

王永娟, 郭艳丽, 吴植, 等. 重组鸭 α -干扰素的抗病毒活性[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1402-1406.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.06.019

重组鸭 α -干扰素的抗病毒活性

王永娟¹, 郭艳丽^{1,2}, 吴植¹, 王安平¹, 郭长明¹, 吴双¹, 洪伟鸣¹, 秦枫¹, 朱善元¹

(1. 江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室, 江苏泰州 225300; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210000)

摘要: 本研究参考大肠杆菌密码子的偏好性, 对 GenBank 中已经发表的鸭 α -干扰素基因序列进行优化, 人工合成后与原核表达载体 pET30a-ELP 连接, 构建原核表达质粒 pET30a-DuIFN α -ELP。将重组表达质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, IPTG 诱导表达重组蛋白 DuIFN α -ELP。根据类弹性蛋白多肽 (ELP) 具有温度敏感的可逆相变特性, 通过重复可逆相变循环 (ITC) 纯化重组蛋白质; 纯化的蛋白质主要以包涵体的形式存在, 通过变性、复性处理后, 采用细胞病变抑制法分别在 MDCK/VSV 和 DEF/VSV 中检测重组蛋白质的抗病毒活性。结果表明, 合成的重组鸭 α -干扰素基因能成功表达, 重组蛋白 DuIFN α -ELP 分子质量约 80 000, 纯化后的重组蛋白质纯度约 90%。通过抗病毒试验检测重组 DuIFN α -ELP 在 MDCK/VSV 系统中的抗病毒活性为 1.0×10^6 U/ml, 比活性为 1.25×10^6 U/mg; 在 DEF/VSV 系统中的抗病毒活性为 1.0×10^7 U/ml, 比活性为 1.25×10^7 U/mg, 比 MDCK/VSV 系统中活性高 10 个单位, 验证了干扰素的抗病毒活性与受体细胞的应答可能存在一定关系。这一研究结果为鸭 α -干扰素防治禽类病毒性疾病的探索奠定了基础。

关键词: 鸭; α -干扰素; 原核表达; 纯化; 抗病毒活性

中图分类号: S858.32; S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2019)06-1402-05

Antiviral activity of recombinant duck α -interferon

WANG Yong-juan¹, GUO Yan-li^{1,2}, WU Zhi¹, WANG An-ping¹, GUO Chang-ming¹, WU Shuang¹, HONG Wei-ming¹, QIN Feng¹, ZHU Shan-yuan¹

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Veterinary Bio-pharmaceutical High Tech Research, Taizhou 225300, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210000, China)

Abstract: With reference to the codon preference of *Escherichia coli*, the duck α -interferon gene sequence published in GenBank, after artificial synthesis, it was ligated with prokaryotic expression vector pET30a-ELP to construct prokaryotic expression plasmid pET30a-DuIFN α -ELP. The recombinant expression plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), induced by IPTG for DuIFN α -ELP expression. According to the temperature-sensitive reversible phase transition

property of elastin-like polypeptide (ELP), the recombinant protein was purified by repeated inverse transition cycling (ITC). The purified protein mainly existed in the form of inclusion bodies. After denaturation and renaturation treatment, the antiviral activity of the recombinant protein was detected in MDCK/VSV and DEF/VSV by micro-cytopathic inhibition method. The results showed that the recombinant α -interferon gene could be successfully expressed. The molecular weight of recombinant protein DuIFN α -ELP was about 80 000, and the purity of the puri-

收稿日期: 2019-04-10

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (19KJA520008);
江苏农牧科技职业学院横向配套课题 (NSFPT201710);
2017 年省高校协同创新中心立项课题 (NSFKF201705);
江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(18)1004]

作者简介: 王永娟 (1980-), 女, 江苏海门人, 博士, 教授, 主要从事动物传染病与生物制药研究。 (E-mail) 43088591@qq.com。
郭艳丽为共同第一作者。

通讯作者: 朱善元, (E-mail) jstzsy126.com

fied recombinant protein was about 90%. Antiviral assay showed that the antiviral activity of recombinant DuIFN α -ELP in MDCK/VSV system was 1.0×10^6 U/ml, the specific activity was 1.25×10^6 U/mg. The antiviral activity in DEF/VSV system was 1.0×10^7 U/ml, specific activity was 1.25×10^7 U/mg, which was 10 units higher than the activity in the MDCK/VSV system. It is verified that the antiviral activity of interferon may be related to the response of recipient cells. These results lay the foundation for the exploration of duck α -interferon in the clinical prevention and treatment of avian viral diseases.

