

## 鸡 $\gamma$ -干扰素的可溶性表达及纯化产物的抗病毒活性

齐静<sup>1#</sup> 杜以军<sup>2#</sup> 朱小玲<sup>1</sup> 胡北侠<sup>1</sup> 孙守礼<sup>1</sup> 张秀美<sup>1</sup> 刘玉庆<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>山东省农业科学院畜牧兽医研究所,山东省畜禽疾病防治与繁育重点实验室,济南 250100)

(<sup>2</sup> Department of Pathobiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2001 South Lincoln Ave, Urbana, IL 61802, USA)

**摘要** 【目的】克隆鸡  $\gamma$ -干扰素(chIFN- $\gamma$ )基因,大肠杆菌表达及产物纯化与活性检测。【方法】通过 RT-PCR 方法用 ConA 刺激的 20 日龄 SPF 鸡的脾脏淋巴细胞中扩增出 chIFN- $\gamma$  成熟蛋白基因 cDNA,克隆至原核表达载体 pET-32a(+ ) 构建重组表达质粒 pET-32a(+ )-chIFN- $\gamma$ ,在大肠杆菌 BL21(DE3)中经 IPTG 诱导表达,利用镍柱亲和层析法纯化可溶性蛋白,并进行 SDS-PAGE、Western blot 鉴定。利用 MDCK-VSV 系统测定抗病毒活性。【结果】克隆得到 456 bp 的 chIFN- $\gamma$  成熟蛋白编码基因,大肠杆菌中成功表达 chIFN- $\gamma$  蛋白,分子量约为 31.0 kDa,能与抗 His 的单克隆抗体和兔源多抗血清发生特异性反应。表达蛋白一部分形成包涵体,另一部分以可溶形式存在,可溶性蛋白经镍柱在天然条件下的纯化得率为 3.0 mg/mL。生物学活性试验表明,1:32 稀释纯化的重组 chIFN- $\gamma$ (rchIFN- $\gamma$ )孵育 MDCK 细胞后能抵抗 100TCID<sub>50</sub> 的 VSV 攻击。【结论】通过镍柱天然纯化获得的 rchIFN- $\gamma$  具有较好的抗病毒活性,为研制新型抗病毒干扰素制剂奠定基础。

**关键词:** 鸡  $\gamma$ -干扰素;原核表达;纯化;抗病毒活性

**中图分类号:** Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)01-0085-07

干扰素(interferon, IFN)是一种诱生蛋白,具有广谱抗病毒、免疫调节和免疫增强作用<sup>[1-2]</sup>。利用基因工程技术生产重组鸡  $\gamma$ -干扰素(recombinant chicken interferon gamma, rchIFN- $\gamma$ )开展鸡病毒性疾病和肿瘤性疾病的防治越来越受到人们的重视<sup>[3]</sup>,因此具有重要的研究价值。1957 年 Isaacs 和 Lindenmann 利用鸡胚绒毛尿囊膜研究流感病毒干扰现象时首次发现鸡干扰素<sup>[4]</sup>。由于干扰素具有种属特异性,很多应用于人类和哺乳动物研究中的有效方法不能用于禽干扰素的研究。直到 1994 年, Sekellick 等通过比较哺乳动物 IFN- $\alpha/\beta$  氨基酸序列,首次克隆得到鸡  $\alpha$ -干扰素基因<sup>[5]</sup>。1995 年 Digby 等

首次克隆到鸡  $\gamma$ -干扰素基因<sup>[6]</sup>。Weining、Michalski 和 Schijns 等在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达了鸡  $\gamma$ -干扰素 cDNA,证实表达产物具有一定的生物学活性<sup>[3,7-8]</sup>。大肠杆菌表达具有生产成本低,产量高,易于工业化生产等优点,但是大肠杆菌表达的蛋白多以包涵体形式存在,不能进行翻译后的修饰等过程,很大程度上影响了表达产物的生物学活性。

本研究成功扩增了鸡 IFN- $\gamma$  成熟蛋白基因,克隆至原核表达载体 pET-32a(+),在大肠杆菌 BL21 中诱导表达。国内首次实现了原核表达系统表达的鸡 IFN- $\gamma$  在天然条件下的纯化,获得了可溶性蛋白,该蛋白具有很好的免疫原性和很强的抗 VSV 病毒

基金项目:山东省农业科学院高技术自主创新基金(2006YCX023)

\* 通信作者。Tel: +86-531-83178342; E-mail: liuiqing@163.com

作者简介: # 对本文有同等贡献。齐静(1979-),女,山东寿光人,硕士,研究方向为动物病原生物学与免疫学。E-mail: qj-happy@tom.com;

