

牛白细胞介素 15 基因的克隆及 在大肠杆菌中的表达

房红莹^{1,2}, 陈钜豪¹, 张欣¹, 胡寻¹, 罗满林¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 苏州大学 医学院, 江苏 苏州 215123)

摘要:根据 GenBank™ 中发表的牛 IL-15 基因序列设计并合成了特异性引物, 以经 LPS 和 ConA 刺激的牛外周血单个核细胞提取的总 RNA 为模板, 用 RT-PCR 方法扩增出长度约 500 bp 的目的基因片段, 并将该基因克隆到 pMD18-T 载体上。酶切、PCR 及序列测定结果表明, 获得了牛 IL-15 全长基因的克隆。进一步通过 PCR 方法得到缺失其 N 端 48 个氨基酸的信号肽序列的牛 IL-15 成熟蛋白基因, 将其亚克隆到原核表达载体 pET-32a 上, 构建重组表达质粒 pET-IL-15, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导, 该菌表达以包涵体形式存在的相对分子质量约为 33 000 的融合蛋白。用 Ni 融合层析方法纯化表达的蛋白。Western-blot 试验显示表达的重组融合蛋白能与抗 6 × His 的单克隆抗体发生反应, 同时也能与鼠抗猪 IL-15 的多克隆抗体发生明显交叉反应。

关键词:牛白细胞介素 15; 基因克隆; 原核表达

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)01-0081-05

Cloning and Expression of Bovine Interleukin-15 in *Escherichia coli*

FANG Hong-ying^{1,2}, CHEN Ju-hao¹, ZHANG Xin¹, HU Xun¹, LUO Man-lin¹

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

2 Medical School of Suzhou University, Suzhou 215123, China)

Abstract: According to the sequence of IL-15 gene available on GenBank™, a pair of primers was designed to amplify the full-length IL-15 gene by RT-PCR from peripheral blood lymphocyte stimulated by LPS and ConA. The full-length IL-15 gene was cloned into the pMD18-T vector. Identification by digestion with restriction endonuclease, PCR amplification and sequencing indicated the IL-15 gene was cloned successfully. The gene of mature IL-15 was amplified by PCR using the full-length gene as template and then inserted into the prokaryotic expressing vector pET-32a to construct pET-IL-15/BL21 (DE3). After the bacteria were induced by IPTG, the target gene was expressed in the form of inclusion body with the fusion protein relative molecular mass 33 000. Expressed protein was purified by affinity chromatography. The result of Western-blot demonstrated that the recombinant fusion protein 6 × His-IL-15 can be recognized by anti-6 × His monoclonal antibody and anti-porcine IL-15 polyclonal antibodies.

Key words: bovine interleukin-15 (IL-15); gene cloning; prokaryotic expression

白细胞介素 15 (IL-15) 是新发现的一种重要的细胞因子, 与 IL-2 具有相似的生物学功能, 成熟的 IL-15 通过与 IL-15 受体复合物 (IL-15 R $\alpha\beta\gamma$) 结合起作用, 其中 β 、 γ 亚基与 IL-2 共用, 而 α 亚基为自身独

有^[1,2]。由于 IL-15 与 IL-2 结合受体有所不同, 所以又有其独特的生物学功能, 引起各国研究者们的重视。IL-15 在先天性免疫和获得性免疫中都发挥重要作用。感染病原体后 IL-15 对中性粒细胞、NK 细胞、

收稿日期: 2008-04-01

作者简介: 房红莹(1970—), 女, 博士研究生; 通讯作者: 罗满林(1957—), 男, 教授, 博士, E-mail: luoml@scau.edu.cn

基金项目: 广东省省级动物防疫检疫研究专项基金“牛结核分枝杆菌重组腺病毒疫苗的研究”(F07004)

T细胞有趋化作用;它还能促进NK细胞、 $NK^+ \alpha\beta T$ 细胞、 $\gamma\delta T$ 细胞的发育,与IL-12、IL-18协同参与NK细胞的活化,刺激NK细胞产生IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF,增强NK细胞的细胞毒作用,抑制NK细胞凋亡;能促进T细胞的活化增殖,诱导产生细胞毒效应,抑制T细胞尤其CD8 $^+$ T细胞的凋亡,与其他细胞因子如IL-12、IL-2、IL-7协同增强T细胞的IFN- γ 产生。在体液免疫方面,IL-15可促进B细胞的分化增殖,诱导分泌免疫球蛋白^[3]。可见IL-15的生物学功能贯穿了机体免疫防御的整个过程。它在抗胞内菌、寄生虫和病毒等病原体感染、抗肿瘤和器官移植领域有着广阔的应用前景,因而国内外对其多样性的生物学活性及作为基因治疗用的细胞因子、免疫佐剂等方面的应用成为研究热点^[2]。迄今为止,人^[4]、鸡^[5]、猪^[6]、猫^[7]等动物的IL-15 cDNA均已克隆成功,有的获得表达。但IL-15在牛羊等大动物上的克隆表达鲜见报道。本研究从牛单个核细胞中克隆了全长IL-15基因,在大肠杆菌中表达其成熟肽基因片段,为进一步研究该细胞因子的功能和临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pMD18-T simple载体、RNA抽提试剂TRIZOL、M-MLV、限制性核酸内切酶Bam H I、Xho I及Ex-TaqTM DNA聚合酶、T₄ DNA连接酶为TaKaRa公司产品;淋巴细胞分离液Ficoll为天津TBD公司产品,ConA、LPS、鼠抗6×His单克隆抗体为Sigma公司产品;DNA胶回收纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒均为OMEGA公司产品。HRP标记的羊抗鼠IgG为SBA公司产品。*Escherichia coli*菌株DH5α、BL21(DE3)和原核表达载体pET-32a(+)、鼠抗猪IL-15多克隆抗体由华南农业大学兽医传染病学实验室保存。

1.2 引物设计与合成

根据GenBank中牛IL-15的序列,设计如下引物:P1:5'-GCCGGATCCATGAGAATT TTGAAACC-3';P2:5'-GACCTCGAGTCAGAACTGTTGATGAAC-3',P3:5'-CGCGGATCCAACCTGGCAGTATGTAAT-3'。P1、P2用于扩增牛IL-15全长基因,P3、P2用于扩增牛IL-15成熟蛋白基因。为方便基因的克隆及鉴定等后续工作,在引物中分别加有Bam H I、Xho I酶切位点,并用下划线表示。基因扩增长度为507 bp,引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 IL-15全长基因的获取

从奶牛颈静脉采血,常规分离外周血单核细胞

(PBMCs),计数后以 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 加入终质量浓度均为20 μg/mL的LPS和10 μg/mL的ConA刺激,24 h后用TRIZOL试剂按常规方法抽提细胞总RNA。以总RNA为模板,oligoT为引物,在M-MLV作用下获得cDNA。以上述cDNA为模板,P1、P2为引物扩增IL-15全长基因。反应条件为:95 ℃变性4 min;95 ℃30 s,53~60 ℃的温度梯度退火30 s;72 ℃40 s,共30个循环;最后72 ℃延伸5 min。

