维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0524-04

IL-18 在大肠杆菌中的可溶性表达和纯化

彭 彦,王 勇,宋方洲,王亚平

(重庆医科大学生物化学与分子药理重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人 IL-18 成熟蛋白(mhIL-18)在大肠杆菌中的高效的非包涵体表达以及纯化方案。方法:利用 PCR 方法扩增出 mhIL-18 基因,构建融合型表达载体 pPTYB1-IL18,转化入大肠杆菌 ER2566 中,IPTG 诱导表达,优化表达条件,超声裂解细胞,采用 SDS-PAGE 和 Western blot 分析重组蛋白的表达,亲和层析后用 MTT 法检测表达 mhIL-18 的活性。结果:成功构建载体并转化入 ER2566 后,经 IPTG 诱导,表达量可占菌体总蛋白的 26 %以上,其中 80%以上的 mhIL-18 融合蛋白以可溶、有活性的形式存在。亲和层析后的 mhIL-18 纯度可达 95%,具有显著的 IL-18 的生物学活性。结论:成功的在大肠杆菌中的高效以非包涵体表达 mhIL-18,并具有显著的 IL-18 的生物学活性。

【关键词】白介素 -18; 原核; 表达; 纯化

【中国图书分类法分类号】R34.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-12-31

High lever soluble expression and purification of recombinant human IL-18 in E.coli

PENG Yan,et al

(*Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacolog, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Objective To study high-level expression and purification of recombinant mature human IL-18 (mhIL-18) in E. coli with soluble form. *Methods*: The gene of mhIL-18 was amplified with PCR. Then, the recombinant expression plasmid pTYB1IL-18 was constructed by cloning mhIL-18 into pTYB1 vector and transformed to E.coli ER2566.IPTG was added into the E.coli ER2566 culture to express recombinant fusion protein. After the harvested bacteria dispersed with ultrasound, SDS-PAGE and Western blot were used to analyze the expression of recombinant fusion protein. The activity of mhIL-18 which had been purified by affinity chromatography was tested by MTT. *Results*: The cloned sequence of mhIL-18 was identical with the sequence in GenBank. After the induction by IPTG inducing, the fusion protein of mhIL-18 covered over 26% total bacterial proteins, which included 80% active fusion protein. Purification of recombinant expressed mhIL-18 purity was 95%, which had the activity of the mhIL-18. *Conclusion*: High level expression and purification of recombinant human IL-18 is succeeded which has the activity.

【Key words】 Interleukin-18; Prokaryotic; Expression; Purification

白介素 18(IL-18)是 Okamura 于 1995 年发现的一种细胞因子[1]。该因子除可以诱生 Th1 细胞产生 IFN-(、IL-2 和 GM-CSF 等细胞因子外,还可与许多细胞因子相互作用,促进 T 淋巴细胞增殖,增强 NK 细胞的细胞毒活性以及 Th1 细胞的 Fas L 表达等,参与机体各种免疫反应过程,对机体起着重要的免疫调节和保护作用。其主要的生物学活性表现在:1)宿主防御功能,如抗病毒、抗结核分支杆菌、抗真菌等[2]。2)抗肿瘤免疫[3]。3)前炎因子活性[4]。4)抗变态反应性疾病作用等[5]。因此,IL-18 不论在基础研究,还是在临床运用方面都具有潜在的巨大的运用前景[6,7]。

近几年有学者开始从事人 IL-18 在原核的克隆表达研究,但表达的 IL-18 均以包涵体形式存在。包涵体复性是非常繁琐、复杂的过程;而且复性效率较低,表达蛋白的活性也会受到影响,不利于 IL-18 的生产和运用。本研究的目的就是采用不同的原核表达系统,改变、优化诱导表达条件,探索以非包涵体形式高效表达 IL-18 的途径。

作者介绍:彭 彦(1972-),硕士、讲师,
主要研究方向:细胞生物学、分子生物学。

基金项目:渝教科 2001[12],重庆医科大学重点基金(Cx200101)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 主要试剂

TRYPTONE 和 YEAST EXTRACT 购于 OXOID 公司。HEPES、质粒抽提盒和胶回收试剂盒购于华美公司。T4DNA 连接酶购于美国 Promage 公司。高保真 Pyrobest、dNTP 及限制性内切酶 NheI 和 XhoI 购于 Takara 公司。CHITIN BEADS 以及抗体 ANTI-CHITIN BEADS 购于 NEB。羊抗兔抗体、DAB 试剂盒及硝酸纤维膜购于北方同正公司。Protein marker 和 DNA marker 分别购于 MBI 和 Takara。