杜以军(1981-),男,山东沂水人,博士,研究方向为分子免疫学与分子病毒学。E-mail: duyijun0916@163.com

收稿日期: 2008-06-13; 修回日期: 2008-09-01

活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验动物** 20 日龄 SPF 鸡由山东省农科院家禽研究所 SPF 鸡厂提供。成年雌性新西兰大白兔, 体重 2 kg/只, 购自山东省农科院畜牧兽医研究所实验种兔厂。

**1.1.2 病毒、细胞、菌株和质粒** :水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) ( $TCID_{50} = 10^{-8.67}/0.1$  mL) 由山东省农科院家禽研究所惠赠。犬肾细胞 (MDCK) 为本实验室保存。宿主菌 : 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3) 表达载体 pET-32a (+) 为本实验室保存。克隆载体 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

**1.1.3 主要试剂** : *EcoR* I、*Sal* I、*Taq* Plus DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、dNTP Mix、100 bp DNA Ladder Marker、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、1 mg/mL 的 BSA 标准品、IPTG (dioxane free)  $\lambda$  Oligo d(T)<sub>8</sub> Primers、Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-)、Ribonuclease Inhibitor、蛋白分子量标准 (低) 均购自 TaKaRa 公司 ; 质粒小量提取试剂盒购自日本博日公司 ; 硝酸纤维素膜 (NC 膜) 购自 Amersham 公司 ; 转膜滤纸购自 Whatman 公司 ; DAB 购自 Amersham 公司 ; QIAexpressionist™ 蛋白纯化柱购自 QIAGEN 公司 ; 氨苄青霉素 (Amp)、胎牛血清 (FCS)、RPMI 1640 和 DMEM 低糖培养基购自 Gibco 公司 ; 24 孔培养板、细胞培养瓶购自 Costar 公司 ; 一次性细菌滤器购自 Pall 公司 ; 胰蛋白酶购自 Oxoid 公司 ; 双抗青链霉素混合液购自上海杰美基因医药科技有限公司 ; 淋巴细胞分离液和 HRP-羊抗兔 IgG 购自北京鼎国有限公司 ; 抗 6His 单克隆抗体和 HRP-羊抗鼠 IgG 购自晶美生物技术有限公司 ; 刀豆素 (ConA)、Freund's Adjuvant Complete、Freund's Adjuvant Incomplete 购自 Sigma 公司 ; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

**1.1.4 引物** 根据 GenBank 上已登录的鸡  $\gamma$ -干扰素序列 (ID : X99774) 及 pET-32a (+) 多克隆位点, 设计引物如下 : chIFN- $\gamma$ -Up : 5'-GAG GAATTC CATACTGCA AGTAGTCT-3' (斜体下划线处为 *EcoR* I 酶切位点) ; chIFN- $\gamma$ -Down : 5'-GAG GTCGAC TTAGCAATTGCATCTC CTC-3' (斜体下划线处为 *Sal* I 酶切位点) 用以扩增鸡  $\gamma$ -干扰素成熟蛋白基因序列。引物由上海生工

有限公司合成, 预期扩增目的片段为 456 bp。

### 1.2 ChIFN- $\gamma$ 基因的克隆与鉴定

**1.2.1 鸡脾脏淋巴细胞的分离、诱导培养及总 RNA 的抽提** 按照鲍明介绍的方法<sup>[9]</sup>取 20 日龄 SPF 鸡的脾脏, 制备鸡脾淋巴细胞, 台盼兰计数后, 用 1640 培养液 (含 10% FCS) 调整至  $5 \times 10^6$  个/mL, 铺 24 孔培养板, 每孔 1 mL。加入 ConA, 使终浓度为 10  $\mu$ g/mL。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。收集细胞, 按 Trizol Reagent 说明书上的操作方法提取经 ConA 刺激的脾淋巴细胞总 RNA。

**1.2.2 ChIFN- $\gamma$  cDNA 第一链的合成** 取上述抽提的总 RNA 10  $\mu$ L 与 2  $\mu$ L Oligo d(T)<sub>8</sub>, 混匀, 65°C 水浴 10 min, 立即置冰上 5 min。然后加入 4  $\mu$ L 5  $\times$  M-buffer 2  $\mu$ L dNTP Mix, 1  $\mu$ L Ribonuclease Inhibitor, 1  $\mu$ L M-MLV, 共 20  $\mu$ L 体系, 混匀, 37°C 水浴作用 60 min, 得到 cDNA。

