

鸡 IL-18 原核表达工程菌遗传稳定性与 表达产物的生物学活性检测

赵敏^{1,2}, 张春杰^{1*}, 程相朝¹, 李银聚¹, 吴庭才¹, 杨涛²

(1. 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003;

2. 河南农业职业学院 动物科学系, 河南 中牟 451450)

摘要: 通过对鸡白细胞素 18(IL-18)原核表达工程菌 BL21-ChIL-18 遗传稳定性、表达产物的 Western-blot 及其经 Sephadex G-100 纯化后的 ELISA 和淋巴细胞转化试验分析, 以检测其遗传稳定性及其表达产物的生物学活性。结果表明, 该重组工程菌能稳定地表达鸡 IL-18, 表达产物不仅能够与抗鸡 IL-18 的多克隆抗体发生反应, 而且具有刺激淋巴细胞增殖并诱导其分泌 γ 干扰素的作用, 为研究鸡 IL-18 在鸡体内的生物学功能奠定了基础。

关键词: 鸡; 白细胞素 18; 原核表达; 生物活性

中图分类号: Q784 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)02-0138-04

Heredity Stability and Bioactivity of Prokaryotic Engineering Bacteria Strain Expressing Chicken IL-18

ZHAO Min^{1,2}, ZHANG Chun-jie^{1*}, CHENG Xiang-chao¹, LI Yin-ju¹, WU Ting-cai¹, YANG Tao²

(1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. Animal Science Department, Henan Vocational College of Agriculture, Zhongmu 451450, China)

Abstract: In order to detect the heredity stability and bioactivity of prokaryotic engineering bacteria strain BL21-ChIL-18, its heredity stability and Western-blot analysis of its products were performed and other bioactivity of Sephadex G-100 column purified products were analyzed by ELISA and MTT. The results showed that the recombinant engineering strains can stably express chicken IL-18. Expression products can react with polyclonal antibody anti-chicken IL-18 and induce T lymphocytes proliferation and secreting IFN- γ *in vitro*. This laid a foundation for further research and the biological function within the chicken body studies.

Key words: Chicken; IL-18; Prokaryotic expression; Bioactivity

白细胞素 18 (Interleukin-18, IL-18) 是一种重要的细胞因子, 在宿主防御^[1]、抑瘤抗癌^[2-3]、抗变态反应^[4]等方面具有重要作用。同时 IL-18 作为天然的免疫调节剂和疫苗佐剂^[5], 克服了使用传统药物成本高, 副作用大等缺点, 是一种可以替代传统疗法的新型免疫调节剂, 具有巨大的应用前景。随着分子生物学技术的快速发展, 细胞因子已由基础研

究逐步转向应用研究。但目前国内外对 IL-18 的研究仍主要集中在人和鼠等哺乳动物上, 而对鸡 IL-18 的研究则相对滞后。2000 年, Schneider 等^[6]首次克隆出鸡 IL-18 基因, 才使对鸡 IL-18 的研究进入分子水平, 但对其体外表达和生物学活性检测等深层次的研究进展仍较缓慢。鉴于此, 对河南科技大学预防兽医教研室构建的鸡 IL-18 (ChIL-18) 重

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 河南省自然科学基金项目 (0511032300)

作者简介: 赵敏 (1983-), 女, 河南中牟人, 硕士, 主要从事免疫学与病原学研究。E-mail: minminzha@126.com

*通讯作者: 张春杰 (1965-), 女, 河南南阳人, 教授, 博士, 主要从事病原微生物与免疫学研究。E-mail: cjzhang@sina.com

组工程菌的遗传稳定性及其表达产物的生物学活性进行了分析,旨在为研究鸡 IL-18 的进一步表达与应用及其在鸡体内的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、载体及抗体

含有 ChIL-18 基因重组表达载体 pET28a-ChIL-18 的工程菌 (BL21-pET28a-ChIL-18)、兔抗鸡 IL-18 抗体,均由河南科技大学预防兽医教研室构建、制备和保存^[7]。

