

鲁西黄牛 α 干扰素基因的克隆及表达

张永红^{①②} 王长法^① 杨少华^① 高运东^① 李爱芹^① 王洪梅^① 李景鹏^② 仲跻峰^{①*}

(^① 山东省农业科学院奶牛研究中心 济南 250100 ;^② 东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030)

摘要 :提取黄牛血液基因组 DNA ,PCR 扩增 α 干扰素基因 ,重组到 pET32a+ 表达载体中。测序结果表明 ,扩增片段含有 498 bp 的 ORF ,可编码 166 个氨基酸的成熟蛋白 ,与已报道的牛 α 干扰素 C 亚型氨基酸组成同源率为 97.6%。构建原核表达载体 pET32a+ /BoIFN- α ,SDS-PAGE 分析蛋白质表达水平 ,IPTG 诱导后表达的融合蛋白分子量为 40 ku ,表达量占菌体总蛋白的 26.7%。结果从鲁西黄牛中克隆了 IFN- α 基因的一种新亚型 ,即 BoIFN- α C2 ,构建原核表达质粒 ,并实现了高效表达 ,为重组牛干扰素的开发奠定了基础。

关键词 :黄牛 ; α 干扰素基因 ;克隆 ;表达

中图分类号 :R392.11 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2007)01-102-05

Cloning and Expression of IFN- α Gene in Luxi Yellow Cattle

ZHANG Yong-Hong^{①②} WANG Chang-Fa^① YANG Shao-Hua^① GAO Yun-Dong^①

LI Ai-Qin^① WANG Hong-Mei^① LI Jing-Peng^② ZHONG Ji-Feng^{①*}

(^① Research Center of Dairy Cattle ,Shandong Academy of Agricultural Science ,Jinan 250100 ;

^② College of Life Science ,Northeast Agricultural University ,Harbin 150030 ,China)

Abstract Interferon α gene was cloned from genomic DNA of Chinese Luxi yellow cattle by PCR ,and the PCR product was inserted into vector pET32a+ to make a recombinant plasmid pET32a+ /BoIFN- α . The expression of BoIFN- α in *Escherichia coli* was induced by addition of IPTG. Sequence analysis showed that the Chinese Luxi yellow cattle IFN- α gene was composed of 498 nucleotides encoding a mature polypeptide of 166 amino acids. Compared to other BoIFN- α subtypes it shared the highest identity of 97.6% with the C-subtype. SDS-PAGE results showed that recombinant protein ,with a molecular weight of 40 ku ,was expressed in inclusion bodies in *E. coli* and the recombinant protein accounted for 26.7% of the total proteins. The results show that the expression plasmid is successfully constructed and BoIFN- α C2 protein is expressed in *E. coli*.

Key words :Yellow Cattle ;Interferon- α gene ;Cloning ;Expression

干扰素(interferon ,IFN)是一类具有高活性、多功能的蛋白 ,具有广谱抗病毒、抗肿瘤及免疫调节功能^[1]。牛干扰素分为 I 型和 II 型 ,其中 I 型干扰素又分为 α 、 β 、 ω 、 τ 亚型 ,均为无内含子的单拷贝或多拷贝基因 ,并具有广谱抗病毒作用^[2]。以人 IFN- α 基因为探针从牛的 cDNA 文库中克隆了牛 IFN- α 基因(BoIFN- α) ,推测 BoIFN- α 至少有 10~12 个亚型 ,并测序了其中 A、B、C、D 亚型^[3,4]。Chaplin^[5]等从病毒感染的

肠上皮细胞中克隆了 BoIFN- α E 亚型 ,并进行了重组表达研究 ;Paul^[6]等克隆了 G、F、H 亚型 ;史喜菊等^[7]重组表达了 I、J 亚型。

基金项目 山东省农科院博士基金项目(No. 2005YQ0036) ,山东省良种工程项目(No. 2003-3009) ;

* 通讯作者 ,E-mail :wcf1967@yahoo.com.cn ;

