

# 犬干扰素- $\gamma$ cDNA 的克隆及其在鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)中表达

杨 琪 夏 春\* 赵德明 汪 明

(中国农业大学动物医学院,北京 100094)

关键词 犬, IFN- $\gamma$ , 重组干扰素, SP2/0 细胞

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0365-04

干扰素(IFN)是由脊椎动物细胞产生的一类分泌型糖蛋白,它具有广谱抗病毒和增强免疫应答的作用<sup>[1]</sup>。干扰素可分为 I 型和 II 型, II 型干扰素又称为干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )或免疫干扰素,主要由抗原刺激 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞所产生<sup>[2]</sup>。IFN- $\gamma$  可使 M $\phi$  功能亢进,诱导产生特异性抗体,在免疫应答中十分重要<sup>[3]</sup>。

80 年代初,人的干扰素基因克隆成功后<sup>[4]</sup>,各国学者相继开展了动物干扰素的研究。1987 年以来,猪、鸡、鸭等动物的干扰素基因先后被克隆报道。Hummeler 等于 1987 年首先开始了犬 IFN- $\alpha$  基因的研究<sup>[5]</sup>。1992 年,Zucker 等<sup>[6]</sup>和 Devos 等<sup>[7]</sup>研究小组几乎同时克隆了犬 IFN- $\gamma$  基因(CaIFN- $\gamma$ ),而且 Zucker 等将 CaIFN- $\gamma$  基因在中国地鼠卵巢细胞(CHO)中进行了表达。1996 年,Akira 等克隆了犬 IFN- $\gamma$  基因<sup>[8]</sup>。最近,Nishikawa 等<sup>[9]</sup>和 Okano 等<sup>[10]</sup>又分别利用痘病毒和重组杆状病毒表达了 CaIFN- $\gamma$  并进行了犬重组干扰素(rCaIFN- $\gamma$ )抗病毒感染和提高 MHC II 表达等实验。夏春等(1999)也克隆报道过德国牧羊犬 IFN- $\alpha$  基因序列<sup>[11]</sup>,但是,至今尚未见 rCaIFN- $\gamma$  的相关研究。

近年来,养犬业在我国发展十分迅速,犬的种类和数量也越来越多。而疾病尤其是病毒病却严重危害着犬的健康与生存。为了研制和开发犬重组干扰素类生物制品,本文克隆了犬 IFN- $\gamma$  cDNA,并用 pRc/CMV2 表达载体率先在鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)中进行表达。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、酶、试剂、细胞和病毒

JM109、pGEM T-Easy 载体购自 Promega 公司。pRc/CMV2 表达载体购自 Invitrogen 公司。QIAPrep Spin Miniprep 质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司。限制性内切酶 *Hind* III、*Not* I、*Eco*R I 和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。RT-PCR-HIGH-PLUS 试剂盒源于 TOYOBO 公司。滤泡性口炎病毒(VSV)和小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)由本室保存。牛肾细胞系(MDBK)购自中国兽药监察所。类新霉素(G418)购于 Gibco 公司。

### 1.2 犬淋巴细胞分离与总 RNA 提取

总 RNA 从犬脾脏的淋巴细胞中提取。首先用淋巴细胞分离液按常规方法分离细胞,再用含 10 $\mu$ g/ $\mu$ L Concanavalin A (ConA, SIGMA)的 RPMI 1640 培养基(GIBCOBRL)在 5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 中培养数小时。随后,用 TRIZOL Reagent (GIBCOBRL)提取总 RNA。

### 1.3 引物设计

从 DDBJ/GenBank 基因库中读取已登录的犬 IFN- $\gamma$  的基因序列(序号为 AP126247 和 S41201)。在开放读码框架(ORF)两端设计引物。上游引物序列为 5'-CAAGCT TAT-GAATTATACAAGCTATATCTTAG-3',含 *Hind* III 酶切位点;下游引物序列为 5'-TGGCGGCCGCTTATTT CGATGCTCTGCGGCCTCG-3',含 *Not* I 酶切位点。引物均由北京赛百盛生物工程公司合成。

