

北极狐 γ -干扰素 cDNA 的克隆、表达及活性测定

张海玲, 柴秀丽, 罗国良, 王凤雪, 易立, 邵西群, 闫喜军

中国农业科学院特产研究所, 吉林 132109

摘要: 为研究狐 γ -干扰素的生物学活性, 应用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)从北极狐外周血淋巴细胞中扩增出 γ -干扰素(VuIFN- γ)cDNA。序列分析表明 VuIFN- γ cDNA 全长 501 bp, 编码 23 个氨基酸的信号肽和 144 个氨基酸的成熟肽蛋白, 与已发表的银黑狐和犬 IFN- γ 核苷酸序列同源性为 99.8% 和 99.4%; 氨基酸同源性均为 100%。应用原核表达系统高效表达北极狐 γ -干扰素成熟肽蛋白, SDS-PAGE 和 Western blotting 分析表达的融合蛋白分子量约为 19 kD, 以不溶性的包涵体形式存在。重组蛋白经纯化和复性, 在 Vero 和 MDCK 细胞上可明显抑制 VSV 病毒的复制, 并测出北极狐重组 γ -干扰素的活性单位分别为 1.0×10^6 u/mg 和 1.56×10^5 u/mg, 为进一步开发基因工程狐干扰素奠定基础。

关键词: 北极狐, 干扰素- γ , 抗病毒活性

Cloning, Expression and Antiviral Activity of Arctic Fox (*Alopex lagopus*) Interferon- γ Gene

Hailing Zhang, Xiuli Chai, Guoliang Luo, Fengxue Wang, Li Yi, Xiqun Shao, and Xijun Yan

Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 132109, China

Abstract: In order to characterize the biological activity of fox (*Vulpes vulpes*) interferon gamma(VuIFN- γ), We have isolated the cDNA encoding arctic fox (*Alopex lagopus*) VuIFN- γ . This cDNA encodes a 23 amino acid signal peptide and a 144 amino acid mature protein, which shares 99.8% or 99.4% for nucleotide identity with silver fox and canine, respectively, and 100% for amino acid identity. Expression of recombinant mature arctic fox interferon gamma (mVuIFN- γ) in bacterial system was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting analysis. Recombinant VuIFN- γ showed higher antiviral activity against vesicular stomatitis virus in cultured Vero and MDCK by inhibiting virus induced cytopathic effect, In view of the immunomodulatory and antiviral activities of VuIFN- γ , it may provide a basis for further research on antiviral therapy of recombinant VuIFN- γ in economic animal practice.

Keywords: Arctic fox, interferon gamma, antiviral activity

干扰素(Interferon, IFN)是一种具有广谱抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等活性的细胞因子。是由英国科学家 Isaacs 于 1957 年利用鸡胚绒毛尿囊膜研究流感病毒干扰现象时首先发现^[1]。它是由脊椎动物

细胞产生的一类分泌型糖蛋白, 具有广谱抗病毒和增强免疫应答的作用^[2], 已经在临床上应用于许多疾病的治疗。IFN 基于它们的基因序列、染色体定位、受体特异性^[3]分为三型, 即 I 型、II 型和 III 型干

Received: January 3, 2008; Accepted: March 26, 2008

Supported by: the Jilin Province Science and Technology Development (No. 20060550).

Corresponding author: Xuejin Chen. Tel: +86-21-63846590-776539; E-mail: chenxuej@yahoo.com.cn;

Xijun Yan. Tel: +86-431-6513435; E-mail: yanxijungmp@163.com

吉林省科技发展计划项目(No. 20060550)资助。

扰素^[4,5], 而 II 型 IFN 仅由 IFN- γ 组成, 又称为免疫干扰素, 主要由激活的 T 淋巴细胞和 NK 细胞产生, 在免疫调节应答方面处于主导地位^[6], IFN- γ 还具有抗病毒、抗寄生虫和抗增殖性质, 但它主要的生物活性是免疫调节作用^[7], 是参与结核和疱疹病毒感染等免疫病理的主要细胞因子^[8,9]。自干扰素发现之后的 50 年中, 得益于生物技术的飞速发展, 大量哺乳动物的 γ -干扰素基因已经成功克隆, 现已有重组猪和犬干扰素在临床上应用, 而毛皮动物干扰素方面的研究较少。本研究成功克隆和表达了北极狐 (*Alopex lagopus*) IFN- γ 基因, 并在不同细胞上进行了抗病毒活性研究, 为狐 (*Vulpes vulpes*) 重组干扰素的研发奠定了基础。

