

# 兔干扰素 $\alpha$ 和白介素2重组融合蛋白 菌株构建与蛋白表达

王慈<sup>1,2,3,4</sup>,王海欣<sup>1,3</sup>,李霄<sup>1,3</sup>,袁万哲<sup>1,3</sup>,李杰峰<sup>2,4\*</sup>

1.河北农业大学动物医学院,河北保定 071001;

2.河北省畜牧兽医研究所,河北保定 071000;

3.河北省兽医生物技术工程技术研究中心,河北保定 071001;

4.河北省中兽药重点实验室,河北保定 071000

**摘要** [目的]本试验拟表达外源兔白细胞介素2(Interleukin-2, IL-2)和干扰素 $\alpha$ (Interferon-alpha, IFN- $\alpha$ )重组蛋白,为兔病毒性疾病预防提供科学依据。[方法]参考 GenBank 数据库中的 IL-2 和 IFN- $\alpha$  基因序列,去除信号肽后使用 linker 连接成为嵌合基因,将其克隆至原核表达载体 pET-32a 中并进行密码子优化,转化至 *E.coli* BL21 感受态细胞培养并诱导表达,通过 SDS-PAGE 对表达产物进行分析。[结果]pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2 在约 1 073 bp 处有明显条带,表明质粒构建成功。pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2-BL21 菌株在扩大培养 3.5 h, 1.0 mM IPTG 诱导 4 h 后表达量较高,相对分子质量约为 49.1 ku,主要以包涵体形式存在。[结论]成功构建了兔 IL-2 和 IFN- $\alpha$  的重组蛋白。

**关键词** 兔;白介素2;干扰素 $\alpha$ ;原核表达;可溶性鉴定;分离纯化

## Construction and protein expression of the recombinant fusion protein strains of rabbit interferon- $\alpha$ and interleukin-2

WANG Ci<sup>1,2,3,4</sup>, WANG Haixin<sup>1,3</sup>, LI Xiao<sup>1,3</sup>, YUAN Wanzhe<sup>1,3</sup>, LI Jiefeng<sup>2,4\*</sup>

1.College of Animal Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

2.Hebei Province Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Baoding 071000, China;

3.Hebei Province Engineering and Technology Research Center of Veterinary Biotechnology, Baoding 071001, China; 4.Hebei Province Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Baoding

071000, China

**Abstract** [Objectives]This experiment aimed to express recombinant proteins of exogenous rabbit interleukin-2 (IL-2) and interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) to provide a scientific basis for the clinical prevention and treatment of viral diseases in rabbit. [Methods]The gene sequences of rabbit IL-2 (accession number: NM\_001163180.1) and IFN- $\alpha$  (accession number: XM\_002708064.2) in the GenBank database were referred to remove the signal peptide and link to form a chimeric gene with a linker. The chimeric gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a with the codon being optimized, and then transformed into *E. coli*

收稿日期:2025-08-27

基金项目:河北省现代农业产业技术体系建设专项(HBCT2024280402)

作者简介:王慈,女,2002年生,硕士。\*通信作者:李杰峰,男,1980年生,博士,农业技术推广研究员。

BL21 competent cell, cultured to induce expression. SDS-PAGE was used to analyze the expression product. [Results]pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2 had a distinct band at approximately 1 073 bp, indicating that the construction of recombinant plasmid was successful. The pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2-BL21 strain had a high level of expression after 3.5 h of expanded culture and 4 h of induction with 1.0 mM IPTG, with a relative molecular weight of approximately 49.1 ku, mainly in the form of inclusion bodies.[Conclusions]The construction of rabbit IL-2 and IFN- $\alpha$  recombinant proteins was successful.