1.2 菌种、引物和质粒

含 IL-18 基因载体由王勇副教授于中国医学科学院血液病研究所构建。pTYB1 购于 New England Biolabs 公司。相关引物由上海博亚合成。ER2566 来源于重庆医科大学生化教研室。

1.3 方法

1.3.1 目的基因 PCR 以我室采用 RT-PCR 法得到的人 IL-18 前蛋白基因（580bp）为模板用高保真 Pyrobest 酶进行 PCR，扩增成熟 IL-18（mhIL-18）基因片段(471bp)。设计引物的时候，两端各加上一个限制性内切酶：Nhe I 和 Xho I：

P1:5′ (—CTAGCTAGCTACTTTGGCAAGCTTGAATC—3′

P2:5′ (—CCGCTCGAGGTCTTCGTTTTGAACAGT—3′

反应条件为：94℃预变性 5 min；循环条件为 94℃，30 秒；60℃，30s；72℃，30s；30 个循环；最后 72℃，10 min。

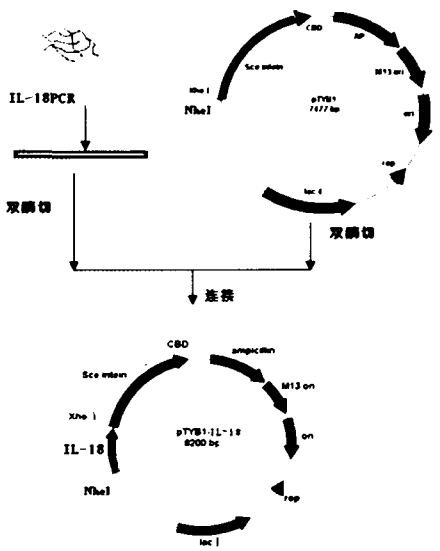


图 1 载体构建示意图

1.3.2 构建重组质粒

胶回收试剂盒回收的 PCR 产物，经 Nhe I 和 Xho I 分别酶切纯化后与同样经过 Nhe I 和 Xho I 分别酶切纯化的载体在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接反应。转化入 E.coli ER2566，通过酶切、PCR 筛选阳性克隆，最后对阳性克隆的插入片段进行 DNA 测序。

1.3.3 诱导表达及表达条件的优化 在 LA 平板挑 ER2566（DE3）单克隆菌于 LA 培养基，37℃剧烈震荡培养过夜，按 1∶100 比例稀释至 600ml LA 培养基中，继续培养 3 h 至 OD600=0.6-0.8，分成 A、B、C、D、E、F 共 6 组，分别给予 20℃、22℃、24℃、26℃、28℃和 30℃不同的温度诱导；每组又分为均等的 10 个小培养瓶，分别给予不同的诱导剂 IPTG 浓度（0.1mmol/L~1mmol/L），继续培养 6 h，每小时分别取样，离心取沉淀。

用 10 倍菌体积的 Cell Lysis Buffer 重悬细菌，进行超声破菌。破菌条件：冰浴，300W（10s × 90，每次间隔 10s）所得悬液产物于 4℃，12000 r/min 离心 15 min。上清液和沉淀分别进行 10%SDS-PAGE。

1.3.4 Western blot SDS-PAGE 电泳结束后，从玻璃板中取出用适量的转移缓冲液室温平衡凝胶；电转仪中进行转膜，转膜后 TTBS 封闭液作用；加入一抗工作液，4℃孵育；加入用 TTBS 按 1:2500 稀释的辣根过氧化物酶标记二抗工作液，室温中缓慢摇动 1 h；充分洗膜；将滤膜置于 DAB 显色液中显色，用蒸馏水洗膜，终止反应；晾干、扫描并进行图像分析。

1.3.5 表达的 mhIL-18 的纯化 先用 10 倍体积的 Column Buffer 平衡几丁质柱子。把超声破菌后的上清加入几丁质柱子，控制流速，使每分流量小于 0.5 ml。加入 Cleavage Buffer，关闭柱子出口，4℃过夜。用 Column Buffer 冲洗柱子，收集剪切下的 mhIL-18。

1.3.6 表达的 mhIL-18 蛋白定量和活性测定 首先用上海申能博彩公司的 BCA 蛋白定量试剂盒，对纯化的 mhIL-18 进行定量。其次，按细胞培养手册上常规方法提取淋巴细胞。分离健康人 PBMC，用 RPMI1640-FCS 调整细胞浓度为 4×10^6/ml。设 4 组，每组设 6 复孔，在 96 孔板中每孔加入 100 μl 细胞悬液。除空白对照组外，另 3 组分别加入 0.5 μg PHA，mhIL-18，0.5 μg PHA+mhIL-18（100 pg/ml）。最后加入 RPMI1640-FCS，使每孔培养体系为 200 μl，以 37℃，5% CO_2 孵箱培养 72h。然后用 MTT 法检测。

