

何 静, 张盼盼, 孙敏华, 等. 鸡 α 干扰素/白细胞介素 18 基因的融合表达及抗病毒活性研究[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(1): 18-22.

鸡 α 干扰素/白细胞介素 18 基因的融合表达及 抗 病 毒 活 性 研 究

何 静, 张盼盼, 孙敏华, 康银峰, 谢 鹏, 向 斌, 韩 翡, 谭阳通, 任 涛
(华南农业大学 兽医学院/人兽共患病防控剂国家地方联合工程实验室/农业部兽用疫苗创制重点实验室/
广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】构建原核表达载体 pET28a-rChIFN- α -ChIL-18、大肠埃希菌 *Escherichia coli* 表达及产物纯化与活性检测,研究高效广谱鸡基因工程重组复合抗病毒制剂,以对鸡的病毒性疾病进行防治。【方法】采用融合 PCR (Fusion PCR) 方法,利用具有互补末端的引物,形成具有重叠链的 PCR 产物,通过 PCR 产物重叠链的延伸将鸡 α 干扰素 (Chicken interferon alpha, ChIFN- α) 与鸡白细胞介素 18 (Chicken interleukin-18, ChIL-18) 基因构建 *ChIFN- α -ChIL-18* 融合基因并克隆入 pET-28a 原核表达载体中进行原核表达。通过镍柱亲和层析法纯化可溶性蛋白,并进行 SDS-PAGE 分析、Western-blot 鉴定。采用细胞病变抑制法检测 rChIFN- α -ChIL-18 蛋白在细胞上抑制水泡性口炎病毒 (VSV) 及新城疫病毒 (NDV) 增殖活性。【结果和结论】成功构建并克隆了 *pET28a-rChIFN- α -ChIL-18* 融合基因。融合基因在大肠埃希菌中表达的 rChIFN- α -ChIL-18 蛋白相对分子质量约为 38 000,蛋白经纯化后纯度在 90% 以上。rChIFN- α -ChIL-18 蛋白在鸡胚成纤维 (CEF) 细胞上具有明显抗病毒活性,其抗 VSV 和 NDV 的活性明显高于单一 rChIFN- α 、rChIL-18 蛋白的抗病毒活性。

关键词:鸡 α 干扰素; 鸡白细胞介素 18; 融合 PCR; 抗病毒活性
中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2015)01-0018-05

Expressions and antiviral bioactivities of chicken interferon α /chicken interleukin-18 fusion protein

HE Jing, ZHANG Panpan, SUN Minhua, KANG Yinfeng, XIE Peng, XIANG Bin,
HAN Fei, TAN Yangtong, REN Tao
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/National and Regional Joint Engineering Laboratory for
Medicament of Zoonosis Prevention and Control/Key Laboratory of Animal Vaccine Development, Ministry of
Agriculture/Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】This study was conducted to explore a highly efficient chicken gene engineering antiviral agent to prevent and control the chicken viral disease. A recombinant plasmid pET28a-rChIFN α -IL18 was constructed, which was expressed in *Escherichia coli*, purified by Ni-NTA and tested for antiviral bioactivity. 【Method】This study introduced a novel method for constructing vectors by fusion PCR, which generated PCR products with overlapping chain using Primers complementary to the end. Through the extension of PCR products, *ChIFN- α* and *ChIL-18* constituted the *ChIFN- α -ChIL-18* fusion gene when cloned into the vector pET-28a, induced the expression in *E. coli* strain BL21 (DE3). This protein was purified by Ni-NTA and detected by SDS-PAGE and Western-blot. Cytopathic effects (CPE)

were applied to examine the potency of recombination rChIFN- α -ChIL-18 against vesicular stomatitis virus (VSV) and newcastle disease virus (NDV) proliferation. 【Result and conclusion】 The fusion gene of *ChIFN- α -ChIL-18* was successfully constructed and cloned into pET-28a vector. The rChIFN- α -ChIL-18 protein was expressed in *E. coli* and successfully purified with a molecular mass of about 38 000 and more than 90% on SDS-PAGE, which indicated that the correct rChIFN- α -ChIL-18 fusion protein had been obtained. The antiviral activity units of rChIFN- α -ChIL-18 protein inhibiting the reproduction of VSV and NDV on chicken embryo fibroblast (CEF) cells were much higher than those of the recombinant rChIFN- α , rChIL-18 protein.

