

# 重组鲁西黄牛 $\alpha$ 干扰素融合蛋白的表达及其抗病毒活性研究 Expression, Purification of Recombinant Luxi Yellow Cattle IFN- $\alpha$ Fusion Protein and Its Antiviral Activities

张永红<sup>1,2</sup>, 王长法<sup>1\*</sup>, 杨少华<sup>1</sup>, 高运东<sup>1</sup>, 王洪梅<sup>1</sup>, 李景鹏<sup>2</sup>, 仲跻峰<sup>1</sup>

ZHANG Yong-Hong<sup>1,2</sup>, WANG Chang-Fa<sup>1\*</sup>, YANG Shao-Hua<sup>1</sup>, GAO Yun-Dong<sup>1</sup>, WANG Hong-Mei<sup>1</sup>,  
LI Jing-Peng<sup>2</sup> and ZHONG Ji-Feng<sup>1</sup>

1 山东省农业科学院奶牛研究中心, 济南 250100

2 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

1 Research Center of Dairy Cattle Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China

2 College of Life Science of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**摘 要** 通过 PCR 从鲁西黄牛 (Yellow cattle) 基因组 DNA 中克隆了  $\alpha$  干扰素 (BoIFN- $\alpha$ ) 基因, 并插入到 pET32a+ 中, 构建成重组核表达质粒 pET32a+/BoIFN- $\alpha$  进行测序和诱导表达。测序结果表明, 鲁西黄牛 IFN- $\alpha$  基因全长 498 个核苷酸, 含一个开放阅读框 (ORF) 编码 166 个氨基酸的成熟蛋白, 与已报道的牛  $\alpha$  干扰素 C 亚型氨基酸组成同源性为 97.6%。表达产物经 SDS-PAGE 分析 表达出 40kD 的融合蛋白, 表达量占菌体总蛋白的 26.7%。表达产物经镍离子螯合次氨基三乙酸 (Ni-NTA) 亲和层析纯化, 纯化产物进行复性后在 MDBK/VSV 上的活性为  $5 \times 10^5$  u/mg。重组牛 IFN- $\alpha$  (rBoIFN- $\alpha$ ) 对牛轮状病毒 (BRV) 有一定的抑制作用, 抗 BRV 病毒活性为  $1.5 \times 10^5$  u/mg。结果显示从鲁西黄牛中克隆了 IFN- $\alpha$  基因的一种新亚型, 即 BoIFN- $\alpha$  C2, 并实现了高效表达, 获得了具有较高抗病毒活性的重组干扰素产物, 为重组牛干扰素的开发奠定了基础。

**关键词** 黄牛  $\alpha$  干扰素基因, 表达, 抗病毒活性

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0730-05

**Abstract** Interferon  $\alpha$  gene was cloned from genomic DNA of Chinese Luxi yellow cattle by PCR, and the PCR product was inserted into vector pET32a(+) to make a recombinant plasmid pET32a(+)/BoIFN- $\alpha$ . The expression of BoIFN- $\alpha$  in *Escherichia coli* was induced by addition of IPTG. Sequence analysis showed that the Chinese Luxi yellow cattle IFN- $\alpha$  gene is composed of 498 nucleotides, encoding a mature polypeptide of 166 amino acids. Compared with other BoIFN- $\alpha$  subtypes, it shares the highest identity of 97.6% to the C-subtype. SDS-PAGE results showed that recombinant proteins were expressed in inclusion bodies in *Escherichia coli* with molecular weight of 40kD and the recombinant proteins accounted for 26.7% of the whole proteins. The expressed product was purified by affinity chromatography with immobilized nickel chelating NTA (Ni-NTA) and its antiviral activities were tested on MDBK/VSV cell system. Its antiviral activities were  $5 \times 10^5$  u/mg on MDBK/VSV cell system. The results showed that the expression plasmid was successfully constructed and BoIFN- $\alpha$  C2 protein was expressed in *Escherichia coli*. Moreover the purification had good effects on antiviral activities.