### 1.4 cDNA 克隆与鉴定

采用 RT-PCR-HIGH-PLUS 试剂盒从脾淋巴细胞总 RNA 扩增 IFN- $\gamma$ 。PCR 反应中含 RNA 3  $\mu$ L,上、下游引物各 100 pmol,PCR 总体积为 50  $\mu$ L。PCR 反应条件为 60 $^{\circ}$ C、30 min,94 $^{\circ}$ C、2 min,1 个循环。再 94 $^{\circ}$ C、1 min,55 $^{\circ}$ C、1 min,40 个循环。最后在 60 $^{\circ}$ C 保温 7 min。PCR 产物经 1.2% 低熔点琼脂糖电泳、回收 520 bp 处目标带 DNA,再与 T-Easy 载体连接、转化 JM109 感受态、挑选白斑,提取质粒后 *Eco*R I 酶切鉴定。阳性重组子名为 pGEM T-Easy/ CaIFN- $\gamma$ 。

### 1.5 表达载体的构建

先用 *Hind* III 和 *Not* I 双酶切 pGEM T-Easy/ CaIFN- $\gamma$  重组子,再用 0.8% 低熔点琼脂糖纯化回收小片段 DNA(CaIFN- $\gamma$ )。同时,用 *Hind* III 和 *Not* I 双酶切载体 pRc/CMV2,用 0.8% 低熔点琼脂糖纯化回收大片段,最后,用 T4 DNA 连接酶连接 CaIFN- $\gamma$  和 pRc/CMV2 片段,构建成重组表达质粒 pRc/CMV2/ CaIFN- $\gamma$ 。

### 1.6 序列测定与分析

将重组表达质粒 pRc/CMV2/ CaIFN- $\gamma$  转入 JM109 感受态细胞,用氨苄青霉素抗性筛选阳性重组子后,再用 *Hind* III 和

*Not* I 双酶切、PCR 鉴定。随后将重组子 pRc/CMV2/ CaIFN- $\gamma$  送 TaKaRa 公司(大连)以 T7 为引物进行序列测定。采用 GENETYX 软件在 Power Macintosh 微机上进行同源性比较和序列分析。

### 1.7 鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)的转染与表达

采用磷酸钙共沉淀法转染 SP2/0 细胞后进行瞬间表达和 G418 筛选表达。即转染 SP2/0 细胞前 1 h 更换一次 DMEM 培养基,并将预先制备好的磷酸钙-pRc/CMV2/ CaIFN- $\gamma$  沉淀加在 SP2/0 单层细胞表面。转染 6 h 后,弃培养基,再用 15% 的甘油处理 3min 后,加入新的 DMEM 培养基。分别于 24 h、48 h 和 72 h 收获细胞培养上清液 2 mL, PBS 透析后,过滤除菌, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。同时,将转染后的细胞继续培养 48 h, 按 1:4 传代,待细胞对数生长期时,用终浓度为 600 $\mu$ g/mL 的 G418 的筛选,继续培养 7d (此时未转染对照组细胞已死亡),存活的 SP2/0 细胞呈克隆化生长后,再用终浓度为 200 $\mu$ g/mL 的 G418 维持培养 2 周,然后更换培养液,72 h 后收获培养上清液, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.8 抗病毒活性测定

将牛肾细胞(MDBK)接种于 96 孔板,5% CO $_2$ 、37 $^{\circ}$ C 培养成单层,加入倍比稀释的培养上清液处理 18 h,每孔再加入 100  $\mu$ L 含 100 TCID $_{50}$  的滤泡性口炎病毒(VSV)24 h 后观察细胞病变结果(CPE),以 50% 细胞出现 CPE 孔的干扰素稀释度的倒数为干扰素效价(u/mL)。

## 2 结 果

### 2.1 cDNA 克隆与鉴定

RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后结果如图 1 A 所示; PCR 产物与 pGEM T-Easy 连接后,经 *Eco*R I 酶切结果如图 1 B 所示。图 1 中在 520 bp 处都有一条特异带。根据其规格推断为 CaIFN- $\gamma$  cDNA。

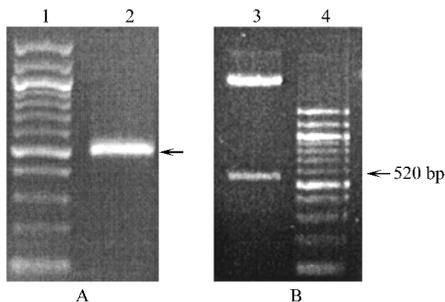


图 1 犬干扰素- $\gamma$  cDNA 克隆与鉴定(A, B)

Fig.1 Cloning and identification of canine IFN- $\gamma$  gene(A, B)