1.4 IL-15全长基因的T-A克隆及鉴定

将获得的PCR产物回收纯化后直接克隆至p-MD18-T载体,再转化DH5α感受态细胞,通过筛选获得重组质粒pMD18-T-IL-15,用Bam H I、Xho I双酶切鉴定及菌液PCR鉴定后,含阳性重组质粒的菌液送交上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 原核表达载体pET-IL-15的构建

以上述测序正确的重组质粒作模板,以上游引物P3和下游引物P2扩增缺失其N端48 aa的信号肽序列的牛IL-15成熟蛋白基因。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,割胶回收后用Bam H I、Xho I双酶切,同样双酶切pET-32a(+),电泳后回收线性化载体与IL-15成熟蛋白基因,回收产物16 ℃连接过夜。连接产物转化DH5α感受态细胞,通过筛选获得重组质粒pMD18-T-IL-15,用Bam H I、Xho I双酶切鉴定及菌液PCR鉴定后,含阳性重组质粒的菌液送交上海英骏生物技术有限公司测序。鉴定正确的重组表达质粒pET-IL-15转化大肠杆菌BL21(DE3),菌液PCR鉴定重组表达质粒pET-IL-15是否转化成功。

1.6 重组蛋白的诱导表达及诱导条件的优化

挑取阳性菌落接种5 mL LB液体培养基中(含200 μg/mL氨苄青霉素),37 ℃振荡培养过夜作为种子液,取种子液按10 mL/L的比例接种于3 mL含Amp(200 μg/mL)新鲜LB液体培养基中,160 r/min、37 ℃振摇培养至 $D_{600 \text{ nm}}$ 为0.6时,用终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导*E. coli* BL21(DE3)表达融合蛋白。于诱导后3 h取菌液1 mL,12 000 r/min离心30 s,弃上清液,用100 μL 1×SDS-PAGE加样缓冲液重悬菌体,反复冻融3次,于沸水中煮沸5~10 min,冷却至室温,12 000 r/min离心2 min,其上清液进行SDS-PAGE分析。同时设未诱导转化菌、BL21菌、pET-32a(+)空载体转化菌样品对照。

用上述同样方法移植振摇培养3 h后,取出分别加入终浓度为0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L的IPTG,继续培养3 h。然后按1.6的方法处理样品,进行SDS-PAGE分析。同时用SDS-PAGE比较IPTG诱导培养不同时间(1、2、4、6、8 h)比较表达产量的高低。

1.7 重组蛋白的可溶性分析与纯化

离心收集菌体,按每100 mL培养基所得菌体加入40 mL 1×Binding Buffer比例重悬菌体,超声破碎,离心15 min分别收集上清液和沉淀,进行SDS-PAGE分析。按每100 mL培养基加入5 mL 1×Binding Buffer(含6 mol/L尿素)比例重悬沉淀。冰浴孵育2 h,彻底溶解包涵体。用His·Bind柱亲和层析纯化表达产物,SDS-PAGE分析纯化效果。

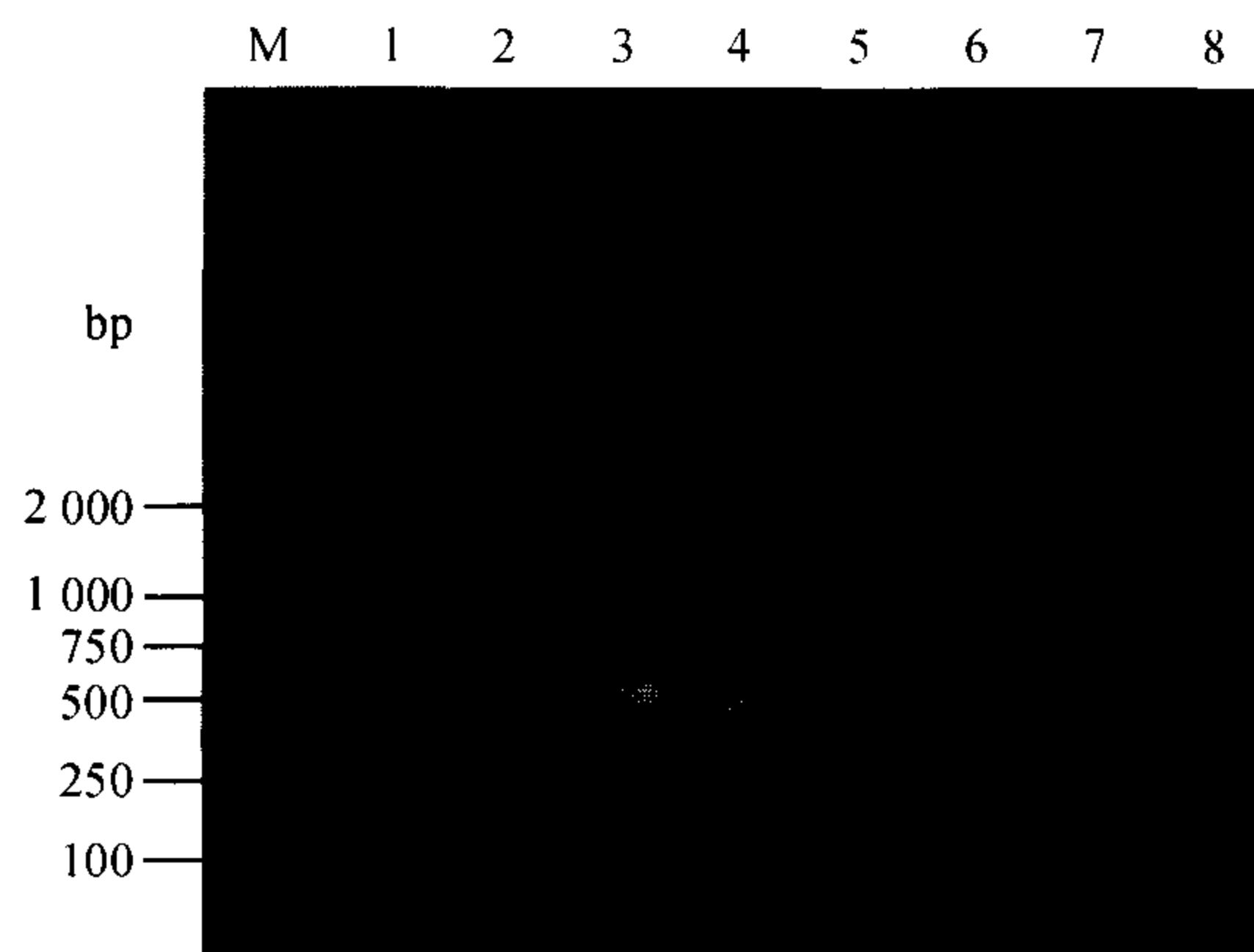
1.8 表达产物的免疫原性分析

纯化产物SDS-PAGE电泳后,电转至硝酸纤维素膜上,封闭液4℃封闭90 min;分别加入1:1 000稀释的鼠抗6×His的单抗和1:100稀释的鼠抗猪IL-15多克隆抗体,37℃过夜;TBS洗涤后,加入1:1 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠第二抗体作用2 h;充分洗涤,加入新鲜配制的二氨基联苯胺(DAB)显色液作用5 min;加入终止液洗涤残液。

