛋白组雏鸡存活率分别为 80% 和 60%，给与  $40\mu\text{g}$  蛋白以上组存活率为 100%。

在亲和层析纯化蛋白试验组中：攻毒后 108h，给与  $1\mu\text{g}$  蛋白组雏鸡存活率为 40%，给与  $2\mu\text{g}$  蛋白组雏鸡存活率为 80%，给与  $4\mu\text{g}$  蛋白以上组雏鸡存活率为 100%。

以雏鸡的存活率对攻毒后的时间作曲线，分析干扰素抗病毒效果，如图(10)所示。试验表明，在雏鸡存活率相同的情况下，亲和层析纯化蛋白是包涵体蛋白活性的 20(  $80\mu\text{g}$   $4\mu\text{g}$  )倍左右。

4 讨论

由于鸡  $\alpha$  干扰素属于 I 型干扰素，由不含内含子的多拷贝基因编码，因此本研究直接以鸡肝基因组 DNA 为模板克隆出了鸡  $\alpha$  干扰素基因，省去了从白细胞中提取 mRNA 为模板进行 RT-PCR 扩增的繁

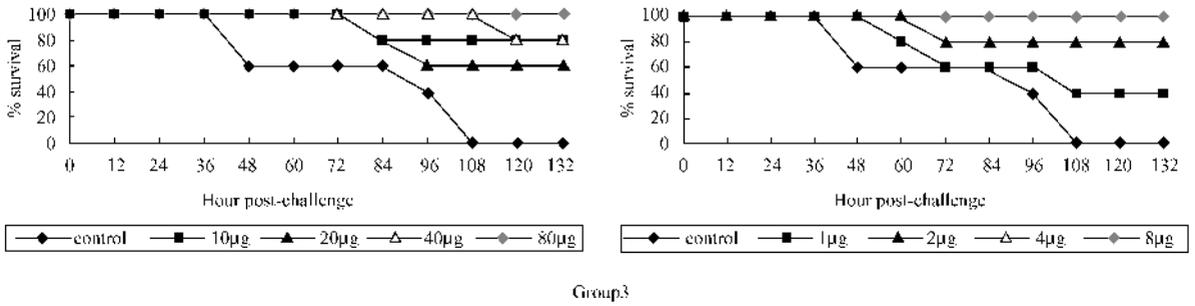


图7 pET28a-IFN $\alpha$  对雏鸡攻毒(H9N2 禽流感病毒)后的保护率

Fig.7 Efficacy of pET28a-IFN $\alpha$  resistant to H9N2 AIV on chicken

Group 3 : the group challenged with H9N2 AIV on chicken.

冗。

本研究中的鸡 $\alpha$ 干扰素全长基因与 GenBank 上登录号为 AB021154 的鸡 $\alpha$ 干扰素序列的同源性为 99% ,与登录号为 X84764 的鸭干扰素相同部位基因同源性为 75% ,说明该基因相对保守。在分析其序列时发现大肠杆菌稀有密码子在本基因开放读码框中不多见 ,Arg 稀有密码子 CGG 仅有两个 ,AGA、AGG、CGA 则没有 ,因此推测本研究中目的基因曾不表达和密码子偏爱性无关。本研究曾采用两种原核表达载体 pET-28a 载体和 pGEX-KG 载体表达干扰素全长基因 ,均没有获得表达 ,将干扰素基因的信号肽缺失掉 ,结果在 BL21/pET-28a 中获得高效表达 ,在 BL21/pGEX-KG 中没有得到表达 ,这表明信号肽在表达中起到了负面作用 ,可能是信号肽往往带有疏水性蛋白 ,不利于外源基因在原核中的表达 ,并且不同的载体系统会影响干扰素基因的表达。

金属离子亲和层析技术的最大优点在于利用它可以从粗提物中经过一些简单的处理便可得到所需的高纯度活性物质 ,具有高收率、高纯度、能保持生物大分子天然状态等优点 ,广泛的应用于生物大分子的分离纯化。本研究表达的融合蛋白带有 6 $\times$  His (多聚组氨酸标签) ,这一供电子的氨基酸残基十分有利于目的蛋白与固定化金属离子 Ni<sup>2+</sup> 结合 ,从而可以将目的蛋白分离纯化。本研究采用的是透析复性 ,研究表明蛋白浓度对复性影响很大 ,包涵体蛋白在透析的过程中 ,蛋白浓度过高容易发生沉淀 ,把复性浓度调到 0.1 ~ 0.5mg/mL 时 ,蛋白沉淀很少 ,复性效果好。总的来说 ,镍亲和层析纯化的蛋白纯度较高 ,可以达到 95% ,生物活性也相对较高 ,但是相对提取包涵体法 ,对试验试剂和材料要求较高 ,操作方法相对繁杂 ,试验证明提取包涵体法获得的重组干扰素蛋白同样可以有较高的抗病毒生物活性。因此

