

Construction and Antiviral Activity Analysis of Rongchang Porcine Interferon- γ Recombinant Baculovirus

Kai Wang*, Yang Yang*, Qiuhan Yu, Shilei Huang, Luyi Xie, Ling Ran, Zhenhui Song#

Department of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing
Email: #szh7678@126.com

Received: Feb. 20th, 2019; accepted: Mar. 6th, 2019; published: Mar. 14th, 2019

Abstract

In this experiment, the Fc-to-Bac baculovirus/insect cell expression system was used to amplify and clone the IFN- γ gene of Rongchang porcine, and the donor plasmid pFastBacTM Dual-IFN- γ containing the completely open reading frame of Rongchang pig IFN- γ was constructed. The recombinant plasmid was transformed into DH10Bac competent cells, and the baculovirus recombinant shuttle plasmid Bacmid-IFN- γ was obtained, and the sf9 insect cells in the logarithmic growth phase were transfected to obtain recombinant baculovirus rBac-IFN- γ . Observing cytopathic effect after inoculation of TGEV on pig kidney cells (PK-15) infected with recombinant baculovirus and using PT-PCR technology to inhibit rPoIFN- γ on porcine transmissible gastroenteritis virus on PK-15 cells, the growth is measured and analyzed. The results showed that the recombinant protein (rPoIFN- γ) was expressed in recombinant baculovirus (Bac-IFN- γ)-infected sf9 insect cells by SDS-PAGE and Western-blot, and rPoIFN- γ was shown in antiviral activity test. It can inhibit the replication of TGEV on PK-15 cells to a certain extent. This indicates that recombinant porcine interferon- γ has the potential to be a protein drug for the treatment of porcine transmissible gastroenteritis virus and even other porcine infectious diseases.

Keywords

Rongchang Porcine Interferon- γ , Baculovirus Expression System, Antiviral Activity

荣昌猪 γ 干扰素重组杆状病毒的构建及其抗病毒活性分析

王凯*, 杨洋*, 余秋寒, 黄石磊, 谢录异, 冉玲, 宋振辉#

西南大学动物科学学院动物学医系, 重庆

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 王凯, 杨洋, 余秋寒, 黄石磊, 谢录异, 冉玲, 宋振辉. 荣昌猪 γ 干扰素重组杆状病毒的构建及其抗病毒活性分析[J]. 微生物前沿, 2019, 8(1): 40-50. DOI: 10.12677/amb.2019.81006

Email: #szh7678@126.com

收稿日期: 2019年2月20日; 录用日期: 2019年3月6日; 发布日期: 2019年3月14日

摘要

本试验通过扩增、克隆荣昌猪的IFN- γ 基因, 利用Bac-to-Bac杆状病毒/昆虫细胞表达系统构建含有荣昌猪IFN- γ 完整开放阅读框的供体质粒pFastBacTM Dual-IFN- γ , 转化至DH10Bac感受态细胞, 获得杆状病毒重组穿梭质粒Bacmid-IFN- γ , 转染对数生长期的sf9昆虫细胞得到重组杆状病毒rBac-IFN- γ 。在有感染重组杆状病毒的猪肾细胞(PK-15)上接种TGEV后观察细胞病变情况并利用PT-PCR技术对rPoIFN- γ 能否抑制猪传染性胃肠炎病毒在PK-15细胞上的增长进行测定分析。结果表明: 通过SDS-PAGE、Western-blot证明了重组蛋白(rPoIFN- γ)在重组杆状病毒(Bac-IFN- γ)感染的sf9昆虫细胞中得到表达, 在抗病毒活性试验中显示rPoIFN- γ 能一定程度抑制TGEV在PK-15细胞上的复制。说明重组猪 γ -干扰素有成为治疗猪传染性胃肠炎病毒, 乃至其他猪传染病的蛋白类药物的潜力。

关键词

荣昌猪 γ -干扰素, 杆状病毒表达系统, 抗病毒活性

Copyright © 2019 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

干扰素(Interferon, IFN)是一类具有广泛的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等作用的由多种细胞分泌的多功能糖蛋白。正常细胞一般不会自发产生, 只存在合成的潜能, 其基因通常处于被抑制的静止状态, 只有当机体受到特定诱生剂刺激, 如病毒、某些细菌和原虫感染等情况下才诱发细胞产生干扰素。干扰素的细胞来源因动物种类、细胞类型、诱生剂的性质和诱生条件而异, 可分为来自白细胞的 α 干扰素, 来自纤维母细胞的 β 干扰素和来自淋巴细胞及NK细胞的 γ 干扰素[1]。其中, 耐酸的IFN- α 干扰素和IFN- β , 又合称为I型干扰素; 对酸敏感的 γ 干扰素称为II型干扰素或免疫干扰素[2]; 近年新发现的III型干扰素是一类细胞因子, 称为 λ 干扰素。干扰素的生物学功能发挥是通过与特异性受体结合, 诱导细胞表达多种效应蛋白质而实现的。干扰素主要通过介导信号转导系统引起特定反应, 诱导效应分子的表达[3], 而干扰病毒的复制, 并不是直接作为反式因子对效应分子进行基因调控。

IFN- γ 全基因为501个碱基, 编码166个氨基酸, 前20个氨基酸为信号肽, 后146个氨基酸为成熟多肽, 含有两个糖基化位点[4]。研究表明, 猪 γ 干扰素原核表达产物经复性后具有较高的生物活性[5]。国内外研究表明, 猪 γ 干扰素在抑制猪口蹄疫病毒, 蓝耳病病毒和非洲猪瘟病毒的试验中均取得了良好效果[6], γ 干扰素对清除中枢神经系统中持续感染的疱疹病毒也起关键作用[7]。研究还表明, 猪 γ 干扰素能增强仔猪对痢疾抗原的免疫应答[8], 在沙门氏菌感染中也起着重要作用[9]。猪传染性胃肠炎(Transmissible gastroenteritis, TGE)是由猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)引起的以猪发生呕吐、水样腹泻等症状为特征的一种急性、高度接触性传染病。2周龄以下的仔猪死亡率高达100%, 严重危害着养殖业的发展。目前我国尚没有有效的治疗手段遏制该病情的发生。

