

海兰鸡白细胞介素 18 成熟蛋白基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

赵 丽^{1,2}, 崔保安¹, 陈红英¹, 宋凌云¹, 方忠意³, 郑兰兰¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 郑州牧业工程高等专科学校 药物工程系, 河南 郑州 450011; 3 河南省兽药监察所, 河南 郑州 450002)

摘要:通过 RT-PCR 方法从用植物血凝素(PHA)活化 60 日龄海兰鸡的脾脏淋巴细胞中扩增出海兰鸡白细胞介素 18(IL-18)成熟蛋白基因的 cDNA,并将其克隆到 pGEM-T Easy Vector 载体上, DNA 序列测定表明,克隆得到的海兰鸡 ChIL-18 cDNA 基因全序列包括终止密码子在内其编码区大小为 510 bp,编码 169 个氨基酸多肽. 将该基因片段克隆到原核表达载体 pQE30 构建重组质粒 pQE30-ChIL-18,转化大肠杆菌 M15,并用 IPTG 诱导. 重组菌菌体裂解物 SDS-PAGE 可检测到相对分子质量为 19 000 的重组蛋白.

关键词:鸡白细胞介素 18; 成熟蛋白; 克隆; 原核表达

中图分类号:S858.31

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)01-0088-04

Cloning and Expression of Hai-Lan Chicken Interleukin-18 in *E. coli* and Preparation of Its Antiseru

ZHAO Li^{1,2}, CUI Bao-an¹, CHEN Hong-ying¹, SONG Ling-yun¹, FANG Zhong-yi³, ZHENG Lan-lan¹

(1 College of Animal Husbandry and Veterinary, He'nan Agricultural University, Zhengzhou, 450002, China;

2 Department of Pharmaceutical Engineering, College of Zhengzhou Animal Husbandry Engineering,

Zhengzhou 450011, China; 3 He'nan Institute of Veterinary Drug Control, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Chicken interleukin-18 (ChIL-18) mature protein gene was amplified from PHA stimulated Hai-Lan chicken spleen cell by RT-PCR. PCR product was cloned into the pGEM-T vector. Sequencing analysis showed that the nucleotide sequence of this ChIL-18 mature protein gene was 510 bp including the stop codon and, pQE30-ChIL18 was obtained by subcloning the encoding region of the ChIL-18 mature peptide gene into pQE30. The recombinant ChIL-18 (rChIL-18) was expressed efficiently in pQE30-ChIL18-transformed M15 induced by IPTG. SDS-PAGE analysis showed that the recombinant mature protein had a relative molecular mass of approximately 19 000.

Key words: chicken IL-18; mature protein; clone; prokaryotic expression

白细胞介素 18(interleukin-18, IL-18) 又称 γ 干扰素诱导因子(interferon gamma inducing factor, IGIF), 自 1995 年由 Okamura 等^[1] 首次从丙酸杆菌感染引起中毒性休克的小鼠中筛选到以来, 研究发现它具有很强的免疫调节能力, 能刺激 Th1 细胞分泌 IFN- γ 、IL-2 和 GM-CSF, 并促进 Th1 细胞增殖、增强 FasL 介导的 Th1 细胞的细胞毒活性和 NK 细胞的细胞毒性^[2]. 因此, IL-18 在抗病原微生物感染、抗肿瘤及抗超敏反应等方面有着广阔的临床应用前景, 极具开发新型免疫佐剂和免疫增强剂的潜力, 自发

收稿日期: 2006-09-19

作者简介: 赵 丽(1973—), 女, 讲师, 硕士; 通讯作者: 崔保安(1948—), 男, 教授, E-mail: baoancui@henau.edu.cn

基金项目: “十五”国家食品安全重大攻关专项(2001BA804A30-11); 河南省重大科技攻关项目(0223013800)

现以来就一直受到了各国研究者的高度重视^[3-5]。鸡白细胞介素18(chicken IL-18, ChIL-18)的研究起步较晚。Schneider等^[6]首次获得ChIL-18 cDNA,并在大肠杆菌中得到表达,并证实表达产物具有促进鸡干扰素- γ (chicken interferon- γ , ChIFN- γ)产生的生物学活性。此后国内外仅见极少数关于禽类IL-18的研究报告^[7-10]。本研究根据GenBank已发表的ChIL-18的cDNA序列,设计合成ChIL-18成熟蛋白基因引物,以鸡脾脏mRNA为模板,应用RT-PCR技术,克隆到ChIL-18成熟蛋白全长基因,并实现了其在大肠杆菌中的初步表达,这为进一步研究其结构和生物学活性,以及研制新型免疫佐剂和免疫调节剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

