

猪 α -干扰素的原核表达

谢海燕, 郭霄峰

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 重组质粒 pMDIFN- α 中的猪 α -干扰素基因经双酶切, 亚克隆到原核表达载体 pET-28a, 构建了重组表达质粒 pETIFN- α , 经过 SDS-PAGE 蛋白质电泳, 测得表达蛋白的相对分子质量约为 26 500. 表达蛋白的 Western-blotting 分析显示: 改进后的半干胶转印免疫印迹法灵敏度高、特异性强、重复性好; 获得的重组融合蛋白具有良好的反应原性.

关键词: 猪 α -干扰素; 原核表达; 免疫印迹

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)04-0086-03

Construction of prokaryotic expression system for producing porcine IFN- α

XIE Hai-yan, GUO Xiao-feng

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The expression plasmid pETIFN- α was constructed successfully and the recombinant porcine IFN- α was expressed as inclusion bodies in *E. coli*. Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed a unique band with almost equal intensity with apparent relative molecular mass of 26 500. The results of western-blotting indicated that the modified technique was highly sensitive, specific with good reproducibility, and the recombinant protein had good immunogenicity. The findings of the present study should have important implications for further studies on the prevention and control of viral diseases in pigs.

Key words: porcine alpha interferon; gene expression; western-blotting

目前, 病毒性传染病已成为困扰养猪业的重大问题, 每年因病毒感染而造成的经济损失无法估量, 尤其是蓝耳病、伪狂犬病、猪瘟、口蹄疫等. 对这些常见的病毒病, 虽然有些可用疫苗作常规免疫, 但由于免疫程序、疫苗本身和动物个体等种种原因, 使其在实际生产中的效果不尽人意, 且弱毒疫苗具有毒力返祖的潜在危险, 还可干扰传染病的诊断. 因而, 生产中急需一种制剂来预防和治疗猪的病毒性传染病. 针对这种现状, 笔者对抗病毒作用广谱、效果最为显著的猪 α -干扰素进行了原核表达研究. 在干扰素家族中, 以 α -干扰素的抗病毒作用最为显著. 在兽医上, 对于猪现在普遍存在的病毒性腹泻、繁殖、呼吸病及猪瘟等^[1-9], 它都有很好的疗效. 现在虽已有商品化的兽用干扰素应市, 但这些干扰素均是由特定的诱导剂诱导产生的, 存在着成本高昂、易被污染

的问题, 难以应用推广, 而通过基因工程方法生产的干扰素基本上就解决了上述问题.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与工程菌 pMDIFN- α 由华南农业大学兽医微生物教研室构建. pET-28a 原核表达载体由中国人民解放军军需大学卢强博士赠送. BL21(DE3) pLysS 工程菌购自广州天象人生物工程公司, 基因型为: F^- , ompT, hsdSB(rB^- , mB^-), dcm, gal, λ (DE3), pLysS, Gm^r .

1.1.2 酶类及其他相关试剂 T4 DNA ligase、*Eco*RI、*Hind*III 购自宝生物工程(大连)有限公司. Western Protein Marker 购自珠海百奥生物技术有限公司.

小鼠抗猪 α_1 -干扰素抗体为美国 PBL 生物医学

收稿日期: 2004-03-24

作者简介: 谢海燕(1976-), 女, 硕士, 现在广东省东莞市兽医防疫检疫站工作; 通讯作者: 郭霄峰(1963-), 男, 教授, 博士.

基金项目: 广东省科技厅农业攻关项目(2003C20206)

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

实验室产品, 购自吉泰科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 猪 α -干扰素表达质粒的构建 用 *Eco*RI、*Hind*III 双酶切质粒 pMDIFN- α ^[7], 回收猪 α -干扰素基因, 亚克隆到原核表达载体 pET-28a, 构建了重组表达质粒 pETIFN- α . 质粒的重组、转化及重组子的筛选和鉴定参考 Sambrook^[8] 方法进行.

1.2.2 猪 α -干扰素的表达 37 °C 振荡培养大肠杆菌重组子至 *D*_{600 nm} 为 0.4~1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 或其他不同的终浓度, 继续培养 3 h 左右.

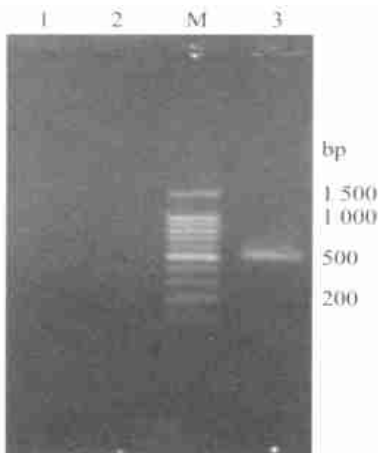
1.2.3 表达产物的蛋白质电泳 (SDS-PAGE) 参照 Laemmli^[9] 的方法进行. 将诱导的产物 10 000 r/min 离心 1 min 后, 收集菌体, 加入 1/10 的 SDS-PAGE Loading Buffer, 煮沸 3~5 min 后, 立即作 SDS-PAGE.

