

# 牛白细胞介素 18 成熟蛋白 cDNA 基因的克隆和表达

刘文强<sup>1</sup>, 胡敬东<sup>1</sup>, 杨少华<sup>2</sup>, 赵宏坤<sup>1,2\*</sup>, 高运东<sup>2</sup>, 仲跻峰<sup>2</sup>

(1. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; 2. 山东省农业科学院奶牛研究中心, 济南 250100)

**摘要:** 应用 RT-PCR 技术分别从脂多糖(LPS)活化的牛脾脏细胞和肺泡巨噬细胞中克隆到编码牛白细胞介素(bIL-)18 成熟蛋白的 cDNA 基因, 其大小为 480 bp。将 bIL-18 克隆到 pET32a(+) 质粒中, 转化大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 分析, 得到了分子量为 38ku 的融合蛋白, 该蛋白经纯化并复性后, 具有诱导 MDBK 分泌 IFN- $\gamma$  的活性, 并且可以刺激 ConA 活化的外周血单核细胞(PBMC)增殖。使用半定量 RT-PCR 对其 mRNA 的体内表达进行了测定, 发现不论是否加入刺激剂, 牛巨噬细胞都可以持续的表达 IL-18 mRNA, 但是被 LPS 活化的 PBMC 只有微弱表达, 肝和脾细胞经 LPS 活化后也可以检测到 IL-18 mRNA 的表达, 其水平明显高于 PBMC, 在不同细胞中表达的差异可能反映了其产成熟 IL-18 的能力。

**关键词:** 牛; 白细胞介素 18; RT-PCR

中图分类号: S852

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)09-0873-04

白细胞介素(IL-)18, 属于 IL-1 家族成员, 是机体先天性和获得性免疫的重要调节因子。IL-18 在慢性炎症、自体免疫性疾病、各种各样的癌变及众多传染病的发生过程中都有表达。IL-18 是在 1995 年由 Okamura 等首次从先经热灭活的痤疮丙酸杆菌感染, 后经脂多糖(LPS)攻毒的小鼠肝脏中克隆成功<sup>[1]</sup>。随着对人、犬、猪与禽等 IL-18 同源物的鉴定与研究, 对其免疫介导活性有了更深入的了解<sup>[2]</sup>。研究发现, 除了可以促进小鼠脾细胞诱导 IFN- $\gamma$  生成的能力, IL-18 还可以强化 T 细胞及 NK 细胞的成熟、细胞因子的产生及细胞毒作用的产生<sup>[3,4]</sup>。国内外关于牛 IL-18 的研究不多。本试验利用 RT-PCR 技术克隆了牛 IL-18 成熟蛋白的 cDNA, 在大肠杆菌中进行了高效表达, 得到了具有生物学活性的重组蛋白, 并对 IL-18 mRNA 在牛体内组织中的分泌水平进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

表达质粒 pET32a(+) 由陈溥言教授惠赠, 受

体菌 *E. coli* BL21(DE3) 购自 Novagen 公司。刀豆蛋白 A(ConA)、脂多糖(LPS)和 RPMI1640 购自 Sigma 公司。M $\sigma$ -MLV 反转录酶和内切酶购自 Promega 公司。ELISA 检测试剂购自华美生物公司。

### 1.2 细胞

从 2 月龄中国荷斯坦奶牛前腔静脉无菌采集抗凝血, 按照常规方法制备外周血单核细胞(PBMC)。无菌取肺、脾和肝脏, 分别制备单核巨噬细胞、单个脾细胞和肝细胞。用含有 5% 新生牛血清的 RPMI1640 生长液(Gibico BRL 公司)将细胞浓度调整到  $2 \times 10^6$ /mL, 然后加入终浓度为 0.1  $\mu$ g/mL 的 LPS, 置于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.3 总 RNA 的提取

细胞培养不同时间(0、1、3、6、18 h)后, 收集细胞, 按照操作说明使用 Trizol 试剂提取总 RNA, 用适量的不含 RNA 酶的水溶解, 进行紫外分析定量。