Key words: chicken interferon alpha; chicken interleukin-18; fusion PCR; antiviral activity

α 干扰素 (IFN- α) 具有广谱抗病毒活性^[1], 其主要作用是抑制病毒繁殖、抗肿瘤活性、加强 NK 细胞杀伤病毒感染细胞的能力从而抑制病毒的增殖和扩散、增强机体细胞免疫应答水平等^[2]. 白细胞介素 18 (IL-18) 是 20 世纪 80 年代发现的一类细胞因子, 由单核巨噬细胞系统的细胞分泌, 在细胞的活化、增殖和分化中起调节作用. ChIL-18 除了能明显诱导 IFN- γ 基因表达外, 还可诱导诸如 IL-2、TNF- α 及 GM-CSF 等多种细胞因子的产生, 同时, IL-18 也可增强 CTL 细胞和 NK 细胞的活性, 上调细胞毒活性作用, 促进 T 细胞增殖, 在细胞免疫反应中发挥重要作用^[3]. 近年来有关 IL-18 的研究非常活跃, 其应用领域包括抗肿瘤、抗感染及作为免疫调节剂治疗一些免疫性疾病, 具有重要的临床应用价值.

本研究采用融合 PCR (Fusion PCR) 方法, 将鸡 *ChIFN- α* 与 *ChIL-18* 基因构建成 *ChIFN- α -ChIL-18* 融合基因并克隆入 pET-28a 原核表达载体中进行表达, 该蛋白具有很好的免疫原性和很强的抗水泡性口炎病毒 (VSV) 和新城疫病毒 (NDV) 活性. 这项研究可有效地降低研制成本, 易于生产, 且具有叠加的 ChIFN- α 和 ChIL-18 抗病毒功能, 为生产高活性及高效基因工程重组复合抗病毒制剂奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌 (毒) 株与质粒 大肠埃希菌 *Escherichia coli* BL21、DH5 α 菌株由华南农业大学兽医学院动物传染病实验室保存; VSV 由广东省农业科学院惠赠; NDV 及质粒载体 pET-28a 均由华南农业大学兽医学院动物传染病实验室保存.

1.1.2 试剂 PCR 扩增用试剂、内切酶、T4 连接酶、dNTP 均为大连 (宝) 生物 (TaKaRa) 工程有限公司产品; DNA 回收试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒等试剂均为 Omega 公司产品; TRIzol 试剂为 Invitro-

gen 公司产品; 淋巴细胞分离液为杭州灏洋生物工程公司产品; DM EM 培养基和小牛血清均为 Hyclone 公司产品.

1.1.3 主要仪器设备 PTC-200 型 PCR 仪为美国 MJ ReSearch 公司产品; 凝胶成像分析系统为英国 Gyndene 公司产品; Galaxy 300 L CO₂ 培养箱为英国 Rsbiotech 公司产品; 分光光度计 (ND-1000) 为 Nano-Drop 公司产品; 恒温 CO₂ 培养箱为英国 Rsbiotech 公司产品; 超声波裂解仪为美国 Scientz 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 参照 GenBank 登录的 *ChIFN- α* 基因序列 (DQ226092)、*ChIL-18* 基因序列 (AJ277865) 及 pET-28a (+) 多克隆位点, 用 Oligo 7 (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO) 辅助设计 2 对具有互补末端的引物, 分别为 P1/P2、P3/P4 引物对, 引物均由英潍捷基 (广州) 贸易有限公司 (Life technologies) 合成. 本试验所用引物见表 1.