**Key words** yellow cattle, interferon- $\alpha$  gene, expression, antiviral activities

Received: December 21, 2006; Accepted: February 13, 2007.

This work was supported by the grant from the Good Breed Engineering foundation of Shandong province (No. 2003-3009).

\* Corresponding author. Tel: 86-531-88604132; E-mail: wcf1967@yahoo.com.cn

山东省农科院青年基金 (No. 2005YQ036), 山东省农科院高技术自主创新基金 (No. 2006YCX027) 和山东农科院重大成果培育计划项目 (No. 2006YCG012) 资助。  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

干扰素(interferon, IFN)是一类具有高活性,多功能的蛋白,具有广谱抗病毒、抗肿瘤及免疫调节功能<sup>[1]</sup>。牛干扰素分为 I 型和 II 型,其中 I 型干扰素又分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\omega$ 、 $\tau$  亚型,均为无内含子的单拷贝或多拷贝基因,并具有广谱抗病毒作用<sup>[2]</sup>。以人 IFN- $\alpha$  基因为探针从牛的 cDNA 文库中克隆了牛 IFN- $\alpha$  基因(BoIFN- $\alpha$ ),推测 BoIFN- $\alpha$  至少有 10~12 个亚型,并测序了其中 A、B、C、D 亚型<sup>[3,4]</sup>。Chaplin<sup>[5]</sup>等(1996)从病毒感染的肠上皮细胞中克隆了 BoIFN- $\alpha$  E 亚型,并进行了重组表达研究,Paul<sup>[6]</sup>等(1996)克隆了 G、F、H 亚型,史喜菊等<sup>[7]</sup>(2003)重组表达了 I、J 亚型。

近年来,由于病毒感染引发的奶牛传染性疾病发病率明显增加,给我国奶牛养殖业造成了较大危害。而相关重组牛干扰素在抗水泡性口炎病毒、口蹄疫病毒、牛病毒性腹泻病毒、呼吸道合胞体病毒研究中均有较好效果<sup>[8-11]</sup>。为获得具有自主知识产权的牛重组干扰素类制品,本文克隆了鲁西黄牛 IFN- $\alpha$  基因,重组到 pET32a(+) 表达载体中,构建成重组原核表达质粒 pET32a(+)BoIFN- $\alpha$ ,并在大肠杆菌中进行高效表达研究,纯化了表达产物并进行了抗病毒活性分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 载体、细胞、病毒:** pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;pET32a(+)载体与 BL21(DE3)购自 Novagen 公司;水泡性口炎病毒(VSV)、牛轮状病毒(BRV)、牛胎肾细胞(MDBK)购自中国兽医药品检定所,重组人 $\alpha$ 干扰素购自山东金泰生物工程有限公司。

**1.1.2 工具酶、试剂:** 各种工具酶购自 TaKaRa 公司;DMEM 培养基为 GIBCO 产品;回收试剂盒购自 U-gene 公司;Ni-NTA 纯化柱购自 QIAGEN 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物:** 根据 BoIFN- $\alpha$  基因序列(Accession number M10954)以及酶切位点分析,在其开放阅读框(ORF)两侧设计一对引物,由 Sangon 公司合成。上游引物:5'-CCGGATCCTGCCACCTGC CTCACACC-3',包含一个 BamH I 酶切位点;下游引物:5'-TCAAGCTTGTCTCTTCTCTGAAACTCTC-3',包含一个 Hind III 酶切位点。

**1.2.2 BoIFN- $\alpha$  基因重组克隆质粒的构建:** 按常规方法提取鲁西黄牛血液基因组 DNA,进行 PCR 扩

增。PCR 扩增体系总体积为 20 $\mu$ L,含上下游引物各 0.5 $\mu$ L。反应条件 95 $^{\circ}$ C 10min,94 $^{\circ}$ C 30s,69 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳回收,连接 pMD18-T,构建重组质粒 pMD18-T/BoIFN- $\alpha$ ,将重组质粒转入大肠杆菌 JM109 经氨苄青霉素(AMP)抗性、半乳糖苷酶蓝白斑筛选,BamH I、Hind III 双酶切鉴定以及 PCR 鉴定。

