

延边白鹅 $IFN-\gamma$ 基因的原核表达 及其多克隆抗体的制备

张 翩,刘恩平,陈海迪,高 旭*,张立媛,于清洋,鲁 承,梁晚枫
(延边大学 动物医学系,吉林 延吉 133400)

摘要:为制备抗延边白鹅 $IFN-\gamma$ 蛋白的多克隆抗体,以已制备的 pMD - IFN - γ 质粒为模板,通过 PCR 扩增到延边白鹅 $IFN-\gamma$ 基因,经 TA 克隆和 *BamH I*、*EcoR I* 双酶切,将目的基因亚克隆至 pGEX - 4T - 1 原核表达载体,转化大肠杆菌 BL21 (DE3),进行 IPTG 诱导表达,将经 SDS - PAGE 及 Western blot 鉴定正确的重组蛋白用 GST 标签纯化试剂盒纯化,以纯化的重组蛋白作为抗原,免疫 BALB/c 小鼠制备多克隆抗体并进行 ELISA 检测。结果显示,成功构建了原核表达载体 pGEX - $IFN-\gamma$,表达的重组蛋白以包涵体形式存在,分子质量约为 43 ku,制备的小鼠抗 $IFN-\gamma$ 多克隆抗体效价为 1:16 000。

关键词: 延边白鹅; $IFN-\gamma$ 基因; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004 - 3268(2015)12 - 0126 - 04

Prokaryotic Expression of Yanbian Goose $IFN-\gamma$ Gene and Preparation of Its Polyclonal Antibody

ZHANG Ying, LIU Enping, CHEN Haidi, GAO Xu*, ZHANG Liyuan,
YU Qingyang, LU Cheng, LIANG Wanfeng
(Department of Veterinary Medicine, Yanbian University, Yanji 133400, China)

Abstract: In order to prokaryotic express Yanbian white goose $IFN-\gamma$ gene, and prepare polyclonal antibody against goose $IFN-\gamma$ protein. The goose $IFN-\gamma$ gene was amplified from pMD-IFN- γ plasmid by PCR, the target gene was cloned into pGEX-4T-1 vector to construct the prokaryotic express plasmid. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL-21(DE3) strain, and induced by IPTG, which can express fused protein GST- $IFN-\gamma$, the product was identified by SDS-PAGE and Western blot. Then the antiserum against GST- $IFN-\gamma$ was prepared in BALB/c mice and the antibody titer was determined by ELISA. The results showed that fusion protein GST- $IFN-\gamma$ was about 43 ku, the polyclonal antibody against GST- $IFN-\gamma$ was prepared, and the antibody titer was 1:16 000 by ELISA.

Key words: Yanbian white goose; $IFN-\gamma$ gene; prokaryotic expression; polyclonal antibody

干扰素 (interferon, IFN) 是在诱导剂作用下,在特定细胞基因控制下产生的一类具有抗病毒、抗寄生虫、抗肿瘤及调节免疫等作用的糖蛋白^[1]。1957 年, Isaacs 等^[2]在研究流感病毒干扰现象时,在鸡胚

绒毛尿囊膜中首次发现一种具有干扰病毒繁殖作用的因子,将其命名为干扰素。IFN 家族基于其基因序列、染色体定位和受体特异性被分为 3 型,即 I 型、II 型和 III 型,其中 I 型干扰素包括 $IFN-\alpha$ 、 β 、 ω

收稿日期:2015 - 07 - 10

基金项目:国家自然科学基金项目(31460661);延边大学第六届大学生科研项目(20130108)