### 1.4 IL-18 cDNA 的 RT-PCR 扩增

根据 GenBank 注册的 IL-18 cDNA 基因保守序列, 设计一对特异性引物, 由大连宝生物公司合成。正向引物 F: 5'-GACCCATTGCATGGATCACTTT-3' (引入 *Nco*I 酶切位点和起始密码子), 反向引物 R: 5'-TGTGAATTCCATGAAAC-CAGAACTAGGAA-3' (引入 *Eco*R I 酶切位点), 产物大小预计为 480 bp, 包含了成熟 IL-18 的全长 cDNA。

分别以上述细胞和组织的总 RNA 5 $\mu$ g 为模板, 以 Oligo(dT)<sub>16</sub> 作为引物, 在 20  $\mu$ L 体系中使用

收稿日期: 2004-08-24

基金项目: 国家“十五”乳业重大科技专项(2002BA518A16); 山东省“三 0”工程基金(2003\_3009)

作者简介: 刘文强(1977-), 男, 山东临清人, 博士生, 主要从事动物传染病诊断与防治技术研究

\* 通讯作者: 赵宏坤, 0538-8241544 转 8111; E-mail: hkzhao@sdau.edu.cn

M $\sigma$ -MLV 酶于 37 ℃ 反应 1 h 进行反转录, 取 2  $\mu$ L 反转录产物作为模板, 以 F 和 R 作为引物, 在 25  $\mu$ L 体系中进行 PCR 反应, 包括 95 ℃ 变性 5 min; 94 ℃ 45 s, 65 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 共 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。结束后取 5  $\mu$ L 产物在 1% 琼脂糖凝胶中, 90V 电泳 1 h 观察结果。

将 PCR 产物用 *Nco*I 和 *Eco*R I 双酶切后, 将 bIL-18 基因克隆到 pET32a(+ ) 中, 转化 BL21 菌。挑选 2 个重组质粒送上海生工有限公司测序。

### 1.5 半定量 RT-PCR 测定 IL-18 mRNA 在体内组织的表达

对上述出现 RT-PCR 产物的细胞, 均取 LPS 活化一定时间的细胞作为模板, 按照上述操作进行反转录, 取 2  $\mu$ L 反转录产物(相当于原来 RNA 模板量为 20 ng), 以  $\beta$ -actin(相当于原来模板量为 2 ng) 作内对照进行 PCR 扩增, 对产物进行凝胶电泳, 然后用 UVP 成像系统采集溴化乙锭染色条带, 用图象分析软件分析条带密度, 将所得条带密度进行 IL-18/ $\beta$ -actin 计算。扩增  $\beta$ -actin 基因的引物参考文献[2], 扩增片段约为 700 bp。

### 1.6 牛 IL-18 的原核表达

将含有 IL-18 基因的重组质粒转化到 BL21 中, 在含有 1 mmol/L 的 IPTG 的 2 $\times$ YTA 培养液中进行诱导表达, 4 h 后取培养物进行 SDS-PAGE 分析, 电泳完毕后经考马斯亮蓝染色 2 h 后脱色, 分析其蛋白条带。

切下表达条带, 免疫小白鼠制备多克隆血清。

### 1.7 bIL-18 的纯化和活性

重组菌体诱导后, 离心收集菌体, 然后将沉淀重新悬浮于 10 mL 预冷的 PBS 中, 超声破碎菌体后, 以 12 000 g 离心 15 min, 收集沉淀。参考文献[5]介绍的方法溶解包涵体, 按照 Pharmacia 公司推荐流程纯化与组氨酸融合表达的 bIL-18 蛋白质, 将纯化后蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

以双夹心 ELISA 测定 bIL-18 对 MDBK 诱导 IFN- $\gamma$  的活性。按照常规方法包被酶标板, 用 1:20 稀释鼠抗牛多抗包被, 1% BSA 封闭, 二抗用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 经 NBT/BCIP 显色, 使用 Bio-Rad 450 型酶标仪读 A490nm 值。同时以重组牛 IFN- $\gamma$ (美国 MBI 公司) 做平行试验, 制作标准曲线, 计算样品中的 IFN- $\gamma$  含量。

