

鸭白细胞介素-2 基因克隆、原核表达及生物学活性检测

张欣¹, 崔敏², 房红莹¹, 贺东生¹, 罗满林¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 福建农林大学 动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要:根据 GenBank 发表的鸭白细胞介素-2(IL-2)基因序列设计并合成了特异性引物,以经 ConA 诱导的广州白鸭外周血淋巴细胞提取的总 RNA 为模板,用 RT-PCR 方法扩增出长度为 360 bp 的目的基因片段. 将该基因克隆到 pMD18-T simple vector 上,经酶切、PCR 鉴定及序列测定,结果表明获得了鸭 IL-2 成熟蛋白基因的完整克隆. 构建的表达质粒 pET-IL-2 经 *Bam*HI、*Xho*I 双酶切鉴定构建正确;经 SDS-PAGE 分析,在约 33 000 处出现新的蛋白条带,Western-blotting 分析表明,融合蛋白能够被抗 His 单克隆抗体识别,体外活性检测表明,重组蛋白具有促进淋巴细胞增殖的活性.

关键词:鸭; 白细胞介素-2; 基因克隆; 原核表达; 生物学活性

中图分类号:Q511:Q786

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)04-0083-04

Cloning and Prokaryotic Expression of Duck Interleukin-2 Gene and Detection of Its Bioactivity

ZHANG Xin¹, CUI Min², FANG Hong-ying¹, HE Dong-sheng¹, LUO Man-lin¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642;

2 College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fujian 350002)

Abstract:Based on the sequence of gene IL-2 available in GenBankTM, A pair of primers was designed and subsequently a fragment of 360 bp was amplified by RT-PCR with the total RNA as template which isolated from peripheral blood lymphocyte of Guangzhou White duck and induced by ConA. The DuIL-2 maturation protein gene was cloned into pMD18-T simple vector, identified by enzymatic digestion and confirmed by PCR and sequencing. The results indicated that DuIL-2 maturation protein gene was cloned successfully. The expression vector pET-IL-2 was constructed and verified by digestion with *Bam*HI and *Xho*I. After induction with IPTG, there was a specific protein band of approximately 33 000 on SDS-PAGE gel. Results of Western-blotting analysis indicated that the recombinant protein could react with monoclonal antibody against His. MTT colorimetric assay indicated that the recombinant protein could induce duck peripheral blood lymphocyte T lymphocytes *in vitro*.

Key words:duck; interleukin-2; gene cloning; prokaryotic expression; bioactivity

白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)是T细胞和自然杀伤细胞产生的糖蛋白,能诱导T淋巴细胞增殖,增强CTL细胞毒活性,刺激细胞分泌IFN- γ 等细胞因子,促进机体的细胞免疫反应;同时也能激活B淋巴细胞,参与机体的体液免疫应答^[1-3]. 1983年

Taniguchi等^[4]将人的IL-2克隆成功,但禽类的研究仍处在初级阶段. 1997年Sundick等^[5]从ConA活化的T细胞中获得了鸡IL-2cDNA,近年来,已在原核和真核表达系统中成功表达^[6-7],而对水禽的IL-2研究起步较晚,王金勇等^[8]在国内克隆了鸭IL-2的

收稿日期:2008-03-06

作者简介:张欣(1980—),男,硕士研究生; 通讯作者:罗满林(1957—),男,教授,博士, E-mail:luoml@scau.edu.cn

基因. 为了研究和开发重组鸭 IL-2 (rDuIL-2) 作为新型免疫调节和生物治疗的制剂, 笔者对鸭 IL-2 基因进行了克隆、表达, 并对表达蛋白的生物学活性进行了检测.

1 材料与方法

1.1 实验动物、质粒及试剂

健康广州白鸭由广州医学实验动物中心提供; RPMI1640、Hanks 液为 GIBCO 公司产品; ConA 为 Sigma 公司产品; 新生牛血清为杭州四季青生物工程有限公司产品; 淋巴细胞分离液为广州展辰生物有限公司产品; Ex Taq 酶、BamHI、XhoI、T4DNA 连接酶、pMD18-T simple Vector、反转录酶 AMV 为 TaKaRa 公司产品. *E. coli* DH5 α 为华南农业大学动物传染病实验室保存.

