

黑白花奶牛白细胞介素-2 基因的克隆和表达

希尼尼根, 申宏旺, 关平原 (内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘要 [目的] 克隆牛白细胞介素-2 基因 (*IL-2*), 并观察其在原核细胞中的表达。[方法] 应用 RT-PCR 技术从黑白花奶牛外周血淋巴细胞总 RNA 中扩增编码牛 *IL-2* 基因, 并将其克隆到 pGEX-2T 原核表达质粒中, 转化大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 分析。[结果] 通过 RT-PCR 扩增获得 500 bp 的目的片段, 所克隆的 *IL-2* 基因在原核细胞中成功表达, 表达产物为分子量约 43 kD 的融合蛋白。[结论] 该研究为 *IL-2* 基因的进一步研究提供了理论依据和物质基础。

关键词 黑白花奶牛; 白细胞介素-2; 克隆; 原核表达

中图分类号 S823 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)35-15389-02

Cloning and Expression of *IL-2* Gene from Holstein-Friesian Cow

Xininigen et al (College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018)

Abstract [Objective] The aim of this study is to clone bovine interleukin-2 gene (*IL-2*) and observe its expression in prokaryotic cells. [Method] Bovine *IL-2* gene was amplified from total RNA of peripheral blood lymphocytes of holstein-friesian cows by RT-PCR. Subsequently, the gene was cloned into pGEX-2T prokaryotic expression plasmid to construct recombinant, which were then transformed into *Escherichia coli* BL21. After IPTG induction, SDS-PAGE analysis was conducted. [Result] A 500 bp target fragment corresponding with expectation was obtained by RT-PCR. The cloned gene successfully expressed fusion protein of about 43 kD in prokaryotic cells. [Conclusion] This study provided a theoretical and material basis for further researches on *IL-2* gene.

Key words Holstein-friesian cow; Interleukin-2; Cloning; Prokaryotic expression

白细胞介素-2 (Interleukin-2, *IL-2*) 是一种分子量为 15 kD 的糖蛋白, 主要是由 T 淋巴细胞或 T 淋巴细胞系产生的一类最强有力的 T 细胞生长因子, 属于 Th1 型细胞因子。白细胞介素-2 在抗肿瘤、抗毒素、免疫调节及感染性疾病的治疗中具有重要作用。

IL-2 于 20 世纪 60 年代从丝裂原刺激的淋巴细胞上清中发现, 当时被称为“淋巴细胞丝裂原因子”、“致母细胞性因子”、“体细胞激活因子”^[1], 1979 年第二届国际淋巴因子会议将其命名为白细胞介素-2。*IL-2* 的发现, 为体外长期培养 T 细胞克隆提供了方便, 同时也揭开了细胞因子研究的序幕。从 Waston 等首次纯化小鼠 *IL-2* 之后, 大鼠、人、长臂猿、豚鼠、兔、猪以及鸡等的 *IL-2* 相继被发现^[2-5], 对其免疫介导活性有了更深入的了解。研究发现, *IL-2* 除了具有维持 T 细胞生长、增殖、分化和维持 T 细胞体外培养的作用外, 还能增强 Tc、Ts、NK 和 K 细胞的活性, 诱导 γ -干扰素和 B 细胞生长因子的生成, 刺激 B 细胞产生抗体等^[6-10]。该试验利用 PCR 技术克隆了黑白花奶牛 *IL-2* 基因, 并在大肠杆菌中进行表达, 旨在为该基因的进一步研究提供理论依据和物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料 黑白花奶牛由内蒙古农业大学动物科学与医学学院实验动物园提供。大肠杆菌 BL21 由内蒙古大学生物工程中心惠赠; 原核表达载体 pGEX-2T 由周伟光博士惠赠。克隆载体 pMD18-T、RT-PCR 试剂盒、ConA、总 RNA 提取试剂 TRNzol 以及工具酶均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 淋巴细胞的分离培养及总 RNA 的提取 根据王克坚等^[11]的方法, 无菌采集黑白花奶牛颈静脉血, 分离并培养淋巴细胞。淋巴细胞经 ConA 刺激、培养 18 h, 离心收取。参照 TRNzol 的使用说明书, 提取淋巴细胞总 RNA。