2 结 果

2.1 IL-18 基因的 PCR 扩增，构建载体的鉴定

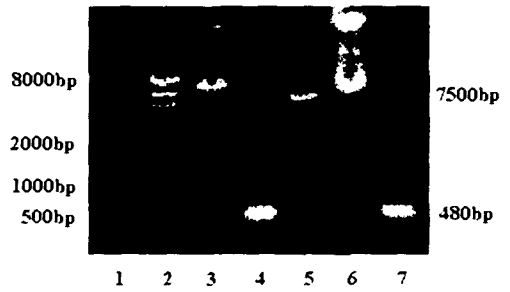
通过对 IL-18 基因的 PCR 扩增得到 480bp 左右的片段（如图 2 中 7 泳道）。重组载体鉴定：PCR 鉴定：所构建的 pTYB1-IL18 质粒作 PCR 得到 480bp 左右的片段（如图 2 中 4 泳道）。酶切鉴定：重组 pTYB1IL-18 载体双酶切得到大小相同的片段。（如图 2 中 5 泳道），初步证明构建载体成功。

测序结果（如图 3）与 GenBank 上人 IL-18 基因序列完全一致，读码框也完全正确。证明构建重组载体 pTYB1IL-18 成功。

2.2 诱导蛋白的表达

与空白对照相比，诱导表达的 ER2566 含重组

维普资讯 http://www.cqvip.com

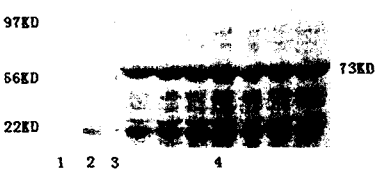


1.DNA marker DL2000
2.DNA mrker λ Hind Ⅲ
3.Plasmid pTYB1
4.PCR product of recombinant plasmid pTYB1-IL-18
5.Recombinant plasmid pTYB1-IL-18 digested by NheI/Xho/I
6.Recombinant plasmid pTYB1-IL-18
7.PCR product of mIL-18

图 2 IL-18 基因的 PCR 扩增,构建载体 pTYB1-IL-18 的鉴定

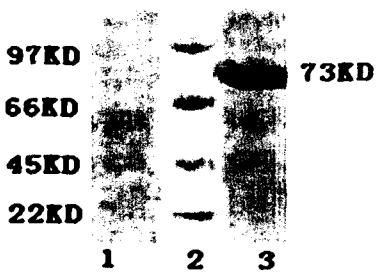
1 gctagctactttggca agcttgaatc taaattatca gtcataagaa atttgaatga ccaagttctc
67 ttcattgacc aaggaaatcg gcctctattt gaagatatga ctgattctga ctctagagat
127 aatgcacccc ggaccatatt tattataagt atgtataaag atagccagcc tagaggtatg
187 gctgtaacta tctctgtgaa gtctgagaaa atttcaactc tctccgctga gaacaaaatt
247 atttccttta aggaaatgaa tcctcctgat aacatcaagg atacaaaaag tgacatcata
307 ttctttcaga gaagtgtccc aggacatgat aataagatgc aatttgaatc ttcatcatac
367 gaaggatact ttctagcttg tgaaaaagag agagaccttt ttaaactcat tttgaaaaaa
427 gaggatgaat tgggggatag atctataatg ttcactgttc aaaacgaaga cctcgag

图 3 测序结果



1.ER2566 without vector
2.Recombinant ER2566 without induction
3.Protein marker
4.Induction and expression of recombinant ER2566

图 4 mhIL-18-Intein 融合蛋白 SDS-PAGE



1.Supernatant of recombinant ER2566 without induction
2.Protein marker
3.Supernatant of induced recombinant ER2566

图 5 超声破菌后上清中的 mhIL-18 融合蛋白

子有明显的蛋白表达。表达条带大小为 73kd (IL-18 融合蛋白 18.3kd + Tag 55 kd), 与预期一致。表达量可达总蛋白量的 26%。而未诱导表达 ER2566 重组子及 ER2566 空菌中无该条带的出现。说明, 成功的在大肠杆菌 ER2566 表达体系中表达了 mhIL-18 融合蛋白(图 4)。