1.2 鸭外周血淋巴细胞的诱导培养

无菌采集广州白鸭外周血 5 mL, 肝素抗凝, 无菌条件下加入等量 RPMI1640 稀释, 取 5 mL 缓慢加入 5 mL 淋巴细胞分离液上, 室温 2 000 r/min 水平离心 15 min, 取中间层的淋巴细胞, 用 RPMI1640 洗 2 次, 1 500 r/min 离心 10 min, 沉淀用含 10 μ g/mL ConA、体积分数 10% 小牛血清及青霉素、链霉素各 2 000 IU/mL 的 RPMI1640 培养液悬浮, 计数后分装细胞瓶在体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h. 用 Trizol 按常规方法提取经 Con A 刺激的外周血淋巴细胞总 RNA.

1.3 鸭 IL-2 成熟蛋白基因的 RT-PCR 扩增

根据 GenBank 已发表的序列, 设计 1 对引物 P1 和 P2, 引物对之间包括去除信号肽的成熟鸭 IL-2 基因, 长度约 360 bp. P1: 5'-CGGGATCCGCACCTCTAT-CAGAGAAAG-3' (下划线处为 BamHI 酶切位点); P2: 5'-CCGCTCGAGTTATTTAGCATAGATCTCAG-GA-3' (下划线处为 Xho I 酶切位点); 引物由上海英骏生物工程公司合成. RT 反应体系如下: RNA 12 μ L, dNTP 2 μ L, RNase Inhibitor 0.5 μ L, AMV 1 μ L, 5 $\times$ AMV buffer 3.5 μ L, Oligo(dT) 1 μ L, 体系总体积 20 μ L. 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h. 然后执行 PCR, 反应体系: cDNA 3 μ L; 5 mmol/L dNTP 2 μ L; 上、下游引物各 0.5 μ L; 10 $\times$ Ex Taq Buffer 2.5 μ L; Ex Taq 聚合酶 0.15 μ L; 加 ddH₂O 至体系 25 μ L; 然后执行下列反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 将 PCR 产物经 8 g/L 琼脂糖凝胶回收 360 bp 目的片段, 纯化后直接克隆至 pMD18-T simple vector, 再转化 DH5 α 感受态细胞, 通过筛选获得重组质粒 pMD-IL-2, 经 BamHI、XhoI 限制性酶切及 PCR 鉴定后, 阳性重组

质粒送交上海英骏生物工程公司进行测序.

1.4 重组原核表达质粒 pET-IL-2 的构建

鉴定正确的重组 pMD-IL-2 质粒和 pET32a 载体质粒经 BamHI、XhoI 双酶切, 回收目的基因片段, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 DH5 α , 构建重组原核表达质粒 pET-IL-2. 提取重组质粒进行双酶切鉴定.

1.5 重组表达质粒 pET-IL-2 转化 BL21 及诱导表达

将鉴定后的 pET-IL-2 纯化后, 按常规方法转化 *E. coli* 感受态细胞 BL21. 次日挑选阳性单菌落, 接种于 5 mL 含 100 μ g/mL Amp 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡 (160 ~ 180 r/min) 培养至细菌的对数生长期 ($D_{600\text{nm}} = 0.4 \sim 0.5$), 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4 h 后收集菌体, 用于 SDS-PAGE 分析.

1.6 表达产物的 SDS-PAGE 分析和 Western-blotting 初步鉴定

按照常规方法制胶, 分别取诱导后的菌液 1 mL, 12 000 r/min 离心 30 s, 收集菌体, 加入 100 μ L 2 $\times$ 上样缓冲液重悬菌体, 沸水浴 10 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 取 10 μ L 沉淀做 SDS-PAGE 电泳, 将电泳的蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上, 用含 10 g/L 脱脂奶粉的 TBS (20 mmol/L Tris-HCl, pH7.4; 150 mmol/L NaCl) 封闭, 因目的蛋白以 His 融合蛋白形式表达, 故通过小鼠抗 His 单克隆抗体为一抗, HRP 标记羊抗小鼠 IgG 为二抗, DAB 显色.