**Keywords** rabbit; interleukin-2; interferon- $\alpha$ ; prokaryotic expression; identification of solubility; isolation and purification

近年来,我国兔业不仅在养殖方面发展迅速,也凭借兔的迷人外表和温顺本性,赢得了众多宠物爱好者的热烈追捧<sup>[1]</sup>,但兔病毒性疾病及其药物使用受限极大制约了兔养殖业和宠物业的发展,其中兔瘟和兔轮状病毒病在兔群中传播最为广泛。兔瘟又称兔病毒性出血症,呈暴发性流行,病兔体温升高,黏膜出血,常以死亡告终。兔瘟造成的继发感染以及免疫抑制,常导致疫苗免疫失败。兔轮状病毒病以仔兔严重腹泻为特征,病死率高,极易引起继发感染,且尚未有疫苗或特效药物可以防治<sup>[2]</sup>。目前对兔病毒性疾病尚无针对性药物,且广谱药物效果较差。

细胞因子可以作为佐剂或通过基因工程参与到疫苗的设计中,以增强免疫效果,也可以用于药物的研发。重组细胞因子具有纯度高、活性高、安全性较高的优点,可以规模化生产,故成为防治兔病毒性疾病的重中之重。本研究对 *RaIFN $\alpha$ -IL2* 基因进行克隆,获得重组菌 pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2 以及高纯度的 RaIFN $\alpha$ -IL2 蛋白,旨在为研发新型疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

质粒 RaIFN $\alpha$ -IL2 及其引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;原核表达载体 pET-32a 由本实验室保存;*E.coli* BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;2 $\times$ Super Pfx MasterMix、2 $\times$ Tap PCR MasterMix、2 $\times$ Super Fusion Cloning Mix 购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司;彩虹 130 广谱蛋白 Marker(15~130ku)购自北京 Solarbio 科技有限公司;BIOMIGA 琼脂糖凝胶 DNA/PCR 产物小量回收试剂盒购自杭州倍沃医学

科技有限公司;NanoDrop 2000 蛋白质/核酸浓度测定仪购自北京六一仪器设备厂。

### 1.2 兔 *IFN $\alpha$ -IL2* 基因的设计与合成

参考 GenBank 数据库中的兔白介素 2(登录号:NM\_001163180.1)和干扰素 $\alpha$ (登录号:XM\_002708064.2)基因序列,去除信号肽序列后进行密码子优化,同时经 SWISS-MODEL 处理得到相应蛋白模型。优化后的序列经过柔性 linker 连接,嵌合在 PUC57 分子生物学实验载体上,命名为 PUC57-RaIFN $\alpha$ -IL2。随后通过胶回收和无缝克隆技术将目的基因从 PUC57 载体上转接到 pET-32a 载体上,命名为 pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2。

### 1.3 引物的设计与合成

使用 SnapGene 设计 3 对特异性引物,见表 1。Linker 的序列为:5'-GGCGGTGGCGGCAGCGGTGGTGGCGGCAGCGGCGGCGGTGGTAGC-3',用于连接兔 *IFN- $\alpha$*  和兔 *IL-2* 两个目的基因,有利于多结构域的正确折叠,提高蛋白表达效率和功能性。

### 1.4 *RaIFN $\alpha$ -IL2* 融合基因和 pET-32a 载体的 PCR 扩增

以 RaIFN $\alpha$ -F/RaIL2-R 为引物,PUC57-RaIFN $\alpha$ -IL2 质粒为模板进行 PCR 扩增,得到 *RaIFN $\alpha$ -IL2* 目的基因。以 32-F/32-R 为引物,pET-32a 质粒为模板,扩增得到 pET-32a 载体。PCR 反应体系按照 2 $\times$ Super Pfx MasterMix 说明书配制。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,使用 BIOMIGA 琼脂糖凝胶 DNA/PCR 产物小量回收试剂盒回收纯化目的基因,用蛋白质/核酸浓度测定仪测定 RaIFN $\alpha$ -IL2 和 pET-32a 的浓度。

表 1 引物序列

序号	引物名称	引物序列(5'→3')
1	RaIFN $\alpha$ -F	TGGTGCCACGCGGTTCTGCTTGGCAGCTGCCGACAGACC
2	RaIL2-R	GAGTCCGCGCCGAAGCTTAGCTAGAGCTCCGCGTAATGATGG
3	32-F	TAAGCTTGGCGCCGCACTC
4	32-R	GAACCGCGTGGCACCA
5	T7-F	CGAAATTAATACGACTCACTATAGGG
6	T7-R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