**1.2.3 PCR 扩增 chIFN- $\gamma$  基因** : 以上述合成的 cDNA 第一链为模板, 扩增 ChIFN- $\gamma$  基因片段。PCR 反应条件 : 95°C 5 min, 95°C 1 min, 57°C 45 s, 72°C 1 min, 35 个循环, 72°C 10 min。取 8  $\mu$ L PCR 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.4 ChIFN- $\gamma$  cDNA 克隆** : 将 PCR 产物用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, LB 平板 (Amp 抗性) 过夜培养筛选, 挑选单菌落, 振荡培养后用质粒小量提取试剂盒提取质粒, PCR 和双酶切鉴定均为阳性的质粒送 TaKaRa 公司测序, 进一步测序鉴定正确的阳性重组质粒命名为 T-chIFN- $\gamma$ 。

**1.2.5 ChIFN- $\gamma$  原核表达载体的构建与鉴定** : *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切阳性重组质粒 T-chIFN- $\gamma$ , 切出 chIFN- $\gamma$  目的基因, 同时用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 pET-32a (+) 空载体 ; 经 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒分别回收 chIFN- $\gamma$  目的基因和 pET-32a (+) 空载体部分 ; 在 T4 DNA Ligase 作用下进行连接反应, 连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布含 Amp 的 LB 平板, 37°C 培养箱过夜, 挑选单菌落, 振荡培养后用质粒小量提取试剂盒提取质粒, 进行 PCR 鉴定及 *EcoR* I / *Sal* I 双酶切鉴定, 鉴定均为阳性的质粒送 TaKaRa 公司测序, 进一步测序鉴定正确的阳性重组质粒命名为 pET-32a (+)-chIFN- $\gamma$ 。

### 1.3 rchIFN- $\gamma$ 的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将 pET-32a (+)-chIFN- $\gamma$  转化表达受体菌 *E.*

*coli* BL21(DE3), 挑选单菌落接种于 LB 培养基(含 Amp 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$ , 250 r/min, 振荡培养过夜, 次日按 1:100 比例接种于含 10 mL 新鲜 LB 培养基(含 Amp 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 100 mL 锥形瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 250 r/min 振荡培养, 当菌液  $OD_{600}$  值达 0.6 ~ 0.8 时加入 1 mmol/L 的 Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) 诱导 4 h, 同时取诱导前的菌液作对照。各取 1 mL 菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$ , 12000  $\times$  g 离心 10 min, 收集菌体沉淀用 100  $\mu\text{L}$  PBS 悬浮, 加入 25  $\mu\text{L}$  的 5  $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液, 充分混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$  煮沸 8 min, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色, 观察蛋白表达结果。

#### 1.4 表达蛋白的可溶性分析、非变性纯化及定量

将诱导 4 h 的菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$ , 12000  $\times$  g 离心 10 min, 将沉淀悬浮于非变性纯化裂解液 I (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, 咪唑 10 mmol/L, pH 8.0), 组织匀浆器充分匀浆后, 置冰浴进行超声波破碎, 设置程序为每超声 3 s, 间隔 3 s, 功率 400 W, 共进行 30 次。裂解菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$ , 12000  $\times$  g 离心 10 min, 分别取上清和沉淀进行 12% 的 SDS-PAGE 分析。

按 QIAGEN 公司的 QIAexpressionist™ 蛋白纯化系统操作指南进行天然纯化(略加改进)。即, 按每 3 g 菌体湿重加入 20 mL 的非变性纯化裂解液 I (添加 1 mmol/L 的  $\beta$ -巯基乙醇和 5% 甘油) 进行超声波破碎, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 12000  $\times$  g 离心 10 min, 然后将上清与 2 mL 镍琼脂糖凝胶混合, 冰上振荡 30 min, 使重组蛋白与镍充分结合后过柱, 用 10 mL 的洗涤缓冲液 II (含 40 mmol/L 咪唑, 其他成分同 I) 洗涤杂蛋白, 最后用 10 mL 洗脱缓冲液 III (含 400 mmol/L 咪唑, 其他成分同 I) 洗脱目的蛋白。非变性电泳鉴定洗脱蛋白的各种组分。洗脱后的目的蛋白合并后, 置于透析袋内, 在 0.1 mol/L PBS 缓冲液中透析, 4 $^{\circ}\text{C}$  磁力搅拌器搅拌, 每 5 h 换液一次, 换液 6 次后收集蛋白液, 分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。经 Bradford 法定量纯化的 rchIFN- $\gamma$  蛋白浓度。

#### 1.5 rchIFN- $\gamma$ 融合蛋白抗血清的制备及效价测定

选择 6 周龄新西兰雌兔 2 只, 体重约 2 kg/只。预采血 2 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$  10000  $\times$  g 离心 5 min 分离血清, 作为正常阴性血清对照。取 250  $\mu\text{g}$  可溶性纯化目的蛋白(稀释至 1 mL PBS 中) 加入 1 mL 弗氏完全佐剂制成油乳剂, 颈背部皮下多点注射免疫兔, 首