**1.2.3 BoIFN- $\alpha$  序列分析:** 将鉴定正确的重组质粒送 Sangon 公司测序,采用 BLAST 进行同源性比较。

**1.2.4 BoIFN- $\alpha$  基因重组表达质粒的构建:** BamH I、Hind III 双酶切 pMD18-T/BoIFN- $\alpha$ ,回收目的片段 pET32a(+)进行同样酶切,T4 DNA 连接酶连接,构建重组表达质粒 pET32a(+)BoIFN- $\alpha$ 。将重组质粒进行 BamH I、Hind III 双酶切鉴定以及 PCR 鉴定。

**1.2.5 BoIFN- $\alpha$  基因表达条件优化、SDS-PAGE 分析:** 将重组质粒 pET32a(+)BoIFN- $\alpha$  和 pET32a(+)载体分别转化 BL21(DE3)感受态细胞,经氨苄青霉素抗性筛选挑取单个阳性菌落,接种于 3mL LB 液体培养基<sup>[12]</sup>,37 $^{\circ}$ C 振荡培养,当 OD<sub>600</sub> 达到 0.6 时加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L,30 $^{\circ}$ C 培养 4h,收集菌体,煮沸裂解变性用于 15% SDS-PAGE<sup>[13]</sup>,鉴定表达产物,同时设不加 IPTG 诱导的对照组。

**1.2.6 纯化与复性:** 以 QIAGEN 公司提供的试剂盒按提供的操作步骤纯化重组蛋白。详细过程如下:取 10mL 菌体离心,沉淀重悬于 1mL buffer B(8mol/L urea,0.1mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.01mol/L Tris-Cl,pH8.0),室温下振摇 1h,离心收集上清,600 $\mu$ L 上清加入预先平衡的 Ni-NTA 柱中,700g 离心 2min,收集流出液;用 600 $\mu$ L buffer C(8mol/L urea,0.1mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.01mol/L Tris-Cl,pH6.3)洗涤,700g 离心 2min,收集流出液;洗脱蛋白用 200 $\mu$ L buffer E(8mol/L urea,0.1mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.01mol/L Tris-Cl,pH4.5),700g 离心 2min,收集的洗脱液即为纯化蛋白,采用 15% SDS-PAGE 电泳鉴定纯化结果。采用逐步降低尿素浓度的稀释复性法进行复性。目的蛋白用 Bradford 法(1976)进行定量<sup>[14]</sup>,以 BSA 作标准,测定样品的 OD<sub>595</sub> 值。

**1.2.7 抗病毒活性分析:** 采用细胞病变抑制法。细胞培养板常规培养 MDBK 至单层后,各孔中分别加入人 $\alpha$ 干扰素 1:10 倍倍比稀释液和 rBoIFN- $\alpha$  1:2 倍倍比稀释液 100 $\mu$ L,过夜培养后分别加入 100 TCID<sub>50</sub> 的 VSV 病毒液 100 $\mu$ L,观察病变。待对照完

全病变后, 结晶紫显色, 酶标仪测  $OD_{550}$  值。并以人 IFN 核准成国际单位。

1.2.8 抗牛轮状病毒结果: 96 孔细胞培养板常规培养 MDBK 至单层后, 每孔加入  $100\mu\text{L}$  2 倍比稀释的 rBoIFN- $\alpha$ , 过夜培养后用 100 TCID<sub>50</sub> BRV 攻毒, 48 h 后观察细胞病变抑制结果, 同时设细胞和病毒对照。

## 2 结果

### 2.1 牛 IFN- $\alpha$ 基因的克隆

以牛血液 DNA 为模板, PCR 扩增特异性片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 在 500bp 处有一条特异的 DNA 条带(图 1), 与报道的 BoIFN- $\alpha$  大小相符。回收该片段, 重组到 pMD18-T 载体中, 酶切、测序鉴定。

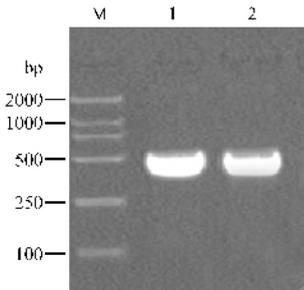


图 1 BoIFN- $\alpha$  PCR 扩增结果  
Fig. 1 Amplification of BoIFN  $\alpha$  gene  
M: marker DL 2 000; 1, 2: PCR product.