第一作者介绍 张永红 ,女 ,硕士研究生 ;主要从事分子生物学和基因工程研究。

收稿日期 2006-07-12 ,修回日期 2006-11-09

近年来,由于病毒感染引发的奶牛传染性疾病发病率明显增加,给奶牛养殖业造成了较大危害。而相关重组牛干扰素在抗水泡性口炎病毒、口蹄疫病毒、牛病毒性腹泻病毒、呼吸道合胞体病毒研究中均有较好效果^[8-11]。为获得具有自主知识产权的牛重组干扰素类制品,本文克隆了鲁西黄牛 IFN- α 基因,重组到 pET32a + 表达载体,在大肠杆菌中进行高效表达研究。

1 材料与方 法

1.1 材料 pMD18-T 载体、各种工具酶购自 TaKaRa 公司, BL21(DE3) 为本实验室保存,回收试剂盒购自 U-gene 公司, pET32a + 载体购自 Novagen 公司。

1.2 引物 根据 BoIFN- α 基因序列 (Accession number M10954) 以及酶切位点分析,在其开放阅读框 (ORF) 两侧设计一对引物,由 Sangon 公司合成。上游引物:5'-CCGGATCCTGCCACCTG-CCTCACACC-3', 包含一个 *Bam*H I 酶切位点;下游引物:5'-TCAAGCTTGTCTTTCTCCTGAA-CTCTC-3', 包含一个 *Hind* III 酶切位点。

1.3 BoIFN- α 基因重组克隆质粒的构建 按常规方法提取鲁西黄牛血液基因组 DNA,进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系总体积为 20 μ l, 含上下游引物各 0.5 μ l (20 pmol/ μ l)。反应条件 95 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 69 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳回收,连接 pMD18-T, 构建重组质粒 pMD18-T/BoIFN- α , 将重组质粒转入大肠杆菌 JM109, 经氨苄青霉素 (AMP) 抗性、半乳糖苷酶蓝白斑筛选, *Bam*H I、*Hind* III 双酶切鉴定以及 PCR 鉴定。

1.4 BoIFN- α 序列分析 将鉴定正确的重组质粒送 Sangon 公司测序,采用 BLAST 进行同源性比较。

1.5 BoIFN- α 基因重组表达质粒的构建

*Bam*H I、*Hind* III 双酶切 pMD18-T/BoIFN- α , 回收 500 bp 片段, pET32a + 进行同样酶切, T4 DNA 连接酶连接, 构建重组表达质粒 pET32a + /BoIFN- α 。将重组质粒进行 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切鉴定以及 PCR 鉴定。

1.6 BoIFN- α 基因表达、SDS-PAGE 分析 将重组质粒 pET32a + /BoIFN- α 和 pET32a + 载体分别转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 经氨苄青霉素抗性筛选挑取单个阳性菌落, 接种于 3 ml LB 液体培养基^[12], 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 在 OD₆₀₀ 为 0.6 时加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 30 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 收集菌体, 煮沸裂解变性用于 SDS-PAGE^[13], 同时设不加 IPTG 诱导的对照组。采用 15% 分离胶、5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE, 鉴定表达产物。

2 结 果

2.1 牛 IFN- α 基因的克隆 以牛血液 DNA 为模板, PCR 扩增特异性片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 在 500 bp 处有一条特异的 DNA 条带 (图 1), 与报道的 BoIFN- α 大小相近。回收该片段, 重组到 pMD18-T 载体中, 酶切、测序鉴定。

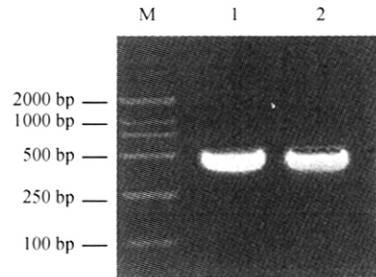


图 1 BoIFN- α PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of BoIFN α gene
M. DL 2000 DNA 分子量标准; 1, 2. PCR 产物。
M. Marker DL2000; 1, 2. PCR product.

