

# 鸡 IL-18 cDNA 的克隆及在大肠杆菌中的高效表达

胡敬东, 崔治中, 赵宏坤\*

(山东农业大学山东省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 泰安 271018)

**摘要:** 运用 RT-PCR 方法, 从经脂多糖 (LPS) 诱导的鸡马立克氏病成淋巴细胞样细胞系 MDCC-MSB1 总 RNA 中扩增得到了鸡白细胞介素 18 (Chicken interleukin 18, ChIL-18) 成熟蛋白基因的 cDNA, 并将其克隆到 pMD18-T 载体上。DNA 序列测定表明, 克隆得到的 ChIL-18 cDNA 与国外报道的完全一致, 包括终止密码子在内其编码区的长度为 510bp, 编码 169 个氨基酸残基的蛋白质。将 ChIL-18 成熟肽段编码区定向克隆到原核表达载体 pGEX-6P-1 中谷胱甘肽转移酶 (GST) 基因的下游, 构建成原核表达质粒 pGEX-ChIL18。该质粒的 BL21( DE3) LysS 转化菌在 IPTG 的诱导下可高效表达 GST-ChIL18 基因融合蛋白, 表达量约占菌体总蛋白的 32%。

**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: S852.4; Q786

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)03-0264-05

白细胞介素 18 (IL-18) 又称 IFN- $\gamma$  诱导因子 (interferon  $\gamma$ -inducing factor, IGIF), 是近年发现的一种主要由活化的巨噬细胞和肝脏枯否细胞 (Kupffer) 产生的多功能细胞因子<sup>[1]</sup>。除了能够明显诱导 Th1、NK、NKT 细胞产生 IFN- $\gamma$  外<sup>[2]</sup>, IL-18 还可诱导诸如 IL-2、GM-CSF 及 TNF- $\alpha$  等其它多种细胞因子的产生, 增强 NK 细胞和 CTL 细胞的活性, 上调细胞毒作用, 促进 T 细胞增殖<sup>[1,3,4]</sup>, 在诱导 Th1 细胞的分化成熟过程和 Th1 细胞为主的细胞免疫反应中具有促进和调节作用。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应用前景, 极具开发新型免疫佐剂和免疫增强剂的潜力, 所以自发现以来就一直受到各国研究人员的格外关注。ChIL-18 基因是 Schneider 等<sup>[5]</sup>于 2000 年才首次报道的, 而国内的相关研究也已起步<sup>[6,7]</sup>。

本研究根据国外已发表的 ChIL-18 的 cDNA 序列, 设计合成其成熟蛋白基因引物, 以 MSB1 细胞 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高效表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

MDCC-MSB1 细胞、pGEX-6P-1 载体、宿主菌大肠杆菌 TG1 和 BL21( DE3) LysS, 由山东省畜禽疫病防治工程技术研究中心实验室保存; 各种限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、质粒载体 pMD18-T、RT-PCR 试剂盒、DNA Marker DL2000 IPTG 均购自 TaKaRa 公司; LPS、FCS、DMEM 购自 Sigma 公司; RNA 提取试剂盒购自 Promega 公司; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司; SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质购自上海升正公司; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 按文献[5]设计如下 2 条引物用于扩增 ChIL-18 成熟蛋白的 cDNA 片段。上游引物 P<sub>1</sub>: 5'-CGC GAATTC GCC TTTT GTA-AGGATAAAACT-3'; 下游引物 P<sub>2</sub>: 3'-CCC GTCGAC TCA TAG GTT GTGCCTTTCATT-3'。上下游引物的 5' 端分别引入了 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点 (划线部分), 以利于此后亚克隆。

1.2.2 ChIL-18 cDNA 的 RT-PCR 在按常规方法培养的 MSB1 细胞中加入终浓度为 5  $\mu$ g/mL 的 LPS, 置于 40  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下诱导活化 10h 后, 收集 MSB1 细胞培养物, 按照 Promega 公司 Total RNA Isolation System 使用说明提取细胞的总 RNA。然后参照 TaKaRa 公司 RNAPCRkit (AMV) Ver2.1 的使用说明对所提取的总 RNA 进行反转录, 最后以反转录产物为模板, P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为引

