

秦岭大熊猫 IFN- γ 基因的表达及其生物活性分析

朱 辉¹, 马清义², 乔 琪¹, 朱小甫³, 陈德坤¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心, 陕西 周至 710402;

3 咸阳职业技术学院, 陕西 咸阳 712000)

【摘 要】 【目的】探讨大熊猫秦岭种群和四川种群 IFN- γ 基因的差异, 获得具有生物活性的秦岭大熊猫重组 γ 干扰素蛋白。【方法】采集秦岭大熊猫血样, 采用 RT-nested PCR 技术扩增秦岭大熊猫 IFN- γ 基因, 将其克隆到表达载体 pET32a 中, 转入 DH-5 α , 进行菌液 PCR 和双酶切鉴定, 经序列测定与分析, 构建表达质粒 pET32a-IFN- γ , 将其转入 BL21(DE3) 受体菌后, 用 IPTG 诱导表达秦岭大熊猫 IFN- γ 蛋白。对重组 IFN- γ 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳、Western-blot 分析后, 用镍柱亲和层析纯化可溶性蛋白。采用淋巴细胞增殖试验检测重组 IFN- γ 的活性。【结果】大熊猫秦岭种群和四川种群的 IFN- γ 基因序列在 434 位核苷酸处存在差异, 秦岭大熊猫的为 G, 而四川大熊猫的为 C; 氨基酸序列相同。重组 IFN- γ 主要以可溶性形式存在, 其分子质量为 35.3 ku, 约占菌体总蛋白的 20%; 纯化的可溶性蛋白经 SDS-PAGE 分析, 纯度可达 90% 以上; 重组 IFN- γ 具有促进淋巴细胞转化增殖的生物学活性。【结论】获得的重组 IFN- γ 蛋白表达量高且具有生物学活性。

【关键词】 秦岭大熊猫; IFN- γ 基因; 基因表达; 生物活性

【中图分类号】 S852.4; Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)12-0022-07

Expression of *Ailuropoda melanoleuca qinlingensis* interferon-gamma and bioactivity analysis of the expressed product

ZHU Hui¹, MA Qing-yi², QIAO Qi¹, ZHU Xiao-fu³, CHEN De-kun¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Rescuing&Raising Research Centre for Rare Wild Animals, Zhouzhi, Shaanxi 710402, China;

3 Xianyang Vocational Technical College, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

Abstract: 【Objective】The research was done to ascertain the difference of IFN- γ gene between Giant Pandas subspecies in Qinling and Sichuan subspecies, and obtain the recombinant IFN- γ protein with biological activity. 【Method】The IFN- γ gene of Giant Panda was amplified by RT-nested PCR and PCR products were cloned into expression vector pET32a, then transferred to *E. coli* DH-5 α . The vector pET32a-IFN- γ was obtained by PCR identification, dual-enzyme digestion and sequence analysis. pET32a-IFN- γ was transferred into *E. coli* BL21(DE3) and introduced by IPTG to express the recombinant IFN- γ . The recombinant IFN- γ protein was detected by SDS-PAGE and Western-blot, and it was further purified by Nickel-column affinity chromatography, the biological activity of the purified protein was detected by lymphocyte proliferation assay. 【Result】Sequence analysis revealed the difference of IFN- γ gene was located in 434 nucleotide, compared with Giant Pandas subspecies in Qinling, 434 nucleotide were mutated (G $\rightarrow$ C). The

* [收稿日期] 2009-04-13

[基金项目] 国家林业局大熊猫国际合作项目(WH0632)

[作者简介] 朱 辉(1977—), 男, 陕西泾阳人, 在读硕士, 主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail: zhuhui7711@163.com

[通信作者] 陈德坤(1964—), 男, 陕西渭南人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

IFN- γ gene of Giant Panda subspecies in Qinling was expressed effectively. The molecular weight of recombinant protein was about 35.3 ku, accounting for about 20% of total protein of bacterium. The recombinant IFN- γ existed in soluble form. And SDS-PAGE, the purification of the soluble recombinant protein could arrive to more than 90%. The anti-recombinant panda IFN- γ had the ability to stimulate transformation and proliferation of Lymphocyte. 【Conclusion】 The soluble recombinant IFN- γ of Giant Panda subspecies in Qinling was expressed effectively and had high biological activity.