参照文献[6]所述, 以 ConA 活化的牛 PBMC 为靶细胞, 以 MTT 比色法测定活细胞数, 测定 bIL-

18 体外表达产物对 PBMC 的增殖能力。

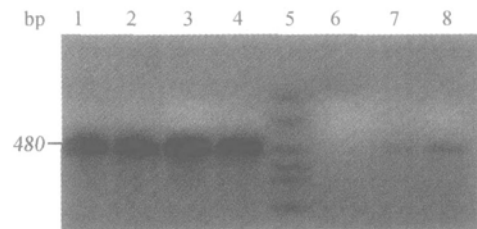
## 2 结果

### 2.1 牛 IL-18 基因的 RT-PCR 扩增

从肺泡巨噬细胞和 LPS 活化的脾细胞中提取细胞总 RNA, 经 RT-PCR 扩增到 480 bp 的目的片段, 对其分别进行了克隆和序列测定, 二者的核苷酸序列完全一致, 说明来自于不同组织的 IL-18 基因没有任何差异。结果表明本试验得到了牛 IL-18 成熟蛋白的完整 cDNA 序列, 即 bIL-18, 翻译为编码长度 159 氨基酸的蛋白多肽( GenBank 接受号: AY690486), 该序列与小鼠、人、犬、猪和牛 IL-18 核苷酸的同源性分别为 65%、78%、80%、90% 和 99.5%, 显示了该基因的保守性。

### 2.2 IL-18 mRNA 在各组织中的表达

RT-PCR 结果发现, 无论是否加入刺激剂, 肺泡巨噬细胞可以持续表达 IL-18 mRNA, 而 PBMC 加入刺激剂后作用不同的时间只可检测到微弱表达(图 1)。脾脏单核细胞需经过 LPS/ConA 刺激后才可检测到其表达, 即 LPS 未发挥作用以前(0 h) 检测不到 bIL-18mRNA 的表达, 但是 LPS 刺激 1 h 后就有表达, 在第 3~6 小时, 表达量较高, 到第 18 小时后, 表达急剧减少(图 2)。肝细胞的情况与脾类似。

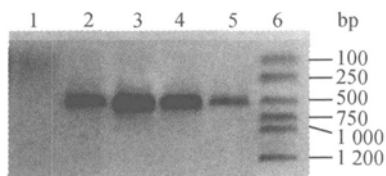


1~4. 肺泡巨噬细胞经 LPS 活化 0、1、3、6 h 后的 RT-PCR 产物; 5. DL2 000 Marker; 6. PBMC 培养 3 h 后的 RT-PCR 产物; 7. PBMC 经 LPS 活化 3 h 后的 RT-PCR 产物; 8. PBMC 经 ConA 活化 3 h 后的 RT-PCR

1~4. Products from alveolar macrophages activated by LPS/ConA for 0、1、3 and 6 h; 5. DL2 000 Marker; 6. Products from PBMC; 7. Products from PBMC activated by LPS for 3 h; 8. Products from PBMC activated by ConA for 3 h

图 1 肺泡巨噬细胞和 PBMC 的 RT-PCR 产物  
Fig. 1 RT-PCR products from alveolus macrophage cells and PBMC

从图 3 可以大致比较出各种细胞分泌 IL-18



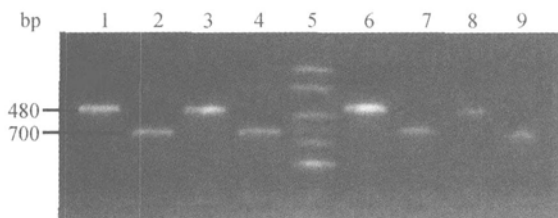
1~ 5.脾细胞经 LPS 活化 0、1、3、6、18 h 后的 RT-PCR 产物; 6. DL2 000 Marker

1~ 5. RT-PCR products from spleen activated by LPS for 0, 1, 3, 6 and 18 h respectively; 6. DL2 000 Marker