Key words: duck; α -interferon; prokaryotic expression; purification; antiviral activity

干扰素(Interferon, IFN)是一类具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等多种生物学功能的糖蛋白^[1-5]。目前国内外关于禽类干扰素的研究比较多的主要是 I 型和 II 型干扰素, IFN- α 是 I 型干扰素, 在所有干扰素中 IFN- α 的抗病毒活性最为突出^[6-7]。中国是养鸭大国, 近年来鸭养殖业一直在稳步增长, 但是由于养殖环境与技术相对落后, 导致鸭病毒性传染病(如鸭瘟、鸭呼肠孤病毒、鸭坦布苏病毒、鸭病毒性肝炎等)威胁着鸭养殖业的发展^[8]。禽类干扰素具有广谱、高效、安全等优点, 现已有部分应用于临床并得到了较好的防治效果^[9-10]。目前关于鸭干扰素的研究虽已取得一些成果, 但存在表达量低、纯化难、抗病毒活性不高、操作繁琐、成本较高、难以实现规模化等问题, 有待进一步探究。

类弹性蛋白多肽(Elastin-like polypeptide, ELP)具有温度敏感的可逆相变特性^[11], 当达到临界温度时溶解度降低, 以聚合物的形式从溶液中析出, 能够帮助实现外源蛋白质的纯化^[12], 能够增加外源蛋白质的可溶性表达^[13], 可以延长蛋白质半衰期, 作为药物的传送载体^[14]。因此, 本研究合成鸭 α -干扰素(DuIFN- α)基因, 并与 ELP 融合表达, 旨在实现鸭 α -干扰素的高效可溶表达。根据 ELP 的特性, 经重复可逆相变循环(Inverse transition cycling, ITC)纯化重组蛋白质, 通过细胞病变抑制法在不同细胞中检测 DuIFN- α 的抗病毒活性, 为研制新型的安全高效的鸭干扰素制品以及探索鸭 α -干扰素在临床防治禽类病毒性疾病的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

限制性内切酶 *Bam* H I、*Nde* I、*Xho* I 购自 Thermo Fisher Scientific 公司, T4 DNA 连接酶、1 kb DNA marker、Prestained protein 分子量 Marker 购自 Fermentas 公司, 质粒小量提取试剂盒购自 TaKaRa 公司, 胶回收试剂盒、SDS-PAGE 电泳试剂盒、包涵体

纯化溶解试剂盒均购自康为世纪公司, FM 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 菌株、载体、病毒及细胞

DH5 α 感受态细胞、BL21(DE3)感受态细胞购自康为世纪公司, pET30a-ELP 载体和 VSV(水疱性口炎病毒)由扬州大学孙怀昌教授惠赠, 鸭成纤维细胞(DEF)和犬肾细胞(MDCK)由本实验室保存。

1.3 基因序列的设计合成

由于鸭干扰素序列相对保守, 依据大肠杆菌密码子的偏爱性, 参考 GenBank 已经发表的鸭 α -干扰素基因序列(登录号: DQ864757)进行序列优化, 并在两端引入酶切位点 *Bam* H I 和 *Nde* I, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成目的基因并与 pUC57 载体连接。

1.4 基因序列的克隆与测定

重组质粒 pUC57-DuIFN α 经 *Bam* H I 和 *Nde* I 限制性内切酶双酶切鉴定, 用胶回收试剂盒对 DuIFN α 片段回收, 并与同样经 *Bam* H I 和 *Nde* I 双酶切处理的 pET30a-ELP 载体 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 用 *Xho* I 和 *Nde* I 双酶切筛选疑似阳性克隆, 经鉴定正确的重组质粒 pET30a-DuIFN α -ELP 进行序列测定。