1 材料

1.1 主要材料及试剂

北极狐外周血采自中国农业科学院特产研究所毛皮动物养殖基地, MDCK、Vero 细胞购自中国兽医药品监察所; *Escherichia coli* BL21 感受态菌株由本实验室保存; pMD18-T 载体、Ex Taq 聚合酶、AMV 反转录酶及植物血凝素 (PHA) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; RPMI1640 购自 GIBCO 公司, 淋巴细胞分离液购自中国医学科学院; TRIzol 细胞裂解液购 Invitrogen 公司; 胶回收试剂盒购自杭州博日科技有限公司; His 单克隆抗体购自 Sigma 公司; NTA-Ni 亲和树脂购自 Novagen 公司, 人用 IFN- γ 标准品购自中国药品生物制品检定所; 水疱型口炎病毒 (VSV) 由本实验室保存; 引物由 Invitrogen (上海) 英骏生物技术有限公司合成。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 上发表的犬 IFN- γ cDNA 全序列 (登录号: AF126247) 设计扩增引物, 引物序列: 5'-A C T A C T T C G G C C T A A C T C T -3' 和 2: 5'-T A T T G C A G G C A G G A T G A C C -3'; 根据扩增的结果设计 mVuIFN- γ 基因扩增引物: A T G G A T C C T G C G A C C T G C C C G A C G C C C (下划线为 BamH I 酶切点); G C A A G C T T T C A T T T C C T C C T C C T G A T T C (下划线为 Hind III 酶切位点)。

1.3 北极狐外周血淋巴细胞制备及 IFN- γ 诱导

无菌采取健康北极狐外周抗凝血 5 mL, 加入 RPMI 1640 培养液 1:1 稀释。取 5 mL 稀释的外周血

缓慢加入 5 mL 人用淋巴细胞分离液上, 室温下 2 000 r/min 水平转子离心 40 min。用灭菌长针头将白细胞层移于另一试管, 用 RPMI 1640 培养液洗涤细胞 2 次, 细胞用含 25 μ g/mL PHA 和 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液悬浮, 取细胞悬液计数, 按计数结果将细胞悬液稀释至 1×10^7 个/mL 浓度, 置 24 孔细胞培养板中, 37°C CO₂ 培养箱培养 24 h。

1.4 外周血淋巴细胞总 RNA 的提取

收集诱导 24 h 后的淋巴细胞于 15 mL 离心管, 2 000 r/min 离心 10 min, 将沉淀用 1 mL TRIzol Reagent 重悬。加入 1/5 TRIzol 体积氯仿, 混匀后静置 3 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 加入 1/2 TRIzol 体积的异丙醇, 混匀后放置 -20°C 沉淀 1 h, 12 000 r/min 离心 15 min, 将沉淀用 75% 乙醇洗涤 1 次, 倒置控干后用 9.5 μ L 的 0.1% 的 DEPC 处理的灭菌水溶解沉淀, 即获得淋巴细胞总 RNA。

1.5 北极狐 IFN- γ cDNA 的扩增

在 9.5 μ L 的 RNA 溶液中加入 1 μ L Oligo(dT)₁₅ 引物 (50 pmol/ μ L), 混匀后置 70°C 水浴锅作用 5 min 后立即冷却, 依次加入 10 mmol/L dNTP 5 μ L, AMV Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor 0.5 μ L, AMV 1 μ L 充分混匀后置 PCR 仪上 42°C 1 h, 95°C 3 min 灭活反转录酶, 冷却后直接用于 PCR 反应。

PCR 反应体系: 10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/ μ L dNTP 2 μ L, 上、下游引物 (25 pmol/ μ L) 各 1 μ L, Ex Taq DNA 聚合酶 (2 u/ μ L) 0.125 μ L, 加灭菌去离子水补足 25 μ L。反应液混匀后, 于 PCR 仪上进行扩增, 循环参数为 95°C 预变性 5 min, 94°C 45 s, 52.5°C 1 min, 72°C 1 min, 32 个循环后 72°C 延伸 6 min, 扩增完毕后, 取 6 μ L 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.6 表达载体构建