### 1.5 重组质粒的构建

将 *RaIFN $\alpha$ -IL2* 基因与 pET-32a 载体按一定比例配制重组反应体系: 2 $\times$ Super Fusion Cloning Mix 5  $\mu$ L, *RaIFN $\alpha$ -IL2* 基因 1.5  $\mu$ L, pET-32a 载体 3.5  $\mu$ L。50  $^{\circ}$ C 反应 45 min, 反应结束后瞬时离心, 反应液置于冰水中冷却。将连接后的产物转化至 *E. coil* BL21 感受态细胞中, 具体操作步骤按照 *E. coil* BL21 感受态细胞说明书进行。培养结束后, 将菌液均匀涂布在含氨苄青霉素的固体平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。用枪头挑取单菌落, 打入含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡培养 4~6 h。取菌液为模板, 以 RaIFN $\alpha$ -F/T7-R 为引物进行 PCR 扩增。同时以 T7-F/T7-R 为引物, pET-32a 载体为模板进行扩增, 以此作阴性对照。对经菌液 PCR 鉴定为阳性的菌株进行测序, 测序正确的质粒被命名为 pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2。

### 1.6 重组质粒的原核表达

质粒 pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2 转化至 *E. coil* BL21 感受态细胞中, 37  $^{\circ}$ C 培养 3.5 h 后加入 IPTG, 调整终浓度为 1.0 mmol/L, 诱导表达 4 h, 吸取 1 mL 菌液, 8 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液。在菌体沉淀中加入 30  $\mu$ L PBS 进行重悬, 随后加入 10  $\mu$ L 的 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液混匀, 于 100  $^{\circ}$ C 沸水中煮 10 min, 煮样结束后进行 SDS-PAEG 电泳检测验证。

### 1.7 RaIFN $\alpha$ -IL2 蛋白的可溶性鉴定与纯化

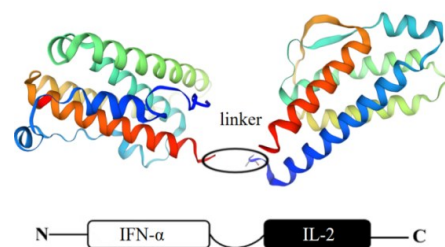
将诱导表达后的菌液 10 000 r/min 离心 5 min, 去上清液。用 25 mL 的 PBS 对菌体沉淀进行重悬, 随后于冰上对其进行超声裂解, 输出功率在 60% 左右, 时间为 20 min。超声裂解结束后, 取 30  $\mu$ L 菌液与 10  $\mu$ L 的 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液混匀进行煮样, 作为全菌体; 剩余菌液 12 000 r/min 离心 10 min, 取

上清液 30  $\mu$ L (上清液最好经过 0.45  $\mu$ m 针式滤器过滤), 加入 10  $\mu$ L 的 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液混匀进行煮样; 去除剩余上清溶液, 取 25 mL 包涵体 BB 溶液对菌体沉淀进行重悬, 取 30  $\mu$ L 重悬液加入 10  $\mu$ L 的 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液混匀进行煮样。对上述 3 种煮样产物进行 SDS-PAEG 电泳检测, 以判断蛋白的表达形式。包涵体 BB 重悬后的样品置于 4  $^{\circ}$ C 条件下过夜, 随后以 1 200 r/min 离心 15 min, 取上清进行镍柱纯化。

