

牛 γ -干扰素在大肠杆菌中的表达及抗原性鉴定

刘巧荣¹, 孙明¹, 乔明明¹, 杨璐¹, 申屠芬琴¹, 马永缨¹,
曹振², 田克恭², 陈西钊^{1,2}

(1. 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司, 北京 100085; 2. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 100094)

【摘要】 目的 在大肠杆菌中高效表达牛 γ -干扰素 (bovine interferon- γ , BovIFN- γ), 并对其生物活性进行初步鉴定。方法 依据 GenBank 上基因序列人工合成 BovIFN- γ 基因, PCR 方法扩增该基因, 将其插入 PET-28a 载体构建原核表达质粒, 转化大肠杆菌 BL21 中, 在 IPTG 诱导下表达 BovIFN- γ , 并进行 Western blot 鉴定。Ni-NTA 亲和层析法和电洗脱方法纯化表达的重组蛋白, 用 Western blot 和商品化的 BovIFN- γ 检测试剂盒进行重组蛋白的抗原性检测。结果 成功构建了 BovIFN- γ 原核表达载体 PET-28a-BIFN- γ , 并在大肠杆菌中高效表达, 表达蛋白约占菌体总蛋白的 32%, 表达产物主要以可溶性形式存在于菌体裂解液上清中; 重组蛋白可与 BovIFN- γ 单克隆抗体反应, Ni-NTA 亲和层析法纯化的重组蛋白抗原活性比电洗脱方法纯化的抗原活性高。结论 在大肠杆菌中成功表达了可溶性的 BovIFN- γ 蛋白, 可与 BovIFN- γ 单抗发生反应, 纯化的重组蛋白具有良好的反应原性。

【关键词】 牛 γ 干扰素; 原核表达; 抗原性; 大肠杆菌

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)02-0038-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.02.009

Expression of Bovine Interferon- γ (BovIFN- γ) in *E. coli* and Identification of its Antigenicity

LIU Qiao-rong¹, SUN Ming¹, QIAO Ming-ming¹, YANG Lu¹, SHENTU Fen-qin¹,
MA Yong-ying¹, CAO Zhen², TIAN Ke-gong², CHEN Xi-zhao^{1,2}

(1. Beijing Anheal Laboratories Co. Ltd, Beijing 100085, China;

2. China Animal Disease Control Center, Beijing 100094)

【Abstract】 **Objective** To express bovine interferon- γ (BovIFN- γ) in *E. coli*, and preliminarily identify its biological activity. **Methods** According to the gene sequence in GenBank to construct the BovIFN- γ gene, and use it as the template, to amplify the BovIFN- γ gene by polymerase chain reaction (PCR). To insert the BovIFN- γ gene into vector PET-28a, transform it into *E. coli* BL21-competent cells, induce it with IPTG to express BovIFN- γ , and analyze it by Western blot. Using the NI-NTA affinity chromatography and electroelution to purify the recombination protein, and detect the protein antigenicity by commercial BovIFN- γ kit. **Results** The recombinant plasmid PET-28a-BIFN- γ was successfully constructed, and BovIFN- γ was efficiently expressed in *E. coli*. The protein expression accounted for 32% of the total soluble bacterial proteins. The expression products mainly existed in soluble form in the cell lysate supernatant, and the proteion could be discriminated by BovIFN- γ monoclonal antibody. The recombinant protein purified by NI-NTA affinity chromatography had higher antigen activity than that by electroelution. **Conclusions** The soluble recombinant BovIFN- γ

[作者简介] 刘巧荣(1979-),女,硕士。主要研究方向:动物疫病诊断。

[通讯作者] 陈西钊,博士,研究员,Email: chenxizhao@anheal.com

protein is successfully expressed in *E. coli*, and the protein can react with BovIFN- γ monoclonal antibody. The purified recombinant BovIFN- γ protein has good antigenicity.