表 1 试验所用引物 ¹⁾	
Tab.1 PCR primers used in this study	
引物名称	引物序列 (5'→3')
P1	GAATTCTGCAACCACCTTC
P2	CCTTACAAAAGGCCTAAGTGCGCGTG
P3	GCACTTAGGCCTTTTGTAAGGATAAACT
P4	AAGCTTTCATAGGTTGTGCCT

1) P1 斜体处为 *EcoR* I 酶切位点; P2 斜体处与 P3 斜体处为互补末端; P₄ 斜体处为 *Hind* III 酶切位点.

1.2.2 *ChIFN- α -ChIL-18* 融合基因的构建 参照李敏等^[4]报道的方法进行 *ChIFN- α -ChIL-18* 融合基因的构建. 首先采用 P1/P2 引物对, 以 rpMD19-T/*ChIFN- α* 质粒为模板对 *ChIFN- α* 基因片段进行扩增后, 采用 P3/P4 引物对, 以 rpMD19-T/*ChIL-18* 质粒为模板扩增 *ChIL-18* 基因片段. 使用低熔点琼脂糖凝胶回收试剂盒分别回收 *ChIFN- α* 、*ChIL-18* 基因片段, 将上述 2 个回收产物混合, 取 0.5 μ g 混合物用于

ChIFN-α 与 *ChIFN-γ* 基因的融合反应. 采用 P2/P3 引物对, 依据上述融合反应片段为模板进行 *ChIFN-α* 与 *ChIL-18* 融合片段的 PCR 扩增. 回收约 996 bp 的 PCR 产物.

1.2.3 *ChIFN-α-ChIL-18* 融合基因的克隆、测序与表达 将“1.2.2”回收的 996 bp 左右的 PCR 产物定向克隆至 pMD19-T 载体, 后筛选阳性克隆质粒 (pMD19-T/*ChIFN-α-ChIL-18*) 送英潍捷基 (上海) 贸易有限公司测序, 阳性克隆质粒经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后连接到经相同酶双切后的表达载体 pET-28a(+), 将构建好的重组 pET-28a/*ChIFN-α-ChIL-18* 表达质粒分别转入宿主菌 *E. coli* BL21 中, 筛选阳性重组菌送英潍捷基 (广州) 贸易有限公司 (Life technologies) 测序. 选取核苷酸序列和插入方向都正确的重组菌、pET-28a/*ChIFN-α-ChIL-18* 空载体菌对照、BL21 空菌对照进行 IPTG 诱导表达, 采用 SDS-PAGE 分析表达蛋白.

1.2.4 重组 *ChIFN-α-ChIL-18* 融合蛋白的诱导表达及 Western-blot 分析 将测序正确的 pET-28a/*ChIFN-α-ChIL-18* 于 10 mL 含 KNa^+ 的 LB 液体培养基中, 37 ℃、150 r/min 扩大培养 12 h. 取培养物 5 mL 接种于 500 mL LB 液体培养基中, 37 ℃、150 r/min 振荡培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 达到 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 16 ℃ 诱导表达 10 h, 同时, 设立 37 ℃ 诱导表达 (IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L) 的对照组、未诱导的菌液和 pET-28a/BL21 空载体菌作为阴性对照. 制备 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 利用 SDS-PAGE 电泳检查目的蛋白表达情况. 将凝胶上的蛋白转印至硝酸纤维素膜 (NC), 将 His 标签抗体 (1:2 000) 作为一抗, 然后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.

1.2.5 重组 *ChIFN-α-ChIL-18* 融合蛋白的纯化 通过试验证明 pET-28a/*ChIFN-α-ChIL-18* 原核表达载体表达的融合蛋白于上清液中以可溶性形式存在, 按 GE 公司 Ni-NTA 纯化系统说明书的 Native purification 方法纯化融合蛋白.