作者简介:张 翩(1987 -),女,吉林通化人,在读硕士研究生,研究方向:动物传染病学。E-mail:187120784@qq.com
刘恩平为共同第一作者。

* 通讯作者:高 旭(1977 -),男,吉林德惠人,副教授,博士,主要从事动物病毒分子生物学与免疫学研究。
E-mail:ybuac@126.com

等,Ⅱ型干扰素由单基因家族 IFN- γ 构成,又称为免疫干扰素,Ⅲ型干扰素是新发现的一种细胞因子,即 IFN- λ ^[3]。研究发现,牛、猪、鸡、鹅的Ⅱ型干扰素(IFN- γ)具有抗病毒活性和免疫佐剂作用^[4-8]。目前,有关禽类 IFN- γ 的研究主要集中于鸡、鸭^[9-12],关于鹅的研究较少。因此,在前期成功克隆到延边白鹅 IFN- γ 基因(GenBank: JX966250)^[13]的基础上,拟对目的基因进行原核表达,并制备小鼠抗鹅 IFN- γ 多克隆抗体,为进一步开展延边白鹅 IFN- γ 基因的抗病毒活性和免调节作用等研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物和菌株 BALB/c 小鼠由延边大学实验动物中心提供;pGEX-4T-1 菌株和 pMD-IFN- γ 质粒为延边大学农学院预防兽医学实验室保存^[13]。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶及 Ex Taq 酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;山羊抗小鼠 IgG-HRP 二抗、抗 GST 标签小鼠单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;质粒提取试剂盒与胶回收试剂盒购自 Omega 公司;BL-21(DE3)感受态细胞和 ProteinIso™ GST Resin 纯化试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组原核表达载体的构建 以已构建的 pMD-IFN- γ 质粒为模板,经特异性引物(上游 P1: 5' - GGCGATCCCATGACTTGCCAGACCTACT-GCTT-3', 下游 P2: 5' - CGGAATTCTTAACATCTGCATCTCTTGG - 3', 分别含有 BamH I 和 EcoR I 内切酶位点)PCR 扩增延边白鹅 IFN- γ 基因,经 TA 克隆和双酶切后,将目的片段亚克隆至 pGEX-4T-1 原核表达载体,将鉴定为阳性的重组质粒送往英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序。

1.2.2 延边白鹅 IFN- γ 基因的原核表达与鉴定

将鉴定为阳性的重组菌复苏后培养至 OD₆₀₀ = 0.6,加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)进行诱导表达,分别在 0、1、2、3、4、5、6 h 取样,预处理后进行 SDS-PAGE 电泳分析。同时以相同诱导条件诱导 pGEX-4T-1 空载体作为对照。

1.2.3 重组蛋白表达形式分析 取诱导 5 h 的重组菌,3 500 r/min 离心 15 min 后,用 PBS 重悬菌体沉淀,-80 ℃反复冻融 3 次后超声波破碎菌体,功

率 200 W,超声开 3 s 后关 4 s,变幅杆 φ6,总时间 10 min。裂解后 3 500 r/min 离心 15 min,分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,采用考马斯亮蓝染色法染色,分析重组蛋白的表达形式。

1.2.4 IFN- γ 重组蛋白的纯化 重组质粒 pGEX-IFN- γ 经诱导表达后,将含有重组蛋白的沉淀用含 3 mol/L 尿素洗涤,梯度透析复性除去包涵体中尿素,应用 ProteinIso™ GST Resin 纯化试剂盒对复性重组蛋白进行纯化,并通过 SDS-PAGE 电泳进行纯化效果检测。

1.2.5 重组蛋白的鉴定 纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳并转移至 NC 膜,以抗 GST 标签小鼠单克隆抗体为一抗(1:500),山羊抗小鼠 IgG-HRP 为二抗(1:5 000),对其进行 Western blot 检测。

1.2.6 多克隆抗体的制备 在免疫前取 BALB/c 小鼠尾静脉血制备阴性对照血清,采用皮下多点注射的方式,按照 100 μg/只的剂量,将纯化的延边白鹅 IFN- γ 重组蛋白加入等体积弗氏完全佐剂进行免疫。第 1 次免疫后 10 d,以同剂量的重组蛋白和等体积弗氏不完全佐剂进行第 2 次免疫,10 d 后以同样方法进行第 3 次免疫。采取眼球采血分离血清,-20 ℃保存备用。

1.2.7 多克隆抗体的间接 ELISA 效价检测 将纯化的延边白鹅 IFN- γ 重组蛋白作为抗原,包被于 96 孔板,以待测本试验制备的小鼠抗延边白鹅 IFN- γ 多克隆抗体为一抗(倍比稀释),以山羊抗小鼠 IgG-HRP 为二抗(1:5 000),TMB 显色后,加 H₂SO₄ 终止反应,采用酶标仪读取 OD₄₅₀ 结果。