2.3 以非包涵体形式表达条件的优化

当生长温度为 28℃,诱导时间为 5 h, IPTG 浓度为 0.2mmol/L 时,80%以上的诱导表达蛋白是以非包涵体的形式存在(图 5)。

2.4 Western blot

在 Western Blot 中,出现特异性的条带,反应所示的条带清晰,无其他杂带的出现,特异性良好。再次证明 mhIL-18 融合蛋白表达成功。

2.5 纯化

图 7 表达产物及表达产物过柱剪切纯化的 SDS-PAGE。图中 2 泳道为 ER2566 表达的 mhIL-18 融合蛋白。图中 3 泳道为 ER2566 表达的融合蛋白过柱剪切后的得到的 mhIL-18 蛋白条带, 大小 18.3kD,和理论一致。

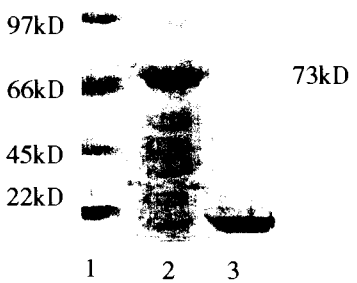
维普资讯 http://www.cqvip.com



1.Recombinant ER2566 without induction
2.and 3. Induction of recombinant ER2566

1 2 3

图 6 Western blot



1.Protein marker
2.Expressed mhIL-18 of ER2566
3.Expressed mhIL-18 of ER2566 purified by chitin

图 7 IL-18 融合蛋白过柱剪切纯化后进行 SDS-PAGE

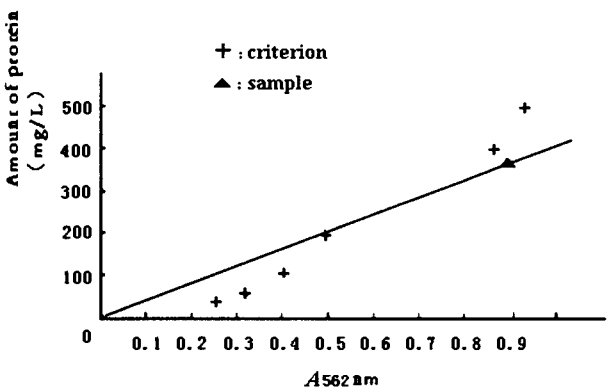


图 8 蛋白定量曲线

表 1 对培养细胞的 MTT 法检测

(n=6, $\bar{x}\pm s$)

Group	A495
Control	1.039 ± 0.014[b]
PHA	1.042 ± 0.034[b]
PHA+mhIL-18	1.258 ± 0.032
mhIL-18	1.061 ± 0.028[b]

[b]P<0.01 vs PHA+mhIL-18; PHA: phytahematoagglutinin.

2.6 生物活性测定

表达 mhIL-18 蛋白定量为 380（μg/ml（图 8）。对 mhIL-18 活性的测定，人外周血单核细胞法是灵敏和有效的，用 SPSS 统计软件分析 MTT 结果证明（表 1）：表达的 IL-18 具有生物学活性。当存在亚适剂量的 PHA 时，可以明显促进 PBMC 增殖，但仅加亚剂量 PHA 或只加 IL-18 时与空白对照组无明显差别。

3 讨 论

IL-18 不论在基础研究，还是在临床运用方面都具有巨大的运用前景。近几年有学者开始从事人 IL-18 在原核的克隆表达研究，但 IL-18 基因的原核表达均以包涵体形式存在，不利于 IL-18 的生产和运用。在大肠杆菌表达体系中，真核基因的高表达往往会导致包涵体的形成。包涵体是细菌表达的蛋白质在肽链折叠时产生的特异性的错误聚合，表现为在细胞内形成无活性的颗粒。把包涵体内的表达蛋白复性为有生物学活性的可溶蛋白却是非常费时的高成本工作。而且包涵体的蛋白质复性率一般都很低。所以如何减少包涵体的形成是必须解决的一个问题。本研究的目的就是采用不同的原核表达系统和改变诱导条件，探索以非包涵体形式高效表达 IL-18 的途径。

选择有效的表达系统是非包涵体形式高效表达的重要前提。在本课题所用的表达载体是高效融合表达载体 pTYB1。该载体有许多成功表达的范例，并含有 intein Tag：intein Tag 编码可与 chitin（几丁质）柱特异结合的亲合手柄，从而快速、简便地纯化目的蛋白；另外，intein Tag （下转第 531 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

鼠的心肌损伤标志物水平，得到了与能降低心肌梗死体积、抑制心肌再灌注损伤一直的结论。

随着冠状动脉介入治疗的广泛开展，心肌的再灌注损伤越来越受到重视，如何限制再灌注损伤成为关注的热点，我们的研究首次将蛋白酶体抑制剂 MG-132 用于在体的心肌缺血/再灌注损伤研究，证明 MG-132 能够降低血浆心肌酶标志物水平，缩小心肌梗死范围，具有减轻心肌缺血再灌注损伤的作用。但是，由于本研究动物数量较少，最后结论还需要扩大样本进一步研究证实，而且，治疗的最佳剂量、治疗的时间窗有待于进一步研究，特别是还要研究其对实验动物生存率的影响。

参 考 文 献

[1] Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. Hypertens, 2000;18(6):655-673.