### 2.2 序列分析

鲁西黄牛 IFN- $\alpha$  基因测序结果以及推导的氨基酸序列如图 2 所示, 克隆的基因 ORF 为 498bp (Accession number DQ396807), 编码 166 个氨基酸的成熟多肽, 无糖基结合位点, 与已报道的 BoIFN- $\alpha$  C 亚型核苷酸序列的同源性为 98.6%, 有 7 个碱基发生了变异, 氨基酸序列同源性为 97.6%。BoIFN- $\alpha$  各亚型氨基酸序列同源性比较如表 1 所示。

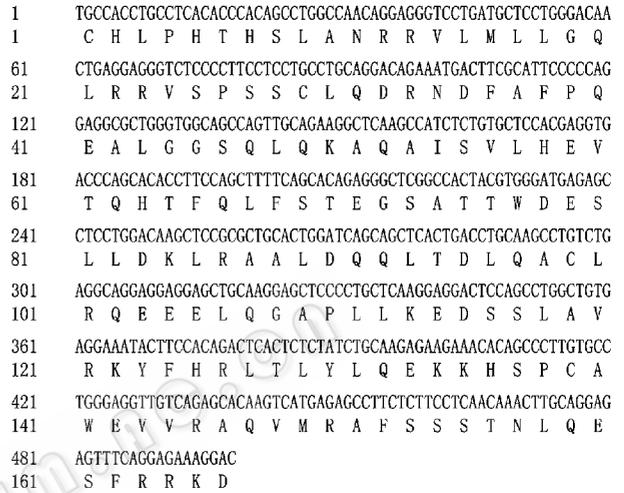


图 2 鲁西黄牛 IFN- $\alpha$  基因测序结果以及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide and predicted amino acid sequences of BoIFN  $\alpha$  gene of Luxi yellow cattle

表 1 BoIFN  $\alpha$  各亚型核苷酸和氨基酸序列同源性比较

Table 1 Alignment of amino acid sequences of Luxi yellow cattle BoIFN  $\alpha$  with other BoIFN  $\alpha$  subtypes

IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Luxi	
IFN- $\alpha$ A	92.8	92.2	91.0	95.2	92.8	91.6	92.2	94.2	94.0	93.4	
IFN- $\alpha$ B	95.4		92.8	92.8	94.6	91.0	94.0	95.2	92.8	93.4	
IFN- $\alpha$ C	95.4	95.6		92.8	92.2	91.0	94.0	91.6	92.8	94.0	
IFN- $\alpha$ D	94.6	95.6	95.8		92.2	91.0	94.0	93.4	92.2	91.6	
IFN- $\alpha$ E	97.2	95.4	95.4	94.2		91.6	91.6	94.6	92.8	94.0	
IFN- $\alpha$ F	95.2	94.4	94.8	94.4	94.4		91.0	91.0	93.4	91.6	
IFN- $\alpha$ G	94.0	95.0	95.8	94.6	93.6	94.0		94.0	92.8	91.6	
IFN- $\alpha$ H	95.2	97.0	95.4	97.0	95.2	94.6	94.8		92.8	94.0	
IFN- $\alpha$ I	97.0	96.2	96.6	95.4	96.2	95.0	94.4	96.4		93.4	
IFN- $\alpha$ J	96.4	95.4	96.0	95.6	95.2	95.6	95.0	95.8	96.8		
IFN- $\alpha$ Luxi	96.0	96.0	98.6	96.4	95.6	96.4	94.4	95.0	97.2	96.2	

The left under is nucleotide sequence identities and the right upper is amino acid sequence identities.