2 结果

2.1 全基因的克隆与序列分析

以经LPS和ConA刺激的牛外周血单个核细胞提取的总RNA为模板,用RT-PCR方法扩增出长度约500 bp的目的条带,与预期大小相符(图1),将该基因克隆到pMD18-T载体上,转化DH5 α 感受态细胞。pMD18-T-IL-15重组质粒经Bam H I、Xho I双酶切鉴定,得到2 692 bp和约500 bp的片段(图2);转化该质粒的DH5 α 菌液经PCR鉴定可检测到约500 bp的基因片段(图3),序列测定表明扩增获得489 bp的IL-15全长基因,可编码162个氨基酸残基,与GenBank公布的牛IL-15基因(NM_174090)相似性为100%。



M:DNA Marker DL2000;1~7:53~60℃不同温度梯度下PCR产物;
8:阴性对照

图1 牛IL-15全长基因的PCR产物

Fig. 1 PCR products of the full-length bovine IL-15 gene

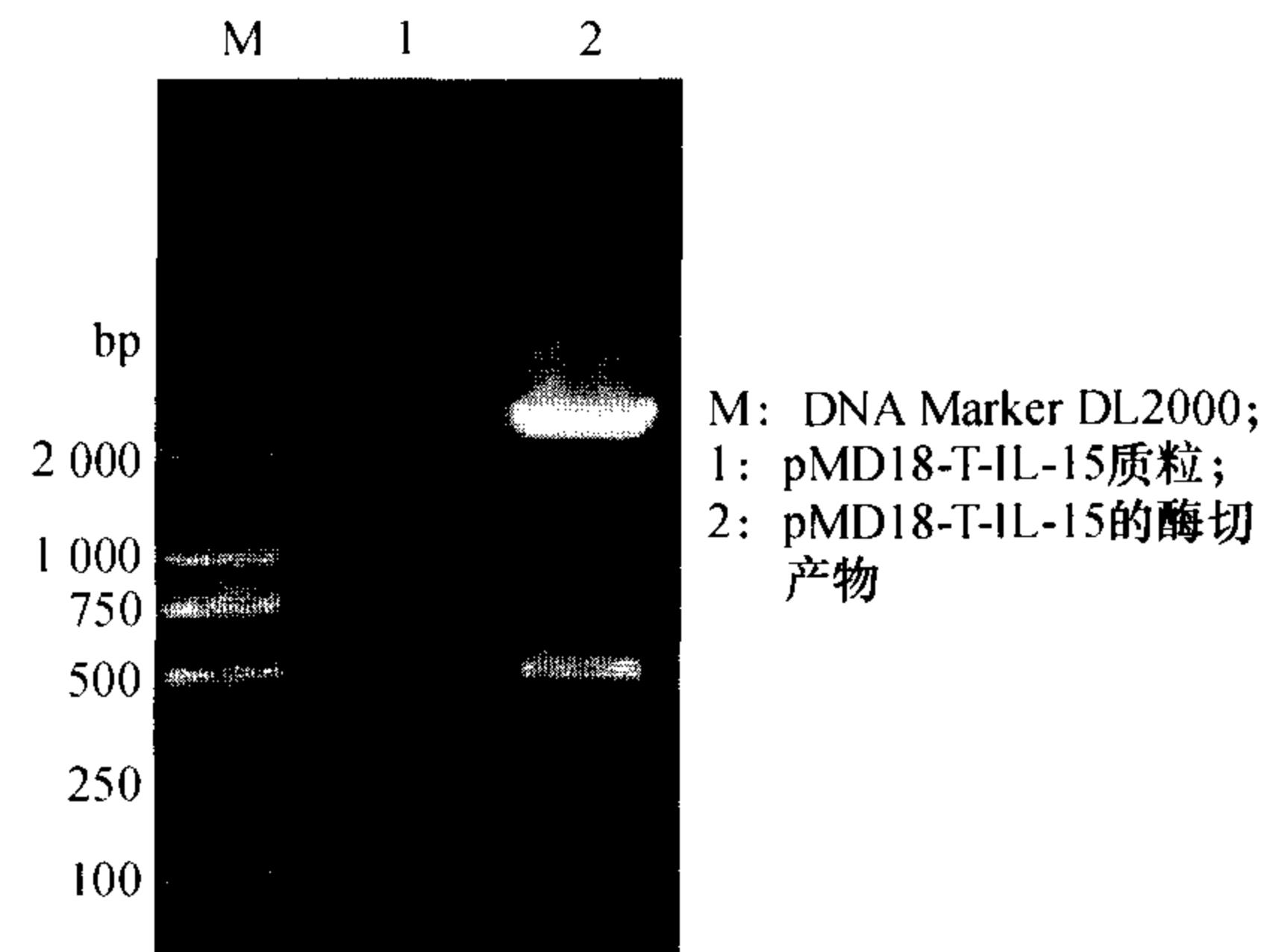


图2 重组质粒pMD18-T-IL-15的Bam H I、Xho I双酶切鉴定
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-IL-15 by digestion with Bam H I, Xho I