近年来, 养猪业在我国得到了快速的发展, 规模化养猪场的数量在不断增加, 病毒性疾病的爆发给

养猪业增添了风险, 并且某些人畜共患病也严重威胁着人类的公共卫生安全。本试验的目的主要是通过杆状病毒/昆虫细胞表达系统, 生产具廉价、高效等优点的广谱抗病毒制品, 为生产中治疗和预防疾病发生、促进养殖业健康发展及开发更高效优质的新一代疫苗佐剂奠定基础。

2. 材料和方法

2.1. 主要材料与试剂

Sf9 昆虫细胞购自齐氏生物科技有限公司; PK-15 细胞为西南大学刘娟教授惠赠; 大肠杆菌 DH5 α 菌株、大肠杆菌 DH10BacTM 菌株、TGEV CQ 株由本实验室保; RNA PCRTM Kit(AMV)Ver3.0、RNAiso Plus、pMD19-T Vector 试剂盒、SYBR[®]Premix Ex TaqTM II 试剂盒购自 TaKaRa 公司产品; Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; PRMI1640 培养基购自上海英俊生物技术有限公司; 淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司; Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统、pFastBacTM Dual 载体试剂盒购自 Invitrogen 公司; GV-plasmid DNA mini Extration kit 少量质粒提取试剂盒购自 GENVIEW 公司; Grace's 无血清培养基、DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司; 兔抗猪 IFN- γ 多克隆抗体购自上海通蔚实业有限公司。

2.2. 引物设计与合成

通过 Primer5.0 软件, 根据参考文献报道和 Gene Bank 发布的序列设计 IFN- γ 、TGEV N 基因荧光定量 PCR 引物, 上、下游引物分别引入 EcoR I 和 Xho I 限制性酶切位点, 序列如表 1 所示。

Table 1. IFN- γ , TGEV-N primer sequence

表 1. IFN- γ 、TGEV-N 引物序列

引物名称	引物序列(5'~3')
IFN- γ -F	CCGGAATTCTGATCGACTGTATATAGG
IFN- γ -R	TCGCTCGAGTTCAAATATTGCAGGCAG
N-F	TTCAACCCATAACCCTCCAACAA
N-R	GGCCCTTCACCATGCGATAGC

上述引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2.3. 荣昌猪 γ 干扰素基因的克隆及序列分析

利用刀豆素诱导荣昌猪外周血液淋巴细胞, 提取淋巴细胞总 RNA 并反转录为 cDNA; 以 cDNA 为模板, 利用聚合酶链式反应(PCR)扩增荣昌猪 IFN- γ 基因片段。反应体系如表 2 所示。

Table 2. PCR reaction system

表 2. PCR 反应体系

cDNA	2.0 μ L
ddH ₂ O	36.75 μ L
5 \times PCR Buffer	10 μ L
TaKaRa Ex Taq [®] HS	0.25 μ L
Forward Primer	0.5 μ L
Reverse Primer	0.5 μ L
Total	50 μ L

反应参数: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s、56°C 退火 1 min、72°C 延伸 50 s, 进行 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统下观察结果。将 PCR 扩增的目的基因克隆于原核表达质粒 pMD18-T 的 EcoR I 和 Xho I 的位点, 转化 DH5 α , 经 IPTG 诱导, PCR 扩增及双酶切鉴定重组质粒表达, 送上海生工生物公司测序及利用 DNASTar 软件与已发表的猪种的 γ 干扰素基因进行同源性比较。

2.4. 重组猪 γ 干扰素的杆状病毒表达及鉴定以 pMD-IFN- γ

阳性重组质粒为模板进行 PCR 扩增, EcoR I 和 Xho I 分别双酶切 pFastBacTM Dual 载体质粒和 PCR 产物并在 T₄ 连接酶作用下连接 IFN- γ 基因与 pFastBacTM Dual 载体得到重组转移质粒命名为 pFastBacTM Dual-IFN- γ , 转化 DH5 α 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选, PCR 鉴定出阳性重组转移质粒, 并将阳性重组转移质粒转化至 DH10BacTM 感受态细胞, 提取质粒, PCR 鉴定出阳性重组穿梭质粒 rBacmid-IFN- γ , 纯化后转染 Sf9 昆虫细胞。待细胞出现病变后, 扩增重组病毒, 蛋白酶-K-SDS-酚-氯仿抽提病毒基因组 DNA, 以 M13-48f、M13-47r 为引物 PCR 验证目的基因在重组病毒中是否获得稳定重组, 并间接免疫荧光(IFA)检测重组蛋白的表达。

2.5. 重组猪干扰素- γ 体外抗病毒活性的测定

用 TGEV-PK-15 病毒细胞系统测定其病毒活性, 以密度为 2×10^6 个/mL 将 PK-15 细胞接种到六孔细胞培养板中, 分成三个实验组, 待细胞贴壁形成单层后, 分别加入收集 rBacmid-IFN- γ 感染后昆虫细胞的细胞裂解液和含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 并且每孔加入含 100 TCID₅₀ 的病毒, 于 37°C, 5%CO₂ 条件下培养, 分别收集 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 三个试验组的上清并提取细胞的 RNA 并反转录为 cDNA, 取经序列测定验证的阳性重组质粒, 稀释 7 个梯度, 作为实时荧光定量 PCR 阳性标准模板进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系如表 3 所示。