1.3 目的基因的体外扩增与克隆 根据 GenBank 发表的牛

IL-2 基因序列, 设计 1 对 RT-PCR 引物, 覆盖完整的阅读框, 预计扩增片段长度为 501 bp。引物序列如下: P1, 5'-TTG-GATCCACAATGTACAAGATACA-3'; P2, 5'-CCGAATTCGAG-GCACTTAGTGATCA-3'。下划线部分分别为 *Bam*H I 与 *Eco*R I 酶切位点。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。以提取的淋巴细胞总 RNA 为模板, 按试剂盒说明书进行一步法 RT-PCR, 反应结束后取 5 μ l 产物于 1% 琼脂糖凝胶中, 90 V 电泳 1 h 观察结果。

将纯化的目的 DNA 与 pMD18-T 载体连接(命名为重组质粒 pMD18-T-*IL-2*), 转化 BL21 感受态细胞, 挑选 2 个重组质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行测序并用 DNASTAR 生物软件对序列进行分析。

1.4 目的基因原核表达重组质粒的构建和原核表达 将重组质粒 pMD18-T-*IL-2*、原核表达载体 pGEX-2T 进行 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切消化, 将牛 *IL-2* 基因与 pGEX-2T 连接成牛 *IL-2* 基因原核表达质粒 pGEX-BoIL-2, 转化 BL21 感受态细胞, 按常规方法挑选重组质粒转化菌, 扩大培养, 抽提质粒, 最后以 P1 和 P2 作为引物, 采用常规 PCR 进行重组质粒鉴定。

以 1 mmol/L IPTG 诱导重组体转化菌表达目的蛋白, 4 h 后收集菌体, 进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后用考马斯亮兰染色, 脱色后分析其蛋白质条带。

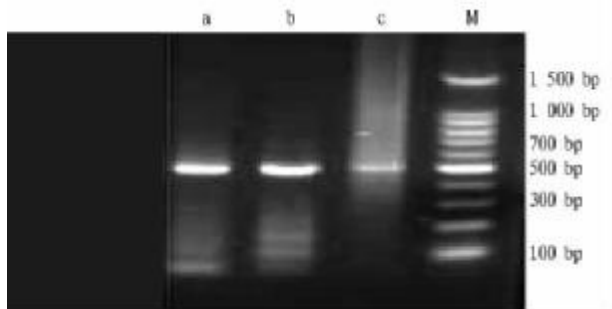
2 结果与分析

2.1 牛 *IL-2* 基因的 RT-PCR 扩增 RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到大小约为 500 bp 的基因条带, 与目的基因大小相符(图 1)。序列分析结果表明, 该试验扩增获得的牛 *IL-2* 基因 ORF 为 465 bp, 命名为 *BoIL-2* (GenBank 登陆号: EF067918), 编码 155 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 17.6 kD, 与 GenBank 中已报道的牛 *IL-2* 基因的同源性为 99.8%, 与绵羊、山羊、猪、猫、人、马、狗、鼠和鸡的同源性分别为 97.8%、96.8%、82.4%、78.6%、75.8%、75.4%、72.5%、57.2%、31.9%, 证明该试验扩增得到了牛 *IL-2*

作者简介 希尼尼根(1971-), 男, 内蒙古赤峰人, 博士, 副教授, 从事动物传染病学研究。

收稿日期 2008-09-18

基因。



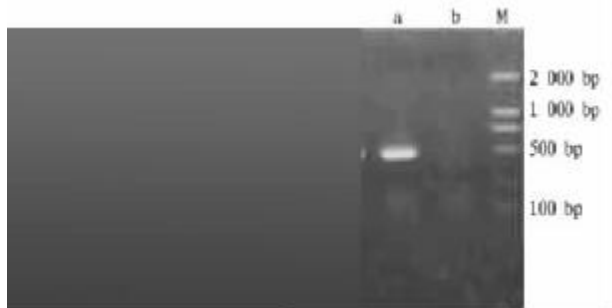
注:a~c.牛 *IL-2* 基因 RT-PCR 扩增产物;M. 100 bp DNA Ladder Marker。

Note:a - c. Amplification products of bovine *IL-2* gene; M. 100 bp DNA Ladder Marker.