1.2 主要酶和试剂

酵母用蛋白胨、酵母提取物 (OXOID)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、蛋白 Marker、考马斯亮蓝 (Sigma)、IPTG、Sephadex G-100、ConA (Sigma)、MTT (Sigma)、INF- γ ELISA 检测试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG,购自北京博奥森生物技术有限公司;增强型 HRP-DNA 底物显色液,购自天根生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 ChIL-18 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

将含重组质粒 pET28a-ChIL-18(具有卡那霉素抗性)的工程菌 BL21-ChIL-18 接种于 LB-Kana 平板上,37℃培养后挑取一单克隆菌落接种于 LB 培养液中(含卡那霉素 100mg/L),37℃下 120 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.3~0.5 时,用终浓度为 0.6mmol/L 的 IPTG 进行诱导。5h 后收集菌体,经 SDS 凝胶上样缓冲液重悬后超声波破碎,沸水浴 3min 后,冰浴 2min,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳。然后用半干式转印法调节电流为 1mA/cm²,将胶条上的蛋白质分子转至硝酸纤维素膜上。以 50g/L 脱脂乳封闭,TBS 洗涤后,加入以 1:1000 TBS 稀释的兔抗鸡 IL-18 抗体,温育 2h 后洗涤,再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 温育 1h,洗涤后,加入 DAB 显色液,避光显色至出现条带时用双蒸水终止反应。

1.4 重组菌的遗传稳定性分析

挑取 BL21-ChIL-18 工程菌种接种于 20mL LB (不含卡那霉素)液体培养基,37℃培养 24h,10⁵~10⁶稀释后分别涂布在 LB-Kana(含卡那霉素 100mg/L)和 LB(不含卡那霉素)平板上,同时以此菌种按 1%的比例接种到新的不含 Kana 的 LB 液体培养基中继续传代,剩余菌种-70℃保存备用,依次类推传到 50 代后,分别计算各代重组菌在 LB-

Kana 板和 LB 培养板上的菌落个数比值,同时按 1.3 中的方法对每代菌种进行诱导表达,分析其表达水平的变化,以鉴定重组菌质粒的遗传稳定性。

1.5 ChIL-18 蛋白的纯化与定量

按 1.3 中的方法对重组菌大量诱导表达后,收集菌体用裂解液 (Tris 0.2mol/L, EDTA-Na₂ 0.05mol/L, pH 7.6)重悬后,超声波破碎,离心,收集包涵体,用裂解液洗涤 2 次,再用 6mol/L 的盐酸胍溶解沉淀。然后按 1:50 体积加复性液 (0.1mol/L Tris 1000mL, 2.5mmol/L CuCl₂ 10mL, 氧化型谷胱甘肽 0.002mol/L, 还原型谷胱甘肽 0.01mol/L),每分钟 50 滴。之后用 0.1mol/L 的 PBS 充分透析、浓缩,最后用 Sephadex G-100 进行分子筛层析。先将预处理的 Sephadex G-100 装柱,再用 0.1mol/L 的 PBS 平衡滤柱至电导率、紫外吸收率、pH 值均稳定,在不含有其他杂质的条件下,加入 1mL 蛋白样品,用相同的 PBS 洗脱,流速为 0.3mL/min。根据不同的峰值收集不同蛋白组分,进行 SDS-PAGE 电泳检测。然后以牛血清白蛋白为标准蛋白质,用 Bradford 法检测纯化目的蛋白的浓度,并对其进行定量,以备进行生物学活性检测。

1.6 ChIL-18 蛋白促进鸡外周血淋巴细胞增殖试验

无菌采取健康鸡血,按细胞培养手册分离鸡 PBM C,用 RPMI1640 完全培养液调整细胞密度为 3×10⁶ 个/L。在 96 孔板中每孔加入 100 μ L 细胞悬液,并将细胞分成 4 组,除对照组(细胞悬液)外,另 3 组分别加入 ConA (10mg/L)、IL-18 (50 μ g/L)、ConA (10mg/L)+IL-18 (50 μ g/L),每组设 3 个重复,于 37℃,5% CO₂ 孵育箱中培养 72h 后,加入 MTT 溶液,继续培养 4~6h,终止反应后用酶联检测仪检测波长为 578nm 下的吸光度值。结果用刺激指数 (SI) 表示:SI=(试验组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值)。