Table 3. RT-PCR reaction system
表 3. 荧光定量 PCR 反应体系

重组质粒DNA	1.0 μ L
N-F	0.5 μ L
N-R	0.5 μ L
2 \times SYBR Premix ExTaq II	10 μ L
ddH ₂ O	8 μ L
Total	20 μ L

将以上各组充分混匀, 瞬时离心后, 在 Eppendorf PCR 仪上进行反应。

反应参数: 95°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s、55°C 退火 30 s、72°C 延伸 30 s, 40 个循环。

利用 Bio-Rad CFX Manager 软件进行分析, 得到扩增曲线和标准曲线。之后进行重复性试验。分析 rPoIFN- γ 是否能在 PK-15 细胞上抑制 TGEV 的复制。

3. 结果

3.1. 荣昌猪 γ 干扰素基因的克隆及序列分析

提取的 RNA 进行逆转录得到的 cDNA 为模板, 分别引入 EcoR I 和 Xho I 限制性酶切位点的 IFN- γ -F 和 IFN- γ -R 为引物, 进行猪 IFN- γ 基因的 PCR 扩增出一条大小约为 600 bp 的 DNA 片段(图 2); 将 IFN- γ 基因经胶回收纯化后, 克隆至 pMD18-T 载体, 将 PCR 和双酶切鉴定结果阳性的重组克隆质粒(图 1)送至生物技术公司完成测序, 测序结果表明扩增的目的片段全长 603 bp (Genbank 收录号是 GU433229), 包括

了由 166 个氨基酸组成的完整的开放阅读框。根据测序结果表明荣昌猪 IFN- γ 基因长 603 bp，利用 DNA star 软件与 GenBank 上发表的 IFN- γ 基因序列进行核苷酸序列分析得到同属之间(图 2)与 DQ839398 (长白猪)、AY293733 (成华猪)等猪种同源性最高，为 99.8%；与 X53085 (野猪)同源性最低，为 96.8%；不同属之间与 AB107652 (骆驼)同源性最高，为 84.8%；与 EF614201 (羊)同源性最低，为 60.7%；其中与 Genbank 刊载的 DQ902588 (荣昌猪)同源性为 99.2% (图 3)。

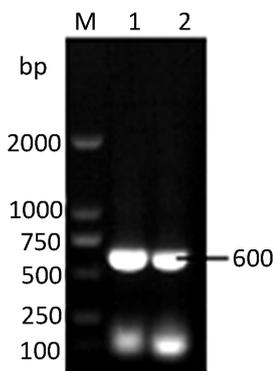


Figure 1. Agarose electrophoresis analysis of the PCR production of porcine IFN- γ gene; M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR production of poIFN- γ gene

图 1. 猪 IFN- γ 基因的 PCR 产物电泳分析；M：DL2000 标准分子量；A：猪 IFN- γ 基因的 PCR 产物

		Percent Identity											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Divergence	1	■	100.0	100.0	99.4	98.7	98.5	100.0	99.8	96.6	96.0	1	AY293733
	2	0.0	■	100.0	99.4	99.8	99.6	100.0	99.8	100.0	97.0	2	DQ666352
	3	0.0	0.0	■	99.4	99.8	99.6	100.0	99.8	100.0	97.0	3	DQ839398
	4	0.6	0.6	0.6	■	99.6	99.0	99.4	99.2	99.4	96.4	4	DQ902588
	5	0.4	0.2	0.2	0.4	■	89.6	99.8	99.6	92.7	94.5	5	DQ913893
	6	0.4	0.4	0.4	1.0	0.9	■	99.6	99.4	82.3	97.4	6	EU118363
	7	0.0	0.0	0.0	0.6	0.2	0.4	■	99.8	100.0	97.0	7	EU249804
	8	0.2	0.2	0.2	0.8	0.4	0.6	0.2	■	99.8	96.8	8	GU433229(rongchang pig)
	9	0.2	0.0	0.0	0.6	0.2	0.4	0.0	0.2	■	97.6	9	S63967
	10	0.2	0.0	0.0	0.6	0.8	0.3	0.0	0.2	0.0	■	10	X53085
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

Figure 2. Percent identity analysis of interferon-gamma

图 2. 同种属间的同源性分析

		Percent Identity										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Divergence	1	■	69.6	82.5	62.2	86.2	84.8	85.2	75.8	75.4	1	AB107652
	2	27.5	■	74.7	51.4	72.7	71.5	68.9	71.9	72.0	2	AF244933
	3	16.5	26.8	■	55.6	80.4	77.6	81.2	75.4	75.0	3	D28520
	4	16.9	35.7	25.4	■	66.8	60.7	68.3	52.9	52.9	4	EF614201
	5	12.9	29.7	19.7	10.4	■	84.0	96.6	71.3	71.1	5	EF675629
	6	14.1	29.4	21.5	18.8	14.3	■	83.8	70.3	69.5	6	GU433229
	7	12.9	27.7	18.9	13.1	3.5	14.8	■	68.9	58.8	7	U34232
	8	24.2	26.7	25.8	36.5	30.7	30.7	23.5	■	99.5	8	X13274
	9	25.0	27.0	26.1	40.4	31.1	32.1	23.7	0.5	■	9	XM_001151968
	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9		