Key words: Giant Panda in Qinling; interferon- γ gene; gene expression; bioactivity

γ -干扰素(Interferon- γ , IFN- γ), 又称免疫干扰素, 主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生, 能够激活 NK 等细胞, 调控巨噬细胞、T 和 B 细胞, 增强机体的免疫应答能力, 具有强大的免疫调节和抗病毒、抗肿瘤作用^[1-2]。重组 IFN- γ (Recombination IFN- γ , rIFN- γ) 在临床中已经初步显示了其潜在的应用价值, 如猪 rIFN- γ 能有效抑制 VSV 病毒的复制^[3]; 奶牛 rIFN- γ 对实验性大肠埃希菌引起的乳房炎具有较好的预防和控制效果^[4]; 羊 rIFN- γ 在羊细胞上对衣原体有较好的抑制作用^[5]; 重组猫 IFN- γ 能增强猫疫苗免疫后抗体的产生^[6]; 重组鸡 IFN- γ 在鸡体内有明显抵抗球虫的作用^[7]; 重组鹅成熟 IFN- γ 可以抑制鹅副黏病毒在鹅胚成纤维细胞中的增殖^[8]; 与 AIV 的 HA 基因在鸡痘病毒中共表达能够有效提高疫苗的免疫效力, 降低病毒载体的毒力^[9]。目前在国外, IFN- γ 已被广泛用于检测和诊断牛、羊副结核病^[10-11]。另外, IFN- γ 在机体内的水平高低被作为疫苗诱导细胞性应答的评定指标^[12]。

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是我国特有的濒危珍稀野生动物, 据国家林业总局最新公布的调查数字, 野生大熊猫现存 1 600 只左右, 人工圈养的大熊猫也仅有 189 只^[13]。秦岭大熊猫是大熊猫的重要种群, 具有特定的地理分布格局, 其种群数量约有 276 只, 为四川亚种种群数量的 17%^[14], 处于极度濒危状态。疾病导致的死亡是秦岭大熊猫种群数量减少的重要因素, 严重威胁其种群的健康发展。目前, 对秦岭大熊猫疾病的防治主要以药物控制为主, 而频繁用药容易导致细菌和寄生虫产生耐药性, 且药物自身存在毒副作用, 这些都给秦岭大熊猫疾病的防治及繁殖工作带来很大难度。本研究采集秦岭大熊猫血样, 采用 RT-nested PCR 技术扩增秦岭大熊猫 IFN- γ 基因, 并进行了克隆表达, 对表达产物进行了纯化和生物学活性研究, 以期应用重组 IFN- γ 治疗秦岭大熊猫疾病, 及监测机体免疫状态与疾病之间的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 血液、菌株及试剂

秦岭大熊猫外周血, 采自陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心。淋巴细胞分离液, 购自上海华精生物高科技有限公可; 载体 pGEM-T-Easy、AMV、PCR 回收试剂盒、质粒回收试剂盒和 IPTG, 均购自 Promega 公司; ConA、RPMI 1640 培养基、TRIzol LS Reagent, 均购自 Invitroge 公司; 载体 pET32a、*E. coli* DH5 α 、BL21(DE3)、rTaq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*H I、蛋白纯化试剂盒和 T4 DNA 连接酶, 均购自大连宝生物工程有限公司; HIS 单抗和羊抗鼠 IgG-HRP, 均为 Sigma 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中已报道的各种哺乳动物 IFN- γ 基因 cDNA 序列的高度保守区和四川大熊猫 IFN- γ 基因序列(登陆号: DQ450843), 利用 DNASTar 软件设计了秦岭大熊猫 IFN- γ 基因的 2 对引物 F1/R1 和 F2/R2(上游引物 F1: 5'-CTCGGATCCA TGAATTATACAAGCTA-3', 下游引物 R1: 5'-CGCAAGCTTTTATTTCGATGCTCTGCG-3'; 上游引物 F2: 5'-CTCGGATCCATGATCTTAGCTT TCCAGC-3', 下游引物 R2: 5'-CGCAAGCTTAT-TCTGACTCCTTTTCCG-3', 上游引物中的斜体部分表示 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物中的斜体部分为 *Hind* III 酶切位点)。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 秦岭大熊猫外周血淋巴细胞的分离与诱导培养

无菌采取健康秦岭大熊猫外周血 5 mL/只, 置于抗凝管中, 然后加入 2 倍体积的 D-Hank's 液稀释。取 3 mL 稀释后的大熊猫外周血缓慢加到 3 mL 淋巴细胞分离液上, 2 000 r/min 离心 20 min, 将淋巴细胞层移于另一试管, 加等量 D-Hank's 液, 1 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 沉淀物加入等量

D-Hank's 液, 1 000 r/min 离心 10 min, 重复 2 次, 弃去上清。沉淀细胞用完全 RPMI 1640 培养基(含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA、100 mL/L 胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素)悬浮, 取 10 μL 细胞悬液计数, 将细胞悬液稀释至 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 加入细胞培养瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养 24 h。