图1 牛 *IL-2* 基因的 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR result of bovine *IL-2* gene

2.2 牛 *IL-2* 基因的原核表达 构建的原核表达重组体经 PCR 扩增,得到大小约为 500 bp 的基因条带(图 2),证明经克隆成功获得 *BoIL-2* 的 pGEX-2T 原核表达重组体 pGEX-BoIL-2。重组质粒转化菌经 IPTG 诱导培养,得到由表达载体谷胱甘肽-S-转移酶基因 26 kD 蛋白和 *BoIL-2* 基因蛋白组成的大小约 43 kD 的融合蛋白,与预测的目的产物大小一致(图 3)。



注:a. 原核表达重组体 pGEX-BoIL-2 PCR 产物;b. 空载体 pGEX-2T PCR 结果;M. DNA Marker DL 2000。

Note:a. PCR products of prokaryotic expression recombinant pGEX-BoIL-2; b. PCR result of empty vector pGEX-2T; M. DNA Marker DL 2000.

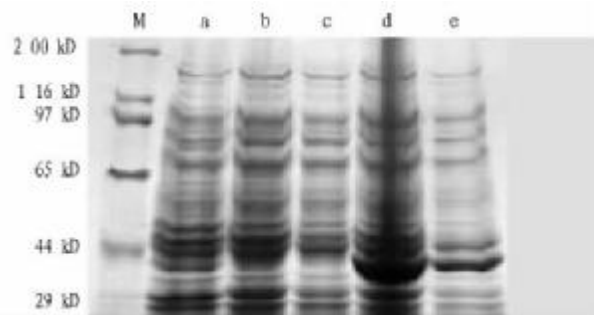
图2 原核表达重组体 pGEX-BoIL-2 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification result of prokaryotic expression recombinant pGEX-BoIL-2 by PCR

3 讨论与结论

白细胞介素-2 是一种具有广泛生物活性的细胞因子,能够有效提高机体的免疫功能。自 20 世纪 90 年代以来,人和多种动物 *IL-2* 的相关研究被报道,发现了 *IL-2* 的许多生物学功能。业已证实,牛白细胞介素-2 在多种牛传染病的预防与治疗中具有很好的效果^[12-14],因此,其相关研究具有良好的应用前景。

该研究从 ConA 激活的黑白花奶牛外周血淋巴细胞总 RNA 中成功扩增出特异性的基因条带,克隆并测序。测序结果显示,该基因序列与报道的牛 *IL-2* 基因序列具有 99.8% 的同源性,证实成功克隆了黑白花奶牛 *IL-2* 基因。种间与多数哺乳动物的同源性都超过 70%,但与鼠的同源性仅为



注:M. 蛋白质 Marker;a~b. 未诱导的空载体菌 pGEX-2T/BL21;c. 未诱导的重组菌 pGEX-BoIL-2/BL21;d~e. 诱导的重组菌 pGEX-BoIL-2/BL21。

Note:M. Protein marker; a - b. Uninduced pGEX-2T/BL21; c. Uninduced pGEX-BoIL-2/BL21; d - e. Induced pGEX-BoIL-2/BL21.