Figure 3. Homology of different species

图 3. 不同种属间的同源性分析

3.2. 重组猪 γ 干扰素的杆状病毒表达及鉴定

将重组阳性转移质粒 pFastBacTM Dual-IFN- γ 转化 DH10BacTM 感受态细胞, 经抗性及蓝白斑筛选, 获得阳性重组菌, 用重组杆状病毒 rBacmid-IFN- γ 感染对数生长期的 Sf9 昆虫细胞, 提取重组杆状病毒 rBacmid-IFN- γ 的基因组, 用 M13 通用引物进行 PCR 鉴定, 扩增出的条带约 3000 bp 大小, 与预期结果符合(图 4); 用猪 IFN- γ 重组杆状病毒感染 Sf9 昆虫细胞, 72 h 后细胞出现明显的病变, 细胞变大, 生长缓慢、停滞(图 5); 用阳性重组杆状病毒 rBacmid-IFN- γ 和野生杆状病毒 Bacmid 分别感染对数生长期的 Sf9 昆虫细胞, 培养 72 h 或至出现病变, 收集上清和昆虫细胞裂解液制成蛋白样品, 同时设置正常 Sf9 昆虫细胞作为对照, 进行 SDS-PAGE 分析。结果显示重组杆状病毒 rBacmid-IFN- γ 感染的 Sf9 昆虫细胞裂解液蛋白样品出现了大小约为 20KDa 的条带, 感染野生杆状病毒的 Sf9 昆虫细胞和正常 Sf9 昆虫细胞、培养上清蛋白样品均没有类似条带(图 6)。将鉴定正确的重组杆状病毒 rBacmid-IFN- γ 感染对数生长期的 Sf9 昆虫细胞, 培养 72 h 或至出现病变后, 进行间接免疫荧光检测。结果显示, rBacmid-IFN- γ 感染的 Sf9 细胞与对照组相比在荧光下发出了特异性荧光, 表明重组猪 γ 干扰素在 Sf9 细胞中得到表达(图 7)。

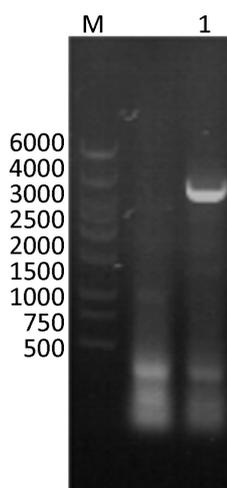


Figure 4. Identification of recombinant of the rBacmid-IFN- γ ; M: DL6000 DNA Marker; 1: PCR production of rBacmid-IFN- γ

图 4. 重组杆状病毒的 PCR 鉴定; M: DL6000 标准分子量; 1: 重组杆状病毒 PCR 扩增产物

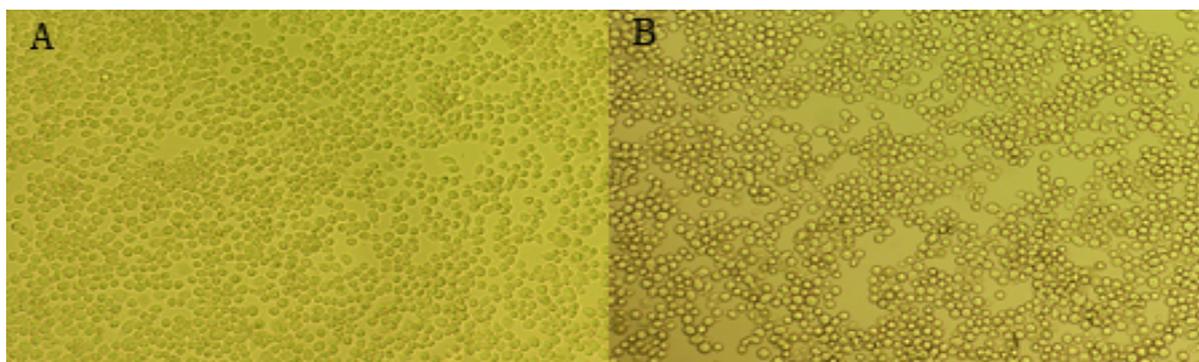


Figure 5. Cytopathic effect of Sf9 infected with PoIFN- γ recombinant baculovirus; A: Normal Sf9 cells; B: Sf9 cells with IFN- γ recombinant baculovirus