将目的基因克隆到 pMD18-T 载体, 经酶切及 PCR 鉴定正确后进行测序; 以正确的目的基因序列为模版设计扩增 VuIFN- γ 成熟肽基因的引物, 上下游引物分别引入 BamH I 和 Hind III 酶切位点, 将酶切后的 PCR 产物与 pPROEXTM HTb 载体连接, 转化 BL21 感受态菌, 随机挑取单个克隆菌株进行进一步鉴定。

1.7 重组质粒 pHTb-mFIFN- γ 在大肠杆菌中的表达

挑取鉴定为阳性的单个菌落接种于 2 mL LB 培养基 (Amp, 100 μ g/mL) 中, 37°C 振荡培养过夜。取上

述培养物以 1/100 的比例接种于新鲜的 LB 培养基 (Amp, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 达 0.6~0.9, 菌液中加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养, 离心收集菌体。加入 200 μL PBS 洗涤菌体, 洗涤 3 次后用 100 μL PBS 重悬后与等量 2 \times SDS 上样缓冲液充分混匀, 煮沸 5 min, 以诱导前菌体和诱导的空载体为对照, 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.8 融合蛋白的纯化

按照 1.7 中所述, 对重组菌大量诱导, 菌体用 1/10 体积的 50 mmol/L Tris \cdot HCl 重悬, 加溶菌酶至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 室温作用 15 min, 超声波冰浴裂解至不粘稠, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清, 沉淀为包涵体, 用 25 mL 含 8 mol/L 尿素的裂解缓冲液溶解包涵体, 然后超声波碎至澄清, 12 000 r/min 离心 15 min, 上清加入 Ni-NTA 树脂材料, 在冰浴搅拌的条件下与目的蛋白结合。之后具体步骤按照 Novagen 公司 Ni-NTA His \cdot Bind $^{\circledR}$ Resins 蛋白纯化试剂盒说明书进行。纯化后收集产物进行 SDS-PAGE 电泳。取少量纯化蛋白 1:10 倍稀释, 用分光光度计检测蛋白浓度。

1.9 重组北极狐 γ -干扰素抗病毒活性测定

将纯化后的目的蛋白洗脱液, 装入透析袋中, 用梯度稀释法复性蛋白, 每 4 h 稀释一次复性液, 至透析袋中尿素除净为止。采用微量细胞病变抑制法^[10]测定北极狐重组 γ -干扰素在 MDCK、Vero 细胞中的抗病毒活性, 每次测定设干扰素参考标准品对照。

2 结果

2.1 北极狐 $IFN-\gamma$ 基因克隆

以 PHA 诱导培养北极狐外周血淋巴细胞总 RNA 作为模板, 经 RT-PCR 获得北极狐 $IFN-\gamma$ cDNA。取 RT-PCR 产物于 1.5%(W/V) 琼脂糖凝胶上电泳, 结果显示, 获得的 PCR 扩增产物为 548 bp 的基因片段(图 1), 含有 501 bp 的开放阅读框, 编码 167 个氨基酸, 前 23 个氨基酸为信号肽, 与犬和牛的报道一致^[6,11]。去掉信号肽的 $IFN-\gamma$ 基因产物为 432 bp(图 2), 扩增的北极狐 $IFN-\gamma$ cDNA(GenBank Accession No. EF428257) 与已发表的银黑狐干扰素基因(GenBank Accession No. AJ621191)^[12] 核苷酸同源率为 99.8%, 犬 γ 干扰素(GenBank Accession No. AF126247)核苷酸序列同源率为 99.4%, 核苷酸序列比较结果见图 4。