1.5 目的基因的诱导表达

将 pET30a-DuIFN α -ELP 重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 挑取阳性克隆过夜培养, 转接种培养 2 h 至菌液 OD_{600} 达到 0.6, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温诱导培养 8 h 后离心收集菌体, 低温条件下超声破碎细菌, 高速离心取上清液。

1.6 纯化重组蛋白质

超声破碎后的菌体裂解液低温高速离心, 取上清液分别加入等体积的 NaCl 溶液, 使盐离子终浓度分别为 2 mol/L、3 mol/L, 分别在 28 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 10 min, 盐离子处理后的混合液在室温下高

速离心,弃上清液,沉淀即为初步纯化的 DuIFN α -ELP。用预冷的 PBS 重悬析出的重组蛋白质,经 8% 的 SDS-PAGE 分析,比较可沉降最高浓度目的蛋白质的最佳盐浓度与温度^[7-8]。

1.7 包涵体变性、复性

初步纯化的 DuIFN α -ELP 不溶于 PBS 溶液,以包涵体的形式存在。低温高速离心弃上清液,沉淀用含 8 mol/L 尿素和蛋白酶抑制剂的包涵体溶解液室温变性 1 h^[9]。变性后的样品低温超高速离心,取上清液 DuIFN α -ELP,加入预冷的复性液(50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L GSSG、1 mmol/L GSH),使尿素终浓度为 0.1 mol/L^[10],放置于 4 ℃ 冰箱过夜复性。复性后的纯化蛋白质经鉴定后用 0.22 μ m 滤器过滤除菌,保存于-80 ℃ 备用。

1.8 重组蛋白质的抗病毒活性分析

1.8.1 水疱性口炎病毒(VSV)的 $TCID_{50}$ 测定 将生长状态良好的 MDCK 细胞和 DEF 细胞分别接种于 96 孔板,待细胞长成单层后,每孔接入 100 μ l 由相应培养基 10 倍梯度稀释的 VSV,每个梯度设置 8 个重复。置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱培养 2 h 后弃掉含病毒的细胞培养液,每孔接入 100 μ l 细胞维持液继续培养,同时设置不加病毒的阴性对照组。在倒置显微镜下观察并记录细胞病变的情况,直至细胞状态不再变化时,根据 Read-Muench 法计算 VSV 的 $TCID_{50}$ 。

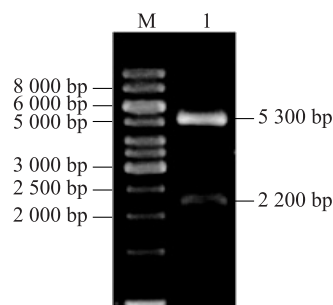
1.8.2 重组蛋白质抗病毒活性检测 待生长状态良好的 MDCK 细胞和 DEF 细胞接种于 96 孔板长成单层后,分别加入 10 倍梯度稀释的复性 DuIFN α -ELP,每孔 100 μ l,每个梯度 4 个重复,在 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱共孵育 18 h 后弃掉含蛋白质的培养液,每孔接入 100 μ l 含 100 $TCID_{50}$ 的 VSV,同时设置阴性对照组(只加梯度稀释的 DuIFN α -ELP),阳性对照组(只加 VSV)和空白对照组(不加 DuIFN α -ELP,也不加 VSV)^[11-12]。继续培养 18 h 后开始记录细胞病变情况,以阳性对照组 75% 以上的细胞出现病变时,试验组能保护 50% 细胞不发生病变的最高稀释度作为一个活性单位(U),根据 Read-Muench 法计算 DuIFN α -ELP 的抗病毒活性^[13-14]。

2 结果

2.1 重组基因的克隆

重组表达质粒 pET30a-DuIFN α -ELP 双酶切后

的产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果见图 1。图 1 显示,出现与预期大小相符的 2 个条带,分别约为 5 300 bp 和 2 200 bp。序列分析结果表明,克隆的基因序列与优化后的 GenBank 中已发表鸭 α -干扰素(DQ864757)的基因序列同源性为 100%,重组质粒构建成功。



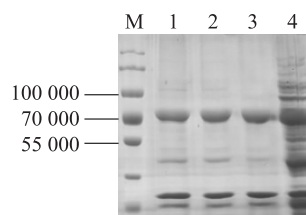
M: 1 kb DNA ladder; 1: *Xho* I/*Nde* I 双酶切 pET30a-DuIFN α -ELP。