图 5. 猪 IFN- γ 重组杆状病毒感染 Sf9 细胞后的细胞病变; A: 正常 Sf9 细胞; B: 猪 IFN- γ 重组杆状病毒感染后的 Sf9 细胞

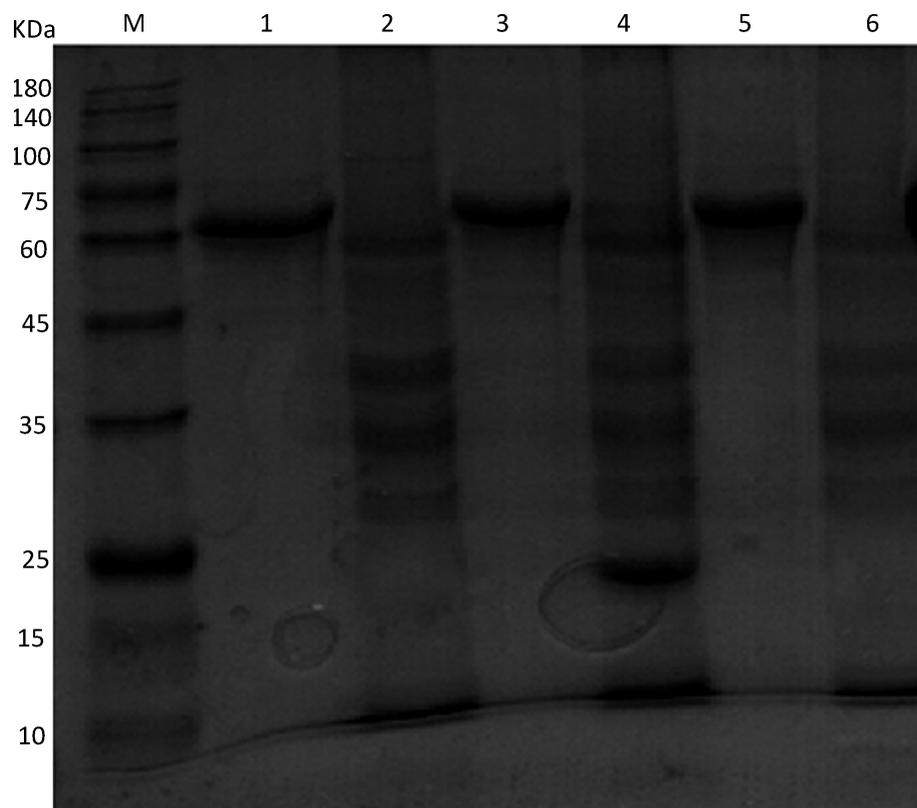


Figure 6. Analysis of recombinant PoIFN- γ by SDS-PAGE; M: Protein Marker; 1: culture supernatant of Sf9 infected by wild baculovirus; 2: lysis liquid of Sf9 cells infected by wild baculovirus; 3: culture supernatant of Sf9 infected by recombinant baculovirus; 4: lysis liquid of Sf9 cells infected by recombinant baculovirus; 5: culture supernatant of normal Sf9 cells; 6: lysis liquid of normal Sf9 cells

图 6. SDS-PAGE 分析猪 IFN- γ 蛋白在 sf9 昆虫细胞中的表达; M: 蛋白 Marker; 1: 感染野生杆状病毒后培养上清; 2: 感染野生杆状病毒后细胞裂解液; 3: 感染重组杆状病毒后培养上清; 4: 感染重组杆状病毒后细胞裂解液; 5: 正常 Sf9 昆虫细胞培养上清; 6: 正常 Sf9 昆虫细胞裂解液

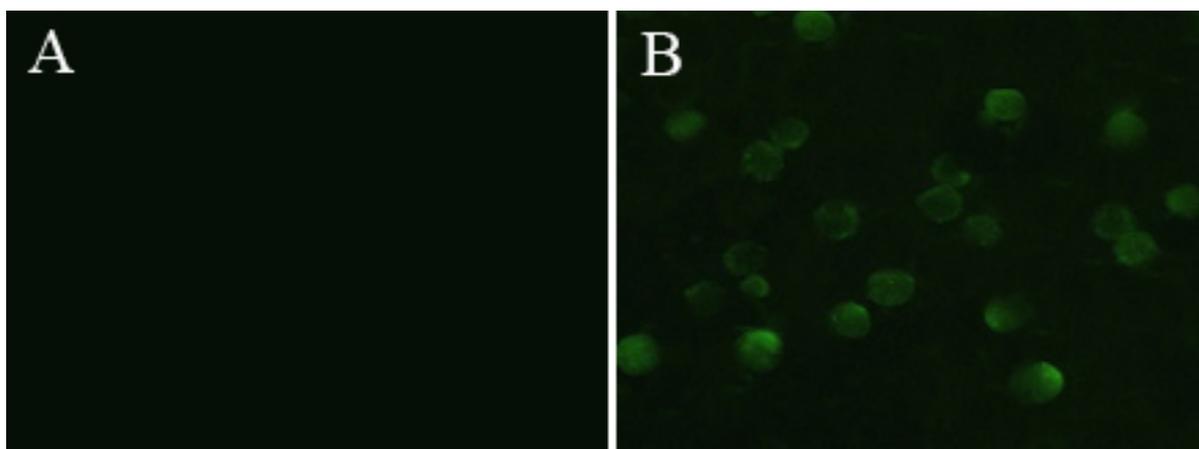


Figure 7. Identification of PoIFN- γ protein expression with IFA; A: negative control; B: Sf9 cells with rBacmid-IFN- γ

图 7. 间接免疫荧光鉴定猪 IFN- γ 的表达; A: 阴性对照; B: Bacmid-IFN- γ 感染的 Sf9 细胞

3.3. 重组猪干扰素- γ 体外抗病毒活性的测定

将 TGEV 病毒接种单层且生长活力大于 95% 的 PK-15 细胞培养, 每天观察病变情况, 当病变达到 80%

以上的时候按三冻三融的方法将病毒收集，TGEV 在 PK-15 细胞上的病变如图 8。

分别提取收集样品的总 RNA 进行反转录，利用特异性荧光定量引物对克隆的阳性质粒进行 PCR 鉴定，扩增的条带大小约为 139 bp 的条带，与预期相符，见图 9。

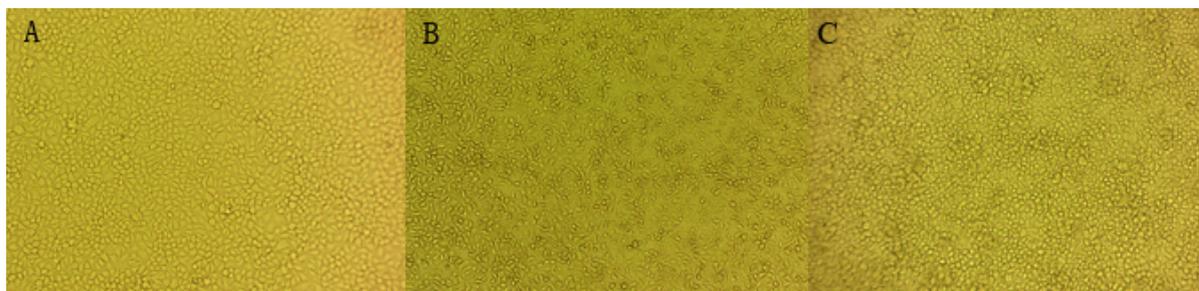


Figure 8. Cytopathic effect of sf9 infected with TGEV; A: Normal PK-15 cells; B: Sf9 cells with IFN- γ recombinant baculovirus; C: PK-15 cells effected by TGEV After rPoIFN- γ processed