60日龄海兰鸡购自河南安阳市某鸡场。

1.2 受体菌和载体

表达载体pQE30,受体菌M15、JM109由河南省动物性食品安全重点实验室保存;pGEM-T Easy Vector购自Promega公司。

1.3 酶类和主要试剂

限制性内切酶Sph I、Pst I购自TaKaRa公司;Ex Taq DNA聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司。UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒为上海生物工程公司产品。PCR产物凝胶回收试剂盒为杭州维特洁生物技术公司产品。质粒回收试剂盒为安徽优品生物工程有限公司产品。

1.4 RT-PCR引物设计与合成

应用DNASTAR(Version 4.0)及Primer(Version 5.0)基因分析软件,根据Schneider等^[6]报道的ChIL-18 cDNA基因序列,设计1对引物,上下游引物间为510 bp碱基。引物本身不形成发夹结构,2条引物间不形成二聚体。

上游引物P1:5'-GCTGCATGCGCCTTTTGTAAAGATA-3';下游引物P2:5'-GCTCTGCAGTCATAGGTTGTGCCTT-3'。上、下游引物的5'端分别包含了Sph I和Pst I酶切位点。

1.5 脾脏细胞的制备及总RNA的提取

参照文献[11]的方法进行海兰鸡脾脏细胞的制备。对脾细胞进行总RNA的提取并对其浓度与完整性进行测定。

1.6 ChIL-18成熟蛋白基因的RT-PCR扩增、克隆与序列测定

参照文献[11]的方法进行RT-PCR。反应条件

为:94℃ 5 min,94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,36个循环,最后72℃延伸10 min。取PCR产物在10 g/L的琼脂糖凝胶进行电泳。将RT-PCR产物回收纯化,将回收的DNA片段与pGEM-T Easy Vector载体连接,再将连接产物转化JM109感受态细胞,在含有X-gal、IPTG和Amp⁺的LB琼脂平板培养基上培养16 h,挑取白斑菌落接种含有Amp的LB液体培养基,37℃振荡培养12~16 h。按质粒回收试剂盒说明提取重组质粒再进行PCR及酶切电泳检测鉴定。将重组阳性的质粒pGEM-T-ChIL-18送宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定。

1.7 ChIL-18成熟蛋白原核表达载体的构建

将重组质粒pGEM-T-ChIL-18与原核表达载体pQE30分别用Sph I、Pst I双酶切后,电泳、分离、回收,按常规方法连接、转化宿主菌M15。将经PCR鉴定和限制性内切酶鉴定为阳性克隆pQE30-ChIL-18送往TaKaRa进行核苷酸序列测定。

1.8 pQE30-ChIL-18在大肠杆菌中的诱导表达

将pQE30-ChIL-18阳性质粒转化大肠杆菌M15感受态细胞,随机挑取分隔良好的单个菌落,接种氨苄青霉素(60 mg/L)的LB液体培养基中,25℃摇瓶培养至 $D_{600\text{nm}} = 0.6 \sim 1.0$,加入IPTG(终浓度1 mmol/L)30℃诱导5 h。取细菌菌液1 mL,10 000 r/min离心3 min,收集菌体,重悬于PBS中,超声破碎后,加入等体积的2×SDS凝胶上样缓冲液,混匀,100℃煮沸5 min。按常规方法制备12%的分离胶和5%的积层胶,将处理好的样品进行电泳,电泳结束后,取下凝胶,经考马斯亮兰R250染色,甲醇-冰乙酸脱色液脱色。

2 结果

2.1 RT-PCR扩增IL-18成熟蛋白基因

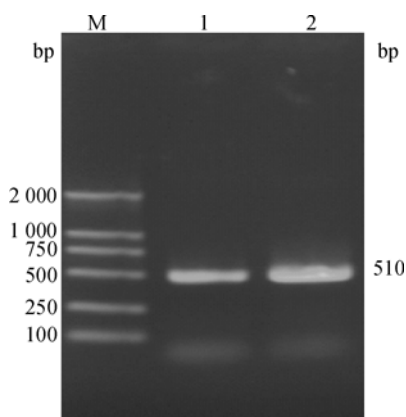
以从PHA活化10 h的海兰鸡脾脏细胞提取的总RNA为模板,利用RT-PCR方法扩增得到略大于500 bp目的DNA片段,与预计大小相一致(图1)。