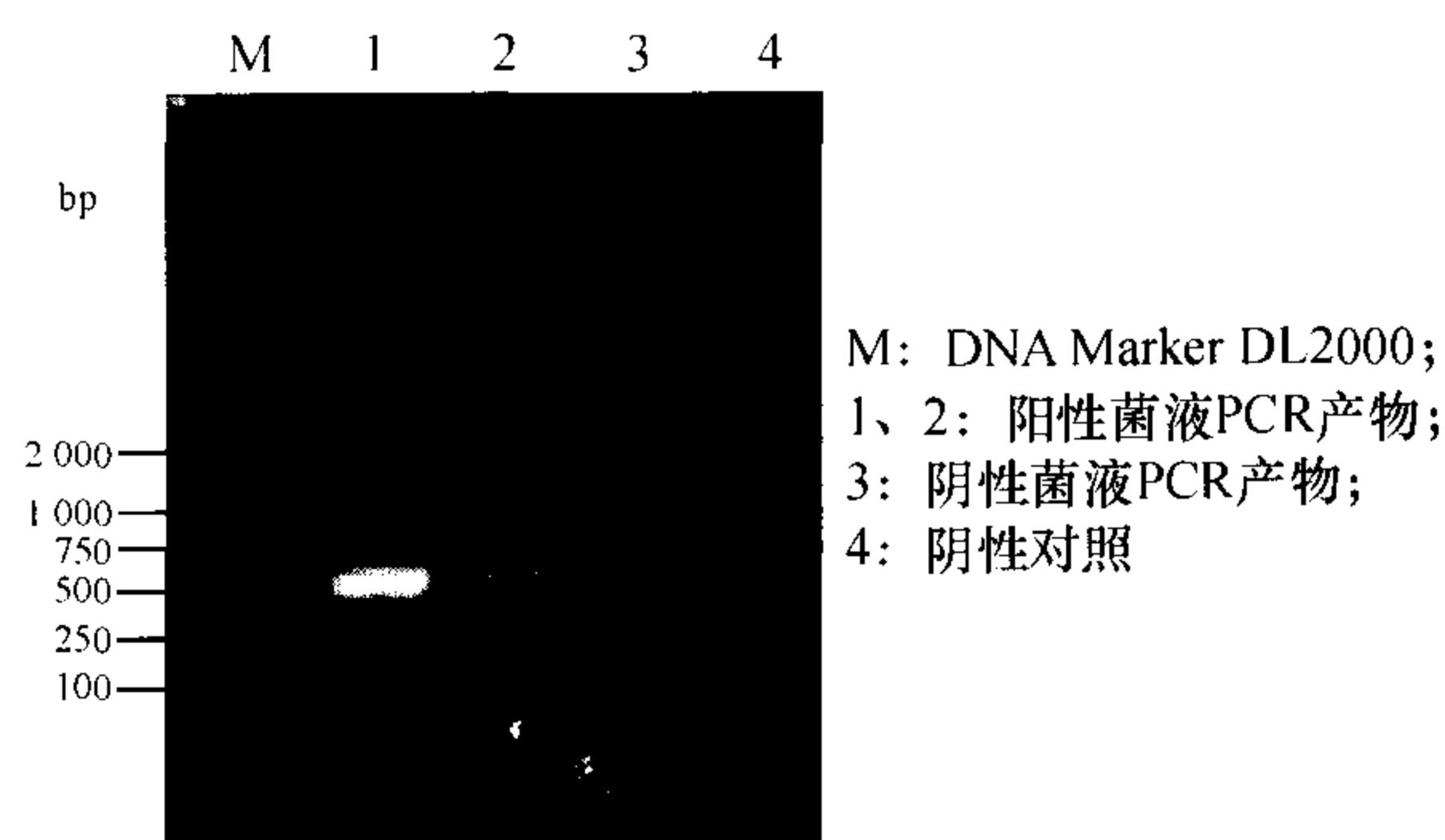


图3 pMD18-T-IL-15 /DH5 α 的菌液PCR产物
Fig. 3 The PCR product of pMD18-T-IL-15 /DH5 α

2.2 原核表达载体pET-IL-15的构建

以pMD18-T-IL-15重组质粒为模板,扩增截去pIL-15基因N端48aa信号肽的基因片段,得到约360 bp的电泳条带(图4)。pET-IL-15重组质粒经Bam H I、Xho I双酶切鉴定,得到5 900 bp和约360 bp的片段(图5);转化该质粒的DH5 α 菌液经PCR鉴定可检测到约360 bp的基因片段,序列测定表明获得约360 bp的IL-15成熟肽基因克隆。