## 2 结果与分析

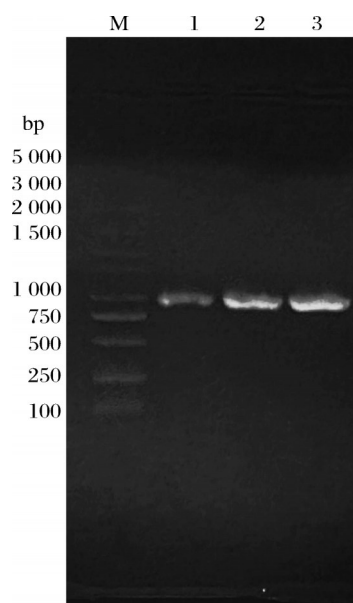
### 2.1 兔 IFN $\alpha$ -IL2 基因的设计与合成

使用 SnapGene 软件将目的基因兔 IFN- $\alpha$  和兔 IL-2 经过 linker 串联并嵌合在 pET-32a 载体上, 经 SWISS-MODEL 处理后得到的蛋白融合策略模型, 见图 1。

图 1 兔重组 IFN- $\alpha$  和 IL-2 融合策略模型

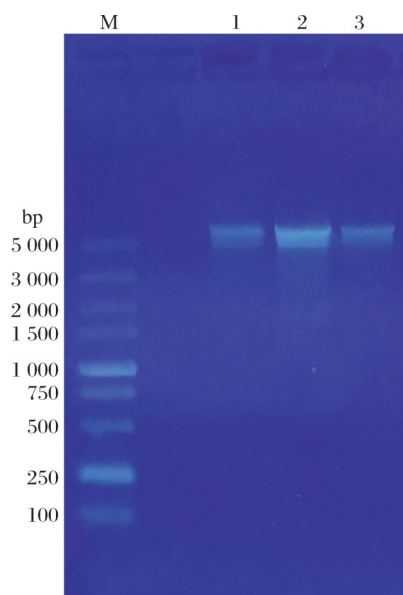
### 2.2 *RaIFN $\alpha$ -IL2* 融合基因和 pET-32a 载体的 PCR 扩增

对融合基因 *RaIFN $\alpha$ -IL2* 和 pET-32a 载体进行 PCR 鉴定, 图 2 可见在大约 1 000 bp 处出现明显条带, 与预期大小 942 bp 相符; 图 3 可见载体 pET-32a 在 5 000 bp 处有明显条带, 与预期大小 5 782 bp 相符。



M: DNA Marker DL 5 000; 1~3: RaIFN $\alpha$ -IL2。

图2 *RaIFN $\alpha$ -IL2*的PCR鉴定



M: DNA Marker DL 5 000; 1~3: pET-32a载体。

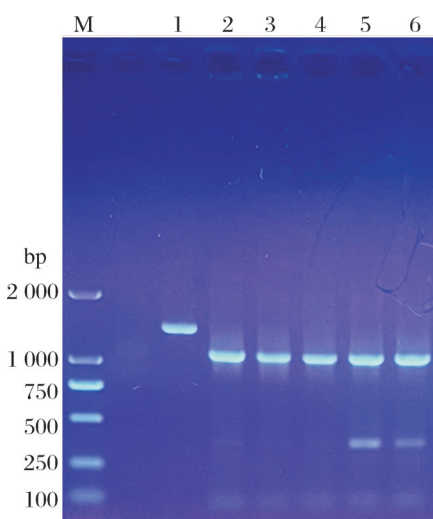
图3 pET-32a载体的PCR鉴定

### 2.3 重组质粒的构建

重组质粒 pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2 转入 BL21 感受态细胞后,经菌液 PCR 鉴定,在大约 1 000 bp 处有明显条带,大小与预期的 1 073 bp 完全相符,见图4。阴性对照经 PCR 鉴定,在大约 1 500 bp 处有明显条带,大小与预期的 1 543 bp 完全相符,见图4。阳性菌液测序结果见图5。