1. 100 bp molecular weight markers (100 200 300 , 400 500bp-1200bp)
2. PCR product;
3. The recombinant plasmids (T-easy/CaIFN $\gamma$  was digged by *Eco*R I ;
4. 100 bp molecular weight markers(100 , 200 300 400 500bp-1200bp)

### 2.2 表达载体的构建与 CaIFN- $\gamma$ 序列测定

CaIFN- $\gamma$  片段与 pRc/CMV2 连接后构建的 pRc/CMV2/

CaIFN- $\gamma$  重组表达质粒如图 2 所示。pRc/CMV2/ CaIFN- $\gamma$  表达质粒经 *Hind* III 和 *Not* I 双酶切和 PCR 扩增鉴定 CaIFN- $\gamma$  结果在 520 bp 处都有一条特异带,即 CaIFN- $\gamma$  DNA 片段。

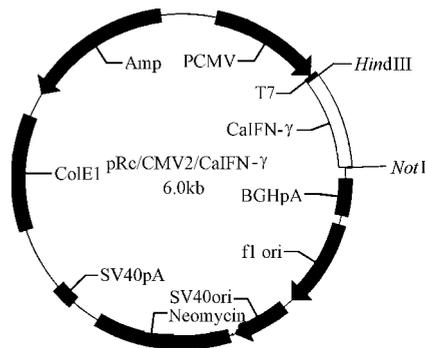


图 2 构建重组表达质粒 pRc/CMV2/ CaIFN- $\gamma$

Fig.2 Structure of the recombinant expression vector pRc/CMV2/ CaIFN- $\gamma$

### 2.3 犬 IFN- $\gamma$ cDNA 序列与序列分析

CaIFN- $\gamma$  cDNA 测序结果如图 3 所示。基因全长为 501 个核苷酸,编码 166 个氨基酸,信号肽为 23 个氨基酸(序列下横线),成熟蛋白为 143 个氨基酸,含两糖基化位点(序列下横线)。蛋白分子量为 19 kD。将该序列与基因库中 CaIFN- $\gamma$  比较,同源性为 99%。

```

1  ATG AAT TAT ACA AGC TAT ATC TTA GCT TTT CAG CTT TGC GTG ATT TTG TGT TCT TCT GGC
1  M N Y T S Y I L A F Q L C V I L C S S S G
61  TGT AAC TGT CAG GCC ATG TTT TTT AAA GAA ATA GAA AAC CTA AAG GAA TAT TTT AAT GCA
21  C N C Q A M F F K E I E N L K E Y F N A
121 AGT AAT CCA GAT GTA TCG GAC GGT GGG TCT CTT TTC GTA GAT ATT TTG AAG AAA TGG AGA
41  S N P D V S D G G S L F V D I L K K W R
181 GAG GAG AGT GAC AAA ACA ATC ATT CAG AGC CAA ATT GCT TCT TTC TAG TTG AAA CTG TTT
61  E E S D K T I I Q S Q I V S F Y L K L F
241 GAC AAC TTT AAA GAT GAC CAG ATC ATT CAA AGG AGC ATG GAT ACC ATC AAG GAA GAC ATG
81  D N F K D D Q I I Q R S M D T I K E D M
301 CTT GGC AAG TTC TTA AAT AGC AGC ACC AGT AAG AGG GAG GAC TTC CTT AAG CTG ATT CAA
101 L G K F L N S S T S K R E D F L K L I Q
361 ATT CCT GTG AAC GAT CTG CAG GTC CAG CGC AAG GCG ATA AAT GAA CTC ATC AAA GTG ATG
121 I P V N D L Q V Q R K A I N E L I K V M
421 AAT GAT CTC TCA CCA AGA TCC AAC CTA AGG AAG CCG AAA AGG AGT CAG AAT CTG TTT CGA
141 N D L S P R S N L R K R K R S Q N L F R
481 GGC CGC AAG GCA TCG AAA TAA
161 G R R A S K *

```

图 3 犬干扰素- $\gamma$ (CaIFN- $\gamma$ )cDNA 序列

Fig.3 The sequence of canine IFN- $\gamma$  cDNA with the predict 166 amino acid sequence shown

### 2.4 干扰素活性测定

瞬间表达犬干扰素活性测定结果如图 4 所示。犬干扰素处理牛肾细胞(MDBK)后,再以 VSV 攻毒,其活性与转染细胞的培养时间直接相关。培养 72 h 后犬干扰素活性达 5000 u/mL。