鉴定正确的重组表达质粒pET-IL-15转化大肠杆菌BL21,随机挑取单个菌落用液体LB振摇培养,菌液PCR鉴定可见约360 bp处出现特异条带。

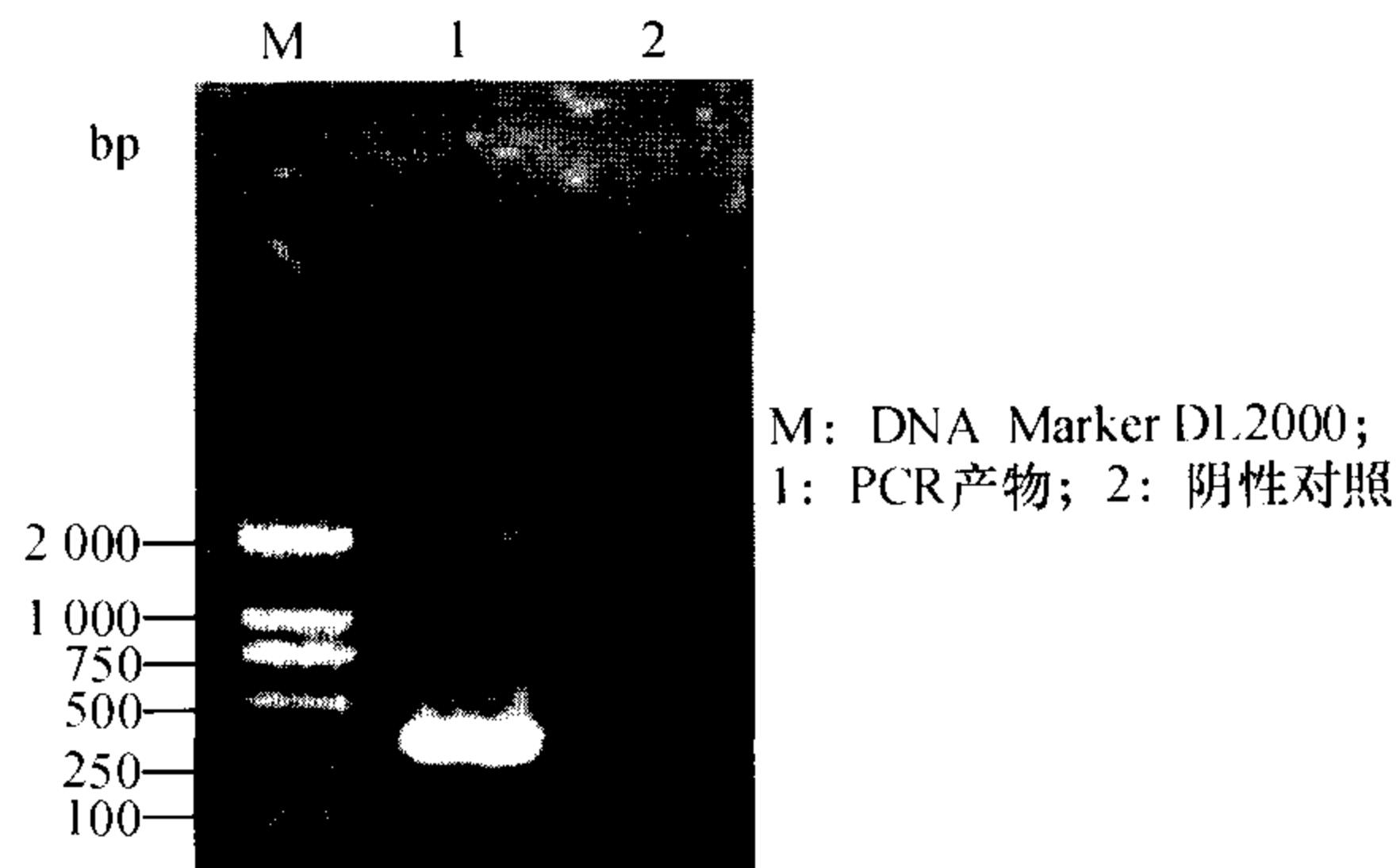


图4 牛IL-15成熟蛋白基因PCR产物

Fig. 4 PCR product of mature bovine IL-15

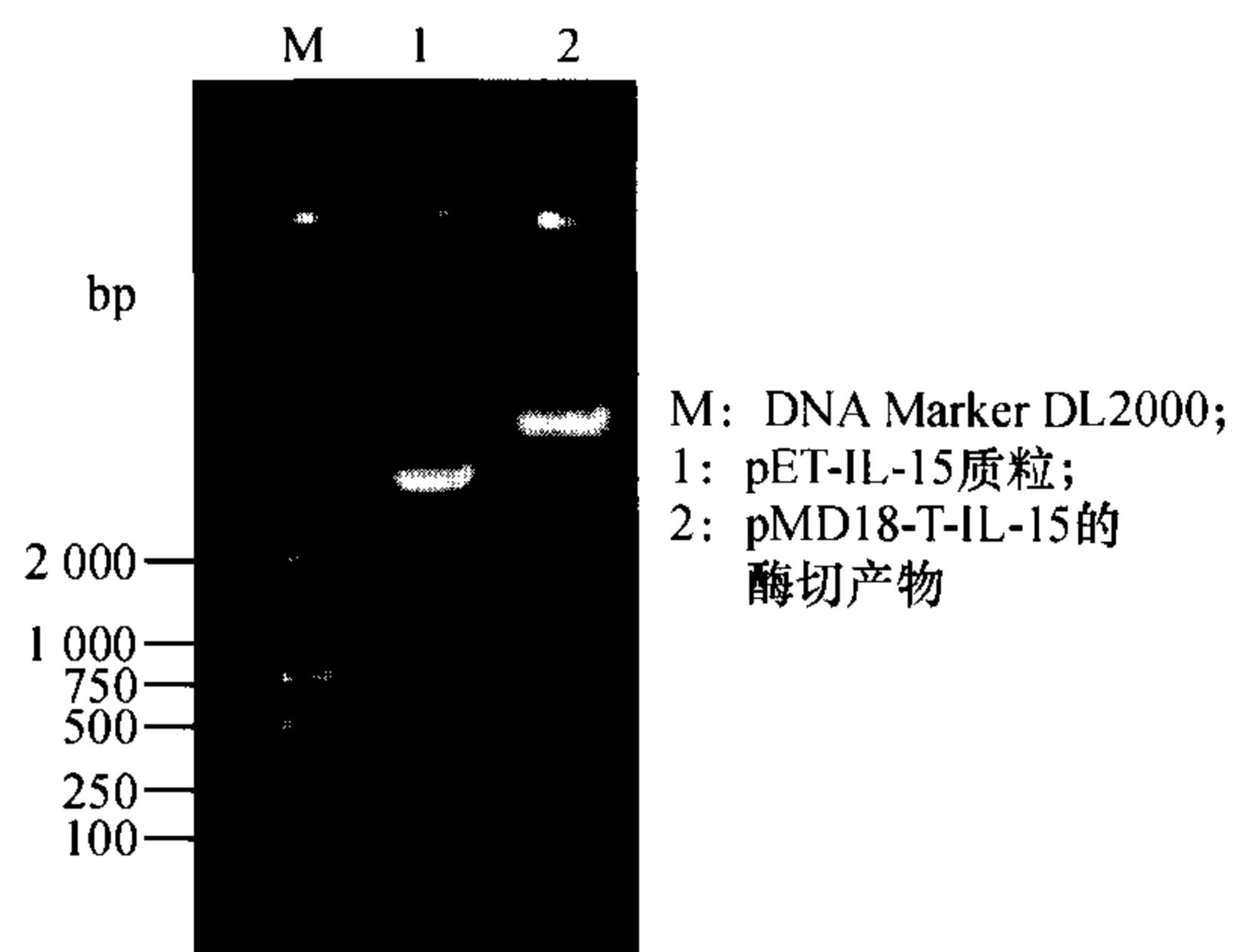


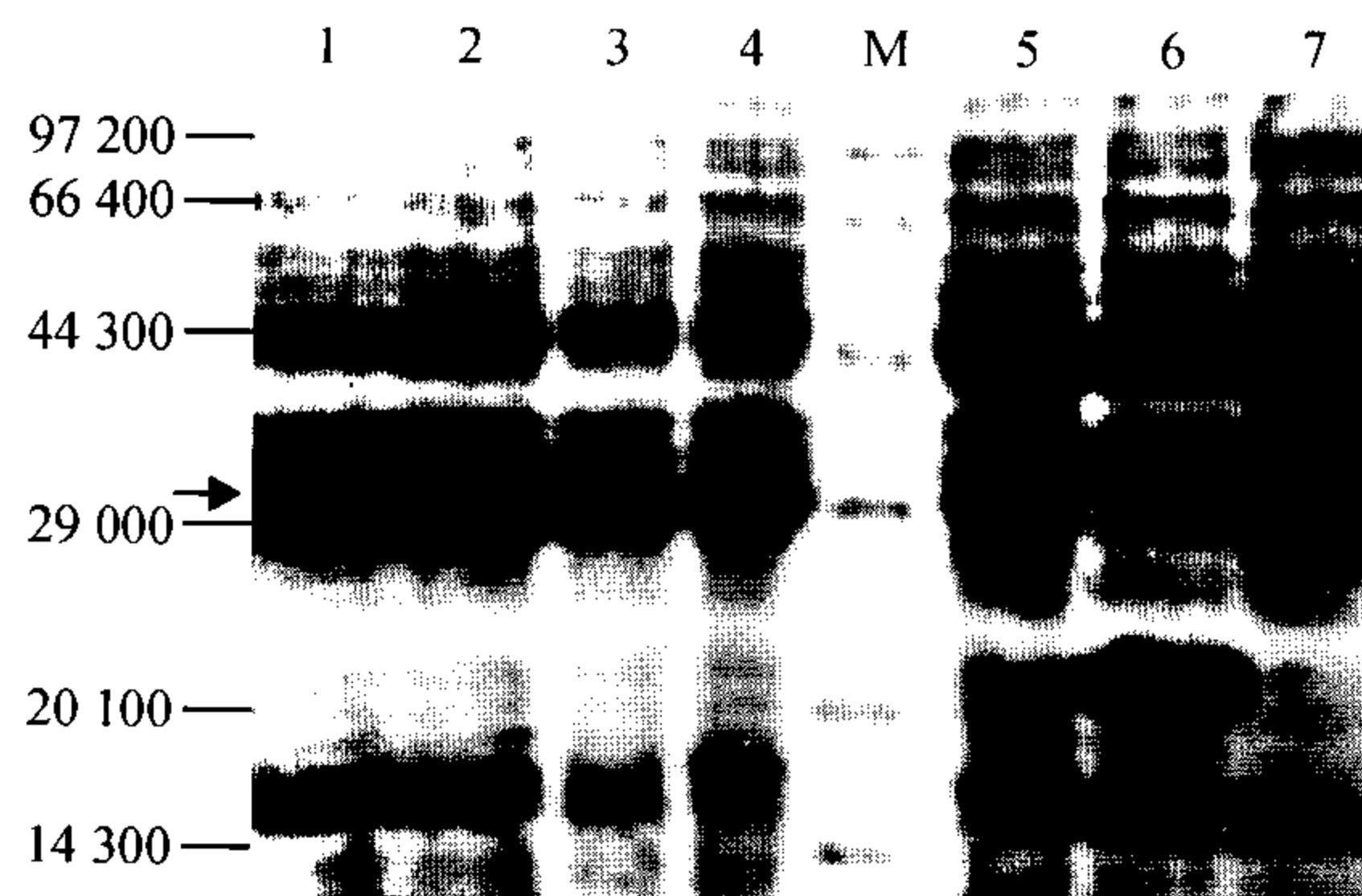
图5 重组质粒 pET-IL-15 的 *Bam* H I 、*Xho* I 双酶切鉴定
Fig. 5 Identification of recombinant plasmid pET-IL-15 by digestion with *Bam* H I , *Xho* I