### 2.4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析结果见图6, *RaIFN $\alpha$ -IL2* 基因表



M: DNA Marker DL 2000; 1: 阴性对照; 2~6: 工程菌。

图4 工程菌的阳性克隆鉴定

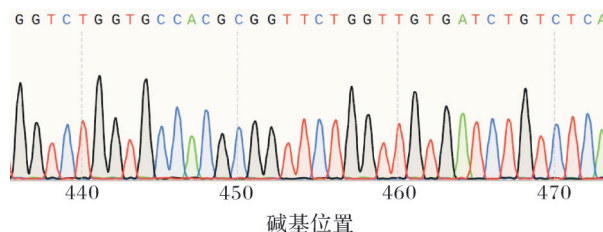
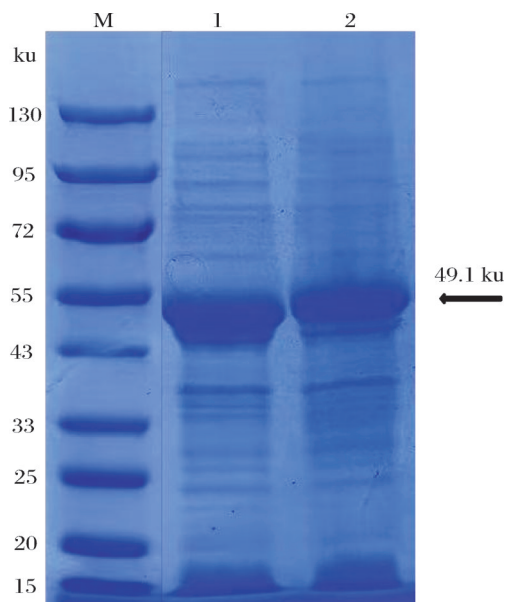


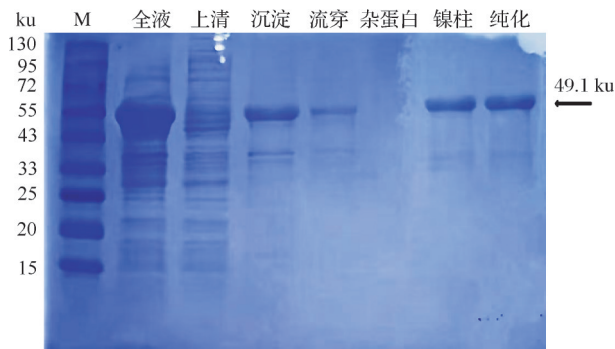
图5 pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2 上游连接位点测序



M: 彩虹 130 广谱蛋白 Marker (15~130 ku); 1~2: 兔重组免疫复合肽。

图6 兔重组免疫复合肽的 SDS-PAGE 分析

达出分子质量约为 49.1 ku 的蛋白。对 RaIFN $\alpha$ -IL2 蛋白进行诱导表达和可溶性分析,结果表明,重组蛋白以不溶性的包涵体形式存在于菌体中,见图7。



M:彩虹 130 广谱蛋白 Marker (15~130 ku)。

图 7 pET32a-RalFN $\alpha$ -IL2-BL21 可溶性鉴定与分离纯化

### 3 讨论

兽用生物制品(如细胞因子、疫苗等)因其无残留、效果好等特点,成为兽药研发的新方向<sup>[3]</sup>。近年来,由兔瘟、兔轮状病毒等引起的病毒性疾病在兔群里十分流行,对兔养殖业和宠物业造成的经济损失巨大。目前比较有效的抗病毒病方案主要是疫苗免疫接种,新型疫苗研发也处于不断进展中,例如近年来针对兔病毒性出血症(RHD)的新型佐剂灭活疫苗、亚单位疫苗、活病毒载体疫苗、核酸疫苗等均得到了快速发展与完善<sup>[4]</sup>。但病毒隐蔽性强、变异快、传播快,故至今尚无批准的特效抗病毒药物,并且针对性疫苗的制备也存在各自不足之处。重组细胞因子抗病毒活性良好、纯度高、产量高,可用于疫苗佐剂或相关抗病毒药物的研发。

