

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2006 )23-2131-04

## 重组人 IL-29 的原核表达、纯化及活性分析

李明才, 何韶衡 ( 汕头大学医学院变态反应学与炎症学研究所, 广东 汕头 515041 )

## Prokaryotic expression, purification and activity analysis of recombinant human interleukin-29

Li Ming-Cai, He Shao-Heng

Allergy and Inflammation Research Institute, Medical College, Shantou University, Shantou 515041, China

**【Abstract】** AIM: To express recombinant human interleukin-29 (IL-29) with biological activity in *E. coli*. **METHODS:** The cDNA fragment coding for mature IL-29 protein was amplified by PCR and cloned into vector pET-44 Ek/LIC to construct fusion expression vector pET-44 Ek/LIC-IL-29. After pET-44 Ek/LIC-IL-29 was transformed into *E. coli* BL21( DE3 ), the bacteria were induced by IPTG. The expressed IL-29 fusion protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and the fusion tag was removed from IL-29 fusion protein by cleavage with enterokinase. The purified IL-29 was subjected to N-terminal sequencing. The antiviral activity of IL-29 was detected by cytopathic effect reduction assay. **RESULTS:** The DNA sequencing showed that the expression vector pET-44 Ek/LIC-IL-29 was constructed successfully. After induced by IPTG, the target protein accounted for 43% of the total bacterial protein and most was expressed in a soluble form in *E. coli* cultured at 30°C. The purified IL-29 appeared a single band on SDS-PAGE and its purity was more than 96%. The first 10 amino acid sequence of the N-terminus was consistent with the theoretical sequence. The recombinant IL-29 showed specific antiviral activity that was comparable to the commercially available IFN- $\alpha$ 2b preparation. **CONCLUSION:** The recombinant human IL-29 with biological activity has been obtained.

**【Keywords】** interleukin-29; *Escherichia coli*; soluble protein; purification

**【摘要】**目的 在大肠杆菌中表达具有活性的重组人白细胞

收稿日期 2005-11-28; 接受日期 2006-01-30

基金项目: 国家自然科学基金( 30671932 ); 李嘉诚基金( C0200001 ); 广东省卫生厅立项课题( A2003484 )

通讯作者: 何韶衡. Tel ( 0754 )8900405 Email :shoahenghe@hotmail.com

作者简介: 李明才, 副研究员. Tel ( 0754 )8900380 Email :mcli@stu.edu.cn

介素-29( IL-29 )。方法: 用 PCR 技术扩增人 IL-29 成熟蛋白的编码序列, 克隆入原核表达载体 pET-44 Ek/LIC 中, 构建融合表达载体 pET-44 Ek/LIC-IL-29, 转化大肠杆菌 BL21( DE3 ), 以 IPTG 诱导表达 IL-29 融合蛋白, 经镍柱亲和层析纯化, 然后用胰凝乳蛋白酶消化除去 N 端融合标签得到完全天然状态的重组人 IL-29, 经 N-端氨基酸测序鉴定纯化的 IL-29, 用细胞病变抑制法测定其活性。结果: 成功构建了表达载体 pET-44 Ek/LIC-IL-29, DNA 序列测定结果与预期结果一致。在 30°C 培养条件下, IPTG 诱导表达的 IL-29 融合蛋白占菌体蛋白总量 43% 左右, 并且大部分以可溶形式存在。纯化后的融合蛋白经胰凝乳蛋白酶切割和回收后, 所得目的蛋白( IL-29 )纯度大于 96%, 该蛋白 N-端序列与理论值一致, 其抗病毒活性与 IFN- $\alpha$ 2b 相当。结论: 获得了具有生物学活性的重组人 IL-29。