【Key words】 Bovine interferon- γ ; Prokaryotic expression; Antigenicity; *E. coli*

研究意义:干扰素(interferon, IFN)是一种多效性细胞因子,主要由活化的 T 淋巴细胞产生,具有广泛抗病毒、抗肿瘤及免疫调节功能。根据产生干扰素的细胞来源、理化性质及生物学活性的差异,哺乳动物的干扰素可分为 5 类,即 α 、 β 、 τ 、 ω 及 γ ^[1]。与其它型比,IFN- γ 除具有抗病毒活性和抗肿瘤活性外,还有更强的免疫调节活性,能促进 MHC II 类抗原表达、增强抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)与 T 细胞的相互作用、增强辅助性 T 细胞活性和细胞毒性 T 细胞产生的能力等,是机体发挥免疫功能,清除体内病原体不可缺少的成分,因此,IFN- γ 成为现代分子生物学,免疫学和临床医学研究的热点之一。

前人的研究进展: Douglas 等(1986)首先对 BovIFN- γ 进行了原核表达,发现重组 BovIFN- γ 蛋白在 MDBK 细胞系上的活性为 1.15×10^5 U/mL。此后,国内外学者用大肠杆菌、毕赤酵母、疱疹病毒和杆状病毒等表达载体对其进行了表达研究^[2-6]。研究表明, BovIFN- γ 在抗水泡性口炎病毒、口蹄疫病毒、牛病毒性腹泻病毒、牛呼吸道合胞体病毒、牛白血病病毒以及副流感-3 型病毒的试验中均取得了良好效果。另外,通过检测牛血液中的 IFN- γ 用于诊断牛结核病,目前已经有 BovIFN- γ 检测试剂盒出售^[7]。

本研究切入点:本研究旨在应用基因工程技术实现 BovIFN- γ 的高效表达,鉴定其抗原活性。为制备 BovIFN- γ 检测试剂盒奠定基础。

1 材料和方法

1.1 载体和菌株

pGEM-T-Easy、PET-28a 载体,购自 Promega 公司。

1.2 主要试剂

TaqDNA 聚合酶、dNTP 和胶回收试剂盒购自 Promega 公司,氨苄青霉素和 IPTG 购自于 Sigma 公司。BovigamTM 牛结核分枝杆菌 γ -干扰素检测试剂盒购自于北京测迪公司。BovIFN- γ 酶标单克隆抗体来自 BovigamTM 牛结核分枝杆菌 γ -干扰素检测试剂盒。内切酶 Sal I 和 EcoR I 为 Takara 公司产品。

1.3 目的基因克隆

参考 GeneBank 上 BIFN- γ 基因序列设计引物。上游引物:5'-AGCGAATTCATGCAGGGCCAATTTT TTAGA-3',下游引物 5'-TTTGTCTGACTTACGTTGAT GCTCTCCGGCCT-3'。由宝生物工程大连有限公司合成。以人工合成的 BIFN- γ 基因序列为模板,克隆目的基因。

PCR 扩增程序:94℃ 4 min,94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 60 s,30 个循环,72℃ 10 min。

扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收。回收产物与 pGEM-T-Easy 载体连接(方法参照 Promega 的产品使用说明),PCR 方法鉴定重组质粒,并命名为 pGEM-T-BIFN- γ 。将鉴定正确的阳性质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.4 重组表达质粒的构建

Sal I 和 EcoR I 双酶切 pGEM-T-BIFN- γ 质粒,回收目的基因,连接至经同样双酶切的原核表达载体 PET-28a 中;转化到 BL21/DE3 感受态细胞中。用 PCR 方法和双酶切鉴定重组质粒,将重组质粒命名为 PET-28a-BIFN- γ 。

1.5 诱导表达与纯化

将 PCR 和酶切鉴定为阳性的菌在 LB/AMP 中 37℃ 培养,当菌摇至 $A_{600} = 0.8 \sim 1.0$ 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,37℃ 诱导培养 4 h,离心收集菌体。菌体经过超声波破碎,收集沉淀和上清液。沉淀用 0.1% Triton X-100 洗涤后,再用包涵体溶解液溶解。Ni-NTA 亲和层析法和电洗脱方法纯化表达的重组蛋白。