1.4 淋巴细胞总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成

取诱导的淋巴细胞经离心后, 参照 TRIzol LS Reagent 试剂说明书提取总 RNA。空气中干燥总 RNA 后, 用 DEPC 处理水充分溶解, 加入下游引物 R1(25.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1.0 μL , 再分别加入 dNTP 4.0 μL , 5 $\times$ AMV Buffer 4.0 μL , AMV 0.5 μL , HPR I RNA 酶抑制剂 0.5 μL , 总体积 20.0 μL 。42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反转录 90 min 后得到第一链 cDNA, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 秦岭大熊猫 IFN- γ 基因的 RT-nested PCR 扩增及鉴定

以第一链 cDNA 作为模板进行 RT-nested PCR 反应, 第 1 次扩增的反应体系为: 第一链 cDNA 4.0 μL , 超纯水 34.0 μL , 10 $\times$ PCR Buffer 5.0 μL , dNTP 4.0 μL , 25.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 上、下游引物 F1 和 R1 各 1.0 μL , rTaq DNA 聚合酶 1.0 μL 。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。第 2 次扩增取稀释 10 倍的第 1 次扩增产物 4.0 μL 作为模板, 反应体系和条件同第 1 次扩增, 上、下游引物为 F2 和 R2。PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像系统中观察照相。

1.6 PCR 产物的回收及表达载体的构建

按照 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明纯化 PCR 产物, 将回收产物与 pGEM-T-Easy 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 涂 Amp $^+$ 平板(含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 培养, 挑取单个菌落, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇动培养至饱和, 进行菌液 PCR 鉴定。提取阳性菌液质粒, 进行 BamH I、Hind III 双酶切, 并回收 IFN- γ 基因。同时, 对 pET32a 空载体进行 BamH I、Hind III 双酶切, 并回收载体。用 T4 DNA 连接酶将酶切回收的 IFN- γ 基因片段和 pET32a 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 涂 Amp $^+$ 平板培养, 挑取单个菌落, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇动培养至饱和, 进行菌液 PCR 鉴定。提取阳性菌液质粒, 进行 BamH I、Hind III 双酶切, 对酶切鉴定为阳性的质粒进行测序。测序正确的质粒命名为

pET32a-IFN- γ , 预计表达的融合蛋白分子质量为 35.3 ku。

1.7 重组质粒的诱导表达及表达产物可溶性条件的优化

将 pET32a-IFN- γ 转化 BL21(DE3) 感受态细胞, 涂 Amp $^+$ 平板培养, 挑取单个菌落, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇动培养至饱和, 进行菌液 PCR 鉴定。取鉴定为阳性的菌液 50 μL , 接种于 5 mL 含 Amp $^+$ 的 LB 培养基, 200 r/min 摇动培养至 OD₆₀₀ 达 0.5~1.0 时, 分别用 0.3, 0.5, 1.0, 1.5 mmol/L IPTG, 于 10, 15, 20, 28, 30, 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 150 r/min 条件下诱导表达, 分别于 1, 2, 3, 5, 10 h 后收集菌液, 同时以空载体 pET32a 为阴性对照。菌液离心后用 pH 7.4 PBS 洗涤 3 次, 以 300~400 W 的超声波裂解 15~20 min, 直到菌液变澄清, 6 000 r/min 离心 20 min 后取上清进行 SDS-PAGE 电泳, 积层胶质量浓度为 50 g/L, 分离胶质量浓度为 120 g/L, 每孔上样 15 μL , 积层胶中电压 80 V, 分离胶中电压 100 V, 至溴酚兰离胶底 1 cm 左右终止电泳, 染色脱色后照相, 薄层扫描分析蛋白表达量。

1.8 秦岭大熊猫 IFN- γ 的纯化

重组菌按筛选出的最佳诱导表达条件大量诱导后, 离心收集菌体, 20 mmol/L Tris-Cl (pH8.4) 重悬, 超声波破碎离心后收集上清液。上清液用 0.45 μm 滤膜过滤后上样镍柱, 流速为 1 mL/min, 流出液反复上样 5 次; 随后用含 100, 150, 200, 300, 400, 500 mmol/L 咪唑的 20 mmol/L Tris-Cl 分段洗脱, 分别收集洗脱液, 对所有洗脱液通过电泳观察其纯化效果。合并目的蛋白纯度较高的洗脱液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用 0.01 mol/L PBS 透析, 期间换液至少 3 次, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, 于 0.01 mol/L PBS 透析 24 h 后, PEG 20000 包埋浓缩, 过滤除菌, 检测浓度后, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.9 秦岭大熊猫 rIFN- γ 的 Western-blot 分析