免后 2、4 和 6 周取 250  $\mu\text{g}$  可溶性纯化目的蛋白(稀释至 1 mL PBS 中) 加入 1 mL 弗氏不完全佐剂乳化后背部皮下多点注射加强免疫兔; 第 4 次免疫后 10 d, 颈动脉放血分离血清。将分离的血清按 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 和 1:64 进行系列梯度稀释, 以正常阴性血清作对照, 按常规方法与 1:20 稀释的纯化重组蛋白进行琼脂扩散试验检测抗体效价。

#### 1.6 Western blot 分析

将表达和纯化的 rchIFN- $\gamma$  蛋白及空载体诱导表达菌经 12% 的 SDS-PAGE 电泳后, 用半干转印法转印到 NC 膜上, 5% 脱脂奶封闭过夜, 一抗分别选择抗 6His 的单克隆抗体和自制兔源抗 chIFN- $\gamma$  多抗血清, 二抗分别为 HRP 标记羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 蒸馏水终止后拍照记录。

#### 1.7 纯化的 rchIFN- $\gamma$ 蛋白生物学活性测定

利用犬肾细胞-水泡性口炎病毒 (MDCK-VSV) 系统测定天然纯化的 rchIFN- $\gamma$  蛋白的抗病毒效价<sup>[9]</sup>。将纯化的 rchIFN- $\gamma$  用维持液 (DMEM + 2% FCS) 按 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 和 1:256 进行系列梯度稀释, 加至已长成单层的 96 孔板的 MDCK 细胞上, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 每个稀释度做 6 个重复孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h; 弃上清, 每孔接种 100 TCID<sub>50</sub> 的 VSV, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 同时设立 VSV 阳性对照(不加干扰素, 只加 VSV), 阴性对照(只加干扰素, 不加 VSV) 和空白对照(不加干扰素, 也不加 VSV)。37 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 ~ 48 h 后在倒置显微镜下观察, 待阳性对照细胞出现明显 CPE 时判定结果, 能抑制 50% 细胞病变的 rchIFN- $\gamma$  的最高稀释度的倒数作为干扰素抗 VSV 活性单位。

## 2 结果

### 2.1 ChIFN- $\gamma$ 基因原核表达载体的构建与鉴定

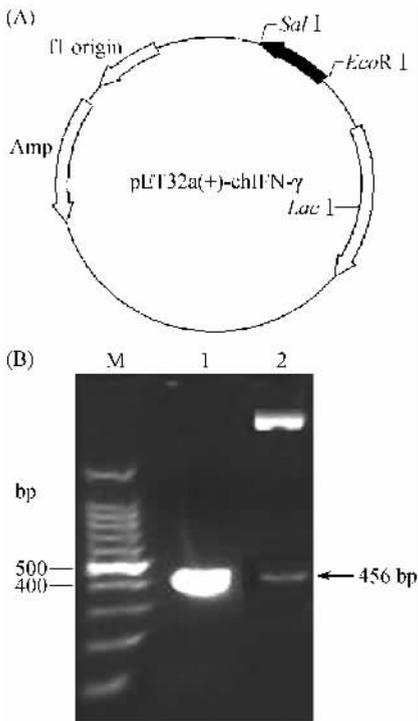
重组质粒 pET32a (+)-rchIFN- $\gamma$  构建如图 1-A 所示。重组质粒经 PCR 和双酶切鉴定, 均可以得到 456 bp 左右的目的条带, 与预期结果相符(图 1-B)。

### 2.2 表达产物 SDS-PAGE 鉴定

SDS-PAGE 电泳结果显示, 在约 31.0 kDa 处出现特异性目的条带, 大小与预期相符, 而 pET32a (+) 空载体对照无此特异性条带(图 2), 利用 BandsScan 软件分析目的蛋白的表达量在 50% 左右。

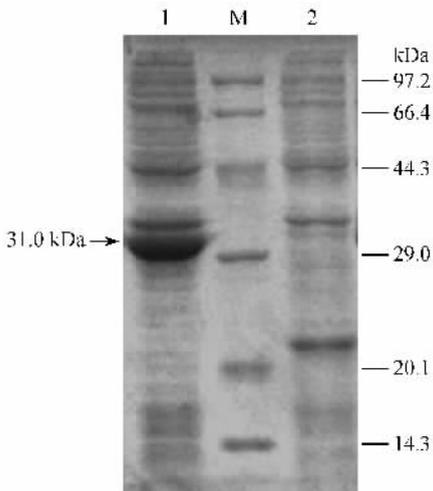
### 2.3 表达产物可溶性分析

可溶性分析表明: 表达蛋白一部分在上清中以



1 重组表达载体 pET32a(+)-chIFN- $\gamma$  构建示意图 (A) 及 PCR 和酶切鉴定 (B)