1.2.4 表达产物的免疫印迹 (western-blotting) 方法参照 Towbin^[10]. 电泳完毕, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 再与酶标鼠抗猪 α -干扰素抗体反应.

2 结果

2.1 原核表达载体 pETIFN- α 的构建

经抗生素和蓝白斑初步筛选后的菌落, 用 PCR、单、双酶切鉴定均为阳性的重组子, 送往上海基康生物技术有限公司作正、反双向测序. 结果与设计的一致, 猪 α -干扰素基因以正确的方向插入 pET-28a 中, 并且阅读框正确 (图 1、2).



M: 100bp Ladder; 1: 阴性对照 空载体的质粒 PCR; 2: 背景对照, 灭菌双蒸水为模板的 PCR; 3: 重组质粒 pETIFN- α 的质粒 PCR
M: 100 bp Ladder; 1, 2: negative control; 3: PCR product

图 1 质粒 pETIFN- α 的质粒 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR analysis of plasmid pETIFN- α

2.2 表达产物的蛋白质电泳 (SDS-PAGE)

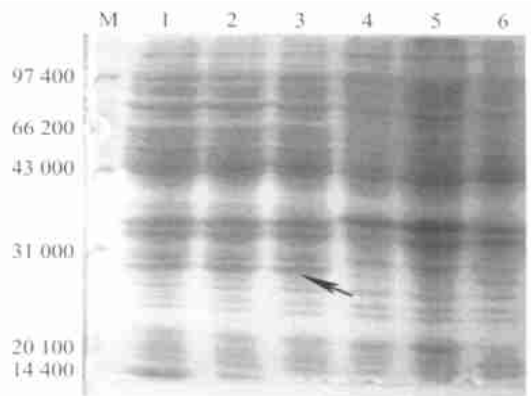
诱导后菌体的 SDS-PAGE 电泳图谱如图 3, 与空载体对照及空菌对照相比较, 表达菌在相对分子质量约 26 500 处明显多出 1 条单一、清晰的蛋白带.



M1: λ DNA/ *Eco*RI + *Hind*III; 1: pET-28a 空载体 *Eco*RI + *Hind*III 双酶切; 2: pETIFN- α 的 *Eco*RI + *Hind*III 双酶切; M2: 100 bp Ladder
M1: λ DNA/ *Eco*RI + *Hind*III; 1: pET-28a/ *Eco*RI + *Hind*III; 2: pETIFN- α / *Eco*RI + *Hind*III

图 2 pETIFN- α 重组子的 *Eco*RI + *Hind*III 双酶切图谱

Fig. 2 Analysis of recombinant expression plasmid pETIFN- α by enzymatic digestion



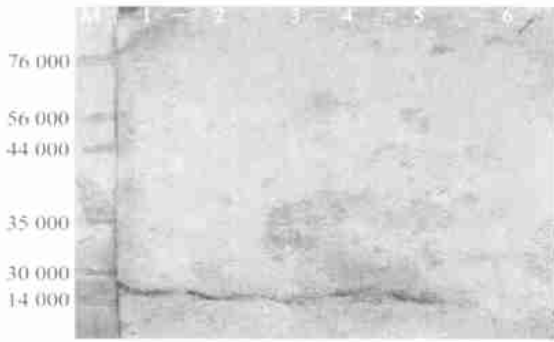
M: 蛋白质低相对分子质量标准;
1, 2, 3: pETIFN- α 在 BL21(DE3)pLysS 中的诱导表达;
4: pET-28a 载体在 BL21(DE3)pLysS 中的诱导表达对照;
5: BL21(DE3)pLysS 空菌对照;
6: pETIFN- α 在 BL21(DE3)pLysS 中未经诱导
M: Low relative molecular mass of protein marker;
Lane 1, 2, 3: expression products of BL21(DE3)pLysS containing pETIFN- α ;
Lane 4: expression products of BL21(DE3)pLysS containing pET-28a;
Lane 5: BL21(DE3)pLysS;
Lane 6: pETIFN- α in BL21(DE3)pLysS without induction

图 3 猪 α -干扰素的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 3 Expression of recombinant plasmid pETIFN- α in BL21(DE3)pLysS analyzed by SDS PAGE

2.3 表达产物的免疫印迹 (western-blotting)

诱导后的重组猪 α -干扰素经还原型 SDS-PAGE 分离后, 通过半干电转印, 将蛋白区带转到硝酸纤维素膜上, 用猪 α_1 -干扰素单克隆抗体和生物素标记抗体与之反应, 利用 ABC 免疫检测方法, 使抗原、抗体反应的免疫学信号得以放大, DAB 显色后, 结果显示: 在相对分子质量约为 26 500 处出现清晰的区带, 见图 4.