图 8. TGEV 接种 PK-15 细产生的细胞病变；A：正常 PK-15 细胞；B：接种 TGEV 的 PK-15 细胞；C：经重组 PoIFN- γ 处理的 PK-15 细胞接种 TGEV

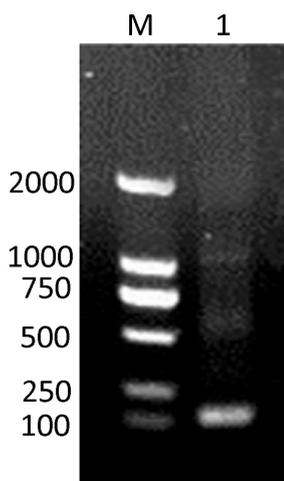


Figure 9. Identification of the PCR product of plasmid; M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR product of plasmid

图 9. 阳性克隆质粒的 PCR 鉴定；M：DL2000 标准分子量；1：阳性克隆质粒 PCR 扩增产物

根据质粒拷贝数计算公式计算出质粒拷贝数为 4.55×10^{12} copies/ μL ，做 10 倍稀释后使用 4.55×10^{11} 、 4.55×10^{10} 、 4.55×10^9 、 4.55×10^8 、 4.55×10^7 、 4.55×10^6 、 4.55×10^5 copies/ μL 7 个稀释度为模板进行荧光定量 PCR，通过 Bio-Rad CFX Manager 软件分析得到荧光定量标准曲线。结果显示在模板稀释度范围内出现 7 条“S”型特异性扩增动力学曲线(见图 10)，得到比较理想的标准曲线， $y = -3.436x + 45.552$ (y 为 Ct 值， x 为 Lg quantity)，相关系数 R 为 0.998，扩增效率为 95.4%，标准品各稀释度扩增产物的溶解温度在 $80.5^\circ\text{C} \sim 81^\circ\text{C}$ ，平均融解温度为 80.8°C (见图 11)，且只有一个融解波峰，结果理想。重复性实验结果显示(见图 12)，同一浓度样品所得的“S”型曲线接近，实际所得的 Ct 值也基本相同，样品融解温度均为 81°C ，且只有一个融解波峰。

将反转录产物按建立的荧光定量 PCR 体系进行荧光定量 PCR 分析。荧光定量 PCR 反应中，每个模板的 Ct 值都与起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越大则 Ct 值越小。结果表明，用猪 γ 干扰素重组杆状病毒作用过的 PK-15 细胞能一定程度阻止 TGEV 进入 PK-15 细胞并抑制其在细胞内的增殖，见图 13。

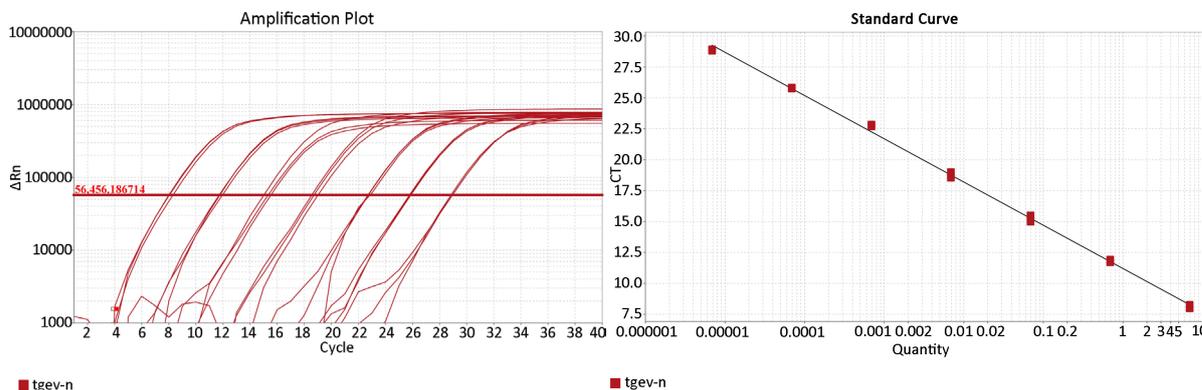


Figure 10. Amplification (A) and standard curve (B) of real-time PCR for the detection of TGEV N
图 10. TGEV N 基因荧光定量 PCR 扩增曲线(A)和标准曲线(B)

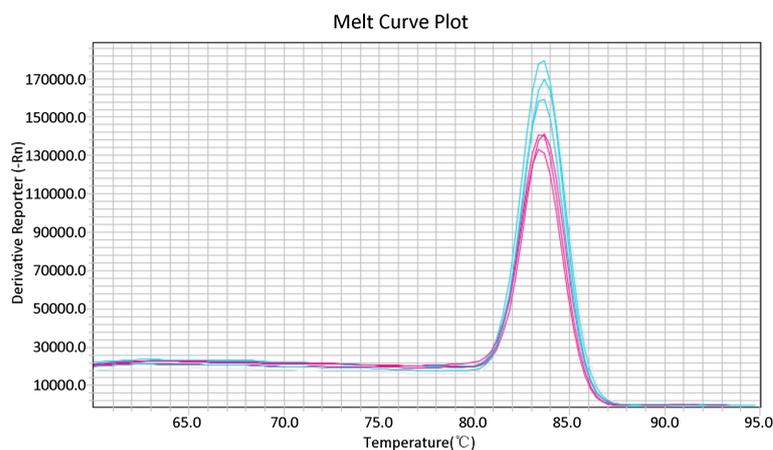


Figure 11. Melting curves of real-time PCR for the detection of TGEV N
图 11. TGEV N 基因荧光定量 PCR 溶解曲线