1.6 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定

将诱导菌液经 SDS-PAGE 电泳分离后,转印到硝酸纤维素膜(NC 膜)。5% 脱脂奶粉封闭过夜, PBST 洗涤 3 次,用辣根过氧化物酶标记的抗 BovIFN- γ 单抗 37℃ 孵育 1h,洗涤 3 次后用二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色液显色 1~5 min,观察结果。

1.7 ELISA 检测鉴定

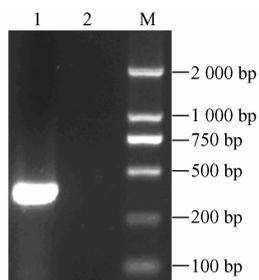
将纯化的 BovIFN- γ 重组蛋白作相应倍数稀释,作为待检抗原和 γ -干扰素检测试剂盒的标准品分别加入到预先包被 BovIFN- γ 抗体的酶标板中,温育 1 h,洗涤 3 次,再加入酶标抗 BovIFN- γ 的单克隆抗

体,温育 1 h,洗涤 3 次。加入底物显色 10 min,再加入终止液。450 nm 波长下测定 A 值,根据标准品和样品的 A 值,判定阴阳性。

2 结果

2.1 目的基因扩增

以合成的 BovIFN- γ DNA 序列为模板进行 PCR 扩增。扩增的基因大小与预期大小一致(图 1)。测序结果显示,克隆的基因片段大小为 429 bp,与 M29867 的序列完全相同。



1 BovIFN- γ 基因;2 阴性对照;M DL 2000 marker

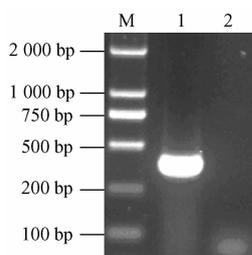
图 1 BovIFN- γ 的 PCR 结果

1. BovIFN- γ gene; 2: Negative control; M: DL 2000 marker

Fig. 1 PCR products of BovIFN- γ

2.2 表达载体构建

BovIFN- γ 与表达载体 PET-28a 连接转化到 BL21/DE3 感受态细胞中。菌液 PCR 鉴定(图 2)显示扩增的基因大小与目的基因大小一致,重组质粒 PET-28a-BIFN- γ 酶切结果见图 3。片段大小与预期结果一致,表明成功构建原核表达载体。



M: DL 2000 marker; 1: 菌液;2: 阴性对照

图 2 PET-28a-BIFN- γ 菌液 PCR 鉴定

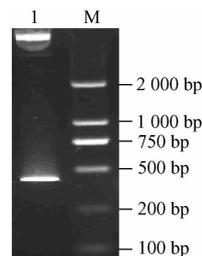
M: DL 2000 marker; 1: PET-28a-BIFN- γ bacilli;

2: Negative control

Fig. 2 PCR identification of PET-28a-BIFN- γ

2.3 PET-28a-BIFN- γ 的诱导表达、纯化及 Western Blot 鉴定

牛干扰素在 PET-28a 中的表达情况以及 Western Blot 鉴定结果分别见图 4 和图 5。结果显示重组质粒在 *E. coli* BL21/DE3 中实现了高效表达,



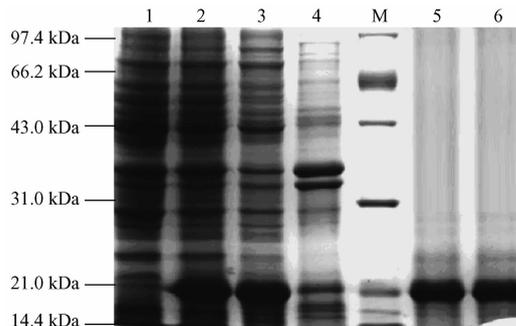
M: DL 2000 marker; 1: PET-28a-BIFN- γ 质粒