2.2 序列分析 黄牛 IFN- α 基因测序结果以及推导的氨基酸序列如图 2 所示, 克隆的基因 ORF 为 498 bp (Accession number DQ396807), 编码 166 个氨基酸的成熟多肽, 无糖基结合位点, 与已报道的 BoIFN- α C 亚型核苷酸序列的同源性为 98.6%, 有 7 个碱基发生了变异, 氨基酸序列同源性为 97.6%。BoIFN- α 各亚型氨基酸序列同源性比较如表 1 所示。

表 1 BoIFN α 各亚型核苷酸和氨基酸序列同源性比较

Table 1 Alignment of amino acid sequences of Luxi yellow cattle BoIFN α with other BoIFN α subtypes

IFN- α	IFN- α	IFN- α	IFN- α	IFN- α	IFN- α	IFN- α	IFN- α	IFN- α	IFN- α	IFN- α	IFN- α
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Luxi	
IFN- α A	92.8	92.2	91.0	95.2	92.8	91.6	92.2	94.2	94.0	93.4	
IFN- α B	95.4		92.8	92.8	94.6	91.0	94.0	95.2	92.8	93.4	
IFN- α C	95.4	95.6		92.8	92.2	91.0	94.0	91.6	92.8	94.0	
IFN- α D	94.6	95.6	95.8		92.2	91.0	94.0	93.4	92.2	91.6	
IFN- α E	97.2	95.4	95.4	94.2		91.6	91.6	94.6	92.8	94.0	
IFN- α F	95.2	94.4	94.8	94.4	94.4		91.0	91.0	93.4	91.6	
IFN- α G	94.0	95.0	95.8	94.6	93.6	94.0		94.0	92.8	91.6	
IFN- α H	95.2	97.0	95.4	97.0	95.2	94.6	94.8		92.8	94.0	
IFN- α I	97.0	96.2	96.6	95.4	96.2	95.0	94.4	96.4		93.4	
IFN- α J	96.4	95.4	96.0	95.6	95.2	95.6	95.0	95.8	96.8		
IFN- α Luxi	96.0	96.0	98.6	96.4	95.6	96.4	94.4	95.0	97.2	96.2	

左下方为核苷酸序列同源性,右上方为氨基酸序列同源性。

The left lower part shows nucleotide sequence identities and the right upper part shows amino acid sequence identities.

1	TGCCACCTGCCTCACACCCACAGCCTGGCCAACAGGAGGGTCTGATGCTCCTGGGACAA
1	C H L P H T H S L A N R R V L M L L G Q
61	CTGAGGAGGGTCTCCCTTCTCCTGCCTGCAGGACAGAAATGACTTCGCATCCCCACAG
21	L R R V S P S S C L Q D R N D F A F P Q
121	GAGGCGTGGGTGGCAGCCAGTTGCAGAAGGCTCAAGCCATCTCTGTGCTCCACGAGGTG
41	E A L G G S Q L Q K A Q A I S V L H E V
181	ACCCAGCACACCTTCCAGCTTTTCAGCACAGAGGGCTCGGCCACTACGTGGGATGAGAGC
61	T Q H T F Q L F S T E G S A T T W D E S
241	CTCCTGGACAAGTCCCGCTGCACTGGATCAGCAGCTCACTGACCTGCAAGCCTGTCTG
81	L L D K L R A A L D Q Q L T D L Q A C I
301	AGGCAGGAGGAGGAGTGCAGGAGCTCCCTGCTCAAGGAGGACTCCAGCCTGGCTGTG
101	R Q E E E L Q G A P L L K E D S S L A V
361	AGGAAACTTCCACAGACTCACTCTCTATCTGCAAGAGAAGAAACACAGCCCTTGTGCC
121	R K Y F H R L T L Y L Q E K K H S P C A
421	TGGGAGGTTGTCAGAGCACAAGTCATGAGAGCCTTCTCTCCCTCAACAACTTGCAGGAG
141	W E V V R A Q V M R A F S S S T N L Q E
481	AGTTTCAGGAGAAAGGAC
161	S F R R K D

图 2 鲁西黄牛 IFN- α 基因测序结果以及推导的氨基酸序列

Fig.2 The nucleotide and predicted amino acid sequences of BoIFN α gene in Luxi yellow cattle