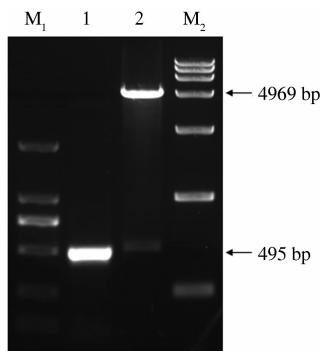
2 结果与分析

2.1 重组原核表达质粒的鉴定

重组原核表达质粒经 PCR 扩增,在约 495 bp 处出现 1 条特异条带,经 BamH I 和 EcoR I 双酶切,在约 4 969 bp 和 495 bp 处出现 2 条特异条带,与预期大小相符(图 1)。测序结果正确,表明已成功构建了重组原核表达质粒 pGEX-IFN- γ 。

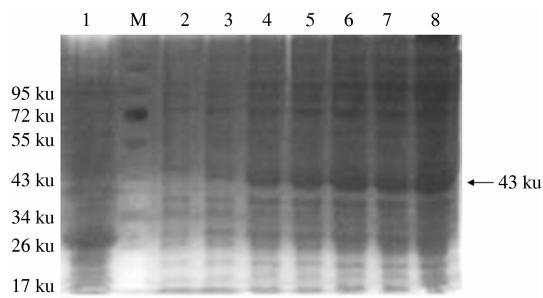
2.2 延边白鹅 IFN- γ 基因的表达及鉴定

经 IPTG 诱导表达和 SDS-PAGE 电泳分析,在分子质量约为 43 ku 处出现 1 条特异条带,与预期大小一致,而空载体对照未见此条带(图 2),在 37 ℃下诱导 4 h 的重组蛋白表达量最高。对诱导的目的蛋白进行可溶性分析,发现目的蛋白主要存在于沉淀中,而上清样品中仅有少量目的蛋白(图 3),表明其主要以包涵体形式存在。



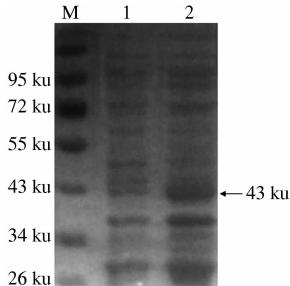
M₁: DL2000 DNA Marker; M₂: DL15000 DNA Marker;
1: IFN - γ 基因 PCR 产物; 2: BamH I 和 EcoR I 双酶切结果

图 1 重组质粒 pGEX - IFN - γ 的鉴定



M: 蛋白质分子质量标准; 1: 诱导 pGEX - 4T - 1 空载体; 2: 未诱导的 pGEX - IFN - γ ; 3—8: 分别诱导 1、2、3、4、5、6 h 的 pGEX - IFN - γ

图 2 重组蛋白 SDS - PAGE 分析



M: 蛋白质分子质量标准; 1: 上清样品; 2: 沉淀样品

图 3 重组蛋白存在形式的鉴定

2.3 延边白鹅 IFN - γ 重组蛋白的纯化

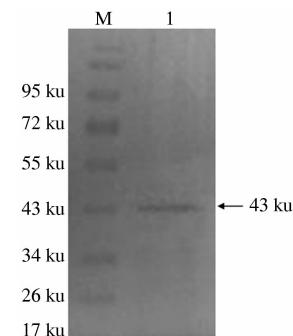
对重组菌大量诱导, 经超声波破碎, 对收集的沉淀进行蛋白复性, 利用 ProteinIsoTM GST Resin 纯化试剂盒进行纯化, 经 SDS - PAGE 分析, 成功获得了纯化的目的重组蛋白, 仅有大小约为 43 ku 的目的条带, 而其他未经纯化前的杂蛋白条带均被去除掉(图 4)。

2.4 表达重组蛋白的鉴定

Western blot 检测结果显示, 在 43 ku 处出现 1 条阳性反应条带, 而空载体仅出现 1 条 26 ku 的 GST 标签蛋白条带, 没有出现 43 ku 的目的条带(图 5), 大小均与预期相符。