图 1 pET30a-DuIFN α -ELP 双酶切鉴定

Fig.1 pET30a-DuIFN α -ELP double enzyme digestion identification map

2.2 重组蛋白质纯化

诱导的蛋白质上清液与终浓度为 2 mol/L、3 mol/L 的 NaCl 分别在 28 ℃、30 ℃ 水浴,初步纯化的样品经 8% 的 SDS-PAGE 分析,结果表明,重组蛋白质成功表达,大小为 80 000,不同纯化条件下目的产物的含量没有显著差异,ELP 的临界温度为 28~30 ℃。通过一轮可逆相变循环, DuIFN α -ELP 得到初步纯化,但是仍然存在一些杂蛋白质(图 2)。



M: Protein marker; 1: 2 mol/L NaCl/28 ℃ 纯化; 2: 3 mol/L NaCl/28 ℃ 纯化; 3: 3 mol/L NaCl/30 ℃ 纯化; 4: 重组菌诱导上清液。

图 2 重组蛋白 DuIFN α -ELP 纯化结果

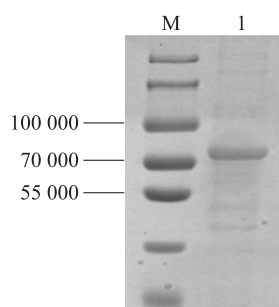
Fig.2 Purification results of recombinant protein DuIFN α -ELP

2.3 纯化产物结果鉴定

初步纯化后的表达产物经过变性、复性后, SDS-PAGE 结果显示重组蛋白质纯度约 90%(图 3)。蛋白质定量软件测得纯化产物质量浓度为 0.8 mg/ml。

2.4 重组蛋白质的抗病毒活性检测

经检测 VSV 在 MDCK 细胞上的 $TCID_{50}$ 为 1 ml



M: Protein marker; 1: 纯化产物 DuIFN α -ELP。

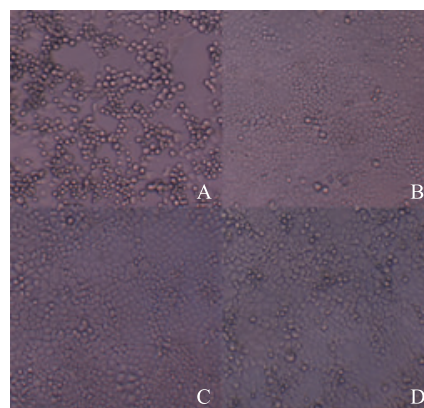
图3 重组蛋白 DuIFN α -ELP 复性后的产物鉴定

Fig.3 Product identification after renaturation of recombinant protein DuIFN α -ELP

$10^{-5.83}$, 在 DEF 细胞上的病毒滴度为每 1 ml $10^{-7.17}$ 。采用细胞病变抑制法检测复性后的重组蛋白质 DuIFN α -ELP 的抗病毒活性, 结果表明重组蛋白质在 MDCK 和 DEF 上均能抵抗 VSV, 具有抗病毒活性。阴性对照组(图 4C、图 5C)较空白对照组(图 4B、图 5B)和阳性对照组(图 4A、图 5A)没有发生病变, 说明重组 DuIFN α -ELP 自身对 MDCK 细胞与 DEF 细胞没有毒副作用。试验组(图 4D、图 5D)较阳性对照组(图 4A、图 5A)没有发生显著的病变, 说明重组蛋白质 DuIFN α -ELP 对接入 VSV 的 MDCK 细胞和 DEF 细胞具有保护作用, 重组蛋白质 DuIFN α -ELP 具有抗病毒活性。经 Read-Muench 法计算, DuIFN α -ELP 在 MDCK/VSV 中的抗病毒活性为 1.0×10^6 U/ml, 比活性为 1.25×10^6 U/mg; 在 DEF/VSV 中的抗病毒活性为 1.0×10^7 U/ml, 比活性为 1.25×10^7 U/mg, 活性比在 MDCK/VSV 中高 10 个单位。