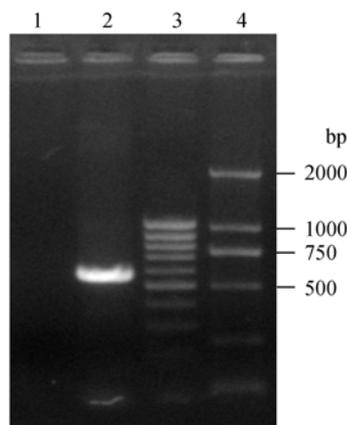


图 1 北极狐 $IFN-\gamma$ cDNA RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig. 1 Identification of the RT-PCR product of arctic fox $IFN-\gamma$ by agarose gel electrophoresis

1: negative control; 2: RT-PCR product of arctic fox $IFN-\gamma$; 3: 100 bp marker; 4: DL2000 DNA marker

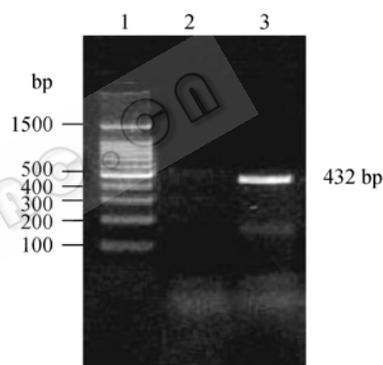


图 2 $INF-\gamma$ 成熟肽基因 ($mVuIFN-\gamma$) PCR 扩增产物
Fig. 2 Electrophoresis of PCR products of recombinant pHTb- $mVuIFN-\gamma$

1: 100 bp marker; 2: negative control; 3: PCR product of $mVuIFN-\gamma$ gene

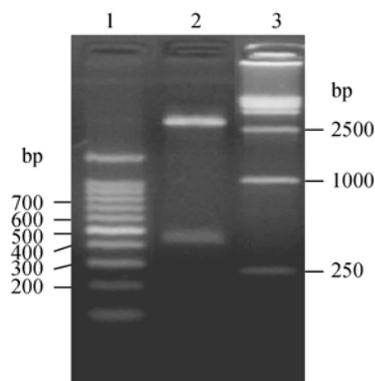


图 3 重组质粒 pHTb- $mVuIFN-\gamma$ 酶切鉴定
Fig. 3 Enzymolysis identification of the recombinant pHTb- $mVuIFN-\gamma$

1: 100 bp DNA marker; 2: product digested with $Bam\text{H I}/Hind\text{ III}$; 3: DL15000 marker