将纯化后的可溶性表达产物 SDS-PAGE 电泳后, 在 60 mA 恒流下转印至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉作为封闭液, HIS 单抗和羊抗鼠 IgG-HRP 分别作为一抗和二抗进行 Western-blot 检测。

1.10 秦岭大熊猫 rIFN- γ 蛋白生物学活性的检测

应用 MMT 法对 rIFN- γ 蛋白进行生物学活性检测。分离秦岭大熊猫外周血淋巴细胞, 台盼蓝染色统计活细胞数大于 95% 时, 用完全 RPMI 1640 调整细胞密度为 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 在 96 孔培养板中每孔加入 100 μL 细胞悬液, 在细胞中分别加入不同质量

浓度的 rIFN- γ 蛋白 100 μ L (终质量浓度分别为 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 和 11.0 μ g/mL), 同时设细胞对照组和空白对照组 (完全 RPMI 1640 200 μ L)。37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养 68 h 后弃上清 50 μ L, 加入 MTT (质量浓度为 2 mg/mL) 10 μ L 继续培养 4 h, 再加 100 μ L 的二甲基亚砷 (DMSO), 用移液器混匀, 用酶标仪检测每孔 OD₆₃₀ 值。淋巴细胞转化指数以 SI (Stimulate Index) 值表示: $SI = (\text{试验组 } OD_{630} \text{ 值} - \text{空白对照组 } OD_{630} \text{ 值}) / (\text{细胞对照组 } OD_{630} \text{ 值} - \text{空白对照组 } OD_{630} \text{ 值})$ 。

2 结果与分析

2.1 秦岭大熊猫 IFN- γ 基因的 RT-nested PCR 扩增结果

RT-nested PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 在 472 bp 处出现一清晰条带, 与预期的结果相符 (图 1)。

2.2 重组质粒 pET32a-IFN- γ 的鉴定

空载体 pET32a 和重组质粒 pET32a-IFN- γ 分别用 *Bam*H I 单酶切, pET32a-IFN- γ 用 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切后电泳, 结果显示, pET32a 和 pET-32a-IFN- γ 经单酶切均出现单条带, pET32a-IFN- γ

经双酶切可见 472 bp 的目的片段以及 pET32a 单条带, 重组质粒双酶切的目的片段与重组质粒 pET32a-IFN- γ 的 PCR 产物电泳结果一致 (图 2), 表明重组质粒 pET32a-IFN- γ 成功构建。对 pET32a-IFN- γ 进行序列测定和分析, 结果表明, 扩增的 IFN- γ 基因读码框正确, 可用于 IFN- γ 蛋白的表达。重组 IFN- γ 蛋白的核苷酸和氨基酸序列见图 3。

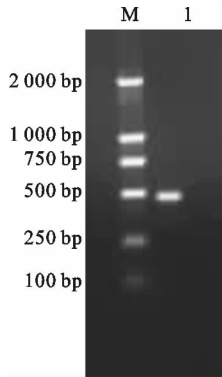


图 1 秦岭大熊猫 IFN- γ 基因的 RT-nested PCR 扩增结果
M, DNA 分子质量标准;
1, IFN- γ 基因的 RT-nested PCR 扩增产物

Fig. 1 Amplification of IFN- γ gene by RT-nested PCR
M, DL2000 DNA Marker;
1, RT-nested PCR amplified IFN- γ gene

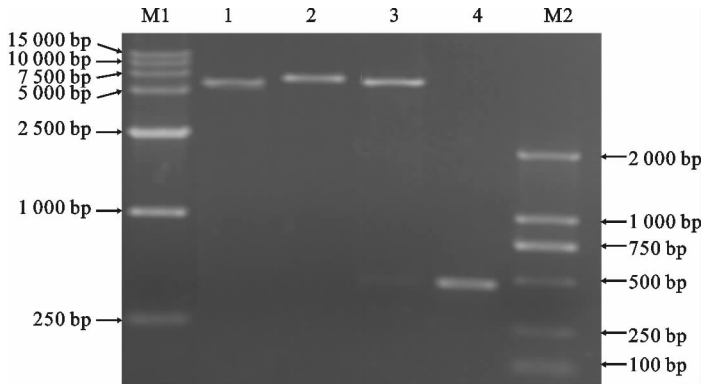


图 2 重组质粒 pET32a-IFN- γ 的 PCR 及酶切鉴定

M1, DNA 分子质量标准 (DL15000); 1, pET32a 空载体 *Bam*H I 单酶切; 2, pET32a-IFN- γ 重组质粒 *Bam*H I 单酶切;
3, pET32a-IFN- γ 重组质粒 *Bam*H I + *Hind* III 双酶切; 4, pET32a-IFN- γ 重组质粒 PCR 产物; M2, DNA 分子质量标准 (DL2000)