2.3 重组蛋白的诱导表达

SDS-PAGE 电泳分析表明,在相对分子质量约 33 000 处出现 1 条新的蛋白条带,与预期融合蛋白的相对分子质量的理论值相符,而对照无此条带。设定的各个 IPTG 诱导浓度和诱导时间均有融合蛋白表达,IPTG 诱导浓度为 1 mmol/L,诱导 4 h 后表达量达到高峰(图 6、图 7)。

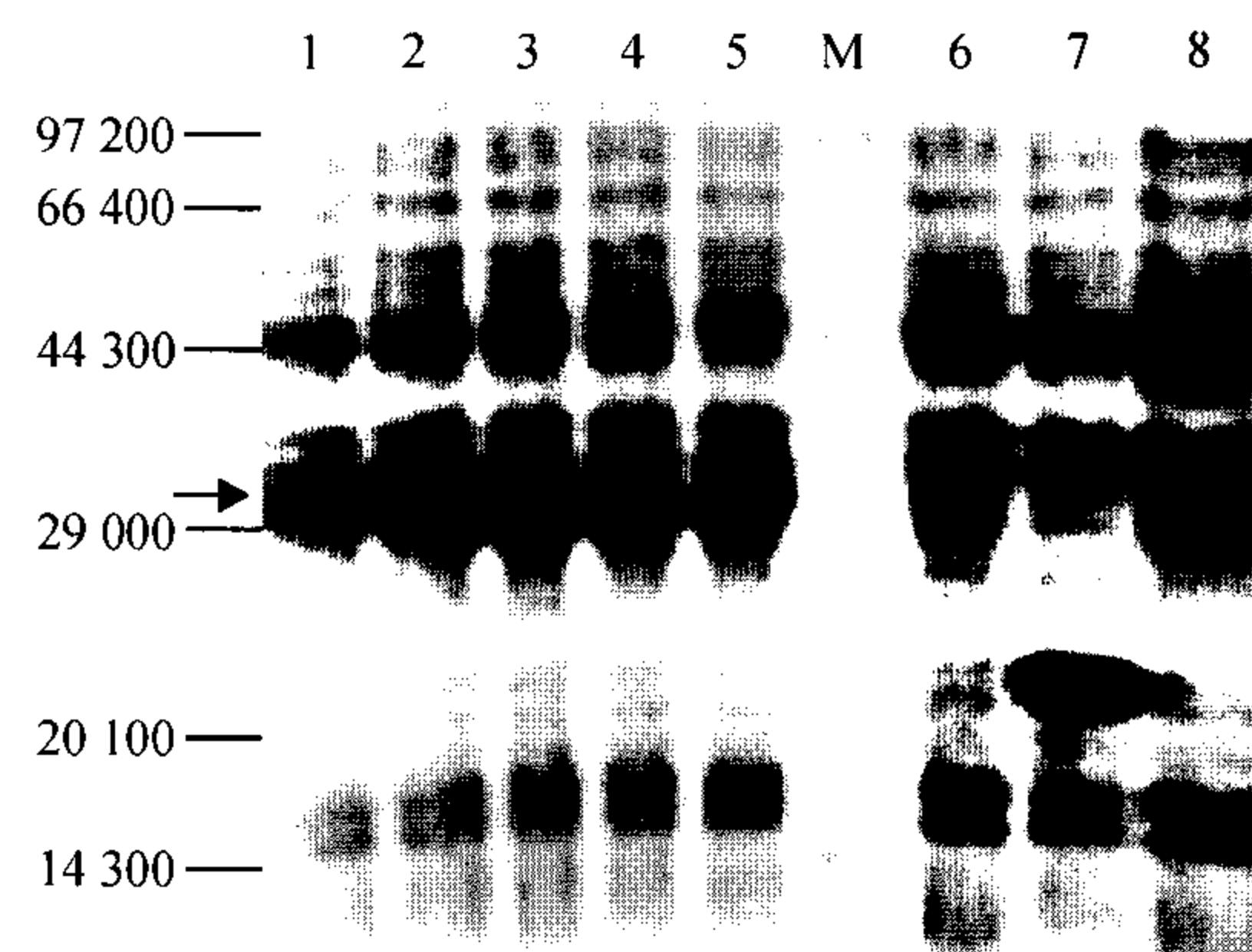
2.4 包涵体的溶解、纯化及 Western-blot 分析

收集诱导表达的菌液,超声破碎菌体,离心后分别收集上清液和沉淀,进行 SDS-PAGE,结果证明表达产物主要以包涵体形式存在(图 8)。用亲和层析法纯化的表达蛋白进行 SDS-PAGE,在相对分子质量约 33 000 处出现清晰的蛋白条带,表明表达产物的纯化良好。纯化产物和包涵体与抗 6 × His 单抗及猪 IL-15 的多抗进行 Western-blot 分析,可见在相对分子质量约 33 000 处出现明显的棕色印迹,与 SDS-PAGE 的特异条带一致。pET32a/BL21 (DE3) 相应位置未见颜色反应条带(图 9)。