1.7 重组蛋白的可溶性分析与纯化

4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集诱导表达的菌体, 于冰浴上进行超声破碎, 4 s/次, 间隔 6 s, 总时间 20 min. 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min, 分别取上清液和沉淀用于 SDS-PAGE 分析. 用 10 mL 含 6 mmol/L 尿素的裂解缓冲液重悬超声处理后的沉淀, 按照 His-Tag 蛋白纯化试剂盒说明书进行纯化, 分步洗脱, 收集洗脱液, 进行 SDS-PAGE 分析.

1.8 重组蛋白的复性

将纯化后的蛋白转移到处理过的透析袋中, 4 $^{\circ}$ C 下用复性液 I (6 mol/L 尿素、1 mmol/L 还原型谷胱甘肽、0.1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽、20 mmol/L Tris-HCl) 透析过夜, 再用复性液 II (5 mmol/L EDTA、20 mmol/L Tris-HCl) 每 4 h 透析 1 次, 最后一次过夜.

1.9 复性后 IL-2 蛋白生物学活性测定

按文献[7]的方法制备鸭外周血 T 淋巴靶细胞, 将靶细胞制成 5×10^6 mL⁻¹ 的细胞悬液, 转入 96 孔细胞培养板, 加入 2 倍梯度稀释的待检样品 (100 μ L/孔), 培养 48 h, 每个样品设 3 个重复. 每孔加入

5 mg/L 的 MTT 溶液 20 μ L, 培养 4 h. 尔后每孔加入 100 μ L 含 0.01 mol/L HCl 的 SDS, 42 $^{\circ}$ C 反应 4 h, 室温下放置 20 min, 读取 $D_{570\text{ nm}}$ 值.

2 结果

2.1 基因组 RT-PCR 扩增及鉴定

RT-PCR 产物经凝胶电泳检测, 得到 1 条条带, 约为 360 bp, 其大小与鸭 IL-2 成熟蛋白基因相符 (图 1). 重组质粒经 *Bam*HI、*Xho*I 双酶切鉴定, 切出 360 bp 大小的目的片段, 与实际大小相符 (图 2), 表明目的基因已克隆到 T 载体中.

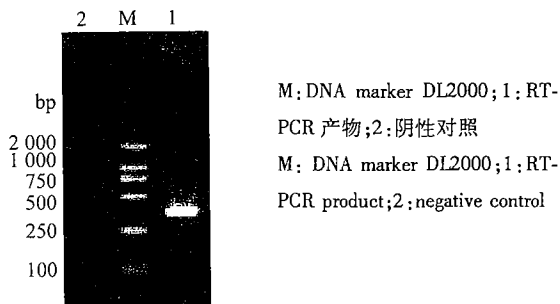


图 1 鸭 IL-2 基因 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR amplification result of duck IL-2 genes

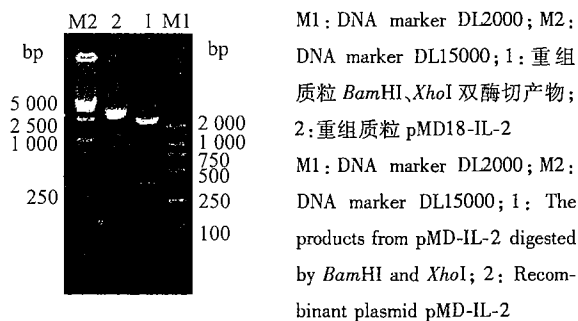


图 2 重组质粒 pMD-IL-2 酶切鉴定

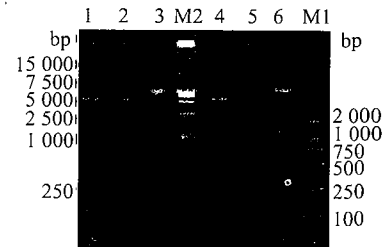
Fig. 2 Enzymatic digestion of recombinant plasmid pMD-IL-2

2.2 序列分析

对阳性质粒进行了序列测定, 结果表明鸭 IL-2 成熟蛋白基因全长 360 bp, 编码 119 个氨基酸. 与 GenBank 中登录的核苷酸序列 AF294322 及 AY173028 进行比较, 同源性为 99.4%, 核苷酸在 69 位由 C 变成 T, 244 位由 G 变成 A. 氨基酸的同源性为 99.2%, 其中 244 位核苷酸的变异, 导致了氨基酸由 Lys 变为 Glu.