Fig. 2 PCR and restriction enzyme digestion analyses of the recombinant plasmid

M1, DL15000 DNA Marker; 1, Digestion product from pET32a by *Bam*H I; 2, Digestion product from pET32a-IFN- γ by *Bam*H I;
3, Digestion product from pET32a-IFN- γ by *Bam*H I + *Hind* III; 4, PCR-amplified pET32a-IFN- γ gene; M2, DL2000 DNA Marker

2.3 秦岭大熊猫 IFN- γ 基因序列的测定与分析

测序结果表明, 克隆的秦岭大熊猫 IFN- γ 基因为 456 bp, 编码 152 个氨基酸, 包含完整的 ORF 区。应用 DNASTar 软件对各种动物 IFN- γ 基因核苷酸序列进行同源性比较发现, 秦岭大熊猫与四川大熊

猫 IFN- γ 基因同源性最高, 仅在 434 位核苷酸处存在差异 (秦岭大熊猫为 G, 四川大熊猫为 C); 与犬的核苷酸序列同源性较近, 为 92.1%; 与鼠的同源性最低, 为 38.8% (表 1)。采用 Clustal W2 软件进行分析, 建立了系统进化树, 结果表明秦岭大熊猫与四

川大熊猫遗传距离最近(图 4)。

1atgatcttagctttccagcttttcgtgattttgtttcttcagcctattactgtcagcccatgttt
M I L A F Q L C V I L C S S G Y Y C Q A M F
67tttaagaaataaaaaacctgaagaaatattttaatccaagtaatccagatgtacccgatcttccc
F K E I E N L K E Y F N A S N P D V A D G G
133cctcttttcttagatattttgaagaactggagagagagagtgacaaaaagatcattcaaaaccaa
P L F L D I L K N W R E E S D K T I I Q S Q
199atcgtctccttctacttgaactgtttgaaaacttttaagataaccagatcattcaaaaggacatg
I V S F Y L K L F E N F K D N Q I I Q R S M
265gataccatcaaggaagacatgcttttcaagttcttcaacacgactaccagtaagccgagtgacttc
D T I K E D M L F K F F N S S T S K R S D F
331cttaagctgattcaaatccccgtgaatgatatgcagcttcagcccaaacgataaatgaactcatc
L K L I Q I P V N D M Q V Q R K A I N E L I
397aaagtgatgaatgactctcaccagatctaacctgaaggaagccgaaggaagtcagaaat
K V M N D L S P R S N L R K R R R S Q N

图 3 重组 IFN-γ 蛋白的核苷酸和氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and AA sequences of recombinant plasmid

表 1 不同物种之间 IFN-γ 基因核苷酸序列的同源性比较

Table 1 Homology comparison of nucleotide sequences of IFN-γ genes among different species

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		99.1	78.9	92.1	78.9	80.7	84.4	86.4	41.9	73.2	38.8	78.7
2	0.2		79.2	92.6	79.0	81.3	84.5	86.4	42.3	74.1	39.9	79.0
3	20.5	21.1		79.6	94.9	95.1	79.4	75.5	39.3	70.3	38.4	83.2
4	7.4	7.4	20.5		79.2	82.6	83.7	86.6	42.3	73.9	39.3	79.0
5	19.9	20.8	5.1	20.8		95.1	80.9	76.6	39.1	69.0	39.9	83.9
6	19.0	18.9	5.1	17.5	4.8		82.6	78.1	40.3	74.5	41.6	85.8
7	14.9	15.4	20.6	16.2	18.9	17.0		80.9	41.8	75.6	43.7	78.3
8	11.7	12.3	23.1	11.8	22.8	20.8	17.8		42.0	71.1	35.9	75.6
9	60.5	62.0	70.5	61.2	68.9	68.0	66.4	64.8		39.9	22.9	41.2
10	26.9	26.7	30.4	26.3	31.3	25.4	25.0	28.4	76.9		41.2	69.9
11	97.3	98.6	101.1	97.0	99.5	97.1	99.7	101.7	159.2	116.4		39.3
12	20.3	20.9	15.4	20.4	14.9	13.4	20.6	22.9	67.1	30.6	105.6	

注:1. 秦岭大熊猫;2. 四川大熊猫;3. 水牛;4. 犬;5. 山羊;6. 鹿;7. 马;8. 猫;9. 鸡;10. 人;11. 鼠;12. 猪;右上部分为同源性,左下部分为分散性。