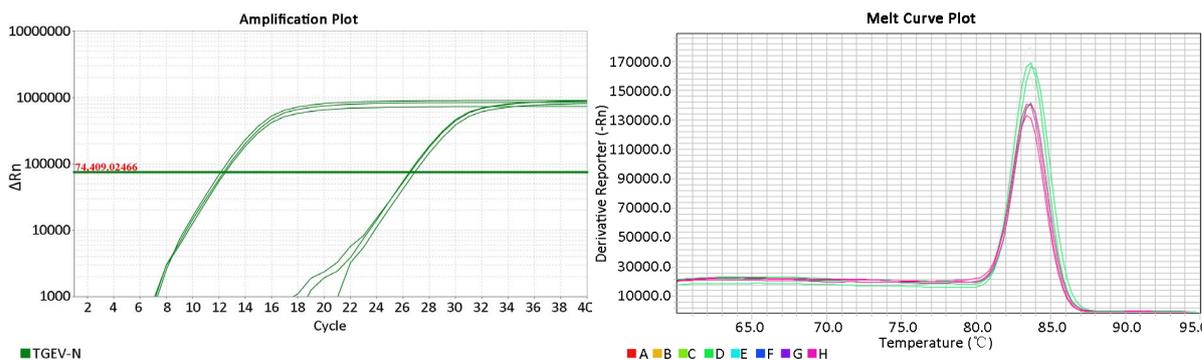


Figure 12. Amplification (A) and Melting curves of the repeatability test
图 12. 重复性试验的扩增曲线(A)和溶解曲线(B)

4. 讨论

国际上最先克隆的干扰素为 IFN- γ ，由日本的 Taniguch 等人在 1979 年完成。1980 年 Derynck 等克隆了人干扰素基因，1981 年 Goeddel 报道 IFN- γ 基因克隆成功。我国干扰素的基因工程研制最初是由侯云德教授开始的，1982 年建立了无性繁殖系统，并于 1985 年成功表达出干扰素[3]。后来，陈炬等[9]人首次在烟草植株中表达成功人 IFN- α 基因。随后，人 IFN- γ 基因也在烟草中获得成功表达。新型载体不

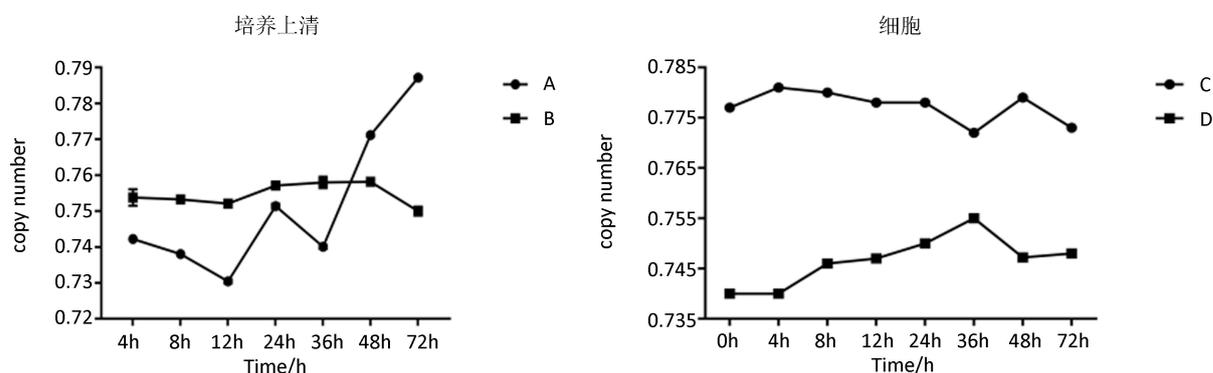


Figure 13. Analysis by real-time PCR; A: culture supernatant of PK-15 effected by TGEV; B: culture supernatant of PK-15 effected by TGEV After rPoIFN- γ processed; C: cells of PK-15 effected by TGEV; D: cells of PK-15 effected by TGEV After rPoIFN- γ processed

图 13. 荧光定量 PCR 分析; A: 感染 TGEV 的 PK-15 细胞培养上清; B: 经猪 γ 干扰素重组杆状病毒作用的 PK-15 细胞感染 TGEV 的培养上清; C: 感染 TGEV 的 PK-15 细胞; D: 经猪 γ 干扰素重组杆状病毒作用的 PK-15 细胞感染 TGEV 的细胞

断构建成功, 新的亚型干扰素基因也陆续被克隆和表达。柴玉波等构建了新型双顺反子表达载体 pEC34; 江漪[10]等构建了人 IFN- γ 植物二元表达载体; 夏春等克隆和测序了猪 IFN- γ 基因; 目前国内对于品种优良的地方猪种的研究比较少, 本试验成功将地方猪种——荣昌猪的 IFN- γ 进行克隆及序列分析, 更好地为进一步成功的表达出该干扰素提供材料。

本试验从荣昌猪外周血淋巴细胞中成功克隆了 IFN- γ 基因, 并将获得到的 IFN- γ 基因与 GenBank 上发表的猪 IFN- γ 基因进行核苷酸同源性比较, 得到同属之间与 DQ839398 (长白猪)、AY293733 (成华猪) 等猪种同源性最高, 为 99.8%, 两者之间的差异性仅在 235 号碱基 T 变成了 C。与 X53085 (野猪) 同源性最低, 为 96.8%; 不同属之间与 AB107652 (骆驼) 同源性最高, 为 84.8%; 与 EF614201 (羊) 同源性最低, 为 60.7%; 与 Genbank 刊载的 DQ902588 (荣昌猪) 同源性为 99.2%, 两者之间发生了 131 位碱基 G-A, 169 位碱基 G-A, 235 位碱基 T-C, 355 位碱基 G-A 的颠换。而这四个地方碱基对的颠换只有第 131 位的碱基对所编码的氨基酸发生了 Pro-Leu 的变化。与 Genbank 刊载的 DQ839398 (长白猪) 的 IFN- γ cDNA 序列之间仅在 235 位碱基 T-C 发生了颠换, 而这个颠换没有改变所编码的氨基酸(Leu)种类。推测氨基酸的变化可能对 IFN- γ 蛋白的理化性质、生物学活性有一定的影响。这些影响还有待进一步研究。