收稿日期: 2004-02-23

作者简介: 胡敬东 (1968), 男, 山东泰安人, 讲师, 博士, 主要从事动物传染病学与分子免疫学研究。Tel: 0538-8249937, E-mail: hjd1968@163.com

\* 通讯作者: Tel: 0538-8241900, E-mail: hk.zhao@sdau.edu.cn

物进行 PCR 扩增。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 30s, 52 °C 45s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增结束后取 5  $\mu$ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳观察。

**1.2.3 ChIL-18 cDNA 克隆及序列分析** 以 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收上述约 0.5kb 的 PCR 产物。将回收的 DNA 片段按说明书方法与 pMD18-T 载体相连, 得到含 ChIL-18 cDNA 的重组质粒 pT ChIL18, 将其送至上海生工公司进行序列测定。

**1.2.4 ChIL-18 重组表达质粒的构建与测序** 将 pT ChIL18 与原核表达载体 pGEX-6P-1 分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后, 电泳、分离、回收, 按常规方法连接、转化宿主菌 BL21<sup>[8]</sup>。通过氨苄青霉素抗性及其利用限制性内切酶进行筛选和鉴定。将所得阳性克隆 pGEX-ChIL18 送交上海生工公司进行序列测定, 以验证其阅读框架。

**1.2.5 pGEX-ChIL18 在大肠杆菌中的诱导表达及表达条件的优化** 将 pGEX-ChIL18 阳性质粒转化 BL21 感受态细胞, 随机挑取分隔良好的单个菌落, 按文献[9]的方法对其进行诱导表达以及包涵体的分离。同时分别用不同的诱导时间与不同的 IPTG 浓度进行条件的优化。

**1.2.6 重组菌菌体的裂解** 取步骤 1.2.5 中诱导后的细菌菌液 1 mL, 10 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 重悬于 250  $\mu$ L 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS, 加等体积的 2 $\times$  SDS 凝胶上样缓冲液, 煮沸裂解 5 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清备用。

**1.2.7 重组菌菌体裂解物的凝胶电泳** 按常规方法制备 12% 的分离胶和 5% 的积层胶, 将处理好的上清样品取 20  $\mu$ L, 采用 Bio-RAD 公司的 Mini-PROTEAN II Electrophoresis cell 电泳装置, 120V, 2 h。电泳结束后, 取下凝胶, 经考马斯亮兰 R<sub>250</sub> 染色, 甲醇-冰乙酸脱色液脱色, 最后通过薄层层析扫描, 确定蛋白质的表达量。

## 2 结果

### 2.1 ChIL-18 cDNA 的 RT-PCR

从 LPS 活化 10 h 的 MDCC-MSB1 细胞系中提取细胞总 RNA 后, 利用 RT-PCR 方法扩增得到略大于 500bp、与预计大小相一致的目的 DNA 片段 (见图 1)。

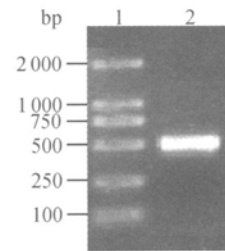


图 1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig 1 Electrophoresis of RT-PCR product

1. DL-2 000 分子量对照; 2. RT-PCR 产物  
1. DNA Marker DL2 000; 2. Product of RT-PCR

### 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 pMD18-T 载体中, 得到含 ChIL-18 cDNA 的重组质粒 pT ChIL18。酶切分析及 PCR 扩增鉴定表明克隆正确。序列分析表明, 本试验所克隆到的 ChIL-18 cDNA 与国外报道<sup>[5]</sup>的完全一致, 包括终止密码子在内其编码区的长度为 510bp, 编码 169 个氨基酸残基的蛋白质。

### 2.3 ChIL-18 重组表达质粒的鉴定

少量制备所获质粒 pGEX-ChIL18 经 *EcoR* I / *Sal* I 双酶切及 PCR 扩增, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳显示, PCR 扩增产物及酶切插入片段长约 510bp, 均符合目的基因分子量。重组质粒测序结果证实, 我们已将编码 ChIL-18 成熟蛋白的全长基因完全正确地插入到原核表达载体的目的位点 (见图 2、3)。