2.3 重组表达质粒的构建与鉴定 将所克隆的 BoIFN- α 重组入 pET32a+, 构建原核表达质粒 pET32a+ /BoIFN- α , 经 BamH I、Hind III 双酶切后可见在 500 bp 处有一条特异的 DNA 条带, 而且 PCR 扩增出 500 bp 特异条带(图 3), 说明重组质粒构建正确。

2.4 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE 结果如图 4 所示, IPTG 诱导株在 40 ku 左右表达 1 条特异蛋白带, 与预测分子量一致。经 BandScan 5.0 分析, 蛋白产量约占菌体总蛋白的 26.7%。经蛋白可溶性分析, 所表达蛋白以包涵体形式存在, 包涵体占沉淀蛋白的 30.9%。

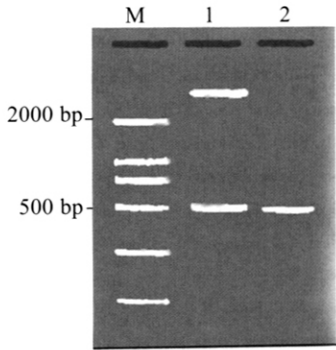


图 3 重组表达质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

Fig.3 Digestion and PCR identifications of recombinant plasmid pET32a + /BoIFN- α

M. DL2000 DNA 分子量标准;

1. *Bam*H I、*Hind*III 双酶切鉴定; 2. PCR 鉴定。

M. Marker DL2000; 1. Digestion identifications with *Bam*H I and *Hind*III; 2. PCR identifications.

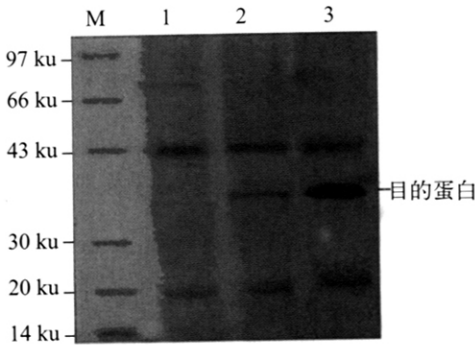


图 4 SDS-PAGE 分析 rBoIFN α 表达

Fig.4 Expression of rBoIFN α analyzed by SDS-PAGE

M. 蛋白分子量标准; 1. pET32a + 表达; 2. 无 IPTG 诱导 rBoIFN α 表达; 3. IPTG 诱导 rBoIFN α 表达。

M. Protein molecular standard marker; 1. Expression of pET32a + ; 2. Expression of rBoIFN α without IPTG; 3. Expression of rBoIFN α by IPTG induction.

3 讨 论

干扰素有广谱抗病毒、抑制细胞增殖以及提高免疫功能等作用。由于病毒病一直困扰着我国的养牛业,造成巨大的经济损失,因此奶牛业生产中需要干扰素类广谱抗病毒生物制剂来治疗和加强疫苗的免疫效果。本研究从鲁西黄

牛血液中扩增出了 α 干扰素基因,测序结果显示该基因与已报道的 BoIFN- α 基因长度完全一致,由 498 bp 编码 166 个氨基酸的成熟多肽,含一个 ORF^[3,4]。与已报道的 BoIFN- α C 亚型相比,4 个氨基酸发生了点变异,第 75 位 Met \rightarrow Thr,第 86 位 Asp \rightarrow Ala,第 97 位 Phe \rightarrow Ala,第 135 位 Arg \rightarrow Lys,同源性为 97.6%,与其他几个亚型氨基酸序列同源性在 91.0% ~ 95.2% 之间,与我国史喜菊等人克隆的荷斯坦奶牛、晋南黄牛、福安水牛、富钟水牛的 IFN- α 氨基酸同源性分别为 92.8%、93.9%、97.2%、96.2%^[14,15]。根据国际干扰素命名委员会建议,在一特定的干扰素型别内,有氨基酸序列或组成方面的差异时可确定为亚型,鲁西黄牛 IFN- α 基因是一种新亚型,即 BoIFN- α C2,在 GenBank 中登录号为:DQ396807。