M: western marker

1, 2, 3, 4, 5: 均为经诱导的重组干扰素表达子,

酶标一抗稀释浓度为 1:3 000

6: 空载体阴性对照 —: 表示未加入样品

Lane 1, 2, 3, 4, 5: expression products of BL21(DE3)pLysS containing pETIFN- α ; dilution of IFN- α_1 antibody is 1:3 000

Lane 6: negative control —: without sample

图 4 表达产物的 western-blotting

Fig. 4 Expression products analyzed by western-blotting

3 讨论

本文选用的是由 Studier 和 Moffat 于 1986 年始建的 T7 启动子系列的 pET-28a. pET-28a 载体不仅拥有强 T7 启动子, 还有低的诱导前渗漏, 快速、简便的诱导方式及能高效表达多种基因的特点, 除此之外, 在载体序列的 N 端有 His-tag, 利用 His-tag 与 Ni 离子的亲和作用, 融合表达出的蛋白产物可以用 Ni-NAT 树脂一步纯化^[11], 而且引入的 His-tag 相对分子质量小, 几乎不影响蛋白原有的功能, 同时, 融合表达方式可以降低宿主对表达蛋白的降解.

SDS-PAGE 作为一种较为成熟的方法, 早就用来快速测定蛋白质的相对分子质量, 已广泛应用于分子生物学、分子遗传学等研究领域. 但在本研究中, 对重组菌进行 SDS-PAGE 时发现, 获得的目的蛋白相对分子质量比理论值要大得多. 这可能与表达的融合蛋白 N 端有 His-tag 结构有关. 2000 年, 唐威华等^[12]也发现了这种现象, 并对这一现象产生的原因作了剖析. 他们排除了错误终止导致相对分子质量较大的可能性, 并对研究蛋白进行了酶切, 切除了包括 His-tag 在内的部分肽段, 再经 SDS-PAGE, 发现相对分子质量的偏差大大降低了, 从而首次实验证实 His-tag 确实是造成偏差的主要原因.

本研究在对目的蛋白进行 western-blotting 分析, 以检测表达蛋白的免疫学特性的试验过程中, 对常规的 western-blotting 方法进行了改进: 为了提高免疫印迹的灵敏度, 将酶标二抗改为生物素化二抗, 联合 ABC 试剂盒进行逐级放大; 并选用 western-blotting Marker 用于 western-blotting 检测的阳性对照, 监控整

个 western-blotting 操作过程. 试验证实, 该半干胶转印免疫印迹法灵敏度高、特异性强、重复性好, 且重组融合蛋白具有良好的反应原性.

本试验在大肠杆菌原核表达系统中对猪 α -干扰素进行了融合表达, 为进一步研究和利用基因工程猪 α -干扰素打下了基础.

参考文献:

- [1] 刘万钧, 张道永, 马思奇, 等. 猪白细胞干扰素防治乳猪流行性腹泻试验[J]. 中国兽医杂志, 1999, 25(2): 13-14.
- [2] 刘万钧, 张道永, 马思奇, 等. 猪白细胞干扰素在乳猪空肠结扎肠段中干扰猪流行性腹泻病毒试验[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(6): 372-373.
- [3] 杨国华, 朱耀华, 陈洪明, 等. 干扰素对猪腹泻病的治疗试验[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1998, 3: 22.
- [4] BUDDAERT W, van REETH K, PENSAERT M. *In vivo* and *in vitro* interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 440: 461-467.
- [5] ALBINA E, CARRAT C, CHARLEY B. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1998, 18: 485-490.
- [6] 杨家华, 刘达远. 猪白细胞干扰素治疗猪病毒性疾病试验[J]. 四川兽医, 1997, 4: 24-25.
- [7] 谢海燕, 郭霄峰. 猪 α -干扰素基因的分子克隆与序列分析[J]. 动物医学进展, 2002, 23(6): 69-72.
- [8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆试验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1996. 343-349.
- [9] LWAMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [10] TOWBIN H, STAEGELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76(9): 4350-4354.
- [11] HOCHULI E, BANNWARTH W, DOBELI H, et al. Genetic approach to purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbant [J]. *Bio/Technology*, 1988, 6: 1321-1325.
- [12] 唐威华, 张景六, 王宗阳, 等. SDS PAGE 法测定 His tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因 [J]. 植物生理学报, 2000, 26(1): 64-68.

【责任编辑 柴 焰】