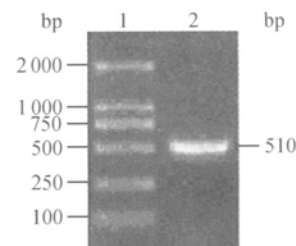


图 2 重组原核表达质粒 pGEX-ChIL18 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR analysis of recombinant plasmid pGEX-ChIL18

1. DL-2 000 分子量对照; 2. 重组质粒 pGEX-ChIL18 为模板的 PCR 结果

1. DNA Marker DL2 000; 2. PCR product of pGEX-ChIL18

### 2.4 ChIL-18 融合蛋白的诱导表达

pGEX-ChIL18 转化 BL21 阳性菌经 IPTG 诱导表达, 12% 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 44ku 的特有的表达蛋白条带, 与预期大小的融合蛋白一致。

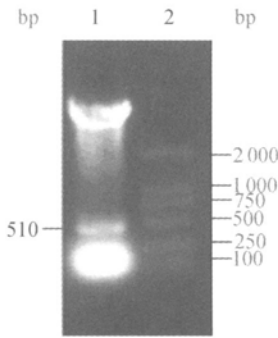


图3 重组原核表达质粒 pGEX-ChIL18 的 *EcoRI* / *SalI* 双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid digested by *EcoRI* / *SalI*

- 1. *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切 pGEX-ChIL18;
- 2. DL-2000 分子量对照
- 1. pGEX-ChIL18 digested with *EcoRI* and *SalI* ;
- 2. DNA Marker DL2 000

而非重组的 pGEX-6P-1 质粒菌诱导培养物样品中, 在与理论值一致的 26ku 处出现明显条带(见图 4)。

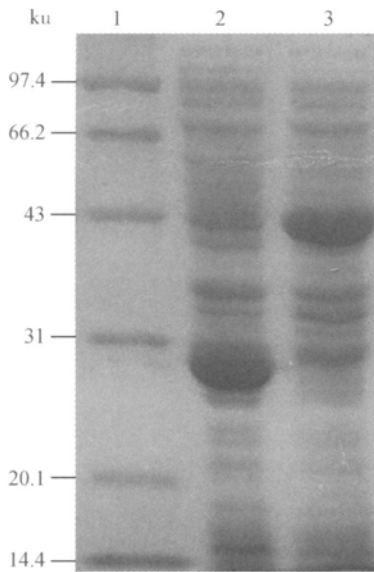


图4 重组菌菌体裂解物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE Analysis of the *E. coli* BL21

lysates containing the GST fusion protein

- 1. 低分子量标准蛋白质;
- 2. IPTG 诱导的 pGEX-6P-1 质粒菌裂解物, 在分子量为 26ku 处有 GST 蛋白条带;
- 3. IPTG 诱导的重组菌菌体裂解物, 在分子量为 44ku 处有 GST-ChIL18 的融合蛋白条带
- 1. Low MW standard protein Marker;
- 2. Host with IPTG-induced pGEX-6P-1;
- 3. Host with IPTG-induced pGEX-ChIL18

2.4.1 不同诱导时间重组菌的表达 挑取单个菌落接种于 1 mL 2 × YT 培养基(含 100 μg/mL Amp), 37 °C 振荡培养过夜至饱和, 按 1% 体积转种另一管, 37 °C 振荡培养至菌液 OD<sub>600</sub> 值为 0.4, 加 IPTG 至终浓度为 0.6 mmol/L, 200 r/min 继续培养, 分别于诱导 1 2 3 4 5 6 h 取样收集菌体, 以空载体菌为对照做 SDS-PAGE 分析, 发现表达量随时间延长而递增, 至 4 h 达到最高, 4 h 后表达量开始递减, 蛋白分子量大小符合(见图 5)。

2.4.2 不同 IPTG 浓度的诱导表达 挑取单个菌落接种于 1 mL 2 × YT 培养基(含 100 μg/mL Amp)中, 37 °C 振荡培养过夜至饱和, 按 1% 体积转种另一管, 37 °C 振荡培养至菌液 OD<sub>600</sub> 值为 0.4, 按 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 mmol/L 浓度梯度分别加入 IPTG, 200 r/min 继续培养 4 h, 离心收集菌体, 以空载体为对照做 SDS-PAGE 分析, 结果表明不同浓度的 IPTG 有着几乎相同的诱导效果, 但以 0.2 mmol/L 终浓度的表达量稍高。凝胶薄层灰度扫描分析显示, 其融合蛋白的表达量约占菌体总蛋白量的 32%(见图 6)。