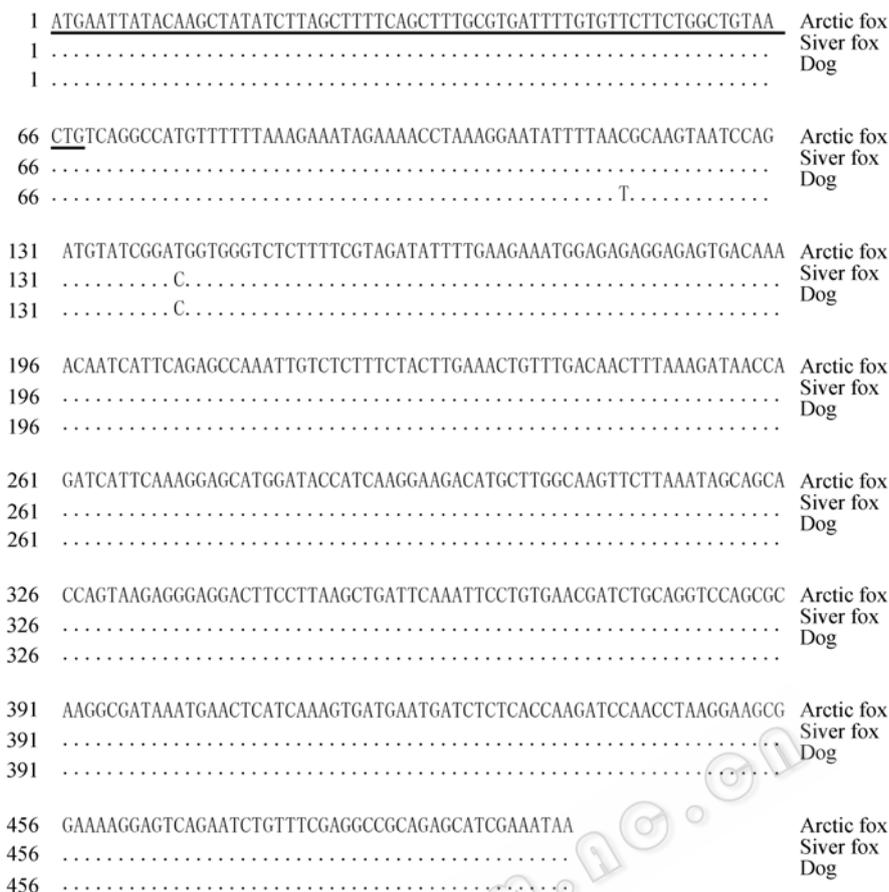


图 4 北极狐、银黑狐和犬 IFN- γ 核苷酸序列分析比较

Fig. 4 Alignment of deduced nucleotide sequence of arctic fox, siver fox and dog of IFN- γ , and underline indicates the gene coding region of signal peptide

2.2 重组质粒 pHTb-mVuIFN- γ 构建

将 IFN- γ 成熟肽基因构建到携有 His 标签的原核表达载体 pPROEX-HTb, 重组质粒 pHTb-mVuIFN- γ 双酶切鉴定结果见图 3, 在 450 bp 左右有 1 条特异带, 证明 mVuIFN- γ 基因片段已正确构建到载体中。

2.3 重组狐 γ -干扰素的表达及纯化

将重组质粒 pHTb-mVuIFN- γ 阳性重组质粒转化 *E. coli* BL21 受体菌, IPTG 诱导后, 经甘氨酸缓冲系统 SDS-PAGE 电泳发现有目的条带, 大小约为 19 kD, 与预期大小一致, 表达量达到 50%, 且以包涵体形式表达, 而 IPTG 诱导前重组菌未出现此蛋白带, 表明重组狐 γ 干扰素在大肠杆菌中获得了成功表达, 以组氨酸单抗作为一抗 Western blotting 进一步鉴定, 结果见图 5, 目的蛋白与单抗出现明显的沉淀线。在表达正确的基础上, 应用 Ni-NTA 树脂对 mVuIFN- γ 重组蛋白进行纯化, 结果见图 6。

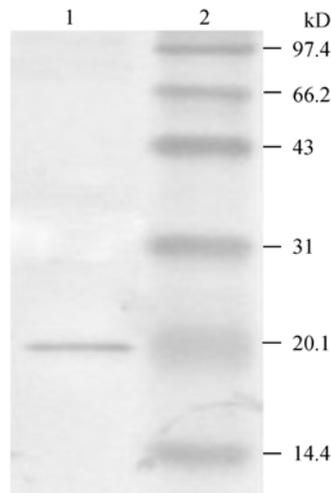


图 5 His-单抗 Western blot 检测北极狐 IFN- γ 成熟肽的表达

Fig. 5 Identification of recombinant protein by Western blotting with His-tag monoclonal antibody

1: pHTb-mVuIFN- γ recombinant *E. coli*; 2: marker

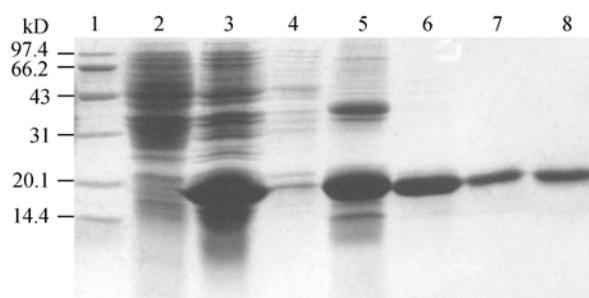


图 6 重组 mVuIFN- γ 表达产物纯化 SDS-PAGE 检测
Fig. 6 Denaturing purification of recombinant protein mVuIFN- γ

1: protein marker; 2: lysate of uninduced bacteria cleared lysate; 3: lysate of induced bacteria; 4: lysate supernatant; 5: lysate of inclusion bodies; 6-8: recombinant protein purified by NTA-Ni resin