2.2 ChIL-18 cDNA的克隆及序列分析

将回收的RT-PCR产物直接克隆到pGEM-T Easy Vector载体中,得到含ChIL-18 cDNA的重组质粒pGEM-T-ChIL-18。酶切分析及PCR扩增鉴定表明克隆正确。序列分析表明(序列略),本试验所克隆到的ChIL-18 cDNA与Schneider等^[6]报道的鸡IL-18基因序列完全相同,包括终止密码子在内其编码区的长度为510 bp,编码169个氨基酸残基。

2.3 ChIL-18重组表达质粒的鉴定

所获质粒pQE30-ChIL-18经Sph I + Pst I双酶切,



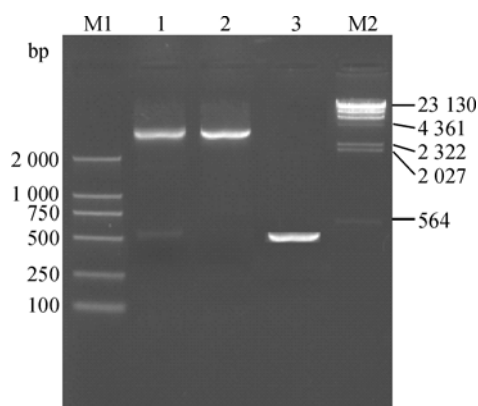
M: DNA marker DL2000; 1, 2: RT-PCR 产物

M: DNA marker DL2000; 1, 2: product of RT-PCR

图1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR product for Hai-Lan chicken interleukin-18

能够切出1条与以 pQE30-ChIL-18 为模板扩增出的 PCR 产物位置一致、片段长度约 510 bp 的特异性条带(图2)。重组质粒测序结果表明,编码 ChIL-18 成熟蛋白的基因片段正确地插入到原核表达载体,读码框正确。



M1: DNA marker DL 2000; 1: *Pst* I 和 *Sph* I 双酶切 pQE30-ChIL-18; 2: *Pst* I 和 *Sph* I 双酶切 pQE30; 3: 重组质粒 pQE30-ChIL-18 为模板的 PCR 结果; M2: λ -Hind III digest

M1: DNA marker DL2000; 1: pQE30-ChIL-18 digest *Pst* I and *Sph* I; 2: pQE30 digest *Pst* I and *Sph* I; 3: PCR product of pQE30-ChIL-18; M2: λ -Hind III digest

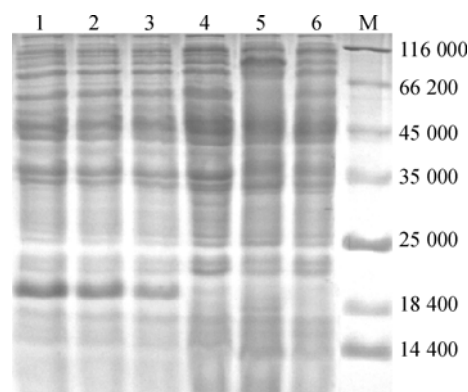
图2 重组原核表达质粒 pQE30-ChIL-18 的双酶切和 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid by double digestion and PCR analysis

2.4 ChIL-18 融合蛋白的诱导表达 SDS-PAGE 电泳结果

pQE30-ChIL-18 转化 M15 阳性菌经 IPTG 诱导表达,用 12% 的 SDS-PAGE 电泳分析,诱导重组菌比对照菌明显地多出 1 条相对分子质量约为 19 000 的特异的表达蛋白条带,与预期大小的融合蛋白一致。

而非重组的 pQE30 质粒菌培养物样品中,未见明显的条带(图3)。



1~3: IPTG 诱导的 pQE30-ChIL-18 在 M15 中的表达; 4: M15 对照; 5~6: 空载体对照; M: 低相对分子质量蛋白质标准

1~3: pQE30-ChIL-18 expression in M15; 4: M15 control; 5~6: control of hollow vector; M: low relative molecular mass marker of protein

图3 表达产物 SDS-PAGE 电泳

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis of ChIL-18 expression product

3 讨论

将鸡细胞因子作为免疫佐剂或者治疗剂,其递送途径大多数为皮下或者腹腔内注射以及与疫苗共同注射^[12],近来的研究还用活病毒载体来递送细胞因子基因,从而使其在机体内获得表达^[13],也有通过重组蛋白口服递送途径的报道^[14],重组蛋白作为饲料添加剂和治疗剂不仅不会给机体带来副效应,而且更加便捷。本研究将海兰鸡 IL-18 cDNA 定向插入到原核表达载体 pQE30 的相应位点构建的 pQE30-ChIL-18 重组蛋白,为开发新型的饲料添加剂和治疗剂奠定了基础,这将在集约化养殖中具有实际应用价值。