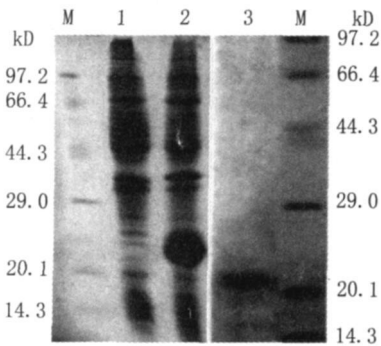
1.7 ChIL-18 蛋白促进鸡外周血淋巴细胞分泌 γ 干扰素试验

取健康鸡 1 只,无菌采血,分离淋巴细胞并调整细胞密度为 5×10⁶ 个/L。然后将细胞分成 4 组:不同质量浓度的重组鸡 IL-18(分别为 25、50、100、150、200、250、300、350 μ g/L)+10mg/L ConA 组、10mg/L 的 ConA 组、细胞对照组与 RPMI1640 空白组,每组及每个质量浓度各设 3 个重复,于 37℃,5% CO₂ 孵育箱中培养 48h 后,取上清,用鸡的 γ 干扰素 ELISA 试剂盒检测各细胞培养孔内 γ 干扰素含量。

2 结果与分析

2.1 ChIL-18 蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

挑取单克隆重组菌及空载体对照菌, 用 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h 后进行 SDS-PAGE 检测。结果显示, 与空载体对照菌相比, 重组菌诱导表达液在 23.0 kD 处有明显的条带出现, 与理论预测分子量基本相符。进一步进行 Western-blot 分析后, 确证重组菌 BL21-ChIL-18 表达了能与抗鸡 IL-18 抗体发生血清学反应的鸡 IL-18(图 1)。

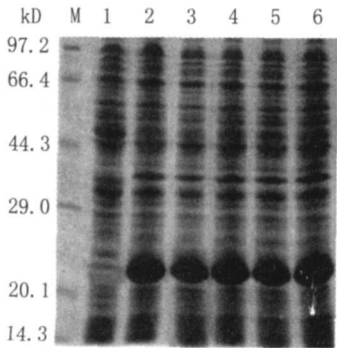


M. 蛋白Marker; 1. 空载体对照菌诱导产物; 2. 诱导产物的 SDS-PAGE; 3. 诱导产物的 Western-blot

图 1 重组菌 BL21-ChIL-18 诱导产物的 SDS PAGE 与 Western blot 图谱

2.2 重组菌 BL21-ChIL-18 的遗传稳定性分析结果

工程菌连续传代培养后, 第 10 代、20 代、30 代、40 代、50 代在 LB-Kana 和 LB 培养基上的生长菌落数并无差异, 且工程菌目标蛋白的表达水平也没有明显差异(图 2)。



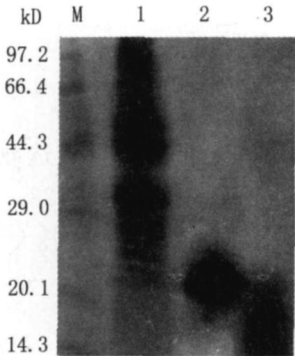
M. 蛋白Marker; 1. 空白对照; 2. 第10代; 3. 第20代; 4. 第30代; 5. 第40代; 6. 第50代

图 2 各代重组菌 BL21-ChIL-18 的表达水平

2.3 ChIL-18 蛋白的纯化结果

采用 Sephadex G-100 分子筛层析对重组蛋白进行分离纯化后, 收集 3 个蛋白峰的组分, 进行 SDS-

PAGE 分析, 发现第 1 个峰和第 3 个峰洗脱出较多的杂蛋白, 而第 2 个峰为目的蛋白所在峰, 洗脱出几乎没有杂蛋白、分子量约为 23.0 kD 的目的蛋白, 表明纯化效果良好(图 3)。