2.4 重组 γ -干扰素蛋白生物活性测定

采用细胞病变抑制法, 以能抑制 50% 细胞病变的干扰素最高稀释度作为一个单位, 每次测定设干扰素参考标准品对照, 将 MDCK 和 Vero 细胞分别接种于 96 孔培养板, 置于 37°C, 5% CO₂ 温箱中培养 12~18 h, 长成单层后, 去除营养液, 依次加入稀释的 IFN 检品, 每个稀释度各加两孔。同时设不同稀释度的 IFN 标准品对照, 细胞对照和病毒对照。37°C, 5% CO₂ 温箱孵育过夜。去除 IFN 溶液, 用 100 TCID₅₀ 的 VSV 攻击(细胞对照孔加入不含病毒的营养液), 再培养 1~2 d。待病毒对照孔细胞全部或 75% 以上出现明显病变时, 在倒置显微镜下观察结果。观察结果显示, 加入 100 TCID₅₀ 的 VSV 病毒进行攻击, 24 h 后观察可见对照孔完全出现严重病变, 在其孔中发现水疱性口炎病毒在 MDCK 和 Vero 细胞上的典型病变(图 7B 和 8B), 任何都不加的细胞对照显示正常(见图 7A 和 8A)。在加入高于 10⁻⁵ 浓度干扰素的细胞孔, 病变明显被抑制(图 7C 和 8C), 多次重复试验测得重组干扰素在 MDCK 和 Vero 细胞上抗病毒活性分别为 1.0×10⁶ u/mg 和 1.56×10⁵ u/mg。

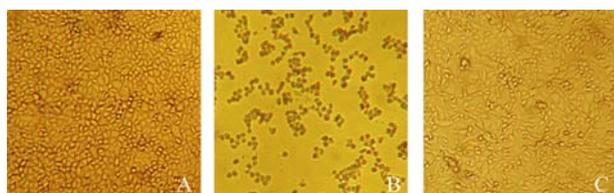


图 7 在 MDCK 细胞中北极狐 γ -干扰素抗病毒活性测定
Fig. 7 Antiviral activity analysis of arctic fox interferon- γ mature protein in MDCK cell

A: the control MDCK cells; B: severe CPE in the control; C: cell disposed by over 10⁻⁵ renatured recombinant arctic fox gamma interferon

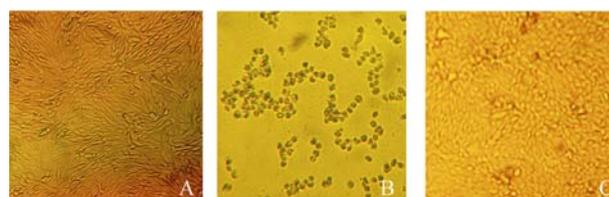


图 8 在 Vero 细胞中北极狐 γ -干扰素抗病毒活性测定
Fig. 8 Antiviral activity analysis of arctic fox interferon- γ mature protein in Vero cell

A: the control Vero cells; B: severe CPE in the control; C: cell disposed by over 10⁻⁵ renatured recombinant arctic fox gamma interferon

3 讨论

狐分为狐属和北极狐属, 狐属包括银黑狐、赤狐等, 北极狐属仅包括北极狐, 它们均属于食肉目, 犬科, 犬亚科动物^[13]。利用犬科动物这一特性, 我们以发表的犬 IFN- γ 基因序列为模版设计引物, 首次从经 PHA 刺激的狐外周血淋巴细胞中成功克隆了北极狐 IFN- γ 基因, 该序列含 501 bp 的开放阅读框, 编码 167 个氨基酸。序列比较发现, 扩增的北极狐 IFN- γ 基因与已发表的银黑狐干扰素基因^[12] 核苷酸同源率为 99.8%, 与犬 γ 干扰素核苷酸序列同源率为 99.4%, 仅有个别核苷酸发生变异, 犬 IFN- γ 在 117(C-T) 和 141(T-C) 位有碱基突变, 银黑狐 IFN- γ 只有 141 位(T-C) 突变, 但三者氨基酸同源性达到 100%, 说明犬科动物 IFN- γ 基因进化较为保守。