选择有效的表达系统是进行外源基因高效表达的重要前提。pQE 是一种原核生物表达载体,可以高效表达和纯化外源蛋白,被广泛应用于重组蛋白的表达和纯化,是近年来国内外经常采用的一种原核表达载体。它利用表达载体与金属亲和层析树脂 (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 有高度亲和力,重组蛋白可在变性或非变性状态下被纯化,即使被纯化的重组蛋白含量很低也能被有效地纯化出来。由于与树脂的结合是可逆的,故被纯化的蛋白可在极温和的条件下被洗脱。树脂的稳定性好,可反复使用多次,成本低,简化了基因工程下游的纯化操作。本研究 pQE30 载体使 ChIL-18 基因未经修饰即在大肠杆菌中获得了高效表达。为后续的工程菌发酵及大规模分离纯化打下了很好的基础。

IL-18 虽在结构上与 IL-1 β 相似,但在功能上更

接近于 IL-12^[15]。其前体在 IL-1 β 转换酶(ICE 或 Caspase-1)的作用下,去除前导序列成为成熟的 IL-18 而发挥生物学作用^[16]。由于细菌中没有 ICE,无法切除其前体的前导序列,本研究通过引物设计,去除 *ChIL-18* 的前导序列,直接克隆了 *ChIL-18* 成熟蛋白基因,并将其亚克隆至原核表达载体 pQE30 中,经测序鉴定正确后在大肠杆菌 M15 中进行了高效表达,为进一步研究 IL-18 的生物学功能及研制新型免疫佐剂和免疫调节剂奠定了基础。

参考文献:

- [1] OKAMURA H, TSUTSUI H. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cell [J]. *Nature*, 1995 (378):88-91.
- [2] 孙文长. 白细胞介素 18 研究进展[J]. 国外医学-临床生物化学与检验学分册, 2000, 21(2):57-59.
- [3] 陈奖励, 王欢. 鸡 IL-2 基因的克隆及序列测定[J]. 中国兽医杂志, 2000, 26(4):11-13.
- [4] 何淑雅, 周钢. 人白细胞介素 18 的基因克隆及序列测定[J]. 中国现代医学杂志, 2001, 15(4):30-33.
- [5] 张瑞军, 田志钢. 重组人白细胞介素 18 的纯化及其生物活性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2001, 17(8):411-415.
- [6] SCHNEIDER K, PUEHLER F, BAEUERLE D, et al. cDNA Cloning of biologically active chicken interleukin-18 [J]. *Interferon and Cytokine Research*, 2000(20):879-883.
- [7] KAISER P. Turkey and chicken interleukin-18 (IL-18) share high sequence identity, but have different polyadenylation sites in their 3'UTR [J]. *Immunology*, 2002, 26:681-687.
- [8] 潘蔚琦, 刘胜旺, 孔宪刚, 等. 编码鸡 IL-18 成熟蛋白的基因克隆[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(2):114-117.
- [9] 刘胜旺, 潘蔚琦, 孔宪刚, 等. 鸡白介素 18 基因原核表达及多克隆抗血清的制备[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(5):427-430.
- [10] 温纳相, 黄青云, 陈金顶, 等. 鸡 IL-18 基因克隆和序列测定[J]. 动物医学进展, 2003, 24(2):64-66.
- [11] 陈红英, 崔保安, 黄青云, 等. 海兰鸡白细胞介素-18 全基因的克隆与序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(1):48-50.
- [12] LOWENTHAL J W, O'NEIL T E, DAVID A, et al. Cytokine therapy: a natural alternative for disease control [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999, 72(12):183-188.
- [13] JOHNSON M A, POOLEY C, LOWENTHAL J W. Delivery of avian cytokines by adenovirus vectors [J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24(2/3):343-354.
- [14] 韩宗玺, 刘胜旺, 孔宪刚, 等. 饲喂重组鸡白细胞介素 18 蛋白增加肉仔鸡体重的初步研究[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(3):60-64.
- [15] KOHNO K, KURIMOTO M. Interleukin-18, a cytokine which resembles IL-1 structurally and IL-12 functionally but exerts its effect independently of both [J]. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1998, 86(1):11-15.
- [16] GU Y, KUIDA K, TSUTSUI H, et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme [J]. *Science*, 1997, 275(5297):206-209.

【责任编辑 柴 焰】