图 3 PET-28a-BIFN- γ 酶切鉴定

M: DL 2000 marker; 1: Recombinant plasmids of PET-28a-BIFN- γ ;

Fig. 3 Restriction enzyme digestion of PET-28a-BIFN- γ

分子量约为 17 kDa 左右。目的蛋白以包涵体和可溶性两种形式存在,且以可溶性表达为主。经 Alpha 成像仪扫描分析,表达蛋白约占菌体总蛋白的 32%。菌体裂解上清经 Ni-NTA 亲和层析和电洗脱方法纯化后得到纯度较高的重组蛋白,浓度分别为 0.56 mg/mL 和 2.6 mg/mL。Western blot 鉴定结果表明两种方法纯化的牛干扰素蛋白均可和酶标 BovIFN- γ 单克隆抗体反应(图 5),具有很好的抗原反应活性。



M 低分子量蛋白 marker;1. 未诱导菌;2. 诱导菌;

3. 诱导菌裂解上清;4. 诱导菌裂解沉淀;

5. 亲和层析法纯化蛋白;6. 电洗脱方法纯化蛋白

图 4 PET-28a-r-BIFN 表达情况

M: Low molecular weight protein marker; 1: Control without induction; 2: Expressions of recombinant plasmid induced by IPTG; 3: Products of bacterial lysate supernatant; 4: Products of bacterial lysate precipitation; 5: Affinity chromatography purified protein; 6: Electroelution purified protein

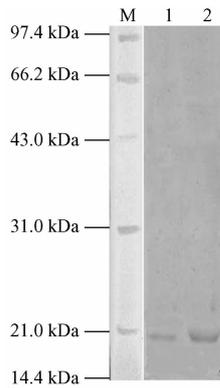
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of PET-28a-r-BIFN protein expressed in BL21

2.4 ELISA

用 γ -干扰素检测试剂盒分别检测两种纯化的 PET-28a-BIFN- γ 重组蛋白。结果见表 1,由表看出,电洗脱和亲和层析纯化的 BovIFN- γ 浓度分别大于

表 1 电洗脱与亲和层析纯化抗原 ELISA 检测 A450 结果
Tab. 1 ELISA results of purified protein determined by electroelution and affinity chromatography

阴性对照 Neg. control	阳性对照 Pos. control	电洗脱纯化抗原 (μg/mL) Antigen purified by electroelution				Ni-NTA 亲和层析纯化抗原 (μg/mL) Antigen purified by Ni-NTA chromatography					
		130	13	1.3	0.13	0.065	0.56	0.056	0.028	0.0056	0.0028
0.062	2.347	2.439	3.673	1.563	0.26	0.120	4.330	1.924	0.972	0.275	0.171



1 电洗脱方法纯化蛋白; 2 亲和层析法纯化蛋白

图 5 Western Blot

1: Protein purified by electroelution

2: Protein purified by affinity chromatography

Fig. 5 Western blot results

或等于 0.13 μg/mL 和 0.0056 μg/mL 时为阳性。

3 讨论

BovIFN-γ 可用于牛的一些病毒性疾病的防治,也可用于牛结核病的诊断^[7,11]。牛结核病的 IFN-γ 诊断法是 1990 年由 Wood 等建立,其原理是将试验牛的血液淋巴细胞培育,加入特异性抗原(如牛结核菌素,ESAT-6 等)一起孵育 16~24 h,感染牛结核的淋巴细胞释放多量 IFN-γ,未感染牛结核的淋巴细胞不释放或释放少量 IFN-γ,通过检测淋巴细胞培养上清中 IFN-γ 量的变化来诊断牛结核病。2000 年世界牛分枝杆菌会议后,IFN-γ 检测方法在许多国家推广使用,且已有检测试剂盒出售。这种方法的敏感性和特异性较高,其敏感度可达 93.6%,远远高于传统的皮内试验 65.6% 的灵敏度^[12],且能检测出早期感染牛分枝杆菌的牛,降低了传染的风险^[13]。可见 IFN-γ 检测方法具有良好的应用前景。