Note:1. Qinling *Ailuropoda melanoleuca*; 2. Sichuan *Ailuropoda melanoleuca* (DQ450843); 3. *Bubalus bubalis* (EF567075); 4. *Canis lupus familiaris* (NM001003174); 5. *Capra hircus* (EF375708); 6. *Cervus elaphus* (X63079); 7. *Equus caballus* (D28520); 8. *Felis catus* (AY878359); 9. *Gallus gallus* (DQ010029); 10. *Homo sapiens* (NM000619); 11. *Mus musculus* (NM008337); 12. *Sus scrofa* (DQ913893); Percents of identity are in the right-upper of the table, and percents of divergence in the left-under of the table.

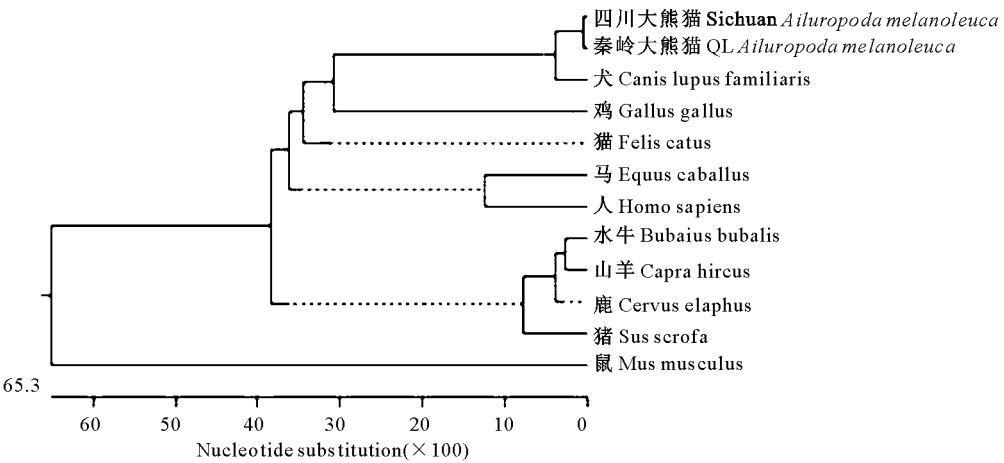


图 4 不同物种 IFN-γ 基因的系统进化树

Fig. 4 Phylogenic tree based on the IFN-γ gene's ORF of different species

2.4 秦岭大熊猫 rIFN- γ 的表达及纯化

重组质粒 pET32a-IFN- γ 阳性菌液经 4 个浓度 (0.3, 0.5, 1.0, 1.5 mmol/L) IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 电泳结果显示, 诱导表达产物分子质量为 35.3 ku, 4 个浓度的 IPTG 诱导效果无明显差异 (图 5)。薄层扫描分析结果表明, 蛋白表达量约占

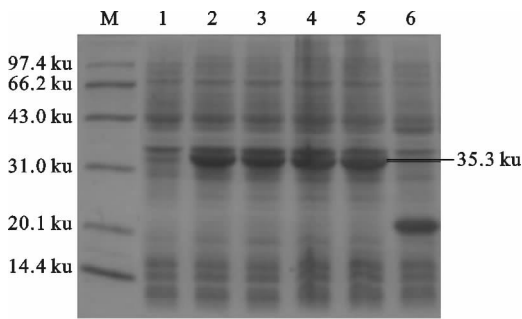


图 5 秦岭大熊猫 rIFN- γ 的 SDS-PAGE 分析结果
M. 蛋白质分子质量标准; 1. BL21 菌体蛋白;
2~5. 分别为 0.3, 0.5, 1.0 和 1.5 mmol/L IPTG
诱导 pET32a-IFN- γ 的表达产物;
6. pET32a 空载体诱导表达蛋白对照

Fig. 5 Analysis of the recombinant pET32a-IFN- γ protein by SDS-PAGE
M. Protein molecular low Marker; 1. Proteins from BL21;
2—5. Proteins from pET32a-IFN- γ induced by
0.3, 0.5, 1.0, 1.5 mmol/L IPTG; 6. Induced pET32a vector