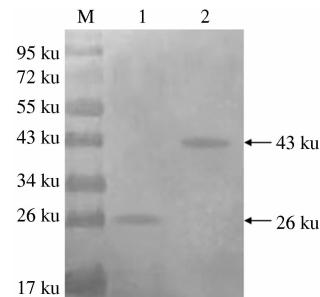
2.5 多克隆抗体效价测定

将纯化的延边白鹅 IFN - γ 重组蛋白作为抗原,



M: 蛋白质分子质量标准; 1: IFN - γ 重组蛋白的纯化产物

图 4 重组蛋白的纯化



M: 蛋白质分子质量标准;
1: pGEX - 4T - 1 质粒阴性对照; 2: IFN - γ 重组蛋白

图 5 表达重组蛋白的 Western blot 鉴定

包被于 96 孔板, 建立检测抗延边白鹅 IFN - γ 重组蛋白多克隆抗体效价的 ELISA 方法。ELISA 检测结果显示, 制备的小鼠抗延边白鹅 IFN - γ 重组蛋白多克隆抗体效价为 1:16 000。

3 讨论

近些年, 随着分子生物学研究的深入和快速发展, 原核表达系统也随之升级和拓展。目前, 原核表达载体有 pET、pGEX、pHAT、pMAL、pKK、pProEX、pRSET、pSE 及 pQE 等, 本试验在前期成功克隆到延边白鹅 IFN - γ 基因(GenBank: JX966250)^[13]的基础上, 采用 pET 和 pGEX 2 种原核表达系统进行表达。延边白鹅 IFN - γ 基因在 pET 原核表达系统中(pET - 28a、pET - 30a 和 pET - 32a 载体)未能稳定表达(未显示), 但在 pGEX 原核表达系统中(pGEX - 4T - 1 载体)能够稳定表达, 且表达量可以满足制备多克隆抗体的要求。其原因可能是外源目的基因过短, 全长仅为 495 bp, 编码 164 个氨基酸, 编码蛋白质的预测分子质量低到 17 ku, 不利于蛋白质的表达和纯化。pGEX - 4T - 1 载体含有谷胱甘肽 S 转移酶(GST)标签, GST 标签含有 211 个氨基酸, 分子质量较大(约 26 ku), 适合用于较短目的基因的表达^[14]。相对而言, pET 原核表达系统的组氨酸(His)标签分子质量较小^[15-16], 且 His 标签为非重组

蛋白,会产生非特异性结合,这将会阻碍 His 标签的亲和纯化。此外,GST 对于其底物谷胱甘肽具有极高的特异性,在缓冲液中加入还原型谷胱甘肽,即可从固化的谷胱甘肽柱子上完全洗脱,回收带 GST 标记的重组蛋白。因此,本研究采用 GST 标签蛋白纯化试剂盒,在表达的目的蛋白分子质量较小且存在包涵体的情况下,仍然获得了较高纯度的纯化蛋白,完全可以满足后期用于多克隆抗体制备的抗原纯度要求。此外,为鉴定延边白鹅 IFN- γ 基因在 BL-21 感受态细胞中正确表达,在没有商品化抗延边白鹅 IFN- γ 蛋白抗体的情况下,试验采用了抗 GST 标签小鼠单克隆抗体为一抗,以 pGEX-4T-1 质粒诱导表达为阴性对照,证明了目的基因在 BL-21 感受态细胞中获得了表达,为进一步验证该重组蛋白为延边白鹅 IFN- γ 基因的表达产物,以及检测重组蛋白的免疫原性和反应原性,本试验以制备的小鼠抗延边白鹅 IFN- γ 多克隆抗体为一抗,进行了 ELISA 方法检测。结果提示,延边白鹅 IFN- γ 基因不仅在 BL-21 感受态细胞中获得了正确表达,而且该重组蛋白具有较好的免疫原性和反应原性。