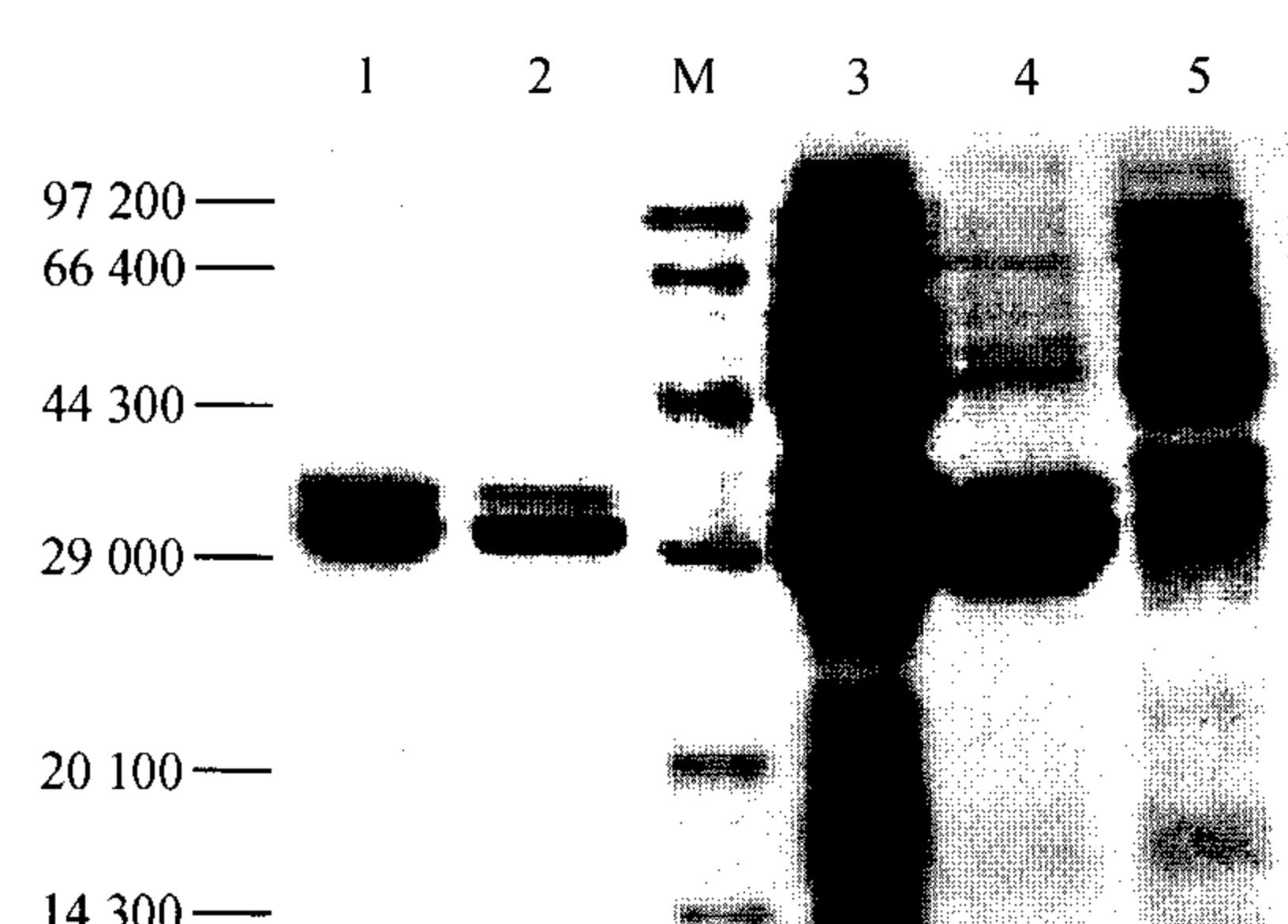
M:低相对分子质量蛋白质标准;1~4:pET-IL-15/BL21 分别经 0.5、1.0,1.5,2.0 mmol/L IPTG 诱导后的菌体蛋白;5:pET-IL-15/BL21 未经 IPTG 诱导的菌体蛋白;6:pET-32a /BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导的菌体蛋白;7:BL21 经 IPTG 诱导的菌体蛋白

图6 IPTG 不同诱导浓度表达产物的 SDS-PAGE
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of expressed recombinant protein induced by IPTG at different concentrations



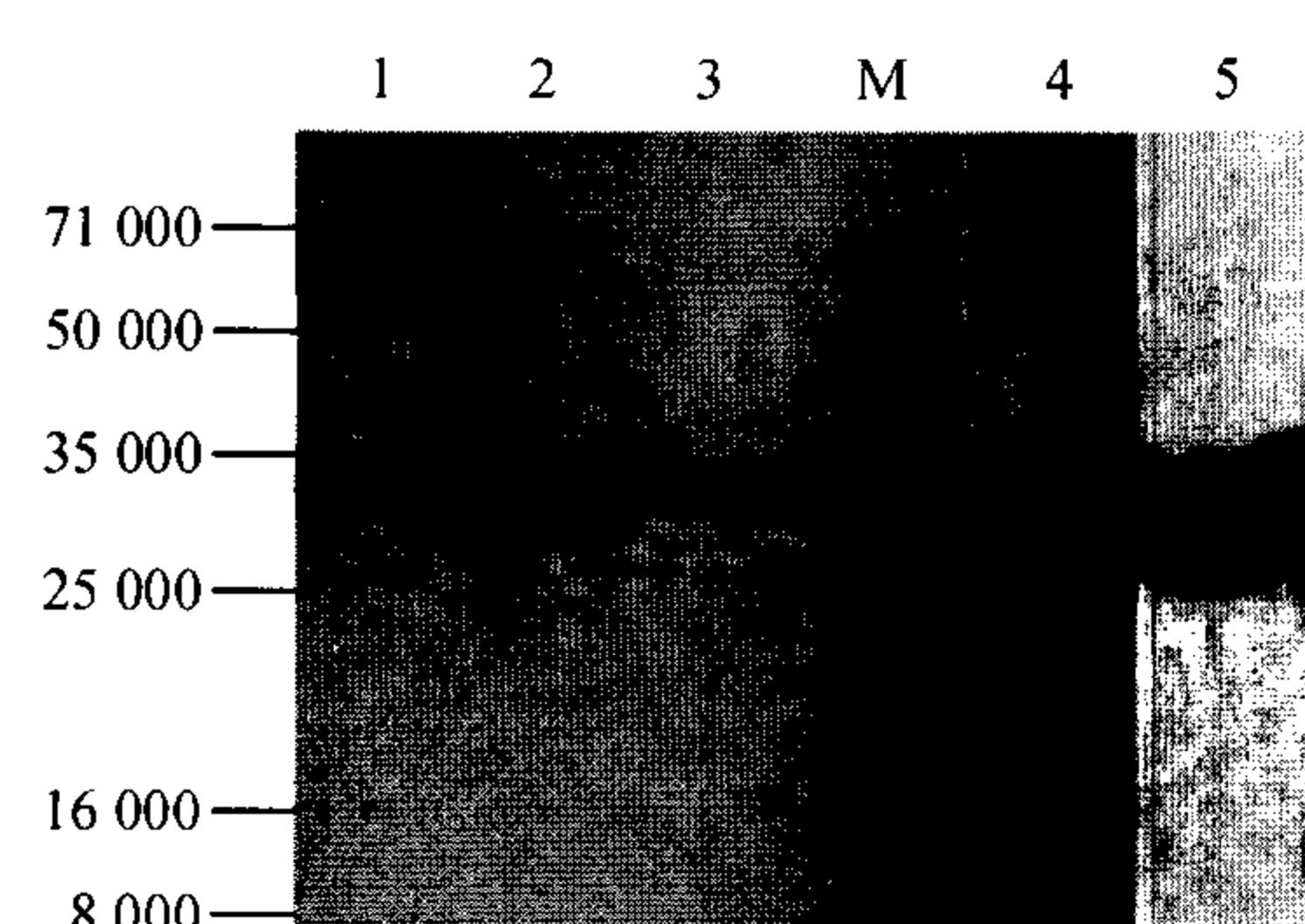
M:低相对分子质量蛋白质标准;1~5:pET-IL-15 BL21 分别经 IPTG 诱导 1,2,4,6,8 h 后的菌体蛋白;6:pET-IL-15/BL21 未经 IPTG 诱导的菌体蛋白;7:pET-32a /BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导的菌体蛋白;8:BL21 经 IPTG 诱导的菌体蛋白