用紫外分光光度计分别测定 $D_{260\text{ nm}}$ 和 $D_{280\text{ nm}}$, 根据下式计算蛋白质质量浓度 [ρ (蛋白质)]^[5]:

$$\rho(\text{蛋白质}) = (1.45 \times D_{280\text{ nm}} - 0.74 \times D_{260\text{ nm}}).$$

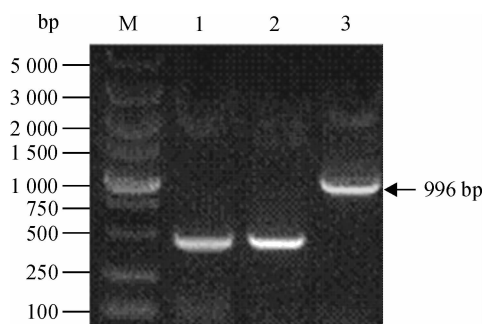
1.2.6 r*ChIFN-α-ChIL-18* 蛋白抗病毒活性检测 采用微量细胞病变抑制法在鸡胚成纤维 (CEF) 细胞上测定 r*ChIFN-α-ChIL-18* 蛋白的抗 VSV 及 NDV 活性. 同时设 r*ChIFN-α*、r*ChIL-18* 蛋白对照. CEF 细胞在 96 孔细胞培养板培养至单层后, 将纯化的 *ChIFN-α-ChIL-18*、r*ChIFN-α*、r*ChIL-18* 用维持液 (DMEM + 体

积分数为 2% 的 FCS) 进行 4 倍倍比稀释, 每个稀释度重复 8 孔, 于 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 培养箱中培养 12 h 后, 弃上清液, 用 PBS 洗涤后, 分别加入 100 μ L 100TCID₅₀ VSV 和 100 μ L 100TCID₅₀NDV 的病毒稀释液, 同时设置只用病毒攻毒对照组和正常细胞对照组, 继续培养 48~72 h 后观察细胞病变情况, 待阳性对照细胞出现明显细胞病变时判定结果, 能抑制 50% 细胞病变的细胞因子的最高稀释度的倒数作为其抗 VSV、NDV 活性单位. 采用 Reed-Muench 法^[6] 计算 r*ChIFN-α-ChIL-18* 蛋白抗 VSV 及 NDV 活性, 同时与 r*ChIFN-α*、r*ChIL-18* 蛋白进行比较.

2 结果与分析

2.1 *ChIFN-α-ChIL-18* 融合基因的构建

以重组质粒 pMD19-T/*ChIFN-α* 和 pMD19-T/*ChIL-18* 为模板 PCR 扩增 IFN- α 和 IL-18 片段, 得到 *ChIFN-α* 和 *ChIL-18* PCR 扩增产物, 大小分别为 489 和 510 bp; 采用 P2/P3 引物对扩增到了大小为 996 bp 左右的 *ChIFN-α-ChIL-18* 融合基因, 这些扩增产物大小均与预期的相一致 (图 1). 说明采用融合 PCR 方法成功构建了 *ChIFN-α-ChIL-18* 融合基因.



M: DNA marker DL5000; 1: *ChIFN-α*; 2: *ChIL-18*; 3: *ChIFN-α-ChIL-18* 融合基因.

图1 融合 PCR 扩增 *ChIFN-α-ChIL-18* 融合基因

Fig. 1 Fusion PCR amplification of *ChIFN-α-ChIL-18* fusion gene

2.2 *ChIFN-α-ChIL-18* 基因表达载体的构建

ChIFN-α-ChIL-18 融合基因成功克隆入 pMD19-T 载体, 测序结果表明, 融合基因序列全长为 996 bp, 对比原模板质粒中的 *ChIFN-α* 和 *ChIL-18* 核苷酸序列没有发生变异. 对阳性 pET-28a/*ChIFN-α-ChIL-18* 质粒测序表明, 插入 pET-28a 载体中的 *ChIFN-α-ChIL-18* 融合基因长度为 996 bp, 与 pMD19-T/*ChIFN-α-ChIL-18* 克隆质粒中的相应基因序列完全一致. 以上结果表明成功构建了 pET-28a/*ChIFN-α-ChIL-18* 表达质粒.

2.3 rChIFN- α -ChIL-18 蛋白的表达及鉴定

重组菌 BL21 (pET-28a/ ChIFN- α -ChIL-18) 经 IPTG 诱导后,经 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析,结果表明,表达的重组蛋白相对分子质量为 38 000 左右,与预期大小相一致;且该融合蛋白具有可溶性,由 SDS-PAGE 电泳结果可知,16 $^{\circ}$ C 比 37 $^{\circ}$ C 更利于蛋白在上清液中的表达. 对照 BL21 空菌和含 pET-28a 空载体的 BL21 菌在相应位置均无条带 (图 2).