图 2 LPS 活化脾细胞不同时间的 RT-PCR 产物

Fig. 2t RT-PCR products from spleen

mRNA 的相对水平。经分析,以脾脏为 1.0,各项 IL-18/ $\beta$ -actin 计算结果如下:肺泡巨噬细胞  $1.18 \pm 0.22$ ,肝脏  $1.02 \pm 2.56$ ,PBMC  $0.735 \pm 0.62$ 。



1、3、6、8.脾脏、肝脏、肺泡巨噬细胞和 PBMC 的 IL-18 RT-PCR 产物; 2、4、7、9. 上述各细胞的  $\beta$ -actin RT-PCR 产物; 5. DL2 000 Marker

1, 3, 6, 8. IL-18 products from spleen, liver, lung and PBMCs treated by LPS for 3h respectively;

2, 4, 7, 9.  $\beta$ -actin products from spleen, liver, lung and PBMC respectively; 5. DL2 000 Marker

图 3 各细胞 IL-18/ $\beta$ -actin RT-PCR 产物电泳结果

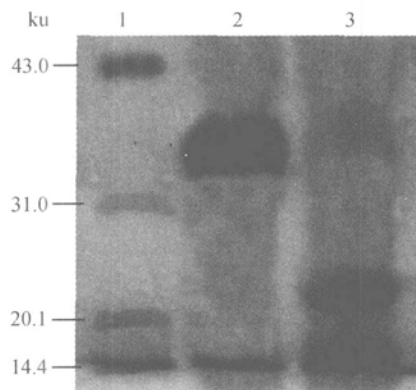
Fig. 3 IL-18/ $\beta$ -actin RT-PCR products

### 2.3 牛重组 IL-18 的表达

重组质粒在 BL21 中得到表达, SDS-PAGE 分析表明得到了约 38.5 ku 的融合蛋白条带(图 4),因此, IL-18 约为 18.3 ku, 与文献报道一致。表明 IL-18 基因在大肠杆菌中得到了表达。薄层扫描分析表明蛋白表达量约为 33%。

### 2.4 重组蛋白的纯化和活性

以回收的纯化蛋白为样品,以空白质粒胶块研磨后的上清液为对照,进行牛 PBMC 增殖刺激性检测,样品的  $OD_{570\text{nm}}$  平均值为  $2.189 \pm 0.003$ ,而对照为  $0.012 \pm 0.001$ 。结果表明,回收的纯化蛋白对 PBMC 有显著的刺激增殖作用,具有较强的生物学活性。



1. 低分子量标准蛋白质; 2. 重组质粒表达产物; 3. pET32a(+) 空载体表达产物

1. Low molecular protein marker; 2. Products of recombinant bIL-18 expressing in plasmid pET32a(+); 3. Products of plasmid pET32a(+)

图 4 表达重组 bIL-18 菌株的 SDS PAGE 分析

Fig. 4 SDS PAGE result of the recombinant bacteria expressing bIL-18

以 MDBK 为反应细胞发现,加入 bIL-18 后,加入一定浓度 bIL-18 后,细胞培养上清中 IFN- $\gamma$  含量明显升高。证明该蛋白表达产物具有刺激靶细胞分泌 IFN- $\gamma$  的能力。

### 3 讨论

最先报道的 IL-18 来源于小鼠肝脏,其 cDNA 编码由 192 个氨基酸组成的前体多肽,经 Caspase-1 切开形成 157 个氨基酸的成熟蛋白,分子量约为 18 ku。除了家禽外,其它动物的 IL-18 分子量与小鼠类似。几乎所有哺乳动物及禽类的 IL-18 都得到了克隆。我们利用 RT-PCR 技术在活化的脾脏和肺脏中克隆到牛 IL-18 成熟蛋白基因,与其它动物的 IL-18 基因序列高度同源,属于同一个进化分支。试验通过 pET32a(+) 原核表达系统在大肠杆菌中表达了含有 bIL-18 的融合蛋白,且该蛋白具有一定的免疫和生物学活性。