**【关键词】** 白细胞介素-29; 大肠杆菌; 可溶性蛋白质; 纯化  
**【中图分类号】** Q786 **【文献标识码】** A

## 0 引言

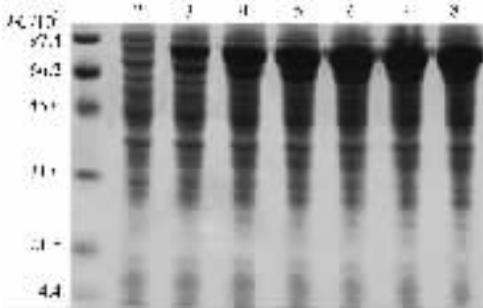
人白细胞介素-29( interleukin-29, IL-29 )是 2003 年初发现的细胞因子<sup>[1]</sup>, 它属于 IL-28 家族的成员。人外周血单核细胞( PBMC )和树突状细胞( DC )等在病毒感染<sup>[1-2]</sup>或 poly I:C<sup>[3-4]</sup>或脂多糖( LPS )<sup>[5]</sup>刺激下可产生 IL-29。尽管 IL-28 家族的基因结构与 IL-10 相似, 但其蛋白质结构与干扰素( IFN )更相近, 所以也分别被称为 IFN- $\lambda$ 1( IL-29 ), IFN- $\lambda$ 2( IL-28A )和 IFN- $\lambda$ 3( IL-28B )<sup>[2]</sup>。近两年来的研究发现, IL-29 具有保护细胞抗病毒感染<sup>[1, 2, 6-8]</sup>、抑制几种细胞增殖<sup>[7-8]</sup>、上调 MHC I 抗原表达<sup>[1-2]</sup>和诱导 DC 成熟<sup>[3]</sup>等作用, 在抗病毒感染和抗肿瘤等方面具有潜在的应用前景。我们在克隆全长人 IL-29 cDNA 的基础上<sup>[9]</sup>构建了重组人 IL-29 的原核表达载体, 在大肠杆菌中进行表达、纯化并测定其抗病毒活性, 为下一步深入研究及临床应用打下基础。

## 1 材料和方法

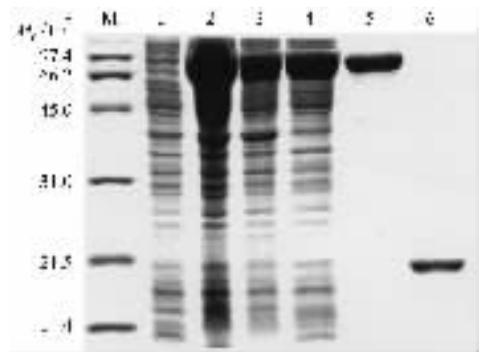
**1.1 材料** 含全长人 IL-29 编码序列的质粒 pcDNA3.1/V5-His-TOPO®-IL-29 由本室构建<sup>[10]</sup>; 各种限制性内切酶购自美国 New England Biolabs 公司; Hot-star Taq DNA 聚合酶、胶回收试剂盒( QIAquick Gel Extraction kit )购自美国 Qiagen 公司; pET-44 Ek/LIC vector 载体, *E. coli* NovaBlue, BL21( DE3 ), Ni-NTA



PTSKPTTTGK 与人 IL-29 成熟蛋白基因编码的序列一致。



1: 蛋白质分子量标准; 2: 未诱导细胞; 3~8: 细胞分别诱导 1~6 h.  
图 2 IL-29 融合蛋白在 *E. coli* BL21( DE3 ) 中诱导表达的 SDS-PAGE 分析



M: 蛋白质分子量标准; 1: 未诱导细胞; 2: 细胞在 30°C 诱导 5 h;  
3: 细胞超声处理后的沉淀; 4: 细胞超声处理后的上清; 5: 纯化的 IL-29 融合蛋白; 6: IL-29 纯品。

图 3 重组人 IL-29 表达与纯化的 SDS-PAGE 分析

**2.4 IL-29 的活性鉴定** 用细胞病变抑制法测定纯化产物的抗病毒活性, 重组 IL-29 抑制 VSV 感染引起的 50% WISH 细胞病变的需要量为 0.88  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 而阳性对照 IFN- $\alpha 2\text{b}$  的为 0.58  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。说明该重组 IL-29 具有生物学活性, 其活性比 IFN- $\alpha 2\text{b}$  的略低。

### 3 讨论

大肠杆菌遗传图谱明确, 具有生长快速、安全性好、可进行高密度培养和适合表达不同基因产物等特点, 已成为表达许多外源蛋白质的首选系统。大量的有价值的基因产物在大肠杆菌中获得了表达<sup>[11-12]</sup>。但是, 在 *E. coli* 中表达的外源蛋白一般以不溶的包涵体形式存在。在目的蛋白中融合可溶性的蛋白标签和降低重组菌的生长温度是减少包涵体形成的最常用方法。我们所用的 pET-44 Ek/LIC 载体整合了一个促溶解多肽 NusA 标签序列, 保证了 IL-29 融合蛋白能在大肠杆菌以可溶性形式表达。同时, 用 pET-44 Ek/LIC 载体作表达还有很多优点: 首先是它由 T7 强