M. 蛋白Marker; 1. 峰1蛋白; 2. 峰2蛋白; 3. 峰3蛋白

图 3 ChIL-18 蛋白的纯化效果

2.4 ChIL-18 蛋白促进鸡外周血淋巴细胞增殖试验结果

各组淋巴细胞 SI 均值(图 4), 经 SPSS 软件分析后得知, 对照组与其他 3 组差异极显著 ($P < 0.01$), ChIL-18+ConA 组分别与对照组、ChIL-18 组和 ConA 组差异极显著 ($P < 0.01$), ChIL-18 组虽稍高于 ConA 组但无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明重组 ChIL-18 同天然 ChIL-18 一样, 可以单独也可以协同合适剂量的 ConA 促进淋巴细胞增殖。

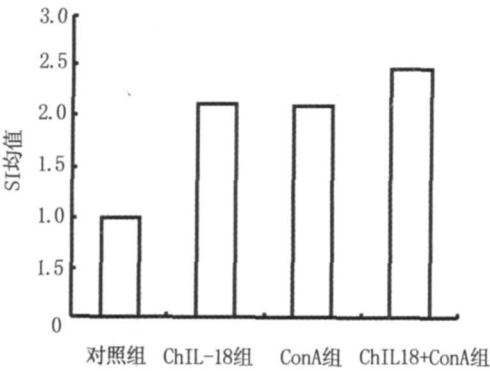


图 4 ChIL-18 诱导鸡淋巴细胞增殖结果

2.5 分泌 γ 干扰素试验结果

IL-18 可以诱导 Th1 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ , 这是它最主要的一个生物学功能。本试验分离淋巴细胞后, 采用 ELISA 试剂盒检测不同质量浓度重组鸡 IL-18 蛋白诱导淋巴细胞分泌 γ 干扰素情况。结果除了对照组、ConA 组和 25 μ g/L 的 IL-18+ConA 组未检测到 γ 干扰素产生外, 其他各组分别产生了不同质量浓度的 γ 干扰素(图 5)。其产生的 γ 干扰素的量与鸡白介素 18 的量呈正相关。

表明重组 ChIL-18 同天然 ChIL-18 一样具有诱导鸡淋巴细胞产生 γ 干扰素的活性。

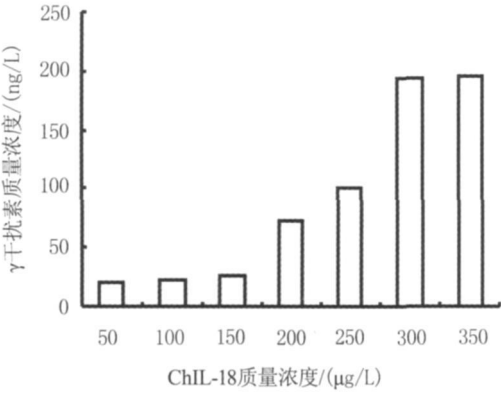


图 5 不同质量浓度 ChIL-18 诱导鸡淋巴细胞产生 IFN- γ 结果

3 讨论

在微生物应用和研究方面, 重组工程菌中质粒的稳定性对于有效发挥工程菌的作用及大规模发酵和制备产物至关重要, 因而受到广泛的重视。依据重组质粒的变化本质, 可将其不稳定性分为 2 种类型: 分裂不稳定和结构不稳定。分裂不稳定指工程菌分裂时出现一定比例不含质粒的子代菌的现象, 结构不稳定指外源基因从质粒上丢失、缺失或碱基重排所致工程菌性能的改变。影响质粒载体稳定性的主要因素有新陈代谢的负荷, 拷贝数的差度和寄主的重组体制^[8], 但是重组质粒赋予宿主细胞的抗药性, 使得宿主在短期内能迅速适应改变的环境条件, 获得生长优势。在本研究中, 构建的重组工程菌 BL21-pET28a-ChIL-18 经连续传 50 代后, 在 LB-Kana 和 LB 培养基的生长形态及特性无明显差异, 目的基因的诱导表达结果也表明, 不同传代次数的工程菌具有相似的表达能力, 说明该重组工程菌具有良好的遗传稳定性, 这对于该工程菌种应用于生产是有利的。