图7 IPTG 不同诱导时间表达产物的 SDS-PAGE
Fig. 7 SDS-PAGE analysis of expressed recombinant protein induced by IPTG for different time periods



M:低相对分子质量蛋白质标准;1~2:纯化蛋白;3:pET-IL-15/BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导的菌体蛋白;4:包涵体;5:上清液

图8 表达蛋白的可溶性分析及纯化蛋白的 SDS-PAGE
Fig. 8 Dissolvability analysis of the expressed protein and SDS-PAGE of purified protein



M:低相对分子质量蛋白质标准;1~3:纯化蛋白与 6 × His 单抗反应结果;4:包涵体与 6 × His 单抗反应结果;5:纯化蛋白与猪抗鼠 IL-15 多抗反应结果

图9 重组蛋白 Western-blot 分析
Fig. 9 The Western-blot analysis of the recombinant bovine IL-15

3 讨论

IL-15 的 mRNA 广泛分布于心、肺、肾、胎盘、骨骼肌，并且单核 - 巨噬细胞、树突状细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞也有不同程度的 IL-15 mRNA 表达。当巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞 (DC) 受到 IFN- γ 、脂多糖 (LPS) 和细菌、寄生虫及病毒感染刺激时，表达的 IL-15 可以进一步被上调，从而发挥更强的生物学作用^[8-9]。

本研究用 ConA 和 LPS 刺激奶牛外周血单个核细胞，提取含牛 IL-15 的 mRNA，经 RT-PCR 扩增获得牛 IL-15 的全长基因。

在对牛 IL-15 全基因序列进行表达的研究中，笔者几经努力均未成功。分析牛 IL-15 全长基因未能表达的原因，可能是前体蛋白基因序列的长信号肽有负调控作用。对人 IL-15 研究发现，长信号肽是不利于 IL-15 蛋白分泌的主要因素^[10]，对猪 IL-15 研究也发现，只有去除长信号肽，猪 IL-15 才能在大肠杆菌中表达。笔者借鉴以上成功表达的经验，通过软件分析，参照人 IL-15 成熟肽基因序列，确定了牛 IL-15 成熟蛋白基因，它编码 114 个氨基酸，编码蛋白大小在相对分子质量 13 000 ~ 14 000。用 PCR 方法获得缺失 N 端 48 个氨基酸的信号肽序列的成熟牛 IL-15 蛋白基因，结果在大肠杆菌中成功表达。从纯化产物的 SDS-PAGE 及纯化产物、包涵体的 Western-blot 结果来看，有 2 条带与抗 6 × His 的单抗反应，它们的相对分子质量很接近，在包涵体进行 SDS-PAGE、Western-blot 加样量大时，2 条带不能分开。出现 2 条带的原因可能是由于 IL-15 成熟蛋白表达中意外中止或水解所致，具体原因有待进一步研究。由于没有抗牛 IL-15 的多抗，而牛与猪 IL-15 的蛋白序列同源性为 84.6%^[6]，所以将纯化的牛 IL-15 成熟蛋白与抗猪 IL-15 的多抗作用，结果反应强烈，说明牛与猪的 IL-15 抗原性很接近，其生物学活性是否跨越种属特异性值得探讨。

由于 IL-15 具多种免疫调节功能，其在抗感染免疫应答中的作用目前越来越受到重视。有证据证实 IL-15 参与不同的微生物包括牛分枝菌、大肠埃希菌、李斯特菌、霍乱沙门菌、结核分枝杆菌、HIV、人疱疹病毒 6、7，丙肝病毒等的抗感染免疫^[2,11]。

在人医领域，国外已经有重组 IL-15 制剂上市，用于临床基因治疗及基础研究。所以开发牛重组 IL-

15 生物制剂用于牛分枝菌、布鲁菌等病原体的防御是完全可行的。

笔者成功地进行了牛 IL-15 的原核表达，为进一步研究牛 IL-15 的结构和生物学活性、研制开发针对牛分枝菌、布鲁菌等病原体的免疫佐剂等方面打下基础。

参考文献：

- [1] SATO N, PATEL H J, WALDMANN T A, et al. The IL-15/IL-15R on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(2): 588-593.
- [2] YOSHIKAI Y, NISHIMURA H. The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections [J]. Microbes and Infect, 2000, 2(4): 381-389.
- [3] 余汉卿, 曹兰芳. 白细胞介素-15 与细胞内病原体感染的关系研究 [J]. 临床儿科杂志, 2005, 23(6): 409-411.
- [4] 董学东, 朱元祺, 姜岩. 人 IL-15 成熟肽的原核表达 [J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(5): 588-590.
- [5] 独军政, 刘胜旺. 鸡 IL-15 的基因克隆与序列分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(2): 105-110.
- [6] CANALS A, GRIMM D R, GASBARRE L C, et al. Molecular cloning of cDNA encoding porcine interleukin-15 [J]. Gene, 1997, 195(2): 337-339.
- [7] DEAN G A, BARGER A, LAVOY A. Cloning and expression of feline interleukin 15 [J]. Cytokine, 2005, 29: 77-83.
- [8] DOHERTY T M, SEDER R A, SHER A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages [J]. J Immunol, 1996, 156(2): 735-741.
- [9] MATTEI F, SCHIAVONI G, BELARDELLI F, et al. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation [J]. J Immunol, 2001, 167(3): 1179-1187.
- [10] BAMFORD R N, DE FILIPPIS A P, AZIMI N, et al. The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxylter minus of IL-15 participate in its multifaceted translational control [J]. Immunol, 1998, 160(9): 4418-4426.
- [11] DENIS J, PETER A, KOICHI U, et al. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection [J]. J Immunol, 1997, 158(2): 800-806.

【责任编辑 柴焰】