图3 重组质粒转化菌诱导表达产物的 SDS-PAGE 结果

Fig. 3 SDS-PAGE result of expression products of bacteria containing recombinant plasmid after IPTG induction

57.2%,与鸡的同源性最低(31.9%)。基因遗传进化树分析结果表明,牛 *IL-2* 基因与其他动物 *IL-2* 基因在遗传进化过程中有着共同的起源,但在不断的进化选择过程中,各种动物的 *IL-2* 发生不同程度的变异,种内也有个别核苷酸的变异。牛 *IL-2* 基因与山羊和绵羊处于同一进化分支,说明与反刍动物有最近的亲缘关系,与其他哺乳动物的关系较近,而与禽类的亲缘关系较远^[15]。

体外表达获得有生物学活性的重组 *IL-2* 是开发应用 *IL-2* 的关键,该试验利用原核表达载体 pGEX-2T 在大肠杆菌 BL21 中表达得到了大小约 43 kD 的融合蛋白,与国内外研究结果^[16-17]基本吻合,证明该载体有效表达了目的基因蛋白。pGEX 载体是 Smith 和 Johnson 于 1987 年构建的,其特点是在载体上连接上了一种 26 kD 的谷胱甘肽-S-转移酶基因,与其他融合载体相比,具有纯化条件温和、步骤简单以及纯化后蛋白能最大限度保持其空间构象和免疫原性的特点^[18]。

综上所述,该研究成功扩增和克隆了黑白花奶牛 *IL-2* 基因,并对其进行了初步的表达,为下一步对其生物学特性的深入研究提供了理论依据和物质基础。

参考文献

- [1] 杨贵贞. 免疫生物工程纲要与技术[M]. 长春:吉林科学技术出版社, 1992.
- [2] GOODALL J C, EMERY D C, PERRY A C F, et al. cDNA cloning of ovine interleukin 2 by PCR[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18(19):5883 - 5889.
- [3] GOODALL J C, EMERY D C, BAILEY M, et al. cDNA cloning of porcine interleukin 2 by polymerase chain reaction[J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1089(2):257 - 258.
- [4] VANDERGRIFT E V, HOROHOV D W. Molecular cloning and expression of equine interleukin 2 [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1993, 39:395 - 406.
- [5] MAI Z, KOUSOULAS K G, HOROHOV D W, et al. Cross-species PCR cloning of gerbil (*Meriones unguiculatus*) interleukin-2 cDNA and its expression in COS-7 cells[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1994, 40(1):63 - 71.
- [6] WALDMANN T, TAGAYA Y, BAMFORD R. Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors[J]. Int Rev Immunol, 1998, 16:205 - 226.
- [7] GRIMM E A, ROBB R J, NECKERS L M, et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Evidence that *IL-2* is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into Lymphokine-activated killer cells [J]. J Exp Med, 1983, 158:1356 - 1361.

(下转第 15404 页)

麦 49-198 花前及花后干物质积累量以及花后干物质积累对籽粒产量贡献率均以低密度为小,花前干物质积累量、成熟期总干物质积累量以及花后干物质积累对籽粒产量贡献率随种植密度增加而提高,但花后干物质积累量以中密度为最大,高密度的花后干物质积累量较中密度有所下降(仍高于低密度),这表明适当增加种植密度有利于花后增加干物质积累,过高的种植密度对增加花后干物质积累不利。加强生育后期田间管理,尤其是高种植密度群体生育后期的养根护叶对实现增加干物质积累量具有重要意义。

(2)适宜的种植密度是充分利用光能和地力,实现小麦增产的重要措施。在试验中,中密度(195 万/hm²)的豫麦 49-198 籽粒产量最高,低密度次之,高密度较低;随种植密度增加,成穗数增加、穗粒数和千粒重下降。这表明在适播条件下,豫麦 49-198 获得高产的最适宜种植密度为 195 万/hm²左右,此密度下产量三要素更协调。在试验中,120 万/hm²的籽粒产量与 195 万/hm² 差异较少,表明适当降低种植密度可以实现较高的产量目标,过高的种植密度(270 万/hm²)对豫麦 49-198 实现高产不利。这与张洪程等^[18]、汤永禄等^[8]观点一致。