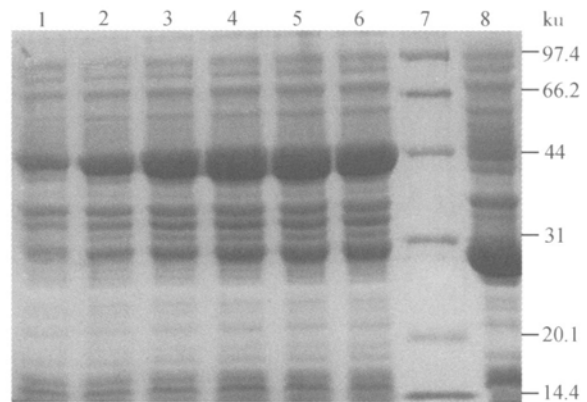


图5 不同诱导时间的表达情况

Fig. 5 Results of expression in different induction time

- 1. 诱导 1 h; 2. 诱导 2 h; 3. 诱导 3 h; 4. 诱导 4 h;
- 5. 诱导 5 h; 6. 诱导 6 h; 7. 低分子量标准蛋白质;
- 8. 空载体对照
- 1. Induced 1 h; 2. Induced 2 h; 3. Induced 3 h;
- 4. Induced 4 h; 5. Induced 5 h; 6. Induced 6 h;
- 7. Low MW standard protein Marker;
- 8. Control of hollow vector

### 3 讨论

1995 年, 日本学者 Okamura 等从痤疮丙酸杆菌(*P. acnes*)致敏后又注射脂多糖(LPS)的小鼠肝

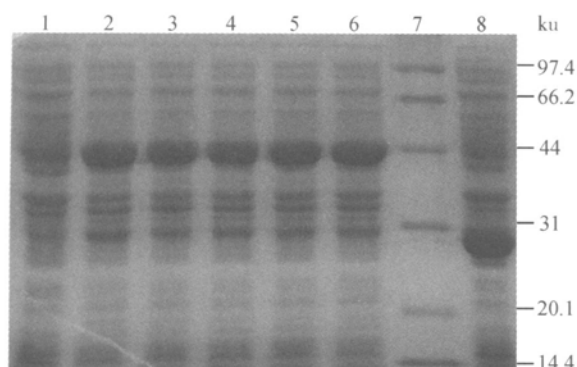


图 6 不同 IPTG 终浓度的诱导结果

Fig. 6 Results of expression induced at different IPTG final concentration

1. 0 mmol/L; 2. 0.2 mmol/L; 3. 0.4 mmol/L;
4. 0.6 mmol/L; 5. 0.8 mmol/L; 6. 1.0 mmol/L;
7. 低分子量标准蛋白质  
Low MW standard protein Marker;
8. 空载体对照 Control of hollow vector

脏 cDNA 文库中筛选并克隆到一种多肽因子, 由于它能够诱导 Th1 类细胞产生 IFN- $\gamma$ , 故被命名为  $\gamma$ -干扰素诱导因子(IGIF)<sup>[11]</sup>。1996 年 Ushio 等以鼠 IGIF (m IGIF) 为探针克隆了人类 IGIF 的 cDNA 并在 *E. coli* 中表达, 因其氨基酸序列与已知数据库中的任何蛋白均不同, 而且除了诱导 IFN- $\gamma$  外, 发现它还具有其他多种生物学活性, 因此又重新命名为 IL-18<sup>[10]</sup>。

IL-18 虽在结构上与 IL-1 $\beta$  相似, 但在功能上更接近于 IL-12<sup>[11]</sup>。其前体在 IL-1 $\beta$  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<sup>[12]</sup>。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 pGEX-6P-1 中, 经测序鉴定正确后在大肠杆菌 BL21 中进行了高效表达, 为进一步研究有关重组 ChIL-18 的生物学特性及其临床应用打下了基础。