2.5 秦岭大熊猫 rIFN- γ 的 Western-blot 检测结果

Western-blot 检测结果表明, 表达产物 rIFN- γ 可与 HIS 单抗发生反应, 在 35.3 ku 处出现 1 条特

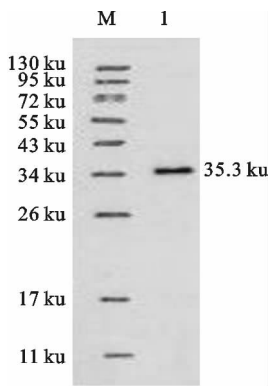


图 7 秦岭大熊猫 rIFN- γ 纯化产物的 Western-blot 检测结果

M. 蛋白质分子质量标准; 1. pET32a-IFN- γ 的表达产物
Fig. 7 Western-blot detection for the recombinant
E. coli BL21 induced by IPTG
M. Low molecular weight protein Marker;
1. pET32a-IFN- γ expressed protein

菌体总蛋白的 20%。经试验, 重组菌 37 ℃ 培养 5 h 后, 在 15 ℃、0.3 mmol/L IPTG 中诱导 10 h, 超声波处理后上清中的可溶性蛋白经镍柱亲和层析纯化和 SDS-PAGE 分析, 纯化的重组蛋白纯度可达 90% 以上 (图 6)。

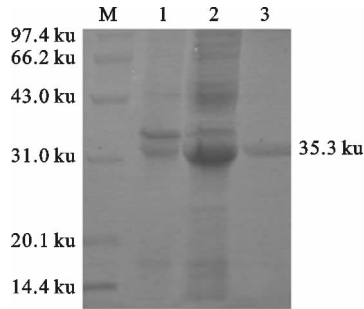


图 6 纯化后秦岭大熊猫 rIFN- γ 的 SDS-PAGE 分析结果
M. 蛋白质分子质量标准; 1. 含 200 mmol/L
咪唑的 20 mmol/L Tris-Cl 洗脱的蛋白;
2. pET32a-IFN- γ 诱导表达的上清液蛋白;
3. 含 400 mmol/L 咪唑的 20 mmol/L Tris-Cl 洗脱的蛋白

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the expressed
supernatant after purification
M. Protein molecular low Marker; 1. Protein isolated
20 mmol/L Tris-Cl eluant containing 200 mmol/L
imidazole; 2. Supernatant protein of the induced-expression
of pET32a-IFN- γ ; 3. Protein isolated 20 mmol/L
Tris-Cl eluant containing 400 mmol/L imidazole

异性条带, 说明 pET32a-IFN- γ 在大肠杆菌中得到了正确表达 (图 7)。

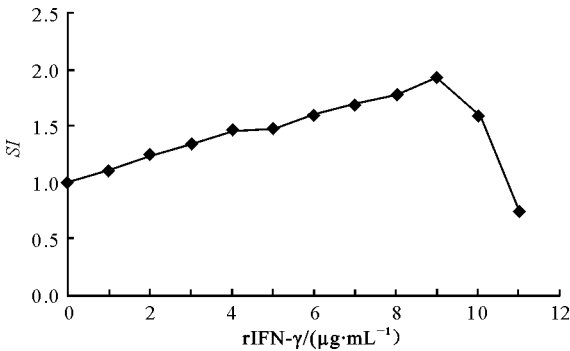


图 8 秦岭大熊猫 rIFN- γ 促外周
淋巴细胞增殖的试验结果
Fig. 8 The proliferations of the recombinant
IFN- γ on lymphocyte

2.6 秦岭大熊猫 rIFN- γ 蛋白的生物学活性

图 8 结果表明,纯化的可溶性 rIFN- γ 蛋白在体外能够诱导淋巴细胞增殖。与细胞对照组相比, rIFN- γ 蛋白浓度在 1.0~9.0 $\mu\text{g/mL}$ 内随质量浓度升高诱导淋巴细胞增殖作用增强,当质量浓度达 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 时诱导细胞增殖能力又减弱,当质量浓度达 11.0 $\mu\text{g/mL}$ 时明显抑制淋巴细胞增殖。

3 讨 论

IFN- γ 是参与免疫调节的重要细胞因子,能够全面地促进体液免疫和细胞免疫,具有抗病毒^[15-16]、抗肿瘤^[17]、增强免疫能力^[18]等多种生物活性。研究表明,将 IFN- γ 基因与保护性抗原基因共同构建或共表达研制基因工程疫苗,可提高基因工程疫苗的免疫效力,降低病毒载体的毒性。同时,内源性 IFN- γ 水平的高低在很大程度上可以反映机体的细胞免疫状态;对样品中的 IFN- γ 进行定量分析,可以间接评估疫苗的免疫效果,研究传染性疾病在动物体内发生、发展、转归的情况及其机体保护性免疫反应的动态规律。