两种方法各有优势 ,操作起来可以根据实际情况各取所需。

9 日龄鸡胚试验中显示 ,干扰素蛋白含量在一定的范围内有很好的抗 H9N2 禽流感病毒效果 ,且试验重复性好 ,抗病毒活性随着蛋白含量的增加而增高 ,在 H9N2 禽流感病毒攻毒组中 ,能保护鸡胚并使其孵出率达到 100% 的重组干扰素最小蛋白含量为 2 $\mu$ g ,表明干扰素抵抗 H9N2 禽流感病毒能力强。在 9 日龄鸡胚 H9N2 禽流感病毒攻毒组和新城疫病毒攻毒组两组试验中 ,我们发现给与 320 $\mu$ g 包涵体蛋白组对鸡胚保护率均有所降低 ,这说明蛋白含量过高会对机体产生副作用 ,影响存活率。雏鸡试验中也显示了其良好的抗 H9N2 禽流感病毒作用。鸡胚和雏鸡两组试验均表明亲和层析纯化蛋白是包涵体蛋白活性的 20 倍左右 ,表明蛋白纯度越高 ,活性越好。

本研究成功地表达和纯化了干扰素 ,表达的重组干扰素抗病毒生物活性高 ,对 H9N2 禽流感病毒有 100% 的抵抗能力 ,对新城疫病毒的复制也有一定的抑制能力 ,显示了其良好的抗病毒活性 ,为新型广谱抗病毒生物制剂的研制和干扰素的大批量生产奠定了基础。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Lu CP ( 陆承平 ). Veterinary Microbiology. Beijing : China Agriculture Press ( 中国农业出版社 ). 2001 p.452
- [ 2 ] Sekellick MJ , Ferrandino A F , Hopkins DA *et al.* Chicken interferon gene : cloning , expression , and analysis. *Journal of Interferon Research* , 1994 , 14 : 71 - 79
- [ 3 ] Ben-Nun A , Mendel I , Bakimer R *et al.* The autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis is potentially pathogenic : effect of copolymer 1 on MOG-induced disease. *J Neurology* , 1996 , 243 : 14 - 22

- [ 4 ] Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis ;principles ,problems and perspectives. *Brain* , 1997 ,**120** 865
- [ 5 ] Yan I( 严琳 ) ,Chen HC( 陈焕春 ) ,Qin YL( 覃雅丽 ) *et al* . The expression of porcine interleukin22 in *Pichia pastoris* . *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*( 畜牧兽医学报 ) ,2004 ,**35** ( 2 ) : 208 - 212
- [ 6 ] Ming Li ,Zhi-Guo Su ,Jan-Christer Janson . *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures . *Protein Expression and Purification* , 2004 ,**33** :1 - 10
- [ 7 ] Sun WM( 孙为民 ) ,Wang HQ( 王惠琴 ) . Cytokine Research Technology . Beijing :People Press( 人民出版社 ) ,1999 ,pp. 443-458
- [ 8 ] Sara Rubinstein ,Philip C ,Familletti ,Sidney Pestka . Convenient assay for interferons . *Journal of Virology* ,1981 ,**37**( 2 ) :755 - 758
- [ 9 ] John A , Armstrong . Semi-Micro , Dye-Binding assay for rabbit interferon . *Applied Microbiology* ,1971 ,**21**( 4 ) :723 - 725
- [ 10 ] Green JA ,Stanton GJ , Goode J *et al* . Vesicular stomatitis virus plaque production in monolayer cultures with liquid overlay medium : description and adaptation to a One-Day ,human interferon-plaque reduction assay . *Journal of Cuncial Microbiology* ,1976 ,**16** ( 6 ) :479 - 485
- [ 11 ] Fei ZZ( 费铮铮 ) ,Guan YX( 关怡新 ) ,Yao SJ( 姚善泾 ) . A colorimetric method to assay biological activity of recombinant human IFN- $\gamma$  . *Microbiology* ( 微生物学通报 ) ,2004 ,**31** ( 3 ) :65 - 69