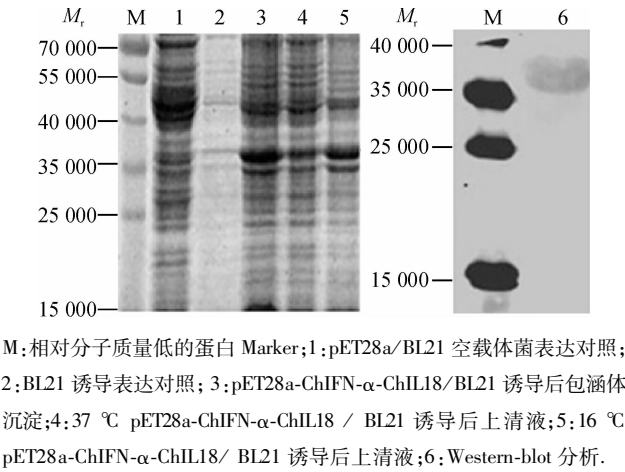


图2 pET28a-ChIFN- α -ChIL18/BL21 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

Fig. 2 SDS-PAGE and Western-blot analyses of pET28a-ChIFN- α -ChIL18

2.4 重组 ChIFN- α -ChIL-18 融合蛋白的纯化

将诱导后的菌体超声裂解,纯化后经 SDS-PAGE 电泳检测,结果显示目的蛋白由 Native-100 的咪唑洗

涤液洗脱下来,用凝胶扫描分析,蛋白纯度高达 90% 以上(图 3). 经紫外分光光度计测定融合蛋白 ChIFN α -IL18 质量浓度为 0.350 mg/mL.

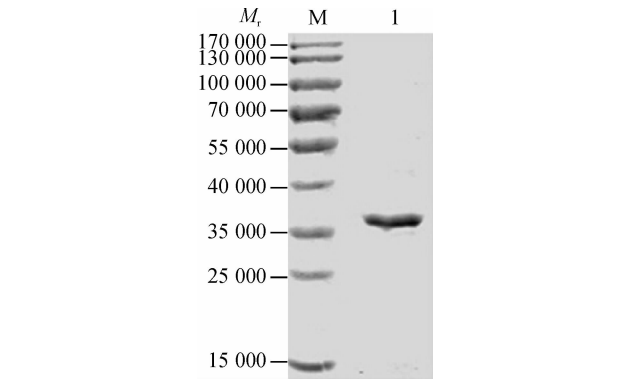


图3 rChIFN- α -ChIL18 蛋白纯化结果

Fig. 3 SDS-PAGE analyses of the purified protein rChIFN- α -ChIL18

2.5 rChIFN- α -ChIL-18 蛋白抗病毒活性检测

2.5.1 rChIFN- α -ChIL-18 蛋白抗 VSV 活性 将抑制 50% 细胞病变的干扰素稀释度的倒数作为干扰素抗 VSV 活性单位. 计算得 rChIFN- α -ChIL-18、rChIFN- α 以及 rChIL-18 的活性分别约为 4.67×10^6 、 2.58×10^5 、 5.9×10^3 IU/mg. 试验结果表明,分别经 rChIFN- α -ChIL-18、rChIFN- α 及 rChIL-18 蛋白作用后感染 VSV 的正常 CEF 细胞,正常的 CEF 细胞均无细胞病变,而病毒对照组感染 VSV 的 CEF 细胞基本死亡 (图 4). 说明 rChIFN α -IL18 和 rChIFN- α 、rChIL-18 均有明显的抗病毒活性,且融合蛋白的抗病毒效果要高于单一蛋白.