在克隆过程中, 我们曾试图通过应用 RT-PCR 方法从经刀豆蛋白 A (ConA) 诱导的 SPF 鸡外周血单个核细胞(PBMCs)总 RNA 中扩增得到 ChIL-18 基因的 cDNA, 但未获成功, 是否鸡的 PBMC 不能产生 IL-18? 对于这一问题, 尚待进一步验证。国内目前已经报道的方法均是来源于分离、培养并诱导活化的鸡脾脏淋巴细胞, 且有基因变异发生<sup>[6]</sup>, 而

本试验所采取的克隆策略较之则更为行之有效, 操作简便, 同时也为克隆鸡的其它重要细胞因子基因提供了一种可以借鉴的方法。

#### 参考文献:

- [1] Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells[J]. *Nature*, 1995, 378: 88~ 91.
- [2] Sugawara I. Interleukin 18(IL-18) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens[J]. *Microbes Infect*, 2000, 2(10): 1257~ 1263.
- [3] Golab J. Interleukin 18-interferon gamma inducing factor-a novel player in tumor immunotherapy? [J]. *Cytokine*, 2000, 12(4): 332~ 338.
- [4] Micallef M J, Ohtsuki K, Kohno F, et al. Interferon gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: Synergism with interleukin 12 for interferon gamma production [J]. *European Journal of Immunology*, 1996, 26(7): 1647~ 1651.
- [5] Schneider K, Puehler F, Baeuble D, et al. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin 18[J]. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2000, 20: 879~ 883.
- [6] 潘蔚琦, 刘胜旺, 孔宪刚, 等. 编码鸡 IL-18 成熟蛋白基因的分子克隆与序列测定[J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(2): 114~ 117.
- [7] 温纳相, 黄青云, 陈金顶, 等. 鸡 IL-18 基因克隆与序列测定[J]. *动物医学进展*, 2003, 24(2): 64~ 66.
- [8] 奥斯伯 F. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 译. 北京: 科学出版社, 1998. 625~ 626.
- [9] Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Ushio S, Namba M, Okura T, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein[J]. *Journal of Immunology*. 1996. 156(11): 4274~ 4279.
- [11] 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.
- [12] Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, et al. Activation of interferon  $\gamma$  inducing factor mediated by interleukin 1 $\beta$  con-

verting enzyme[J]. Science, 1997, 275(5297): 206~ 209.

### **Cloning of Chicken Interleukin-18 Mature Protein Gene and Its High Expression in *E. coli***

HU Jing-dong, CUI Zhi-zhong, ZHAO Hong-kun\*

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University,  
Tai'an 271018, China)

**Abstract:** Chicken interleukin-18 (ChIL-18) mature protein gene was amplified from LPS-stimulated MD-CC-MSB1 cells by RT-PCR. PCR product was cloned into the pMD18-T vector. Sequencing analysis showed that the nucleotide sequence of this ChIL-18 mature protein gene was 510bp including the stop codon and the same as the published ChIL-18 cDNA sequence by Schneider K. A prokaryotic expression plasmid of ChIL-18, pGEX-ChIL18, was obtained by subcloning the encoding region of the ChIL-18 mature peptide into pGEX-6P-1. The recombinant ChIL-18 (rChIL-18) was expressed efficiently in pGEX-ChIL18-transformed BL21(DE3) LysS induced by IPTG, the yield was accounted for 32% of the total bacterial protein.

**Key words:** chicken interleukin-18; mature protein; cloning; prokaryotic expression

\* Corresponding author

## 本刊论文喜获第二届中国科协期刊优秀学术论文奖

第二届中国科协优秀论文评选活动于2004年3月开始至12月结束。本届参加评选的优秀论文由中国科协所属全国性学会、协会、研究会主办的学术期刊编辑部推荐,先由3名同行专家个人推荐,再由刊物的主办学会组织专家初审后推荐,经中国科协期刊优秀学术论文专家评审委员会评选,报中国科协学术交流工作委员会审定,共评出99篇优秀学术论文,并上网公示,公示期内无异议,于2005年1月12日正式发文予以表彰。

发表于本刊2003年第2期刘文博等同志的论文“应用噬菌体肽库技术定位沙门氏菌鞭毛蛋白上属特异性共同抗原表位”荣获第二届中国科协期刊优秀学术论文奖。

《畜牧兽医学报》编辑部