鸡 IL-18 是一种具有多种生物学活性的细胞因子, 能够促进 T 细胞、NK 细胞的增殖, 刺激 T 细胞及 NK 细胞分泌 IFN- γ , 增强穿孔素及 FasL 介导的细胞毒作用, 并能将 NK 细胞、吞噬细胞介导的非特异性免疫与 Th、Tc 细胞介导的特异性免疫有机地结合起来, 从而在增强免疫、抗肿瘤、抗感染等方面发挥重要作用, 是一种有效的免疫佐剂和治疗型制剂。而且 IL-18 无免疫原性, 不会引起自身免疫性疾病, 从而克服了传统佐剂的一大主要缺点, 在畜禽养殖业中有较好的应用前景。

目前, 哺乳动物 IL-18 的研究已经十分广泛深入, 人和鼠的 IL-18 已有产品, 但禽 IL-18 与哺乳动物 IL-18 的序列同源性普遍较低 (30% ~ 50%)^[6]。系统进化树分析结果表明^[9], 鸡 IL-18、火鸡 IL-18 与哺乳动物分成明显 2 个不同的组。因此, 为了能够使鸡 IL-18 早日进行标准化生产, 本试验对构建的工程菌 BL21-pET28a-ChIL-18 的遗传稳定性分析的同时, 对其表达的鸡 IL-18 重组蛋白的生物学活性进行了初步鉴定。结果表明, 表达的鸡 IL-18 蛋白纯化后同天然鸡 IL-18 一样具有诱导淋巴细胞产生 IFN- γ 和促进 T 细胞增殖的生物学活性, 而且诱导淋巴细胞产生 IFN- γ 时不需要协同 IL-2, 这与人 IL-18 体外活性检测的报道不同^[10], 为进一步研究鸡 IL-18 的作用机制及其在鸡体内的生物学功能奠定了基础。

参考文献:

[1] Tanaka H, Narita M, Teramoto S, *et al.* Role of interleukin-18 and T- helper type 1 cytokines in the development of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adults[J]. *Chest*, 2002, 121(5): 1493-1497.

[2] Marshall DJ, Rudnick KA, McCarthy SG, *et al.* Interleukin-18 enhances Th1 immunity and tumor protection of a DNA vaccine[J]. *Vaccine*, 2006, 24(3): 244-253.

[3] 李宏梅, 胡敬东, 郭慧君, 等. 重组鸡白细胞介素 18 (rChIL-18)对 MDV 感染 SPF 鸡细胞免疫的影响[J]. *中国兽医学报*, 2007, 27(5): 624-627.

[4] Eaton AD, Xu D, Garside P. Administration of exogenous interleukin-18 and interleukin-12 prevents the induction of oral tolerance[J]. *Immunology*, 2003, 108: 196-203.

[5] 曹素芳, 黄青云. 鸡 IL-18 对禽多杀性巴氏杆菌 DNA 疫苗的免疫佐剂作用[J]. *中国兽医科学*, 2007, 37(12): 1058-1061.

[6] Schneider K, Puchler F, bacubrlle D, *et al.* cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, 20(10): 879-883.

[7] 刘一尘, 张春杰, 程相朝, 等. 鸡 IL-18 成熟蛋白基因原核表达载体的构建及多克隆抗体的制备[J]. *河南农业科学*, 2009(2): 110-113.

[8] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京: 科学出版社, 1998.

[9] Kaiser P. Turkey and chicken interleukin-18(IL-18) share high sequence identity, but have different polyadenylation sites in their 3' UTR[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2002, 26(8): 681-687.

[10] 杨莉莉, 魏枫, 刘虹, 等. 重组人白介素 18 在毕赤酵母中的高效分泌表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(11): 1040-1043.