在构建表达载体时,考虑到真核生物的信号肽在原核生物中进行表达时大部分不具有分泌功能,干扰素的信号肽蛋白可能会影响到重组干扰素的生物学活性。本研究克隆了牛 α 干扰素成熟蛋白基因,并在宿主菌 BL21 (DE3) 中表达,从而避免了信号肽对成熟蛋白生物活性的影响。

经软件分析,所得基因序列内部无 *Bam*H I、*Hind*III 酶切位点,pET32a + /BoIFN- α 经上述两种酶切后,不会影响基因序列编码区的内部结构。原核表达载体 pET32a + ,含 T7 启动子和转录终止信号,其特点除了能够编码 6 个组氨酸残基外,还带有大肠杆菌 TrxA 基因。TrxA 基因编码 109 个氨基酸的硫氧还蛋白,外源基因经多克隆位点插入后与 TrxA 一起融合表达。外源蛋白与硫氧还蛋白融合表达不仅提高了表达产物的稳定性,而且由于分子量增大,经 SDS-PAGE 分析时更容易鉴定。此外,外源蛋白与硫氧还蛋白之间具有肠激酶和凝血酶的识别位点,因而分离外源蛋白也非常方便。

构建正确的重组质粒 pET32a + /BoIFN- α 转化 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 分析^[13]发现在 40 ku 处表达出了一条特异的融合蛋白带,分子量与所推测的 BoIFN- α 大小相符,

蛋白产量约占菌体总蛋白的 26.7%。本研究率先在我国克隆了鲁西黄牛干扰素基因,并在大肠杆菌中成功表达了牛重组干扰素蛋白,为重组牛干扰素的临床应用打下了基础。

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. *中国药业* 2001, **10**(10):11 ~ 13.
- [2] Roberts R, Liu L M, Guo Q T, *et al.* The evolution of the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res*, 1998, **18**(10):805 ~ 816.
- [3] Baruch V, Sara C, Haim G, *et al.* Bovine interferon α genes. *J Biol Chem*, 1985, **260**(9):5 498 ~ 5 504.
- [4] Daniel C, Michael S, David G. Two distinct families of human and bovine interferon- α genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol Cell Biol*, 1985, **5**(4):768 ~ 779.
- [5] Chaplin P J, Entran G, Gelder K I, *et al.* Cloning and biologic activities of a bovine interferon- α isolated from the epithelium of a rotavirus-infected calf. *J Interferon Cytokine Res*, 1996, **16**(1):25 ~ 30.
- [6] Paul J C, Keith R P, Robert A C. The cloning of cattle interferon-subtypes isolated from the gut epithelium of rotavirus-infected calves. *Immunogenetics*, 1996, **44**(2):143 ~ 145.
- [7] 史喜菊,夏春,汪明. 水牛干扰素基因的克隆与表达及其抗病毒活性. *农业生物技术学报*, 2004, **12**(3):288 ~ 293.
- [8] Charleston B, Fray M D, Baigent S, *et al.* Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gene Virol*, 2001, **82**(8):1 893 ~ 1 897.
- [9] Perler L, Schweizer M, Jungi T, *et al.* Bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and independent pathways. *J Gene Virol*, 2000, **81**(4):881 ~ 887.
- [10] Jarasvech W C, Maria E P, Marvin J G, *et al.* Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon. *J Virol*, 1999, **73**(12):9 891 ~ 9 898.
- [11] Esparza I, Gonzalez J C, Vinuela E. Effect of interferon- α , interferon- γ and tumour necrosis factor on African swine fever virus replication in porcine monocytes and macrophages. *J Gene Virol*, 1988, **69**(12):2 973 ~ 2 980.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3th ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 103 ~ 105.
- [13] 汪明,吴志光,夏春. 肉鸡 IFN- α 基因的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达. *农业生物技术学报*, 2000, **8**(4):377 ~ 381.
- [14] 史喜菊,夏春,汪明. 晋南黄牛 IFN- α 基因的克隆、表达及抗病毒活性研究. *中国预防兽医学报*, 2004, **26**(2):110 ~ 114.
- [15] 史喜菊,夏春,汪明. 荷斯坦奶牛 IFN- α 基因的克隆表达和抗病毒活性分析. *中国兽医杂志*, 2004, **40**(1):13 ~ 17.