2.3 重组原核表达载体 pET-IL-2 的酶切鉴定

重组表达载体用 *Bam*HI 进行单酶切, 应能切出约 6 300 bp 大小的 1 条带; 用 *Bam*HI、*Xho*I 进行双酶切鉴定时应出现大小约为 360 和 5 900 bp 的 2 条带. 酶切结果与预期完全相符 (图 3).



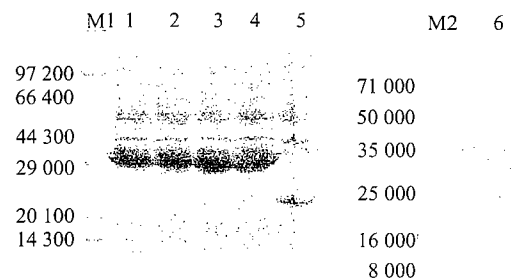
M1: DNA marker DL2000; M2: DNA marker DL15000; 1: pET-IL-2 *Bam*HI 单酶切产物; 2: pET32a *Bam*HI 单酶切产物; 3, 6: pET-IL-2 重组质粒; 4: pET-IL-2 *Bam*HI、*Xho*I 双酶切产物; 5: pET32a *Bam*HI、*Xho*I 双酶切产物

图 3 重组质粒 pET-IL-2 的酶切鉴定

Fig. 3 Enzymatic digestion of recombinant plasmid pET-IL-2

2.4 诱导表达及其产物的 SDS-PAGE 分析与 Western-blotting 分析

电泳结果显示, 重组表达阳性菌经诱导表达, 产生了 1 条相对分子质量约 33 000 的蛋白带, 与预期的融合蛋白相对分子质量大小一致, 而对照无此条带, 对表达产物初步进行了免疫印迹试验, 结果显示融合蛋白能够被抗 His 单克隆抗体识别, 且无非特异条带出现 (图 4).



M1: 低相对分子质量蛋白质标准; M2: 预染色的蛋白质 marker; 1 ~ 4: pET-IL-2/BL21 诱导后的菌体蛋白; 5: 诱导的 pET32a (+)/BL21 菌体蛋白; 6: 诱导的 pET-IL-2/BL21 菌体蛋白与单抗的反应

M1: Low relative molecular mass protein marker; M2: Pre-stain protein marker; 1-4: Total protein from pET-IL-2/BL21 induced by IPTG; 5: Total protein from pET32a (+)/BL21 induced by IPTG; 6: Protein from pET-IL-2/BL21 induced by IPTG, which reacted with mAb His

图 4 表达产物的 SDS-PAGE 分析与 Western-blotting 初步鉴定

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed products and its primary identification by Western-blotting

2.5 重组蛋白的可溶性分析和纯化

处理的沉淀经琼脂糖凝胶电泳有明显的条带, 表明目的蛋白主要以不溶性包涵体形式存在 (图 5). 用镍离子亲和层析法对其进行纯化后电泳, 可见清晰单一的特异性条带 (图 6).

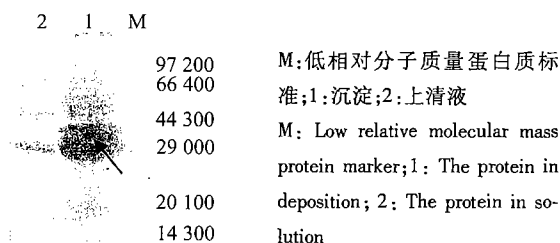


图5 表达产物的可溶性分析

Fig. 5 Dissolubility analysis of expressed recombinant protein

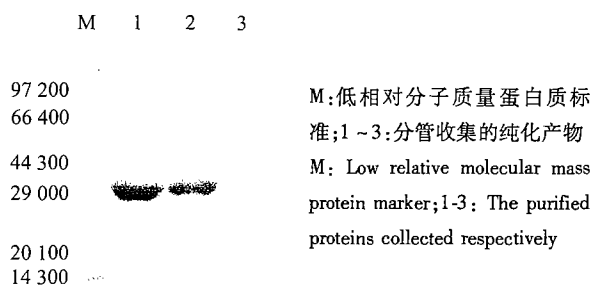


图6 纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified protein

2.6 重组蛋白的生物活性检测

复性后蛋白的生物活性检测结果表明, 试验组 $D_{570\text{ nm}}$ 为 0.114 ± 0.019 , 对照组 $D_{570\text{ nm}}$ 为 0.0110 ± 0.0009 . 经 SPSS 软件分析差异显著 ($P < 0.05$).