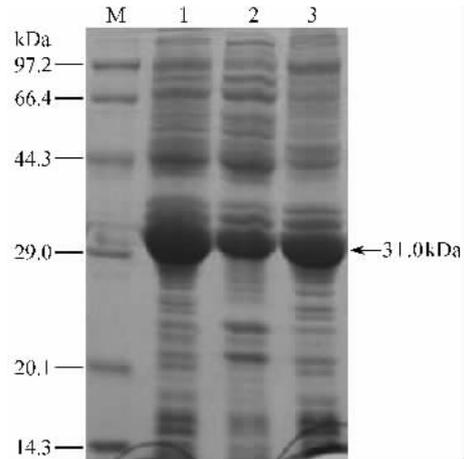
Fig. 1 Schematic map (A) and PCR and restriction enzyme analysis (B) of recombinant plasmid pET32a(+)-chIFN- $\gamma$ . M: 100 bp DNA ladder; 1: PCR identification of pET32a(+)-chIFN- $\gamma$ ; 2: pET32a(+)-chIFN- $\gamma$  digested with *EcoR*I/*Sal*I.



2 SDS-PAGE 分析鸡 IFN- $\gamma$  在 pET32a(+) 表达系统中的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of chIFN- $\gamma$  expressed in pET32a(+) system. M: Protein molecular weight marker; 1: pET32a(+)-chIFN- $\gamma$ /BL21 induced for 4h; 2: pET32a(+)-BL21 used as control.

可溶的形式存在,而一部分在裂解沉淀中以包涵体的形式存在(图3)。



3 SDS-PAGE 分析 rchIFN- $\gamma$  蛋白的可溶性

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the solubility of rchIFN- $\gamma$  protein. M: Protein molecular weight marker; 1: Total protein; 2: Supernatants; 3: Inclusion bodies.

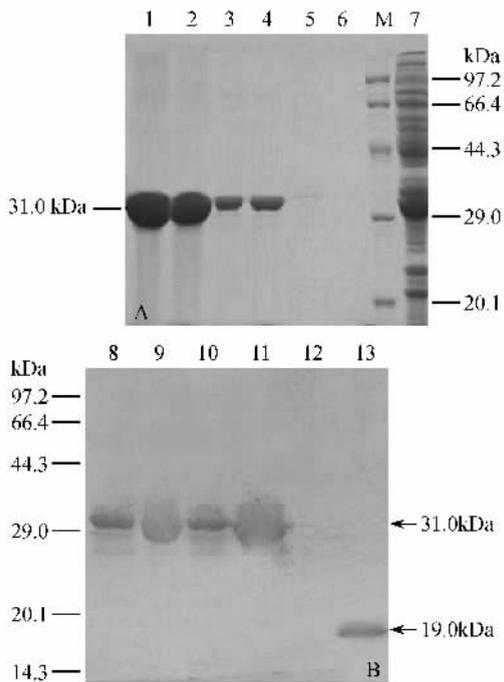
## 2.4 rchIFN- $\gamma$ 蛋白的非变性纯化及 Western blot 鉴定

非变性条件下,用镍柱亲和层析纯化经 pET32a(+)系统表达的 rchIFN- $\gamma$  蛋白,400 mmol/L 的咪唑基本能将目的蛋白洗脱下来(图 4-A 泳道 1~6 所示),泳道 1~6 分别代表 1~6 号 Eppendorf 管收集蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果。将洗脱后的目的蛋白合并,经 Bradford 法定量纯化的 rchIFN- $\gamma$  蛋白浓度为 3.0 mg/mL。

经 4 次免疫新西兰兔,颈动脉放血分离血清,琼脂扩散试验测定抗血清的效价为 1:16。Western blot 结果表明:表达和纯化 rchIFN- $\gamma$  蛋白均能与抗 chIFN- $\gamma$  多抗血清(pAb)和抗 6His 的单克隆抗体在目的带 31.0 kDa 处发生特异性显色反应。而空载体表达菌与抗 chIFN- $\gamma$  多抗血清不发生反应,无显色条带,与抗 6His 的单克隆抗体发生反应,在约 19.0 kDa 处出现空载体表达蛋白的显色条带。(图 4-B)。说明该 rchIFN- $\gamma$  蛋白具有很好的免疫原性。