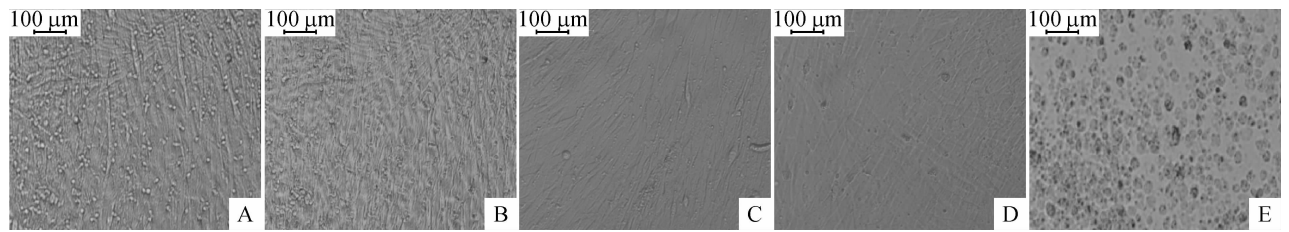
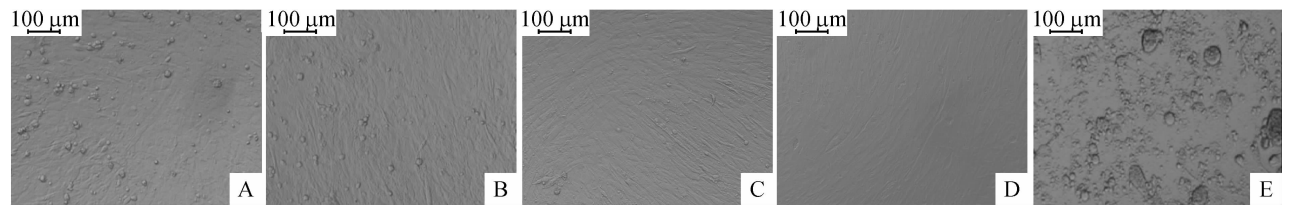


图4 rChIFN- α -ChIL-18 蛋白对 VSV 的抑制作用

Fig. 4 rChIFN- α -ChIL-18 antiviral activities against VSV

2.5.2 rChIFN- α -ChIL-18 蛋白抗 NDV 活性 将可以抑制 50% 细胞病变的干扰素的稀释浓度的倒数作为干扰素抗 NDV 活性单位. 计算得 rChIFN- α -ChIL-18、rChIFN- α 及 rChIL-18 抗 NDV 的活性分别约为 3.17×10^6 、 2.0×10^3 、 1.19×10^3 IU/mg. 试验结果表明,分别经 rChIFN- α -ChIL-18、rChIFN- α 及

rChIL-18 蛋白作用后感染 NDV 的正常 CEF 细胞,正常的 CEF 细胞均无细胞病变,而病毒对照组感染 VSV 的 CEF 细胞基本死亡 (图 5). 说明 rChIFN α -IL18 和 rChIFN- α 、rChIL-18 均有明显的抗病毒活性,且融合蛋白的抗病毒效果要高于单一蛋白.



A:未感染 NDV 的正常 CEF 细胞;B:经 rChIFN- α -ChIL-18 处理后感染 NDV 的 CEF 细胞;C:经 rChIFN- α 处理后感染 NDV 的 CEF 细胞;D:经 rChIL-18 处理后感染 NDV 的 CEF 细胞;E:病毒对照组 CEF 细胞.

图 5 rChIFN- α -ChIL-18 蛋白对 NDV 的抑制作用
Fig. 5 rChIFN- α -ChIL-18 antiviral activities against NDV

3 讨论

目前禽类病毒性传染病依然严重威胁着养禽业,但是仍然没有有效的药物可以预防,人们的防控依然主要依靠疫苗免疫.由于疫苗的单一血清型而导致无法有效地对快速变异的病毒进行防控,而大量药物的使用,引起一系列的药物残留和抗药性的问题.因此研发广谱、高效、安全、无毒副作用的抗病毒药物对促进养鸡业健康发展具有重要意义.干扰素因具有广谱的抗病毒活性,一方面可以促进机体加强对病毒的抵抗,另一方面也能促进疫苗的免疫效果.因此重组干扰素的研究和应用将成为病毒性疾病防治的重要方向.