3 讨论

大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、目的基因表达水平高、培养周期短、抗污染能力强等特点, 是基因表达技术中发展最早、目前应用最广泛的经典表达系统, pET 系统已成为在大肠杆菌中表达蛋白的首选. 本试验以 pET32a 为载体, 在大肠杆菌 BL21 中以包涵体形式表达了 IL-2 重组蛋白, 为目的蛋白的纯化提供了方便. 表达的蛋白为鸭 IL-2 成熟蛋白, 在设计引物时去掉了其信号肽, 这表明鸭 IL-2 的信号肽可能不是必需的.

本试验从广州白鸭外周血淋巴细胞总 RNA 中克隆到鸭 IL-2 的成熟蛋白基因, 并与 GenBank 已发表鸭 IL-2 基因序列 (AF294322 和 AY173028) 进行比较, 发现存在一个实义突变, 且导致氨基酸发生变异. 其具体意义有待进一步阐明.

pET-32a(+) 在目的基因两端各编码 6 个连续的组氨酸作为亲和臂, 使所得的重组蛋白能通过金属离子 (Ni^{2+}) 配体亲和层析快速纯化, 而且 N 端 His-Tag 通过柔性氨基酸 (Ser-Ser-Gly) 组成的连接区与外源蛋白相连, 由于这段柔性连接区使 His 融合片段与外源蛋白之间的连接更为灵活, 从而减少对外源蛋白空间构象及活性的影响. 因鸭 IL-2 研究较

少, 国内外还没有其单克隆抗体, 所以本试验选用了抗 His 单克隆抗体进行了初步鉴定.

在本试验中, 采用淋巴细胞增殖试验来验证重组蛋白的活性, 结果表明, 重组蛋白具有淋巴细胞增殖活性, 但增殖效果与重组蛋白的浓度具有一定的相关性, Zhou 等^[9] 研究表明, 当重组蛋白含量在 3.12 ng/孔时, 鸭淋巴细胞增殖效果显著, 对鸡淋巴细胞表现出增殖作用蛋白含量则需要达到 25 ng/孔. 鸭 IL-2 是一种重要的免疫调节因子, 该研究为水禽传染病特别是免疫抑制性疾病的发病机理研究、进行免疫增强剂的临床应用研究及构建基因工程疫苗奠定了基础.

参考文献:

- [1] SIEGEL J P, SHARON M, SMITH P L, et al. The IL-2 receptor β chain (p70): Role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities [J]. Science, 1987, 238 (4823): 75-78.
- [2] SMITH K A. Interleukin-2: Inception, impact and implications [J]. Science, 1988, 240 (4856): 1169-1176.
- [3] COLLINS R A, OLDHAM G. Recombinant human interleukin 2 induces proliferation and immunoglobulin secretion by bovine B-cells: tissue differences and preferential enhancement of immunoglobulin A [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1993, 36 (1): 31-43.
- [4] TANIGUCHI T, MITSUI H, FUJITA T, et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2 [J]. Nature, 1983, 302 (2): 305-310.
- [5] SUNDICK R S, GILL-DIXON C. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15 [J]. J Immunol, 1997, 159 (2): 720-725.
- [6] ROTHWELL L, HAMBLIN A, KAISER P. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2 [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2001, 83 (3-4): 149-160.
- [7] STEPANIAK J A, SHUSTER J E, HU W, et al. Production and *in vitro* characterization of recombinant chicken interleukin-2 [J]. Interferon Cytokine Res, 1999, 19 (5): 515-526.
- [8] 王金勇, 周继勇, 陈吉刚, 等. 鸭的类似鸡白细胞介素 2 基因的克隆及遗传进化分析 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23 (6): 545-548.
- [9] ZHOU Ji-yong, WANG Jin-yong, CHEN Ji-gang, et al. Cloning, *in vitro* expression and bioactivity of duck interleukin-2 [J]. Mol Immunology, 2005, 42 (5): 589-598.

【责任编辑 柴 焰】