启动子控制, 充分诱导时, 几乎所有的细胞资源都用于表达目的蛋白, 诱导表达几小时, 目的蛋白通常可以占到细胞总蛋白的 50% 以上; 表达的蛋白还融合有多聚组氨酸和 S-蛋白标签, 有利于目的蛋白的纯化和检测; 在融合标签和目的蛋白之间有肠激酶和凝血酶切割位点, 利用它们可以切除所有融合的标志蛋白; 构建载体时采用不需要连接反应的克隆方法 (LIC) 这种方法快速高效, 而且为定向克隆。

较低的生长温度由于降低了蛋白质的合成速度和无活性聚集体形成的速率使细胞内易于形成聚集的折叠中间产物浓度降至最低, 因此低温有利于蛋白产物的正确折叠, 可以减少包涵体的形成, 从而可以得到大量特异性的可溶蛋白。我们在利用 pET-44 Ek/LIC-IL-29 诱导表达重组 IL-29 时, 发现降低温度可以增加重组 IL-29 蛋白可溶性表达, 在 30°C 下诱导表达时, 重组 IL-29 蛋白主要以可溶性形式存在。IL-29 融合蛋白中的多聚组氨酸和 S-蛋白标签的存在, 可以用镍柱亲和层析或 S-蛋白亲和层析纯化, 我们用 Ni-NTA 亲和层析一步法纯化, 所获 IL-29 融合蛋白的纯度很高。纯化的 IL-29 融合蛋白经肠激酶消化, 可以切除所有的融合标签, 经回收后, 得到了纯度大于 96% 的重组 IL-29, N-末端氨基酸测序证明了重组蛋白的正确性, 同时, 该蛋白具有抗病毒活性, 说明我们制备重组 IL-29 的方法是成功的。本研究获得的高纯度重组 IL-29 为进一步进行其理论研究和临床应用奠定了基础。

### 【参考文献】

- [1] Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 63-68.
- [2] Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, et al. IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 69-77.
- [3] Coccia EM, Severa M, Giacomini E, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and  $\lambda$  interferon as in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(3): 796-805.
- [4] Gautier G, Humbert M, Deauvieux F, et al. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(9): 1435-1446.
- [5] Siren J, Pirhonen J, Julkunen I, et al. IFN- $\alpha$  regulates TLR-dependent gene expression of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-28, and IL-29 [J]. *J Immunol*, 2005, 174(4): 1932-1937.
- [6] Brand S, Zitzmann K, Dambacher J, et al. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2' 5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29 [J]. *Biochem Biophys Res*

Commun, 2005, 331(2): 543-548.

[7] Meager A, Visvalingam K, Dilger P, et al. Biological activity of interleukins-28 and -29: Comparison with type I interferon[J]. Cytokine, 2005, 31(2): 109-118.

[8] Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, et al. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: Similarities with type I interferon signaling[J]. J Biol Chem, 2004, 279(31): 32269-32274.

[9] 李明才, 何韶衡. 人白细胞介素(IL)-28和IL-29基因的克隆与序列分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(5):

635-637.

[10] 中国生物制品标准化委员会编. 中国生物制品规程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 672-676.

[11] 李岩, 黄勇, 陈南春, 等. 重组人血小板因子4的表达、纯化及活性鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(10): 888-891.