目前国内外用于诊断牛结核病的检验方法分为三类:第一类是细菌学方法,如涂片镜检、细菌培养等。镜检简便、快速,检测的灵敏度低;细菌培养耗费时间,检测阳性率低。第二类是免疫学方法,包括结核菌素变态反应(TST)、ELISA 和 γ 干扰素检测法等。TST 是临床上应用最广的方法,也是国

际兽医局推荐的牛结核病诊断的唯一方法。ELISA 和 γ 干扰素实验法通过检测结核菌的特异性抗体或细胞因子等,可检出处于不同感染时期(潜伏感染期、疾病期)的牛,简便快速、检测阳性率较高。第三类是分子生物学方法,如 PCR、核酸探针、基因芯片等,检测的阳性率高于细菌学方法,但检出的病牛也已处于传染期。故应用 ELISA 技术检测 BovIFN-γ 以鉴定牛结核病的感染情况不失为一种快速、有效的方法。

本研究表达的重组蛋白主要以可溶性形式存在于菌体裂解上清中。试验用亲和层析和电洗脱两种方法纯化重组蛋白,纯化蛋白均能与试剂盒中的 BovIFN-γ 单克隆抗体发生特异性反应。ELISA 试验结果显示 Ni-NTA 亲和层析纯化的 BovIFN-γ 与 BovIFN-γ 单克隆抗体的反应活性明显高于电洗脱方法纯化的蛋白。如浓度为 0.056 μg/ml 亲和层析法纯化的 BovIFN-γ 仍与 BovIFN-γ 单克隆抗体呈强阳性反应(A450 值 = 1.924),而相当浓度(0.065 μg/mL)的电洗脱方法纯化的蛋白与 BovIFN-γ 单克隆抗体呈阴性反应(A450 值 = 0.120)。

本研究在大肠杆菌中成功表达了 BovIFN-γ,纯化的蛋白能被 BovIFN-γ 单克隆抗体识别,其中 Ni-NTA 亲和层析纯化蛋白的活性明显高于电洗脱方法纯化蛋白的活性。为制备抗 BovIFN-γ 的单克隆抗体以及建立 BovIFN-γ 检测试剂盒奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘皓, 焦丹, 葛继乾. 干扰素国内市场的现状与发展分析 [J]. 中国药业, 2001, 10(10):11-13.
- [2] Cerretti DP, Mckereghan K, Larsen A, et al. Cloning, sequence, and expression of bovine interferon-gamma [J]. J Immunol, 1986, 136(12):4561-4564.
- [3] Raggio C, Habemehehl M, Babiuk L A, et al. The in vivo effects of recombinant bovine herpesvirus-1 expressing bovine interferon-gamma [J]. J Gen Vet, 2000, 81:2665-2673.
- [4] Mutakami K, Uchiya A, Kokuho T, et al. Production of biologically active recombinant bovine interferon-gamma by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae [J]. Cytokine, 2001, 13:18-24.
- [5] 史喜菊, 张灿, 韩春来, 等. 牛 γ-干扰素在大肠杆菌与赤霉

- 母中的表达及抗病毒活性比较[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(4):461-467.
- [6] 牛 γ -干扰素基因在大肠杆菌中的克隆[J]. 大连轻工业学报, 2005, 24(2):106-109.
- [7] Buonavoglia D, Corrente M, Mosca R, et al. The diagnosis of bovine tuberculosis—preliminary results on the use of the γ -interferon test [J]. *II Progress Veter*, 1995, 23:770-772.
- [8] 李彤, 张以芳, 罗佳琴. 牛 γ -干扰素在牛结核检测中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(11):53-57.
- [9] Grobler DG, Michel AL, De Klerk LM, et al. The gamma-interferon test. Its usefulness in a bovine tuberculosis survey in African buffaloes (*Syncerus caffer*) in the kruger National Park [J]. *Onderstepoort J Vet Res*, 2002, 69:221-227.
- [10] Cousins DV, Florisson N. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species [J]. *Rev Sci Tech*. 2005, 24:1039-1059.
- [11] De la Rúa-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, et al. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques [J]. *Res Vet Sci*. 2006, 81:190-210.
- [12] Wood PR, Corner LA, Rothel JS, et al. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis [J]. *Aust Vet J*. 1991, 68:286-290.
- [13] Wood PR, Rothel JS. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis [J]. *Vet Microbiol*. 1994, 40:125-135.