干扰素是由免疫细胞和特定组织细胞分泌的一类蛋白质,具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节三大核心作用。作为干扰素亚型中最大的类别,IFN- $\alpha$ 主要由白细胞中的浆细胞样树突状细胞在检测到病毒入侵时分泌,随后通过激活细胞表面的特定受体启动细胞内的信号传导过程,诱导细胞产生多种抗病毒蛋白,抑制病毒的复制和转录,促进免疫系统的抗病毒反应<sup>[5]</sup>。除了抗病毒活性,IFN- $\alpha$ 还参与调节细胞增殖、免疫应答和细胞凋亡等过程。它们不仅激活宿主细胞的内在免疫机制,还影响适应性免疫反应。IFN- $\alpha$ 能够增强 T 细胞和自然杀伤细胞的活性,提高抗原呈递细胞的效率,从而在整个免疫系统中产生协同效应<sup>[6]</sup>。Gao 等<sup>[7]</sup>表达了兔 IFN- $\alpha$ ,发现其具有广泛的抗病毒活性和抗增殖活性,可诱导 Mx1 发挥抗病毒活性,在 BT 细胞上诱导多种

启动子活性。孙弘宇<sup>[8]</sup>通过 pET-32a 原核表达兔  $\alpha$ 、 $\beta$  干扰素,试验证明该表达产物能有效抑制兔轮状病毒在体内外的复制,保护率分别达 90% 和 80%。李秀丽等<sup>[9]</sup>使用大肠杆菌表达了重组猪  $\alpha$  干扰素,体外试验表明重组蛋白可以抑制伪狂犬病病毒 (PRV)、脑心肌炎病毒 (EMCV) 在 PK-15 细胞上的增殖,体内试验表明重组蛋白可使感染 PRV、EMCV 的小鼠病死率分别从 100% 降到 0%、20%。陈红艳等<sup>[3]</sup>对猪 IFN- $\alpha$  基因进行了密码子优化,由此构建大肠杆菌表达系统,成功获得以包涵体形式高效表达的工程菌,精纯样品的比活力可达  $1.28 \times 10^7$  IU/mg,表达后的蛋白对感染水疱性口炎病毒的猪具有保护作用。

IL-2 是一种由活化的 T 淋巴细胞(尤其是 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞)产生的糖蛋白,具有重要的免疫调节作用。IL-2 既有促进淋巴细胞增殖、分化和活化,从而增强免疫应答的作用,同时还可以刺激 B 淋巴细胞,促进抗体的分泌。除此之外,IL-2 还可以诱导细胞分泌细胞因子,从而增强机体免疫,具有抗病毒和抗肿瘤等功效<sup>[10]</sup>。保明秀等<sup>[11]</sup>通过活化载有重组白介素 2 (rIL-2) 的大肠杆菌,获得重组目的蛋白,并对红鳍东方鲀进行免疫,发现外源 IL-2 在使机体免疫器官做出反应的同时也会促使免疫细胞反应,表明 rIL-2 能进一步促进细胞免疫和体液免疫。闫若潜等<sup>[12]</sup>利用原核表达载体 pQE-30 成功表达了猪白细胞介素 2/6 嵌合基因,能够有效促进猪外周血淋巴细胞和猪脾脏细胞的增殖活性。易悦<sup>[13]</sup>将 IL-2、IL-6 及其融合蛋白用于犬瘟热病毒基因工程疫苗佐剂效应的研究,结果表明 IL-2 对犬瘟热病毒有明显抑制作用。

目前,使用重组干扰素  $\alpha$  (rIFN- $\alpha$ ) 和 rIL-2 制剂治疗病毒性疾病和肿瘤性疾病在人医临床上已广泛应用,但对于兔的相关研究比较滞后。冯桂丹等<sup>[14]</sup>将猪 IFN- $\alpha$  和 IL-2 嵌合基因改造后通过 pET-32a 载体进行表达,结果显示,该蛋白在不同细胞上具有抑制不同病毒增殖的活性。苗天姿等<sup>[15]</sup>对鸡的 IFN- $\alpha$  和 IL-2 进行重组融合,并经过原核系统表达,证明该蛋白在鸡胚成纤维细胞上具有抗水疱性口炎病毒活性。闫若潜等<sup>[16]</sup>将猪的 IFN- $\alpha$  和 IL-2 融合基因插入到 pQE-30 表达载体进行表达,结果表明,表达产物同时具有 2 种蛋白的生物学活性,可用于猪病毒性疾病的预防和治疗以及相关制剂的开