## 2.5 rchIFN- $\gamma$ 的抗病毒效果分析

抗病毒活性试验结果表明:细胞对照组生长良好(图 5-A),纯化 rchIFN- $\gamma$  蛋白(1:32 稀释)能抵抗 100TCID<sub>50</sub> 的病毒攻击(图 5-B),而病毒对照组细胞基本死亡(图 5-C),说明纯化获得的 rchIFN- $\gamma$  蛋白具有较好的抗病毒活性。



**图4 SDS-PAGE (A)和 Western blot (B)鉴定 rchIFN- $\gamma$  蛋白**

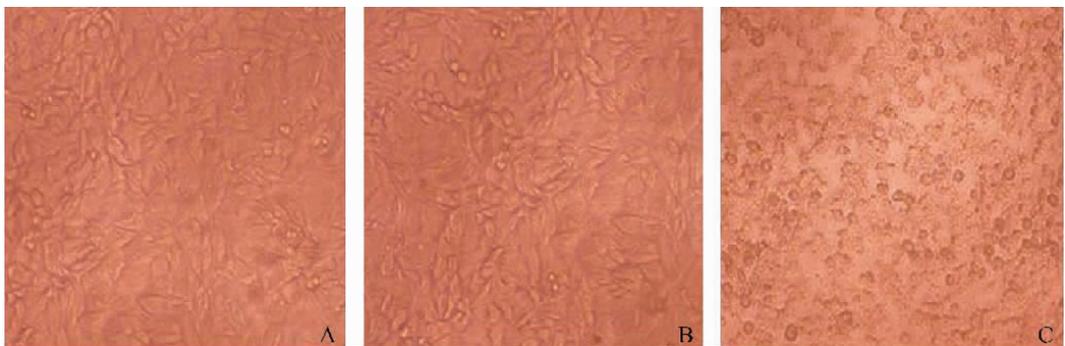
Fig.4 Identification of the rchIFN- $\gamma$  protein by SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis. M:Protein molecular weight marker; 1~6.Purified rchIFN- $\gamma$  proteins; 7.pET32a(+)-chIFN- $\gamma$ /BL21 induced for 4 h; 8.Expressed rchIFN- $\gamma$  protein recognized by pAb against chIFN- $\gamma$ ; 9.Purified rchIFN- $\gamma$  protein recognized by pAb against chIFN- $\gamma$ ; 10.Expressed rchIFN- $\gamma$  protein recognized by anti-His mAb; 11.Purified rchIFN- $\gamma$  protein recognized by anti-His mAb; 12.The extracts of pET32a(+)-chIFN- $\gamma$ /BL21 induced by IPTG reacted with pAb against chIFN- $\gamma$ ; 13.The extracts of pET32a(+)-chIFN- $\gamma$ /BL21 induced by IPTG reacted with anti-His mAb.

### 3 讨论

目前禽类传染性疾病的防治主要采用疫苗免疫和药物治疗,由于疫苗免疫的血清型单一,而病毒的血清型复杂,毒株变异快,常导致疫苗免疫失败;而大量使用药物,引起一系列的药物残留和抗药性的问题。因此很有必要研究广谱抗感染类生物制剂。干扰素因其作用机理的独特性而具有广谱的抗病毒活性,且与机体免疫系统相互作用,能增强疫苗的免疫效果。研究表明,重组干扰素与天然干扰素具有同样的抗病毒和免疫调节活性<sup>[10]</sup>,因此重组干扰素的研究和应用将成为病毒性疾病预防的重要方向。

鲍明等、史耀旭等用 pGEX 原核表达载体表达了鸡  $\gamma$ -干扰素,但是表达的融合蛋白主要以包涵体形式存在<sup>[9,11]</sup>;蔡梅红等用 pRLC 原核非融合性表达载体表达了鸡  $\gamma$ -干扰素,也主要以包涵体形式存在<sup>[12]</sup>;由于表达产物主要以包涵体形式存在,必须对包涵体成分进行复杂的变性复性处理。而本研究选用 pET32a(+ )表达载体进行表达,超声波裂解后,上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析,结果有相当一部分(总蛋白的 50% 左右)以可溶性的形式存在,从而解决了天然条件下分泌太少的缺陷,也避免了包涵体表达进行变性复性处理等复杂步骤,并且为鸡  $\gamma$ -干扰素通过天然纯化从而保持其活性提供了保证。这是国内利用原核表达系统表达鸡 IFN- $\gamma$  在天然条件下纯化的首次报道。

高山等用鸡  $\gamma$ -干扰素 cDNA 构建了温度诱导型原核表达载体 pBVcDNA,并将其转导到大肠杆菌



**图5 rchIFN- $\gamma$  对 VSV 的抑制作用**

Fig.5 Inhibition effect of rchIFN- $\gamma$  in MDCK cells. A:MDCK cells control; B:After infection with VSV,

one CPE was observed in MDCK cells which had been previously treated with rchIFN- $\gamma$ ; C:Obvious CPE of VSV in MDCK cells.