目前市场上使用的猪干扰素大多是通过大肠杆菌表达的, 但是由于原核表达系统存在缺陷, 表达的重组蛋白无法实现天然状态的修饰和折叠, 而必须经过变性复性后使用, 大大折损其效果, 应用不太理想。相对原核表达系统而言, 真核表达系统具有翻译后的加工修饰系统, 表达的重组蛋白更接近天然蛋白质。在昆虫细胞中表达重组蛋白, 王彦彬[11]分别用带蜂素信号肽和不带蜂素信号肽的重组杆状病毒感染 sf9 昆虫细胞进行重组蛋白的表达, 发现二者在昆虫细胞中表达的蛋白分布存在显著差异。本试验中, 表达的重组蛋白极少被分泌到细胞培养上清中, 应用杆状病毒表达系统对猪干扰素进行表达的条件有待改进和提高。

干扰素抗病毒活性的检测最常见的方法就是细胞病变抑制法, 秦立廷[12]等人用 VSV*GFP-MDBK 细胞系统测定了重组牛 IFN- γ 的抗病毒活性, 重组 VSV*GFP 可以在宿主细胞内复制, 并表达绿色的荧光蛋白, 故通过观察荧光强度和数量就能测定重组干扰素的抗病毒活性, 与传统的细胞病变抑制法通过直接观察细胞病变相比更直观且简单, 是检测抗病毒活性的好选择。本试验将目的基因与转移载体 pFastBacTM Dual 连接构建了重组转移载体 pFastBacTM Dual-IFN- γ , 转化 DH10BacTM 感受态细胞, 通过 X-gal、IPTG 和抗性筛选, 获得重组穿梭质粒 Bacmid-IFN- γ 。Bacmid-IFN- γ 转染 Sf9 昆虫细胞, 得到

重组杆状病毒, 经过扩大培养获得稳定扩增的重组杆状病毒。通过 SDS-PAGE 和 IFA 鉴定, 发现表达的重组蛋白主要存在于感染了重组杆状病毒的 Sf9 细胞上, 并不能在 Sf9 昆虫细胞培养上清中进行大量分泌, 在上清中重组蛋白量少, SDS-PAGE 电泳的灵敏度不足以将其分辨出来, 表明应用杆状病毒表达系统对猪干扰素进行表达的条件有待改进和提高。

本试验采用 SYBR 荧光染料法进行 Real-time PCR 检测并对起始模板的拷贝数进行分析, 结果表明 rPoIFN- γ 能一定程度阻止 TGEV 在 PK-15 细胞中的增殖复制。试验用来处理 PK-15 细胞的重组 PoIFN- γ 感染昆虫细胞的细胞裂解液并未进行纯化浓缩, 浓缩纯化后的抑制效果应该会更好。亦或将重组猪 γ 干扰素表达成蛋白, 纯化后抑制病毒的效果想必要较为可观, 重组猪 IFN- γ 能一定程度抑制病毒在细胞内的复制增殖。

参考文献

- [1] 杜念兴. 兽医免疫学[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 1997: 74-76.
- [2] 高建忠, 祝卫东, 黄玉帮. 干扰素的研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2004, 23(1): 58-59.
- [3] 侯云德, 张丽兰, 张利萍, 等. 干扰素及其临床应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 21(4): 408-411.
- [4] Dijkmans, R. and Vandebroek, K. (1990) Sequence of the Porcine Interferon Gamma Gene. *Nucleic Acids Research*, **18**, 4259-4261. <https://doi.org/10.1093/nar/18.14.4259>
- [5] Vandebroek, K., Dijkmans, R., Aerschot, A.V., et al. (1991) Engineering by PCR Based on Amplification of the Genomic Porcine Interferon-Gamma for Expression in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **180**, 1408-1415. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)81353-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)81353-1)
- [6] 秦立廷, 王喜军, 胡森, 等. 猪 γ -干扰素在重组杆状病毒中的表达及其抗病毒活性的测定[J]. 生物工程学报, 2007, 23(3): 387-391.
- [7] Vandebroek, K., Nauwynck, H., Vanclerpooten, A., et al. (1998) Recombinant Porcine IFN-Gamma Potentiates the Secondary IgG and IgA Responses to an Inactivated Suid Herpesvirus-1 Vaccine and Reduces Post Challenge Weight Loss and Fever in Pigs. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **18**, 739-744. <https://doi.org/10.1089/jir.1998.18.739>
- [8] Heath, A.W. and Playfiar, H.L. (1990) Conjugation of Interferon-Gamma to Antigen Enhances Its Adjuvanticity. *Immunology*, **71**, 454-456.
- [9] 陈炬, 孙勇如, 李向辉, 等. 人 α -干扰素 cDNA 在转化的烟草植株中表达[J]. 中国科学, 1990(3): 253-260.
- [10] 江漪, 谢雯芳, 代婉娟, 等. 七味白术散对轮状病毒感染乳鼠 sIgA、血清 IFN- γ 及小肠黏膜病理的影响[J]. 新中医, 2015, 47(9): 203-205.
- [11] 王彦彬. 猪干扰素 α 和 γ 在杆状病毒/昆虫细胞系统中表达及重组蛋白初步应用[D]: [博士学位论文]. 郑州: 河南农业大学, 2008.
- [12] 秦立廷, 王喜军, 胡森, 等. 牛 γ -干扰素在重组杆状病毒中的表达及其抗病毒活性的测定[J]. 微生物学报, 2007, 47(3): 503-507.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: amb@hanspub.org