经过 G418 筛选后,稳定表达犬干扰素活性测定结果如图 5 所示。3 组细胞系其培养上清均检测到抗 VSV 活性。犬干扰素活性平均达 2500u/mL。

## 3 讨 论

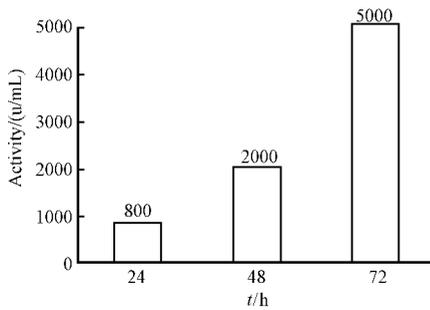


图4 瞬间转染表达犬干扰素活性检测结果

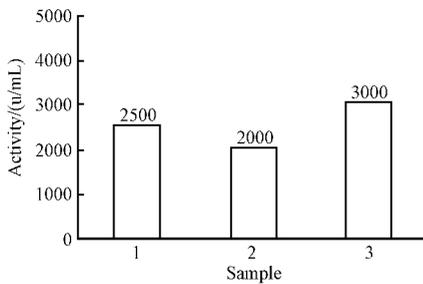
Fig. 4 The antiviral activity of recombinant canine IFN- $\gamma$  expressed by instant transfection

图5 稳定转染表达犬干扰素活性检测结果

Fig. 5 The antiviral activity of recombinant canine IFN- $\gamma$  expressed by steady transfection

序列设计了引物对,用 PCR 技术克隆了一段不含信号肽的 CaIFN- $\gamma$  基因<sup>[6]</sup>。Devos 等(1992)则采用了羊 IFN- $\gamma$  基因作为探针,从犬 DNA 基因组文库中克隆了含 3 个内含子的 CaIFN- $\gamma$  基因,并首先在中国地鼠卵巢细胞中表达,活性在 10~1000 u/ml<sup>[7]</sup>。迄今为止,在 DDBJ/EMBI/GenBank 和现有文献中仅有 2 个含 CaIFN- $\gamma$  成熟蛋白基因序列,序号分别为 AF126247 和 S41201,两者区别在于前者含 23 个氨基酸的信号肽,即两序列中的成熟蛋白序列完全一致。本文克隆的 CaIFN- $\gamma$  基因中的信号肽序列与 AF126247 一致,而在成熟蛋白序列中的第 86 位发生了点变异,密码子 AAC 变成了 GAC(天冬酰胺(N)变成了天冬氨酸(D))见图 4 中虚框显示)。成熟蛋白序列中都含 2 个糖基化位点以及与干扰素 pH 的感受性有关的 KRKR 序列。我们推测 86 位氨基酸的点变异不会影响 CaIFN- $\gamma$  结构与活性,但与犬的种类相关。

pRc/CMV2 是以人巨细胞病毒 CMV (Cytomegalovirus immediate early) 为启动子、加载有新霉素抗性基因( Neo ) 并可在哺乳动物细胞中高效表达,也是 DNA 疫苗用的良好载体之一。鼠骨髓瘤细胞是易生长、易转染、可糖基化的永久细胞系,是近年报道较多的宿主表达系。本文将含完整信号肽的 CaIFN- $\gamma$  基因插入 pRc/CMV2 表达载体 CMV 启动子下游,转染了鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0),在培养细胞和培养上清中均可检出抗 VSV 病毒活性。在 G418 选择压力下,具有新霉素抗性的 SP2/0 存活,15d 后非转染骨髓瘤细胞凋亡,逐步形成了以转染细胞为主的产 rCaIFN- $\gamma$  细胞群,并且形成了稳定表达 rCaIFN- $\gamma$  的细胞群。

Devos 等<sup>[7]</sup>曾采用 VS40 启动子在 CHO 细胞中表达 CaIFN- $\gamma$ ,rCaIFN- $\gamma$  在 CD17 细胞上的活性为 104 u/mL,而在人、牛、和鼠细胞上测定出的活性仅为 10 u/mL。Okano 等<sup>[10]</sup>用重组杆状病毒在蚕体上也表达过 rCaIFN- $\gamma$ ,并采用 FCBR11 细胞测定其活性为 10<sup>6</sup> u/蚕。Nishikawa 等<sup>[9]</sup>利用重组痘病毒表达的 rCaIFN- $\gamma$  在 MDCK 细胞上可抑制疱疹病毒 (CHV) 伪狂犬和腺病毒。本文利用 SP2/0 表达了 rCaIFN- $\gamma$ ,培养上清在 MDCK 细胞上测定的活性可达 5×10<sup>3</sup> u/mL。我们也曾在猪 PK-15 和鸡 EFC 上测定 rCaIFN- $\gamma$  的活性,均低于在 MDBK 细胞上的测定结果。因此,rCaIFN- $\gamma$  在不同的表达系和不同的测定系上活性不同,这有待于深入研究。