DH5 $\alpha$  中,温度诱导表达的目的蛋白占细菌总蛋白的 8.75%,但其是否有活性,是否以包涵体形式存在,怎样提取纯化蛋白等都没有做进一步研究<sup>[13]</sup>。而本研究选用 pET32a(+) 高效表达载体进行表达,通过摸索实验条件,如诱导前菌液浓度,诱导时间,诱导剂浓度等,提高了目的蛋白的表达量,利用 BandsScan 软件分析目的蛋白的表达量在 50% 左右;另外,pET32a(+) 表达载体中带有 6His 的标签,可以和目的蛋白一起融合表达,因此表达产物可以通过镍柱亲和层析柱进行纯化,纯化 rchIFN- $\gamma$  蛋白浓度可达 3.0 mg/mL。本试验中用抗 6His 的单克隆抗体和抗 chIFN- $\gamma$  多抗血清均可检测到表达和纯化 rchIFN- $\gamma$  蛋白在约 31.0 kDa 处出现特异性显色条带,而空载体本身经诱导可以表达含有 6His 标签的载体自身蛋白,用抗 6His 的单克隆抗体可以检测到 His 蛋白的表达,而与抗 chIFN- $\gamma$  多抗血清不发生反应。说明本研究获得的 rchIFN- $\gamma$  蛋白具有较好的免疫原性。

本研究直接对表达的可溶性蛋白在非变性条件下纯化,经过摸索并且采取了一系列措施,如加入甘油、 $\beta$ -巯基乙醇等最大程度的维持蛋白的生物学活性<sup>[14]</sup>。这样既简化了纯化工艺,大大降低了生产成本,也最大程度地保证了纯化产物的活性。通过 MDCK-VSV 系统测定表明纯化蛋白具有很好的抗病毒活性,从而为研究开发新型抗病毒制剂和免疫佐剂奠定了重要基础。将  $\gamma$ -干扰素基因与抗原保护性基因共同构建成共表达的基因工程疫苗,可以提高基因工程疫苗的免疫效果<sup>[8]</sup>,本研究也为进一步研究鸡  $\gamma$ -干扰素与抗原保护性基因共表达的基因工程疫苗奠定了基础。

致谢 本研究得到浙江大学动物科学学院郑肖娟博士后的悉心指导,在此表示衷心感谢!

## 参考文献

- [ 1 ] Schultz U ,Rinderle C ,Sekellick MJ ,et al. Recombinant chicken interferon from *Escherichia coli* and transfected COS cells is biologically active. *European Journal of Biochemistry* ,1995 ,229( 1 ) :73 - 76.
- [ 2 ] Playfair JH ,De Souza JB. Recombinant gamma interferon is a potent adjuvant for a malaria vaccine in mice. *Clinical and Experimental Immunology* ,1987 ,67( 1 ) :5 - 10.
- [ 3 ] Michalski WP ,Shiell BJ ,O 'Neil TE ,et al. Recombinant chicken IFN-gamma expressed in *Escherichia coli* :analysis of C-terminal truncation and effect on biologic activity. *Journal of Interferon and Cytokine Research* ,1999 ,19( 4 ) :383 - 392.
- [ 4 ] Isaacs A ,Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society B of London , Series B , Containing Papers of Biological Character* ,1957 ,147( 927 ) :258 - 267.
- [ 5 ] Sekellick MJ ,Ferrandino AF ,Hopkins DA ,et al. Chicken interferon gene :cloning ,expression and analysis. *Journal of Interferon Research* ,1994 ,14( 2 ) :71 - 79.
- [ 6 ] Digby MR ,Lowenthal JW. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene. *Journal of Interferon and Cytokine Research* ,1994 ,15( 11 ) :939 - 945.
- [ 7 ] Weining KC. Biological properties of recombinant chicken interferon gamma. *European Journal of Immunology* ,1996 ,26( 10 ) :2440 - 2447.
- [ 8 ] Schijns VE ,Weining KC ,Nuijten P ,et al. Immunoadjuvant activities of *E. coli*- and plasmid-expressed recombinant chicken IFN-alpha/beta ,IFN-gamma and IL-1beta in 1-day- and 3-week-old chickens. *Vaccine* ,2000 ,18( 20 ) :2147 - 2154.
- [ 9 ] 鲍明 ,仲大莲 ,许发芝 ,等. 鸡  $\gamma$ -干扰素基因的克隆与原核表达. *安徽农业大学学报( Journal of Anhui Agricultural University )* 2004 ,31( 1 ) :92 - 95.
- [ 10 ] Lambrecht B ,Gonze M ,Morales D ,et al. Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon-gamma. *Veterinary of Immunology and Immunopathology* ,1999 ,70( 3 - 4 ) :257 - 267.
- [ 11 ] 史耀旭 ,关贵全 ,高金亮 ,等. 鸡  $\gamma$ -干扰素基因的克隆及原核表达. *中国兽药杂志( Chinese Journal of Veterinary Drug )* 2006 ,40( 7 ) :12 - 16.
- [ 12 ] 蔡梅红 ,曹瑞兵 ,周斌 ,等. 鸡  $\gamma$  干扰素成熟蛋白基因的表达及其产物抗病毒活性测定. *中国病毒学( Virologica Sinica )* 2004 ,19( 1 ) :32 - 35.
- [ 13 ] 高山 ,杨国庆 ,郭英 ,等. 鸡  $\gamma$ -干扰素 cDNA 的克隆和在大肠杆菌中的温度诱导型表达. *农业生物技术学报( Journal of Agricultural Biotechnology )* ,2003 ,11( 4 ) :394 - 398.
- [ 14 ] 齐静 ,陈吉刚 ,王金勇 ,等. 鹅 IL-2 基因在大肠杆菌中的表达及其可溶性单体的分离. *生物工程学报( Chinese Journal of Biotechnology )* ,2008 ,24( 2 ) :183 - 187.