### 2.3 重组表达质粒的构建与鉴定

将所克隆的 BoIFN- $\alpha$  重组入 pET32a(+), 构建原核表达质粒 pET32a(+)/BoIFN- $\alpha$ , 经 BamH I、Hind III 双酶切后可见在 500bp 处有一条特异的 DNA 条带, 而且 PCR 扩增出 500bp 特异条带(图 3), 说明

重组质粒构建正确。

### 2.4 SDS-PAGE 及纯化结果

SDS-PAGE 分析表明在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、4h 时表达量最高而不同 IPTG 浓度对其表达影响不大; SDS-PAGE 及纯化结果如图 4 所示, IPTG 诱导株与纯化产物都在

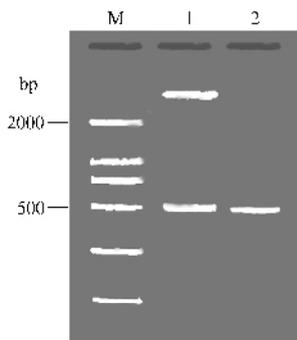


图3 重组表达质粒的酶切鉴定和PCR鉴定

Fig.3 Digestion and PCR identifications of recombinant plasmid pET32a(+)-BoIFN- $\alpha$

M: marker DL 2 000; 1: digestion identifications with *Bam*H I and *Hind* III 2: PCR identifications.

40ku左右表达出了1条特异蛋白带,与预测分子量一致。经BandScan5.0分析,蛋白产量约占菌体总蛋白的26.7%。经蛋白可溶性分析,所表达蛋白以包涵体形式存在,包涵体占沉淀蛋白的30.9%。

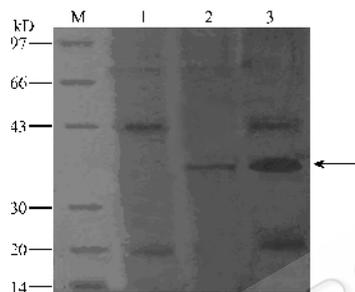


图4 SDS-PAGE分析rBoIFN- $\alpha$ 表达和纯化结果

Fig. 4 Expression and purification of rBoIFN- $\alpha$  analyzed by SDS-PAGE

M: protein molecular standard marker; 1: expression of pET32a(+); 2: purification of the rBoIFN- $\alpha$ ; 3: expression of rBoIFN- $\alpha$  by IPTG induction.

## 2.5 抗病毒活性

纯化的重组牛干扰素能有效地抑制VSV对MDBK细胞的致病作用,表现出较高的抗VSV病毒活性,其活性为 $5 \times 10^5$  u/mg。

## 2.6 抗牛轮状病毒效果

rBoIFN- $\alpha$ 处理MDBK后,BRV进行感染48h后空白对照组细胞正常,病毒组发生了明显的病变,而加入1:2<sup>11</sup>稀释度的rBoIFN- $\alpha$ 样品组,细胞仍未出现明显病变。经换算rBoIFN- $\alpha$ 抗BRV病毒活性为 $1.5 \times 10^5$  u/mg。

## 3 讨论

本研究从鲁西黄牛血液中扩增出了 $\alpha$ 干扰素基因,测序结果显示该基因与已报道的BoIFN- $\alpha$ 基因长度完全一致,由498bp编码166个成熟多肽,含一个ORF<sup>[3,4]</sup>。与已报道的BoIFN- $\alpha$  C亚型相比4个氨基酸发生了点变异,第75位Met→Thr,第86位Asp

→Ala,第97位Phe→Ala,第135位Arg→Lys,同源性的97.6%,与其他几个亚型氨基酸序列同源性在91.0%~95.2%之间,与我国史喜菊等人克隆的荷斯坦奶牛、晋南黄牛、福安水牛、富钟水牛的IFN- $\alpha$ 氨基酸同源性分别为92.8%、93.9%、97.2%、96.2%<sup>[15,16]</sup>。根据国际干扰素命名委员会建议,在一特定的干扰素型别内,有氨基酸序列或组成方面的差异时可确定为亚型,鲁西黄牛IFN- $\alpha$ 基因是一种新亚型,建议命名为BoIFN- $\alpha$  C2,在GenBank中登录号为DQ396807。