(3)种植密度对豫麦 49-198 籽粒品质有一定影响。在该试验中,豫麦 49-198 籽粒蛋白质含量、湿面筋含量、沉降值和纤维含量均随种植密度增加而降低;籽粒硬度和淀粉含量随种植密度增加而提高。这与林昌明、雷钧杰等研究种植密度对中筋小麦籽粒产量与品质的结果相同^[19-20]。还有研究发现^[21],随种植密度增加,中筋小麦籽粒蛋白质含量、湿面筋含量和稳定时间的变化均表现为先增加后降低的趋势。在本试验中,未发现高种植密度下蛋白质、湿面筋含量下降可能与所设种植密度不够大有关。可见种植密度过大对改善豫麦 49-198 籽粒品质不利。

纵上所述,在适期播种的高肥田,保持 120 万 ~ 195 万/hm²的种植密度有利于实现豫麦 49-198 优质高产。

(上接第 15390 页)

- [8] SMITH K A. Interleukin-2: inception, impact and implications[J]. Science, 1988, 240: 1169 - 1176. [9] SWAIN S L. Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2 [J]. Curr Opin Immunol, 1991, 3 (3): 304 - 310.
- [10] DING K, CHENG A C, WANG M S, et al. Cloning and bioinformatics analysis of Interleukin-2 of Sichuan white goose [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3): 80 - 84.
- [11] 王克坚, 余兴龙, 殷震, 等. 绵羊白细胞介素 2 基因的克隆与序列分析 [J]. 中国兽医学报, 2000, 20(6): 523 - 527.
- [12] REDDY P G, BLECHA F, MINOCHA H C, et al. Bovine recombinant interleukin-2 augments immunity and resistance to bovine herpesvirus infection [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1989, 23: 61 - 74.
- [13] REDDY D N, REDDY P G, XUE W, et al. Immunopotentiality of bovine respiratory disease virus vaccines by interleukin-1 and interleukin-2 [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1993, 37(1): 25 - 38.
- [14] NICKERSON S C, BAKER P A, TRINIDAD P. Local immunostimulation of the bovine mammary gland with interleukin-2 [J]. J Dairy Sci, 1989, 72 (7): 1764 - 1773.
- [15] 申宏旺, 希尼尼根, 苏丽娅, 等. 牛白细胞介素-2 基因的克隆与序列分析 [J]. 中国兽医杂志, 2008(4): 12 - 13.
- [16] REEVES R, SPIES A G, NISSEN M S, et al. Molecular cloning of a func-