发。由此来看,重组融合两种细胞因子用于菌株构建和蛋白表达,所表达的蛋白可抑制病毒活性,甚至可能同时具有 2 种细胞因子活性。因此,本次试验采用基因工程技术重组细胞因子,成功构建了 pET32a-RaIFN $\alpha$ -IL2-BL21 菌株,表达纯化的重组蛋白经验证主要以不溶性的包涵体形式存在,为后续抗兔病毒性药物和疫苗的研发提供了物质基础,旨在推动其临床应用的转化进程,对推动兔业发展具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] 李炎. 宠物兔的常见疾病及治疗措施[J]. 畜牧兽医科技信息, 2024(7):236-238.
- [2] 孙弘宇, 赵巧雅, 李宏梅, 等. 兔轮状病毒病研究进展[J]. 中国养兔杂志, 2021(5):32-34.
- [3] 陈红艳, 施忠芬, 胡媛媛, 等. 重组猪干扰素 $\alpha$ 发酵纯化与抗病毒活性测定[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2024, 54(3):10-15.
- [4] 李娇, 王艳, 王文秀, 等. 我国兔病毒性出血症疫苗研究与应用进展[J]. 中国养兔, 2015(3):21-24, 20.
- [5] CARTY M, GUY C, BOWIE A G. Detection of viral infections by innate immunity[J/OL]. *Biochemical pharmacology*, 2021, 183: 114316[2025-08-27]. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114316>.
- [6] GEBREMESKEL S, NELSON A, WALKER B, et al. Natural killer T cell immunotherapy combined with oncolytic vesicular stomatitis virus or reovirus treatments differentially increases survival in mouse models of ovarian and breast cancer metastasis[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(3): e002096[2025-08-27]. <https://doi.org/10.1136/JITC-2020-002096>.
- [7] GAO M C, LIU Y, GUO Y L, et al. Identification and characterization of a rabbit novel IFN- $\alpha$  unlocated in genome[J]. *Developmental & comparative immunology*, 2018, 78:91-99.
- [8] 孙弘宇. 兔 $\alpha$ / $\beta$ 干扰素表达产物的制备及其抗兔轮状病毒活性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [9] 李秀丽, 韩颖, 赵款, 等. 重组猪干扰素 $\alpha$ 的原核表达及抗病毒活性[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(2):245-252.
- [10] TAGUCHI T. Interleukin-2(IL-2)[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1994, 21(5):719-724.
- [11] 保明秀, 藏林, 张红斌, 等. 重组白介素 2 对红鳍东方鲀的血液生化指标及免疫指标的影响[J]. 生物技术通报, 2020, 36(3): 177-182.
- [12] 闫若潜, 马文涛, 吴志明, 等. 猪白细胞介素 2/6 嵌合基因的融合表达及活性[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(1):73-78, 82.
- [13] 易悦. 重组大熊猫白介素 2 和 6 及其融合蛋白在小鼠模型中对犬瘟热重组疫苗的佐剂效应研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- [14] 冯桂丹, 闫若潜, 马震原, 等. 重组猪 $\alpha$ 干扰素/白细胞介素-2 的可溶性表达及体外活性研究[J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(3):595-604.
- [15] 苗天姿, 赵款, 雷白时, 等. 重组鸡白介素 2 和干扰素 $\alpha$ 融合蛋白的表达及生物学活性的检测[J]. 河北农业大学学报, 2021, 44(6):85-91.
- [16] 闫若潜, 吴志明, 张志凌, 等. 猪 $\alpha$ 干扰素/白细胞介素 2 基因的融合表达及活性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(2): 248-255.

【责任编辑:赵琳琳】