经软件分析,所得基因序列内部无*Bam*H I、*Hind* III酶切位点,pET32a(+)-BoIFN- $\alpha$ 经上述两种酶切后,不影响基因序列编码区的内部结构。原核表达载体pET32a(+),含T7启动子和转录终止信号,其特点除了能够编码6个组氨酸残基外,还带有大肠杆菌TrxA基因,TrxA基因编码109个氨基酸的硫氧还蛋白,外源基因经多克隆位点插入后与TrxA一起融合表达,不仅提高了表达产物的稳定性,而且由于表达蛋白N末端含6个组氨酸,易于用亲和层析柱纯化、鉴定。重组蛋白经尿素变性、梯度浓度尿素和PBS分步透析复性后,在MDBK/VSV系统上测得的活性为 $5 \times 10^5$  u/mg,抗BRV病毒活性为 $1.5 \times 10^5$  u/mg,说明纯化过程不影响重组蛋白的生物学活性,利于规模化生产。由此也表明黄牛IFN- $\alpha$ 基因序列的变化并没有引起抗病毒活性的改变。

在构建表达载体时,考虑到真核生物的信号肽在原核生物中进行表达时大部分不具有分泌功能,干扰素的信号肽蛋白可能会影响到重组干扰素的生物学活性,本研究只克隆、表达了牛 $\alpha$ 干扰素成熟蛋白基因,避免了信号肽对成熟蛋白的生物活性的影响。

干扰素有广谱抗病毒、抑制细胞增殖以及提高免疫功能等作用。由于病毒病一直困扰着我国的养牛业,造成巨大的经济损失,因此奶牛业生产中需要干扰素类广谱抗病毒生物制剂来治疗和加强疫苗的免疫效果。本研究率先在我国克隆了鲁西黄牛干扰素基因,在大肠杆菌中成功表达了牛重组干扰素蛋白,并对其抗病毒活性进行了分析,为重组牛干扰素的临床应用打下了基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Liu H(刘皓),Jiao D(焦丹),Ge JQ(葛继乾). The actuality and develop analysis of interferon in home market. *China Pharmaceuticals(中国药业)* 2001, 10(10):11-13.
- [2] Roberts R, Limin IU, Guo QT, et al. The evolution of the type I

- [ 3 ] Baruch V, Sara Cohen, Haim Grosfeld, *et al.* Bovine interferon  $\alpha$  genes. *J Biol Chem*, 1985, **260**(9): 5498 - 5504.
- [ 4 ] Daniel C, Michael S, David G. Two distinct families of human and bovine interferon- $\alpha$  genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol Cell Biol*, 1985, **5**(4): 768 - 779.
- [ 5 ] Chaplin PJ, Entrican G, Gelder KI, *et al.* Cloning and biologic activities of a bovine interferon- $\alpha$  isolated from the epithelium of a rotavirus-infected calf. *J Interferon Cytokine Res*, 1996, **16**(1): 25 - 30.
- [ 6 ] Paul JC, Keith RP, Robert AC. The cloning of cattle interferon-subtypes isolated from the gut epithelium of rotavirus-infected calves. *Immunogenetics*, 1996, **48**(2): 143 - 145.
- [ 7 ] Shi X(史喜菊), Xia C(夏春), Wang M(汪明). Cloning and expression of water buffalo IFN- $\alpha$  genes and its antiviral activities. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2004, **12**(3): 288 - 293.
- [ 8 ] Charleston B, Fray MD, Baigent S, *et al.* Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gene Virol*, 2001, **82**(8): 1893 - 1897.
- [ 9 ] Perler L, Schweizer M, Jung T, *et al.* Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and independent pathways. *J Gene Virol*, 2000, **81**(4): 881 - 887.
- [ 10 ] Jarasvech C, Maria EP, Marvin JG, *et al.* Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon. *J Virol*, 1999, **73**(12): 9891 - 9898.
- [ 11 ] Esparza I, Gonzalez JC, Vinuela E. Effect of interferon- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor on African swine fever virus replication in porcine monocytes and macrophages. *J Gene Virol*, 1988, **69**(12): 2973 - 2980.
- [ 12 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3th ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, pp. 103 - 105.
- [ 13 ] Wang M(汪明), Wu ZC(吴志光), Xia C(夏春). Molecular cloning and expression of interferon- $\alpha$  from chicken. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2000, **8**(4): 377 - 381.
- [ 14 ] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(7): 248 - 254.
- [ 15 ] Shi XJ(史喜菊), Xia C(夏春), Wang M(汪明). Cloning, expression and studies on antiviral activities of IFN- $\alpha$  gene of Jinnan yellow cattle. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*(中国预防兽医学报) 2004, **26**(2): 110 - 114.
- [ 16 ] Shi XJ(史喜菊), Xia C(夏春), Wang M(汪明). Molecular cloning, expression and antiviral activity analysis of IFN- $\alpha$  gene of Holstein cow. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*(中国预防兽医学报), 2004, **40**(1): 13 - 17.