在成功获得纯化的延边白鹅 IFN- γ 重组蛋白后,本试验以体积较小的 BALB/c 小鼠为实验动物进行多克隆抗体的制备。与单克隆抗体相比,多克隆抗体是血清学研究最常用和必不可少的一种工具,其具有制备方法简单、节省时间和成本低等优势,而单克隆抗体具有特异性高、后期通过细胞分泌可以继续生产完全一致的抗体等优点,但单克隆抗体的制备工艺复杂、消耗时间和成本高,且不能用于免疫沉淀和免疫凝集试验,抗原与抗体的反应强度不如多克隆抗体,使其应用范围受到一定的限制^[17]。因此,本试验没有采用复杂的单克隆抗体制备工艺,应用简单、省时和低成本的多克隆抗体制备技术,以弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂乳化纯化的延边白鹅 IFN- γ 重组蛋白,经 3 次免疫获得了较高的抗体效价,ELISA 检测结果显示,制备的小鼠抗延边白鹅 IFN- γ 重组蛋白多克隆抗体 ELISA 效价为 1:16 000,完全可以满足下一步对延边白鹅 IFN- γ 基因的体内外分子生物学试验研究。

本试验成功表达了延边白鹅 IFN- γ 重组蛋白,并制备了高效价的抗延边白鹅 IFN- γ 重组蛋白的多克隆抗体。该重组蛋白及其多克隆抗体的制备,不仅为探讨延边白鹅 IFN- γ 蛋白的抗病毒活

性和免疫调节作用提供依据,也为今后深入开展延边白鹅 IFN- γ 基因的功能和作用机制研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 侯云德. 干扰素研究现状和展望 [J]. 国外医学微生物分册, 1985(6):241-244.
- [2] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. the interferon [J]. J Interferon Res, 1987, 7(5):429-438.
- [3] 杨生海, 殷宏, 刘永生, 等. 干扰素- γ 研究进展 [J]. 生物技术通报, 2010, 42(8):29-34.
- [4] 梁望旺, 周丹娜, 杨克礼, 等. 猪 γ -干扰素的表达及抗病毒活性研究 [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(11):2283-2286.
- [5] 胡晓静, 刘棋, 付薇, 等. 鹅 γ -干扰素的原核表达及抗病毒活性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(2):65-70.
- [6] 齐静, 杜以军, 朱小玲, 等. 鸡 γ -干扰素的可溶性表达及纯化产物的抗病毒活性 [J]. 微生物学报, 2009, 49(1):85-91.
- [7] Karpala A J, Morris K R, Broadway M M, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of chicken IFN-lambda [J]. J Interferon Cytokine Res, 2008, 28(6):341-350.
- [8] 王云峰. 表达多种外源基因的鸡痘病毒载体疫苗构建及免疫学评价 [D]. 哈尔滨: 中国农业科学院, 2005.
- [9] 彭永刚, 陈海迪, 高旭, 等. 延边白鹅 IFN- α 基因的原核表达及其表达产物生物学活性的研究 [J]. 中国兽医学报, 2014, 44(5):527-531.
- [10] 张颖, 高旭, 陈海迪, 等. 表达鹅 α -干扰素基因重组禽痘病毒的构建及表达产物抑制鹅细小病毒活性的初步研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2012, 12(12):942-945.
- [11] 包晶晶. 重组鸭 α 、 γ 干扰素的研制及其抗病毒作用研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [12] 张颖, 高旭, 陈海迪, 等. 表达鹅细小病毒 VP3 基因重组腺病毒的构建与鉴定 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(33):11751-11754.
- [13] 张颖, 高旭, 汪雨婷, 等. 延边白鹅干扰素基因的克隆及序列分析 [J]. 吉林畜牧兽医, 2012(11):24-26.
- [14] 周宇荀, 魏东芝, 王二力. 融合蛋白表达载体 pGEX 及其应用 [J]. 生命科学, 1998, 10(3):122-124.
- [15] 朱丽丹, 朱杰华, 赵冬梅, 等. 致病疫霉 NLP 家族基因 PiNLP30 的克隆、原核表达及蛋白质纯化 [J]. 河南农业科学, 2014, 43(10):74-78.
- [16] 张澍, 王燕华, 郭保党, 等. 鸡胸腺肽 β 4、 β 15 基因的原核表达及其生物学活性测定 [J]. 河南农业科学, 2014, 43(12):140-143.
- [17] 贾慧娜, 罗海玲. 多克隆抗体制备方法的研究进展 [J]. 中国草食动物科学, 2012(S1):66-69.