3 讨论

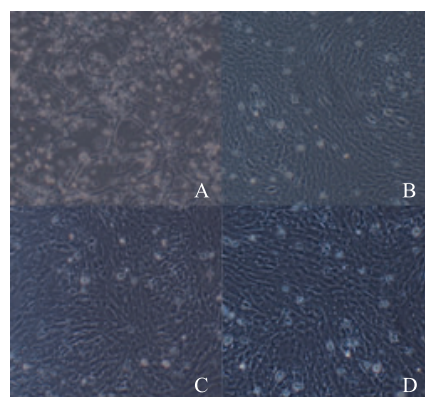
ELP 具有温度敏感的可逆相变特性^[11], 在低于临界温度时以可溶形式溶解在缓冲液中, 随着温度升高溶解度逐渐下降, 到达临界温度时开始集聚, 从溶液中析出; 同时通过增大 ELP 与水分子之间的表面张力, 例如增加溶液中的盐离子浓度, 提高溶液中的离子强度, 进而使目标蛋白质集聚析出^[8]。因此基于 ELP 温敏特性并增加盐离子浓度, 经离心便可以分离纯化目的蛋白质, 操作简单且成本较低。另外, 由于 ELP 可以延长蛋白质半衰期, 提高在动物体内的稳定性^[15], 也被用作体内药物传送的载体^[16-18]。目前大多数重组干扰素都是通过亲和层



A: 阳性对照; B: 空白对照; C: 阴性对照; D: 试验组。

图4 重组蛋白质 DuIFN α -ELP 在 MDCK/VSV 系统中抗病毒活性

Fig.4 Antiviral activity of recombinant protein DuIFN α -ELP in MDCK/VSV system



A: 阳性对照; B: 空白对照; C: 阴性对照; D: 试验组。

图5 重组蛋白质 DuIFN α -ELP 在 DEF/VSV 系统中抗病毒活性

Fig.5 Antiviral activity of recombinant protein DuIFN α -ELP in DEF/VSV system

析进行纯化^[19-21], 操作繁琐, 成本较高, 且难以实现规模化, 而且重组干扰素的半衰期比较短, 难以长时间在体内维持其抗病毒活性。因此本研究设计并表达了融合蛋白 DuIFN α -ELP, 利用 ELP 的温敏特性使下游蛋白质纯化过程得以简化, 大大降低了纯化的成本。融合蛋白 DuIFN α -ELP 实现了高效、可溶表达, 通过简单的可逆相变循环纯化蛋白质, 得到的目的蛋白质纯度较高, 达到约 90%; 重组蛋白质的抗病毒活性最高达到 1.0×10^7 U/ml。以上研究结果充分体现了 ELP 的功能优势。

本研究采用经典的稀释法^[22]对变性蛋白质进

行复性,通过加入复性缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L GSSG、1 mmol/L GSH)稀释变性蛋白质溶液,使尿素终浓度为0.1 mol/L以降低变性剂的浓度。同时,复性液中含有GSSG和GSH,这2种低分子质量的含巯基的化合物提供了合适的氧化还原电位,创造了蛋白质正确折叠的环境,从而提高二硫键正确配对的产率^[23],促使蛋白质正确折叠。采用经典的稀释法对蛋白质进行复性,操作简单且效果较好。

干扰素的抗病毒活性与很多因素有关,比如机体自身免疫力、受体细胞的应答等,同种亚型的干扰素在不同受体细胞上测得的活性会有很大差异^[24],不同亚型在相同的受体细胞上测得的效价也不尽相同。本研究采用细胞病变抑制法在MDCK细胞中接入VSV测定重组鸭 α -干扰素的抗病毒活性为 1.0×10^6 U/ml,比活性为 1.25×10^6 U/mg。进一步探究用同种属DEF细胞进行生物学活性测定,在DEF细胞中接入VSV测得重组鸭 α -干扰素抗病毒活性为 1.0×10^7 U/ml,比活性为 1.25×10^7 U/mg,比在MDCK中活性高10个单位。本研究结果进一步验证了干扰素的抗病毒活性与受体细胞的应答可能存在一定关系。

参考文献:

- [1] GAO P, XIANG B, LI Y L, et al. Therapeutic effect of duck interferon-alpha against h5n1 highly pathogenic avian influenza virus infection in peking ducks [J]. Journal of Interferon & Cytokine Research: the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 2018, 38(4): 145-152.
- [2] NARAYAN R, BURONFOSSE T, SCHULTZ U, et al. Rise in gamma interferon expression during resolution of duck hepatitis B virus infection [J]. Journal of General Virology, 2006, 87(11): 3225-3232.
- [3] SCHULTZ U, SUMMERS J, STAEHEL P, et al. Elimination of duck hepatitis B virus RNA-containing capsids in duck interferon-alpha-treated hepatocytes [J]. Journal of Virology, 1999, 73(7): 5459-5465.
- [4] 高 佩, 黎玉莲, 李亚玲, 等. 鸭干扰素研究进展与应用[J]. 养禽与禽病防治, 2016(2): 6-9.
- [5] 郭建军, 曾 静, 袁 林, 等. 多角体包裹型猪 α 干扰素在昆虫细胞中的表达[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(23): 41-44.
- [6] 夏 春, 万建青, 吴志光, 等. 北京鸭I型干扰素基因分子克隆与序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2000(6): 567-570.
- [7] 阮小飞, 林常有, 杨天耀, 等. 北京鸭干扰素- α 基因的分子克隆与表达[J]. 中国兽医杂志, 2004(12): 11-13.
- [8] 高 华. 鸭病流行呈现出的新特点及预防策略[J]. 吉林畜牧兽医, 2018, 39(10): 30-32.
- [9] 吴晓莉. 干扰素的分类及其在兽医临床中的应用[J]. 养殖技术顾问, 2009(11): 125.
- [10] 杨东亮, 林永利. 干扰素的研究进展及其在动物临床中的应用[J]. 福建畜牧兽医, 2009, 31(1): 25-27.
- [11] 任艳艳, 庄嘉楠, 荣 娜, 等. 温敏类弹性蛋白多肽的基因设计及重组克隆表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(1): 56-62.
- [12] 袁 君. ELP特性研究及ELP标签在重组蛋白纯化中的应用[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [13] WANG Y J, TAN X, ZONG Y, et al. Enhancing purification and plasma stability of porcine interferon- α/γ by fusion to elastin-like polypeptide [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2018, 8(203): 60-64.
- [14] 张 敏. ELP融合犬 β 干扰素的表达、纯化、抗病毒活性及体外半衰期研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
- [15] 徐光宇. 类弹性蛋白多肽融合犬干扰素的表达、纯化和活性检测[D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
- [16] 董文凤, 毕 娟, 杜 丽, 等. 类弹性蛋白多肽在给药系统中的应用研究进展[J]. 药学服务与研究, 2013, 13(5): 321-325.
- [17] KUNA M, WALLER J P, LOGUE O C, et al. Polymer size affects biodistribution and placental accumulation of the drug delivery biopolymer elastin-like polypeptide in a rodent pregnancy model [J]. Placenta, 2018(72): 20-27.
- [18] FLETCHER E E, DANDAN Y, KOSIBA A A, et al. Biotechnological applications of elastin-like polypeptides and the inverse transition cycle in the pharmaceutical industry[J]. Protein Expression and Purification, 2019, 153: 114-120.
- [19] 吴斯宇, 孙 超, 崔 进, 等. 鸡 α 干扰素的原核表达及纯化[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(8): 29-31.
- [20] 姚凌云, 王晶宇, 欧阳伟, 等. 犬干扰素 α_2 的原核表达及抗病毒活性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(2): 59-63.
- [21] 李树启, 赵 俊, 王利利, 等. 水牛干扰素 α 的可溶性原核表达、纯化及其抗病毒活性[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(3): 272-277.
- [22] 靳 挺, 关怡新, 费峥峥, 等. 重组人 γ -干扰素包涵体稀释复性[J]. 化工学报, 2004, 55(5): 770-774.
- [23] 陈 斌. 鸭 α 干扰素原(真)核表达及其生物学活性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.
- [24] 侯云德. 干扰素的不同亚型与临床应用[J]. 中国生物制品杂志, 1993, 6(4): 145-146.

(责任编辑:陈海霞)