rIFN- α 具有广谱的抗病毒活性,基因工程 rIFN- α 作为抗病毒制剂对多种病毒性疾病的疗效已明确^[7].rChIFN- α 蛋白对 NDV^[8]、禽流感 H9N2 型病毒及马立克氏病毒^[9-11]均具有抑制作用,rChIL-18 蛋白可调节机体免疫功能,明显诱导 IFN- γ 基因表达,增强疫苗的免疫效果.本研究通过融合 PCR 方法成功将 ChIFN- α 、ChIL-18 基因融合成 ChIFN- α -ChIL-18 融合基因并进行了融合表达,经对比 rChIFN- α -ChIL-18 融合蛋白进行生物学活性测定结果表明,rChIFN- α -ChIL-18 蛋白在 CEF 细胞上具有明显优于单一 rChIFN- α 和 rChIL-18 的生物学活性,说明 rChIFN- α -ChIL-18 具有单一 rChIFN- α 蛋白和 rChIL-18 蛋白的双重生物学活性,调动了机体强大的免疫功能,发挥抗病毒效果,这与闫若潜等^[7]的相关报道一致.

本研究采用的融合 PCR 方法,与传统利用酶切位点将各个片段逐个连接到载体上的方法相比,此技术在不需内切酶消化和连接酶处理的条件下实现 DNA 片段的体外连接,大大缩短了反应时间,降低了操作难度.

重组蛋白绝大部分以可溶的形式存在于上清液中.正常的诱导表达中,蛋白主要以包涵体的形式存在,由于包涵体纯化难度高、纯化产物不易保存,本试验经过多次探索,发现在 16℃ 低温诱导条件下,上清液中可检测到可溶性蛋白表达.

本研究证明,rChIFN- α -ChIL-18 蛋白对 NDV 和 VSV 具有有效的抑制效应,本试验为临床上新城疫的防治提供了新的思路和方法,对病毒性疫病的防控具有重要意义^[10].同时为下一步将 rChIFN- α -ChIL-18 蛋白用于鸡体内抗病毒感染研究奠定了基础.

参考文献:

[1] MEAGER A, LEUNG H, WOOLLEY J, et al. Assays for tumour necrosis factor and related cytokines [J]. J Immunol Methods, 1989, 116(1): 1-17.

[2] JOHNSON H M, BAZE F W, SZENTE B E. How interferons fight disease [J]. Sci Am, 1994, 270(5): 68-75.

[3] 王宪文, 刘兴友, 王岩. 鸡白细胞介素 18 研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(16): 6776-6777.

[4] 李敏, 杨谦. 一种高效构建同源重组 DNA 片段的方法—融合 PCR [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(8): 53-58.

[5] 韦琴, 彭贵青, 金梅林, 等. 鸡 α 干扰素基因的克隆、原核表达及抗病毒效果研究 [J]. 生物工程学报, 2006, 22(5): 737-743.

[6] SAGANUWAN S A. A modified arithmetical method of reed and muench for determination of a relatively ideal median dose (LD₅₀) [J]. Afr J Pharm Pharmacol, 2011, 5(12): 1543-1546.

[7] 闫若潜, 谢彩华, 吴志明. 鸡 α 干扰素/白细胞介素 2 基因的融合表达及活性研究 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(3): 594-604.

[8] YEH H Y, WINSLOW B J, JUNKER D E, et al. In vitro effects of recombinant chicken interferon-gamma on immune cells [J]. J Interf Cytok Res, 1999, 19(6): 687-691.

[9] MEAGER A. Biological assays for interferons [J]. J Immunol Methods, 2002, 261(1/2): 21-36.

[10] VOLPINI L M, CALNEK B W. Interferon modulation of marek's disease virus genome expression chicken cell lines [J]. Avian Dis, 1996, 40(1): 78-87.

[11] XING Z, SCHAT K A. Inhibitory effects of nitric oxide and gamma interferon on in vitro and in vivo replication of Marek's disease virus [J]. J Virol, 2000, 74(8): 3605-3612.

【责任编辑 柴 焰】