综上所述,本文克隆了具有一氨基酸点变异的犬 IFN- $\gamma$  cDNA,并采用 pRc/CMV2 表达载体率先在鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 中成功地表达了其重组蛋白,为应用犬重组干扰素奠定了基础。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Minagawa T, Ishiwata K, Kajimoto T. Feline interferon-omega treatment on canine parvovirus infection. *Vet Microbiol*, 1999, **69**(1-2): 51~53
- [2] Pinelli E, van der Kaaij S Y, Broeren C P, Ruitenber E J, Rutten V P. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. *Immunogenetics*, 1999, **49**(7-8): 696~699
- [3] Pinelli E, Rutten V P, Bruysters M, Moore P F, Ruitenber E J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on Leishmania infantum-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect Immun*, 1999, **67**(1): 237~243
- [4] Gray P W, Leung D W, Pennica D. Expression of human immune interferon cDNA in *E. Coli* and monkey cells. *Nature*, 1982, **295**: 503~505
- [5] Himmler A, Hauptmann R, Adolf G R. Structure and expression in *Escherichia coli* of canine interferon-alpha genes. *J Interferon Res*, 1987, **7**: 173
- [6] Zucker K L P, Esquenazi V, Miller J. Cloning of the cDNA for canine interferon-gamma. *J Interferon Res*, 1992, **12**: 191~194
- [7] Devos K, Duerinck F. Cloning and expression of the canine interferon-gamma gene. *J Interferon Res*, 1992, **12**: 95~102
- [8] Akira Iwata, Toshiki Saito, Noriko Mizukoshi-Iwata. Cloning and expression of the canine interferon-beta gene. *J Interferon and cytokine Res*, 1996, **16**: 765~770
- [9] Nishikawa Y, Iwata A, Katsushi K et al. Expression of canine interferon- $\gamma$  by a recombinant vaccinia virus and its antiviral effect. *Virus Research*, 2001, **75**: 113~121
- [10] Okano F, Satoh M, Ido T, Okamoto N, Yamada K. Production of canine IFN-gamma in silkworm by recombinant baculovirus and characterization of the product. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, **10**~**20**(11): 1015~22
- [11] XIA (夏春), WANG M (汪明). Cloning and analyse of canine interferon alpha gene. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1999, **7**(3): 245~247

## Cloning and Expression of Canine Interferon- $\gamma$ Gene in Mouse SP2/0 Cell Line

YANG Qi XIA Chun\* ZHAO De-Ming WANG Ming

( College of Animal Medicine , China Agricultural University , Beijing 100094 , China )

**Abstract** Canine Interferon- $\gamma$  (CaIFN- $\gamma$ ) cDNA was cloned from spleen T cells of dog by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). CaIFN- $\gamma$  cDNA were digested with *Hind* III and *Not* I, and inserted into pRc/CMV2 expression vector. The pRc/CMV2 /CaIFN- $\gamma$  vector was sequenced, and predicted to produce a signal peptide of 23 amino acids and a mature protein of 143 amino acids with a molecular weight of 19 kD. Two potential N-glycosylation sites are located at positions 16 and 83 of the mature protein. Comparison of the CaIFN- $\gamma$  protein sequence with that of CaIFN- $\gamma$  reported from DDBJ/GenBank revealed a homology of 99%. To establish a long time expression system, pRc/CMV2/CaIFN- $\gamma$  vector was transfected into mouse SP2/0 cell line. The SP2/0 cells culture supernatants was harvested and the antiviral activity was measured following cytopathic-effect inhibition assay using Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-vesicular stomatitis virus (VSV) system. Initial transformants with G418 phenotype produced recombinant CaIFN- $\gamma$  titers ranging from 2 500 to 5 000 u/mL of culture medium.

**Key words** canine, interferon-gamma, recombinant interferon, SP2/0 cell

Received: 10-18-2001

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62893372; Fax: 86-10-62893154; E-mail: xiachun@cau.edu.cn

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>