[12] Swartz JR. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins[J]. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12(2): 195-201.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)23-2134-01

## 环形电切术对宫颈病变的诊断治疗体会

周玲, 张文颖, 杜建新

(解放军第306医院妇产科, 北京 100101)

【关键词】 环形电切术, 宫颈病变, 治疗

【中图分类号】 R711 【文献标识码】 B

**0 引言** 1989年, Prendiville等<sup>[1]</sup>将环形电切术(loop electro-surgical excision procedure, LEEP)用于切除异常宫颈组织。由于这种方法有着手术时间短, 术中、术后出血少, 术后感染少, 愈合彻底, 不易复发, 门诊可以施行, 而且与冷刀一样能够获得满意的病理标本等优点, 在临床上已被广泛用于宫颈病变的诊断和治疗。如何正确地选择LEEP手术, 避免宫颈的过度治疗是本研究的重点。我们对因宫颈病变行LEEP手术的患者进行了回顾性分析, 探讨LEEP对宫颈病变的诊断和治疗价值, 旨在指导正确选择病例, 减少不必要的检查, 避免宫颈的过度治疗。

**1 对象和方法** 2003-10/2005-10解放军第306医院妇产科门诊对因宫颈病变的患者159例, 术前均行液基薄层细胞学检测(TCT)和阴道镜检查加活检术, 于月经干净后3~7d进行LEEP治疗。

### 2 结果

**2.1 TCT、阴道镜及LEEP标本组织学对照检查** 经TCT检查为炎症, 术后阴道镜检查及LEEP证实均为炎症的患者105例, TCT检查提示有不典型鳞状上皮细胞(ASCUS)的患者24例, 其中1例阴道镜检查为宫颈上皮内病变I级(CIN I), LEEP术后证实24例患者均为炎症, TCT检查为低度鳞状上皮内病变(LSIL)的患者22例, 阴道镜检查为炎症者12例, CIN I~II 10例, LEEP术后证实13例为炎症, CIN I~II 9例, TCT检查为高度鳞状上皮内病变(HSIL)的患者8例, 阴道

镜检查为炎症者3例, CIN II 4例, CIN II~III 1例, LEEP术后证实1例为炎症, CIN II 6例, CIN II~III 1例。

**2.2 LEEP治疗的基本情况** 患者手术时间平均为6.0 min, 出血量平均为11.4 mL, 患者术前及术中均未使用镇痛药物, 除1例患者因精神高度紧张, 手术无法进行而改用静脉麻醉外, 其余均诉疼痛可以忍受, 患者术后即可下地活动, 术后随访发现, 患者均于术后1 wk左右出现阴道少量血性分泌物, 出血时间平均7.5 d, 宫颈外形恢复正常平均8.6 wk。

**3 讨论** 我们的研究表明, TCT检查的敏感性高, 但特异度不高, 而阴道镜检查有可能遗漏宫颈上皮内病变。有文献报道, 阴道镜检查对HSIL的敏感度和特异度低至50%~60%<sup>[2]</sup>。阴道镜检查患者的主观因素起到很重要的作用。通常我们在临床工作中, 多依赖活检来提高诊断准确性, 但是活检部位选择的是否正确, 是保证诊断准确性的关键。尤其是老年人鳞柱交界上移, 活检往往取材困难, 这些都是导致阴道镜检查的敏感度和特异度降低的原因。亦有报道称LEEP手术切割组织较多, 创面大, 愈合时间长, 有可能导致宫颈管狭窄, 妊娠后导致早产、胎膜早破等<sup>[3]</sup>。因此, LEEP并不是所有患者都必须选择的手术方法。我们的研究表明, TCT检查结果为慢性炎症或ASCUS的患者, 阴道镜活检和LEEP标本的组织学异常者的发生率极低。我们可以利用TCT检查对癌前病变的高度敏感性的这一特性, 加上有经验的医师进行阴道镜检查, 使轻、中度宫颈糜烂和有生育要求的患者可以在细胞学检查和阴道镜检查排除宫颈癌、癌前病变后, 再选择其他的物理治疗。

### 【参考文献】

[1] Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large loop excision of the transformation zone (LLETZ): A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia [J]. Br J Obstet Gynaecol, 1989, 96: 1054-1060.

[2] Buxton EJ, Luesley DM, Shafi MI, et al. Colposcopically directed punch biopsy: A potentially misleading investigation [J]. Br J Obstet Gynaecol, 1991, 98: 1273-1276.

[3] Sadler L, Saftlas S, Wang W, et al. Treatment for cervical intraepithelial neoplasia and risk of preterm delivery [J]. AMA, 2004, 291: 2100-2106.

编辑 杨湘华

收稿日期 2006-05-30; 接受日期 2006-08-20

作者简介: 周玲, 主治医师. Tel: (010) 66356729 Ext 2016 Email: icepear@hotmail.com