[2] Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning[J]. Physiol Rev, 1999;79:609-634.

[3] Elsasser A, Vogt AM, Nef H, et al. Human hibernating myocardium is jeopardized by apoptotic and autophagic cell death[J]. JACC,2004;43(12): 2191-2199.

[4] Li C, Browder W, Kao RL. Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1999;276:H543-H552.

[5] 张 波,王志农,王 军,等.核因子 kappa B 在早期心肌缺血再灌注损伤中的作用[J].中华实验外科杂志,2004;21(9): 1042-1044.

[6] Li Q, Verma IM. NF-B regulation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2002;2:725-734.

[7] Onai Y, Suzuki J, Kakuta T, et al. Inhibition of IB phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Cardiovascular Research, 2004;63:51-59.

[8] Yeh C, Lin Y, Wu Y, et al. Inhibition of NF-kB activation can attenuate ischemia/reperfusion-induced contractility impairment via decreasing cardiomyocytic proinflammatory gene up-regulation and matrix metalloproteinase expression[J]. Cardiovasc Pharmacol TM, 2005;45:301-309.

[9] Meiners S, Laule M, Rother W, et al. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis[J]. Circulatio,2002;29: 483 - 489.

[10] Meiners S, Hocher B, Weller A, et al. Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by Inhibition of the proteasome[J]. Hypertension, 2004;44:471-477.

[11] Pye JP, Ardeshirpour F, McCain A, et al. Proteasome inhibitor ablates activation of NF-kappaB induced during myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2003;284: H919 - H926.

[12] Jialin B, Kaori S, Li M, et al. PR-319 and PR-11 peptides inhibit ischemia-reperfusion injury by blocking proteasome-mediated I-B degradation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2001;H2612-H2618.

（上接第 527 页）

可以从目的蛋白的氨基端自身剪切，切下 intein，回收目的蛋白。从而为纯化提供了高效的途径。

本研究中除通过挑选新的表达载体和宿主工程菌外，并采取降低工程菌的生长温度、减少诱导剂 IPTG 的浓度、减少诱导时间以及添加促进重组蛋白可溶性表达的生长添加剂和保护剂等手段，降低无活性聚集体形成的速率以减少包涵体的形成。在 28℃，诱导时间为 5h，IPTG 最佳诱导浓度为 0.2mmol/L 时，表达量可占菌体总蛋白的 26 %以上。其中 80%以上的诱导表达蛋白是以非包涵体的形式存在于上清中。因此，不必进行包涵体的复性。从而节约了大量的时间和成本，而且避免了复性中蛋白质复性率一般都很低的问题。表达的融合蛋白过柱纯化后纯度达 95%以上，具有明显的生物学活性。本研究以非包涵体形式高效表达 IL-18 为进一步研究奠定了基础。

（通信作者：王亚平 Tel:023-68485898；宋方洲 Tel: 023-68485898）

参 考 文 献

[1] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells [J].Nature, 1995; 378-388.

[2] 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.

[3] Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine[J]. Eur Cytokine Netw, 2000 ;11(3):483-486.

[4] Yamanaka R, Tsuchiya N, Yajima N, et al. Induction of an antitumor immunological response by an intratumoral injection of dendritic cells pulsed with genetically engineered Semliki Forest virus to produce interleukin-18 combined with the systemic administration of interleukin-12[J]. J Neurosurg,2003 ;99(4):746-753.

[5] Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, et al. IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice [J]. J Immunol, 2000 1;164(11):6067-6074.

[6] Papamichail M, Perez SA, Gritzapis AD, et al. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function[J]. Cancer Immunol Immunother, 2004 ;53(3):176-186.

[7] Schmidt OI, Morganti-Kossmann MC, Heyde CE, et al. Tumor necrosis factor-mediated inhibition of interleukin-18 in the brain: a clinical and experimental study in head-injured patients and in a murine model of closed head injury [J]. J Neuroinflammation, 2004;28 1(1):13.