## Soluble expression of chicken interferon- $\gamma$ and antiviral activity of purified expression product

Jing Qi<sup>1#</sup>, Yijun Du<sup>2#</sup>, Xiaoling Zhu<sup>1</sup>, Beixia Hu<sup>1</sup>, Shouli Sun<sup>1</sup>, Xiumei Zhang<sup>1</sup>, Yuqing Liu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Animal and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Shandong Key Laboratory of Animal Disease Control and Breeding, Jinan 250100, China)

(<sup>2</sup>Department of Pathobiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2001 South Lincoln Ave, Urbana, IL 61802, USA)

**Abstract [ Objective ]** We cloned and expressed chicken interferon-gamma gene (chIFN- $\gamma$ ), and detected the bioactivity of chIFN- $\gamma$  expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). **[ Methods ]** The chIFN- $\gamma$  mature protein gene was amplified by RT-PCR from spleen lymphocytes of chicken which were stimulated with concanavalin A (ConA) and then cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a(+). Recombinant expression plasmid of pET-32a(+)-chIFN- $\gamma$  was constructed and then transformed into the competent *E. coli* BL21(DE3) cells for expression with IPTG induction. Purified soluble rchIFN- $\gamma$  proteins were obtained by Ni-NTA His Bind Resin affinity chromatography and identified by SDS-PAGE gel and Western blot assay. The antiviral activity was detected by MDCK-VSV system. **[ Results ]** A 456 bp cDNA encoding chIFN- $\gamma$  mature protein gene was cloned and successfully expressed in *E. coli* with approximate molecular weight of 31.0 kDa, which could be recognized by anti-His mAb and rabbit polyclonal antibody against chIFN- $\gamma$ . The recombinant chIFN- $\gamma$  proteins were expressed to form inclusion bodies with a portion of soluble protein. The soluble rchIFN- $\gamma$  proteins were purified by Ni-NTA column under a native condition with the yield of 3.0 mg/L. The purified recombinant chIFN- $\gamma$  (rchIFN- $\gamma$ ) proteins by 1:32 dilution could resist 100 TCID<sub>50</sub> VSV virus attack. **[ Conclusion ]** The purified rchIFN- $\gamma$  proteins by Ni-NTA column under a native condition had better antiviral activity, which will establish a basis for further developing new type antiviral interferon praeparatum.

**Keywords :** chicken interferon-gamma ; prokaryotic expression ; purification ; antiviral activity

( 本文责编 : 王晋芳 )

Supported by the the High-tech Independent Innovation Fund of Shandong Academy of Agricultural Sciences( 2006YCX023 )

\* Corresponding author. Tel : + 86-531-83179342 ; E-mail : liuyqing@163.com

# These authors contributed equally to this work.

Received : 13 June 2008 / Revised : 1 September 2008

### 《微生物学报》答作者问——关于署名

问 我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表, 如果想在作者和单位方面增、减新的内容, 并且修改作者及单位署名顺序是否可以? 是否需要提供什么证明或者相关的材料?

答 : 可以变更, 但需要作者再提供以下材料。

- (1) 如变单位署名顺序, 需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信, 证明内容: 原署名顺序 → 现署名顺序 → 盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序, 需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容: 原作者姓名及顺序 → 修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部( 邮寄或扫描后 E-mail 发来 ), 新的变更即可生效。