本研究结果表明,秦岭大熊猫 IFN- γ 基因的开放阅读框由 456 个核苷酸组成,编码 1 个由 152 个氨基酸组成的多肽(包括编码 15 个氨基酸的信号肽和 137 个氨基酸的成熟肽),重组蛋白分子质量约为 35.3 ku。将秦岭大熊猫 IFN- γ 基因与其他哺乳动物的 IFN- γ 基因的核苷酸序列和推导氨基酸序列比对后分析,发现秦岭大熊猫与四川大熊猫 IFN- γ 基因同源性最高,仅在 434 位核苷酸处存在差异(秦岭大熊猫为 G,四川大熊猫为 C);推导氨基酸序列相同。与犬的核苷酸序列同源性较近,为 92.1%;与鼠的同源性最低,为 38.8%。从构建的进化树来看,秦岭大熊猫与四川大熊猫遗传距离最近,其基因差异可能是由于生存环境等因素的影响而形成的,具体原因有待进一步研究。

本研究利用 pET32a 高效表达载体成功地构建了秦岭大熊猫 IFN- γ 原核表达载体,并对重组蛋白的表达条件进行了优化,结果表明,重组菌在 15 $^{\circ}\text{C}$ 、0.3 mmol/L IPTG 中诱导 10 h,能够表达可溶性的重组干扰素,从而避免了重组蛋白以难溶性的包涵体形式表达的缺点,省略了包涵体的变性及复性过程,简化了生产重组干扰素的程序。本研究建立的方法利用了大肠杆菌容易培养、对外源蛋白有很高的耐受能力以及能高水平表达外源蛋白等优点,同时利用其自身带的 His·Tag 标签使纯化更方便。

本研究制备的重组 IFN- γ 蛋白具有促进淋巴细胞转化增殖的生物学活性,为制备秦岭大熊猫 IFN- γ 重组蛋白,并用于大熊猫临床疾病治疗提供了一种可能的手段,同时为建立 IFN- γ 检测方法和研究疾病与机体免疫状态奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Estes D M. Differentiation of B cells in the bovine; Role of cytokines in the immunoglobulin isotype expression [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1996, 54(1/4): 61-67.
- [2] Domeika K. Porcine immunoregulatory cytokines with special reference to their induction by Cp G containing DNA [D]. Uppsala: University of Agricultural Sciences, 2003.
- [3] 曹瑞兵,蔡梅红,陈德胜,等. 猪 γ -干扰素双顺反子表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达 [J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1): 52-55.
Cao R B, Cai M H, Chen D S, et al. Construction of porcine interferon-gamma bicistron expression vector and its expression in *E. coli* [J]. Chinese Journal of Veterinary, 2004, 24(1): 52-55. (in Chinese)
- [4] 许金俊. 奶牛 γ -干扰素基因的表达及其在乳房炎防治中的初步应用 [D]. 江苏扬州: 扬州大学, 2004.
Xu J J. Expression of bovine interferon-gamma gene and its preliminary application in the therapy of bovine mastitis [D]. Yangzhou, Jiangsu: University of Yangzhou, 2004. (in Chinese)
- [5] Graham S P, Jones G E, Maclean M, et al. Recombinant ovine interferon-gamma inhibits the multiplication of *Chlamydia psittaci* in ovine cells [J]. J Comp Pathol, 1995, 112(2): 185-195.
- [6] Schijns V E, Scholtes N C, Zuileicom H I, et al. Facilitation of antibody forming response to viral vaccine antigens in young cats by recombinant baculovirus-expressed feline interferon-gamma [J]. Vaccine, 2002, 20(13/14): 1718-1724.
- [7] 叶秀华,蔡建平,吴志光,等. 重组鸡 γ -干扰素的抗球虫作用 [J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(7): 3-5.
Ye X H, Cai J P, Wu Z G, et al. Research on recombinant chicken IFN- γ against chicken coccidiosis [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2004, 40(7): 3-5. (in Chinese)
- [8] 李洪涛,马 波,王伟伟,等. 鹅 γ -干扰素成熟蛋白的表达及其生物学活性研究 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(1): 190-195.
Li H T, Ma B, Wang J W, et al. Expression of goose interferon γ mature protein and detection of bioactivity [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(1): 190-195. (in Chinese)
- [9] 程 坚,刘秀梵,彭大新,等. 共表达 H9 亚型禽流感病毒血凝素基因和鸡 II 型干扰素基因的重组鸡痘病毒构建及其免疫效力 [J]. 病毒学报, 2003, 19(1): 52-55.
Cheng J, Liu X F, Peng D X, et al. Recombinant fowlpox virus coexpressing HA from subtype H9N2 of avian influenza virus and chicken type II interferon and its protective efficacy against homologous challenge in chickens [J]. Chinese Journal of Virology, 2003, 19(1): 52-55. (in Chinese)