## 防致癌聚氯乙烯与发展生物塑料

废弃烃类聚合物或其衍生物如旧塑料内所含的聚氯乙烯比较容易分解,在加工制作工程中会转化为氯化氢(遇水转化为盐酸)。如果用这类废旧塑料制成容器,当其加入温水、开水之后,其容器内所含的各种化学元素产生反应,会转化为各种对人体有害的物质。据有关资料显示,每公斤聚氯乙烯中可分解产生 4000mg 氯乙烯单体,而此“单体”被国家癌症机构已定为“人类致癌物”。我国成都一家塑料加工厂加工制造带“毒”饮料瓶事件引起有关方面重视。如何治疗这种有致癌作用的聚氯乙烯及其单体呢?从生物技术应用考虑,可采取两方面技术措施(1)利用某些微生物对这些聚氯乙烯及其单体废弃物降解或转化。如一种脱卤拟球菌(*Dehalococcoides ethenagenes*)已测定基因组序列,对三氯乙烯、四氯乙烯的降解,并转化为无害代谢产物乙烷,这是脱氢酶作用的结果,还发现假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)对三氯乙烯(TCE)也有很好降解能力,这方面研究有待开发;“脱卤工程菌”的研发将用于洁净地下水,仍需做进一步研究。(2)发展生物塑料(可降解塑料)是时代发展的必需。特别是我国即将迎来奥运会,减轻或根除那些有害难降解塑料垃圾应引起高度重视。在北京,日产垃圾 1.2 万吨,并每年以 10% 以上的速度递增,仅超市每天消耗塑料袋达 5 万吨,2008 年北京奥运会预计将产生 1 万吨垃圾,其中大部分为餐饮垃圾包括 4% 的塑料垃圾(400 吨)。面对现实,如何实现“绿色奥运”的理念?那就是严防有害“白色污染”,大力推行“可生物降解塑料”。生物可降解塑料主要利用秸秆、麸皮中的淀粉、纤维素、蛋白质等天然高分子材料制造,而这种环保型的塑料具有如下优点:1. 原料易得且丰富 2. 可生物全降解,不污染环境 3. 安全,无毒副作用 4. 经济实用,不亚于传统化工塑料 5. 产生“三效益”(经济、社会、环保)6. 也是节能的一项措施,降低或杜绝对石油的依赖性 7. 利用一种转基因酵母研发成实用塑料,废弃后可以转化成燃料塑料,将一种酶基因建构“工程大肠杆菌”能将废塑料转化成燃料塑料,作为一种能源的替代性、竞争性有待进一步研究。目前我国可生物降解塑料产量只有 5 万吨生产能力,整个年产塑料如包装材料产量 150 万吨。为此,发展可生物降解塑料还要下很大工夫才能得以实现,如果达到产业化、商品化,还必须降低成本,价格便宜,提高生产效力和良好的产品性能,这将为扩大应用范围,走向市场,满足商品需求作出贡献。

(柯为)