应用原核表达系统高效表达了北极狐 IFN- γ 成熟肽蛋白, 表达产物浓度达到菌体蛋白的 40% 以上, 表达产物带有 6×His 标签, 为重组蛋白纯化提供了方便。而且 6×His 标签分子量小, 生理条件下不带电荷, 因而基本上不影响目的蛋白的结构和功能。采用亲和层析进行目的蛋白纯化, 检测得出纯化的目的蛋白纯度达到 95% 以上, 为准确测定重组蛋白活性提供了保证。本试验改进了蛋白稀释复性方法, 在低温条件下采用将变性蛋白溶液分时间段逐滴加入蛋白复性液的方法进行复性, 提高了复性率, 复性后活性蛋白浓度达到了 1.55 μ g/mL。采用 Vero 细胞、MDCK 细胞测定了北极狐重组 γ -干扰素的生物活性, 重组 VuIFN- γ 在两种细胞上具有明显的抑制病毒活性。

在兽医领域, IFN 的临床应用主要是使用 IFN 进行预防和治疗病毒和细菌的感染。近年来, 干扰素

在动物疫病治疗方面应用越来越广泛,临床上应用的干扰素主要是从大肠杆菌中获得的基因重组蛋白,仅表现为单一亚型,如 IFN- γ -1b 等。基因工程干扰素与血源性干扰素相比,具有无污染、安全性高、纯度高、比活性高、成本低、疗效确切等优点^[14,15],使得干扰素能进入大规模的产业化生产阶段,获得大量活性高、疗效好的干扰素,从而使干扰素能够广泛应用于临床。本研究为研制和开发重组干扰素类生物制品研发奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1957, **147**(927): 258–267.
- [2] Gray PW, Leung DW, Pennica D. Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature*, 1982, **295**(5849): 503–505.
- [3] Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 2004, **202**: 8–32.
- [4] Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, 2003, **4**(1): 69–77.
- [5] Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, 2003, **4**(1): 63–68.
- [6] Premraj A, Sreekumar E, Rasool TJ. Cloning and biological characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) interferon- γ . *Mol Immunol*, 2006, **43**(6): 717–724.
- [7] Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*, 1993, **11**: 571–611.
- [8] Parr MB, Parr EL. The role of gamma interferon in immuneresistance to vaginal infection by herpes simplex virus type 2 in mice. *Virology*, 1999, **258**(2): 282–294.
- [9] Yang J, Mitsuyama M. An essential role for endogenous interferon-gamma in the generation of protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *Immunology*, 1997, **91**(4): 529–535.
- [10] Shen GX, Zhou RL. Experiment Technology of Modern Immunology. Wuhan: Hubei Science Press, 1998, 275–276.
沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学出版社, 1998, 275–276.
- [11] Yang Q, Xia C, Zhao DM, *et al.* Cloning and expression of canine interferon- γ gene in mouse SP2/0 cell line. *Chin J Biotech*, 2002, **3**(18): 365–368.
杨琪, 夏春, 赵德明, 等. 犬干扰素- γ 基因的克隆及其在鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)中表达. 生物工程学报, 2002, **3**(18): 365–368.
- [12] Rolland-Turner M, Farré G, Boué F. Cloning of fox (*Vulpes vulpes*) IL2, IL6, IL10 and IFN- γ and analysis of their expression by quantitative RT-PCR in fox PBMC after *in vitro* stimulation by Concanavalin A. *Vet immunol immunopathol*, 2006, **110**(3-4): 369–375.
- [13] Wang YL. Detection and analysis on pathogenetic nucleic acids of 3 viral infections and serum antibody levels among the farmed fur animals in vaccinated status. Ph. D thesis, *Notheast Forestry University*, 2004.
王玉龙. 几种毛皮动物病毒性传染病病原核酸及血清抗体的检测. 博士论文, 东北林业大学, 2004.
- [14] Schwaab T, Tretter CP, Gibson JJ, *et al.* A randomizer phase II trial comparing two different sequence combinations of autologous vaccine and human recombinant interferon (gamma) and human recombinant interferon (alpha)2b therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: clinical outcome and analysis of immunological parameters. *J Urol*, 2000, **163**(4): 1322–1327.
- [15] Liu H, Pan HC, Peng L, *et al.* RP-HPLC determination of recombinant human interferon omega in the *Pichia pastoris* fermentation broth. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, **38**(4): 734–737.