参考文献

- [1] 徐恒永, 赵振东, 刘爱峰, 等. 氮对优质专用小麦产量和品质的影响 [J]. 山东农业科学, 2001(2): 13 - 17.
- [2] 朱新开, 郭文善, 周君良, 等. 氮素对不同类型专用小麦营养和加工品质调控效应 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(6): 640 - 645.
- [3] 李春燕, 封超年, 徐月明, 等. 弱筋小麦宁麦 9 号优质高产群体质量指标及形态特征 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2003, 24(4): 44 - 49.
- [4] BAKER R J, BRIGGS K G. Relationships between plant density and yield in barley [J]. Crop Science, 1983, 23: 590 - 593.
- [5] 陈天房, 李春喜, 姬生栋. 播种密度与小麦产量及籽粒营养品质关系的初步研究 [J]. 河南职业技术师范学院学报, 1988(4): 15 - 17.
- [6] 易杰忠, 董全才, 刘萍英, 等. 不同基本苗对强筋小麦产量形成及品质的影响 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(8): 129 - 131.
- [7] 张冀涛, 李硕碧, 张联会. 不同栽培条件与小麦籽粒品质的关系 [J]. 干旱地区农业研究, 1991(2): 16 - 21.
- [8] 汤永禄, 黄钢, 郑家国. 密肥水平对川西平原春(播)小麦产量与品质的影响 [J]. 耕作与栽培, 2003(4): 8 - 11.
- [9] 吴九林, 彭长青, 林昌明. 播种期和播种密度对弱筋小麦产量与品质影响的研究 [J]. 江苏农业科学, 2005(3): 36 - 38.
- [10] 杨永光, 张维成. 播量对小麦产量和籽粒营养品质的影响 [J]. 河南职业技术师范学院学报, 1989, 17(3): 113 - 116.
- [11] 李卓夫, 金正勋, 孙艳丽. 春小麦品种蛋白质含量与种植密度关系的研究 [J]. 现代化科学, 1994, 18(8): 12 - 14.
- [12] 亢福仁. 不同栽培条件对小麦籽粒产量和品质影响 [J]. 榆林学院学报, 2003, 13(3): 31 - 36.
- [13] 曹承富, 汪芝寿, 孔令聪, 等. 氮素与播种密度对优质小麦产量和品质的影响 [J]. 安徽农业科学, 1997, 25(2): 115 - 117.
- [14] 海江波, 由海霞, 张保军. 不同播量对面条专用小麦品种小偃 503 生长发育、产量及品质的影响 [J]. 麦类作物学报, 2002, 22(3): 92 - 94.
- [15] 胡承霖, 谢家琦, 范荣喜. 综合栽培技术对小麦籽粒品质的调控作用 [J]. 安徽农业大学学报, 1994, 21(2): 151 - 156.
- [16] 于文明, 于振文, 魏守江. 施氮量和基本苗对小麦干物质积累量和产量及氮肥利用率的影响 [J]. 山东农业科学, 2006(4): 35 - 37.
- [17] 王长年, 吴朵业, 夏新宇, 等. 高肥条件下密度对济南 17 号小麦群体质量和产量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2002(1): 18 - 19.
- [18] 张洪程, 戴其根. 小麦稀植化开源拓库理论与技术研究 [J]. 江苏农学院学报, 1992, 13(3): 27 - 29.
- [19] 林昌明, 于宝富, 唐进, 等. 专用小麦基本苗对产量及品质影响试验初报 [J]. 耕作与栽培, 2004(6): 37 - 38.
- [20] 雷钧杰, 赵奇, 陈兴武, 等. 播期和密度对冬小麦产量与品质的影响 [J]. 新疆农业科学, 2007, 44(1): 75 - 79.
- [21] 徐恒永, 赵振东, 刘爱峰, 等. 群体调控对济南 17 籽粒品质的影响 [J]. 山东农业科学, 2001(4): 17 - 19.

tional bovine interleukin 2 cDNA [J]. Proc Natl Acad Sci, 1986, 83(10): 3228 - 3232.

- [17] 付满良, 李惠, 武梅, 等. 牦牛白细胞介素 2 (IL2) 基因 cDNA 的分子克隆和表达研究 [J]. 四川动物, 2005(4): 507 - 512.
- [18] 周宇荷, 魏东芝, 王二力. 融合蛋白表达载体 pGEX 及其应用 [J]. 生命科学, 1998, 10(3): 123 - 125.
- [19] CHEN Z Q, WU K X, LIANG X D, et al. Prokaryotic expression of rubber elongation factor gene and preparation of its polyclonal antibody [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4): 29 - 33.
- [20] 韩明勇, 于金明, 郭其森, 等. 白细胞介素-18 转导人大肠癌细胞株的建立及其生物学活性的研究 [J]. 肿瘤防治杂志, 2003, 10(8): 809 - 810.
- [21] SUN P, GUO Y H, QI J J, et al. Cloning and sequence analysis of actin gene from *Rehmannia glutinosa* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 42 - 44, 66.
- [22] 羊东哗, 卢放根, 汤熙翔, 等. 人白细胞介素 12 双亚基共表达载体的构建及表达 [J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(2): 79 - 82.
- [23] LI M Y, XU B Y, YANG X L, et al. Cloning and sequence analysis of *Ma14-3-3d* encoding a homologue 14-3-3 protein from banana [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3): 75 - 79.