在人类, IL-18 主要是由巨噬细胞样细胞产生的。以前的研究表明,不论是否加入活化剂,牛外周血来源的单核巨噬细胞都可以持续的表达 IL-18 mRNA<sup>[7]</sup>,本研究发现牛肺脏巨噬细胞的表达情况与之相同。IL-18 的这种特性与 IL-12 有着明显的区别,因为 LPS 和 ConA 可以上调 IL-12 mRNA 的表达。牛 PBMC 只是微弱的表达 IL-18 mRNA,这

与人及小鼠存在着明显差异,后两者的 PBMC 一般都可稳定分泌 IL-18 mRNA。肝脏和脾脏细胞经 LPS/ConA 活化后可以检测到 IL-18 mRNA 的表达。这种在不同细胞中表达的差异可能反映了其产生成熟 IL-18 的能力。对牛白细胞介素 18 基因克隆和表达及其 mRNA 在体内各细胞水平的分析为进一步研究 IL-18 的作用机理和应用奠定了基础。

IL-18 是一种多效应的细胞因子,必须切除信号肽才表现出活性<sup>[8]</sup>。本研究中表达的 bIL-18 融合蛋白, N 端加入了起始氨基酸,以保持其完整蛋白的活性,这为其表达产物作为佐剂或者治疗剂在临床的应用,以及研究 bIL-18 在各种疾病中的免疫调节作用奠定了基础。

#### 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] Kohno K J, Kataoka T, Ohtsuki Y, et al. IFN- $\gamma$ -inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12 [J]. *J Immunol*, 1997, 158: 1 541~ 1 550.
- [3] Puren A J, Fantuzzi G, Dinarello C A. Gene expression synthesis and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 $\beta$  are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells[J]. *Immunology* 1999, 96: 2 256~ 2 261.
- [4] 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]. *J Immunol*, 1996, 156(11): 4 274~ 4 279.
- [5] 卢圣栋, 马清钧, 刘德培, 等. 现代分子生物学技术 [M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1999. 71~ 292.
- [6] 唐漫书, 高 荣, 孟民杰, 等. 猪白细胞介素 26 基因的原核表达及其活性研究[J]. *四川大学学报*, 2002, 39: 753~ 754.
- [7] Shoda L K, Zarlenga D S, Hirano A, et al. Cloning of cDNA encoding bovine interleukin 18 and analysis of IL-18 expression in macrophages and its IFN- $\gamma$ -inducing activity [J]. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 1999, 19: 1 169~ 1 177.
- [8] Muneta Y, Zhao H K, Inumaru S, et al. Large-scale production of porcine mature Interleukin 18(IL-18) in silkworms using a hybrid baculovirus system[J]. *J Vet Med Sci*, 2003, 65: 219~ 223.

### cDNA Cloning and Expression of Mature Bovine Interleukin-18 Gene

LIU Wen-qiang<sup>1</sup>, HU Jing-dong<sup>1</sup>, YANG Shao-hua<sup>2</sup>, ZHAO Hong-kun<sup>1,2\*</sup>,  
GAO Yur-dong<sup>2</sup>, ZHONG Ji-feng<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 2. Milk Cow Center of Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

**Abstract:** We isolated and sequenced a 480 bp cDNA encoding mature bovine interleukin-18 (bIL-18) from alveolar macrophages and splenocytes activated with LPS by RT-PCR. The bIL-18 gene was cloned into pET32a (+) vectors and sequenced. Nucleotide sequence of bIL-18 shares high homology with cattle. Functional expression with pET32a (+) of bIL-18 of about 38ku was obtained by SDS-PAGE analysis after induction by IPTG in the *E. coli* BL21 expression system. The recombinant protein can augment T cell proliferation ConA-stimulated and IFN- $\gamma$  production by MDBK. The IL-18 mRNA was constitutively detected in bovine alveolar macrophages with or without LPS, While, enhanced expression was detected in splenocytes and liver cells if treated by LPS, and can be weakly detected in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) treated by activators. Significant deference of IL-18 mRNA level may reflect the capacity to produce mature IL-18 in such tissues.

**Key words:** cattle; interleukin 18; RT-PCR

\* Corresponding author