[修回日期]2011-09-19

《中国比较医学杂志》论文书写格式要求

论文包括中文题目、作者、单位(单位所在地和邮编)、中文摘要以及英文题目、作者、单位与摘要、中文关键词(3~8个)、中图分类号、英文关键词(与中文关键词对应)、正文、参考文献。

1. 题目应简明扼要、准确地反映文章的主题,避免使用非公知公用的缩略语符号和代号。一般以 20 个字内为限,英文题名不宜超过 10 个实词。中英文题名含义应一致。

2. 作者姓名之间以逗号隔开,姓字母全部大写,名第一个字母大写,双名之间加连字符(-)。作者单位要求同中文,后面加 China。不同单位的作者,应在姓名右上角标上角码。作者单位另起一行在作者姓名之下,包括单位全称,所在城市名称和邮编,两端加圆括号。不同单位的作者,应在单位名称前加上与作者名字相同的标识。如:

链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型稳定性观察

蒋 升¹, 谢自敬¹, 张 莉²

(1. 新疆医科大学第一临床医学院内分泌科, 乌鲁木齐 830054; 2. 武警新疆总队医院眼科, 乌鲁木齐 830000)

Observation of Stability of Type I Diabetic Rat Models Induced by Streptozotocin

JIANG Sheng¹, XIE Zi-jing¹, ZHANG Li²

(1. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

2. Xinjiang General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Urumqi 830091, China)

3. 摘要和关键词

中文摘要应包括目的、方法、结果(应有主要数据)、结论四部分内容。篇幅一般 300 字左右。摘要不分段。英文摘要应有英文题目、作者、作者单位、邮政编码、正文和关键词。英文摘要正文的内容与中文摘要基本相同,可更为详细些,但不宜过长。英文摘要置于中文摘要下方。

关键词是反映文章最主要内容的术语。中英文的意思要相同。关键词之间用分号隔开。

4. 脚注(文章首页左下方):(1)基金项目(论文所受资助的课题资金来源及编号);(2)作者简介(第一作者);(3)通讯作者。第一作者和通讯作者简介包括:姓名(生年-)、性别、职称、学位、研究方向。

5. 正文:格式和层次结构按照引言、材料和方法、结果、讨论 4 部分撰写。各层次标题应简短明确,同一级标题应反映同一层次的内容(格式为 1 1.1 1.2……2 2.1 2.2……)。

凡在文中出现的生物名称请用正确的中文学名,并在第一次使用时提供其完整的拉丁学名。

凡可用文字说明者均不用图表。每个图表均应有图表题。图表题及其文字说明及注释采用中英文两种文字,先中文后英文。图、表按照在文中出现的顺序编号,图表序号一律用阿拉伯数字。表格一律采用三线表。图表置于正文中。如是彩图,按照顺序统一置于文章参考文献后,作彩版使用。

参考文献采用顺序编码标注,按照引文先后顺序,用阿拉伯数字连续编号。参考文献格式如下:

(1) 期刊:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 文题[文献标识码]. 刊名, 出版年, 卷:起-止页.

(2) 专著:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 书名(版次)[文献标识码]. 出版地:出版者, 出版年:起-止页.

(3) 论文集:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 文题[文献标识码]. 见(In):著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 论文集, 出版地:出版者, 出版年:起-止页.

文献标识码按:期刊[J]、专著[M]、论文集[C]、标准[S]、学位论文[D]。