技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001099

重组小鼠白细胞介素-27 融合蛋白多克隆抗体的制备及鉴定

路晓红[1]，付玉荣[2]，伊正君[1]

（潍坊医学院 1. 医学检验学系；2. 病原生物学教研室，潍坊 261053）

【摘 要】**目的**：制备重组小鼠白细胞介素-27（interleukin-27，IL-27）融合蛋白的多克隆抗体并鉴定其活性。**方法**：用反转录 PCR 从小鼠脾细胞扩增出 EB 病毒诱导基因 3（EBI3）和 p28 成熟肽基因片段，采用重叠延伸 PCR 用 $(Gly_4Ser)_3$ 接头将 2 个片段进行连接，将得到的小鼠 IL-27 单链融合基因片段克隆于 pET-32a(+)载体。阳性重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)，异丙基硫代-β-D-半乳糖苷（IPTG）诱导融合蛋白表达，利用 SDS-PAGE 与 Western blot 鉴定目的蛋白的表达。以纯化的 IL-27 融合蛋白免疫新西兰大白兔，制备兔抗小鼠 IL-27 融合蛋白的多克隆抗体，利用 Western blot 和 ELISA 进行特异性及效价分析。**结果**：从小鼠脾细胞总 RNA 中扩增得到 IL-27 单链融合基因经测序与预期序列一致；在大肠杆菌 BL21(DE3)中经 IPTG 诱导，SDS-PAGE 显示表达出的融合蛋白相对分子质量（molecular weight，Mr）约 67 000；Western blot 结果表明该融合蛋白能与抗 6×His 的单克隆抗体发生反应；该蛋白免疫新西兰大白兔后获得抗血清，Western blot 结果显示该血清可以特异性地与 IL-27 融合蛋白结合，ELISA 测定该多克隆抗体的效价可以达到 1:3 200。**结论**：在大肠杆菌中成功表达出小鼠 IL-27 融合蛋白，并制备出效价较高、特异性较好的兔抗小鼠 IL-27 多克隆抗体。

【关键词】小鼠白细胞介素-27；重叠延伸 PCR；融合蛋白；原核表达；多克隆抗体

【中图分类号】R392.11；R392-33 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-01-19

Preparation and identification of the polyclonal antibody against mouse interleukin-27 fusion protein

Lu Xiaohong[1]，*Fu Yurong*[2]，*Yi Zhengjun*[1]

（*1. Department of Laboratory Medicine；2. Teaching and Research Section of Pathogenic Biology，Weifang Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To prepare polyclonal antibody to recombinant mouse interleukin-27（IL-27）fusion protein and to detect its activity. ***Methods***：Reverse transcription PCR was used to clone mature peptide gene fragments of EB virus induced gene 3（EBI3）and p28 from mouse spleen cells. Both fragments of EBI3 and p28 were joined together with $(Gly_4Ser)_3$ using splicing overlap extension（SOE）PCR to obtain single-stranded IL-27 fusion gene fragment. Then，recombinant pET32a(+)-IL-27 was prepared by inserting IL-27 fusion gene fragment into pET32a(+) vector. Positive recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and fusion protein expression was induced by Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside（IPTG）. SDS-PAGE and Western blot were used to identify protein expression. Purified IL-27 fusion protein was used to immunize New Zealand rabbits to prepare polyclonal antibody. Titer and specificity of polyclonal antibody to IL-27 were analyzed by ELISA and Western blot respectively. ***Results***：Single-stranded IL-27 fusion gene fragment was amplified，which sequence was consistent with the expected sequence. Western blot and SDS-PAGE showed that IL-27 fusion protein was successfully induced in *Escherichia coli BL21*(DE3). Obtained serum can specifically recognize IL-27 fusion protein and titer of rabbit polyclonal antibody was about 1:3 200. ***Conclusion***：Recombinant mouse IL-27 fusion protein is successfully obtained and rabbit anti-IL-27 antibody with high titer and specificity is prepared.

【Key words】mouse interleukin-27；splicing overlap extension PCR；fusion protein；prokaryotic expression；polyclonal antibody

作者介绍：路晓红，Email：luxiaohong2009@126.com，研究方向：临床疾病的分子诊断。

通信作者：伊正君，Email：fuyizhengjun@163.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81170080、81470001）；潍坊医学院 2011 年科技创新前沿探索重点研究资助项目（编号：K11TS1004）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161215.1551.064.html（2016-12-15）

白细胞介素-27（interleukin-27，IL-27）是由 Pflanz 等[1]发现并命名的 IL-12 家族细胞因子，由EB 病毒诱导基因 3（Epstein-Barr virus-induced gene 3，EBI3）和 p28 两个亚基构成异源二聚体。IL-27 主要由活化的抗原提呈细胞产生，包括活化的单核细胞、树突状细胞及巨噬细胞等。IL-27 的受体由 WSX-1（T 细胞细胞因子受体，T cell cytokine receptor，TCCR）与糖蛋白 130（glycoprotein 130，gp130）亚基组成，表达于 T 细胞、B 细胞、自然杀伤（natural killer，NK）细胞和单核巨噬细胞等多种特异性及非特异性免疫细胞表面。最初的研究认为 IL-27 与 Th1 细胞的增殖与功能密切相关，可广泛作用于 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞，并能通过促进 IL-10 分泌而发挥炎症调节作用[2]。只有 EBI3 与 p28 亚基同时存在时，IL-27 才能高水平分泌。p28 的分泌并不依赖于 EBI-3 的存在，并且 p28 表现出拮抗 IL-27 信号通路的作用[3]。对 IL-27 的研究多集中在其对炎症的双重调控作用，深入研究发现大多数情况下 IL-27 发挥着负性免疫调节功能。因此，中和 IL-27 在调节机体免疫中亦有重要作用。本研究采用重叠延伸 PCR（splicing by overlap extension PCR，SOE PCR）将小鼠 EBI3 和 p28 基因通过编码疏水性多肽$(Gly_4Ser)_3$的 DNA 片段进行连接，克隆至原核表达载体 pET-32a(+)，将重组质粒 pET32a-IL-27 转化大肠杆菌进行表达，并初步鉴定小鼠 IL-27 融合蛋白，将该蛋白免疫兔后获得多克隆抗体，为进一步研究 IL-27 的生物学功能奠定基础。

机体免疫的动态平衡需要各种细胞因子的参与，白介素在介导 T 细胞与 B 细胞活化、增殖、分化以及在机体炎症反应中起重要作用。然而，有些白介素的含量过高则会对机体造成损伤。因此，研究者们不仅成功克隆表达了 30 多种白介素，还针对一些白介素及白介素受体制备了相应抗体。已有研究报道，应用白介素的抗体阻断其相应信号通路而发挥作用，其中应用较为成功的是应用 IL-17A 抗体控制强直性脊柱炎的症状，并处于Ⅱ期临床试验[4]。大量研究显示，应用 IL-5 抗体治疗严重的嗜酸性哮喘患者可能是一种良好的治疗[5]。目前，关于 IL-27 抗体的研究则较少，本研究克隆表达 IL-27 蛋白并制备抗 IL-27 抗体，为今后应用抗体阻断其信号转导作铺垫。

1 材料和方法

1.1 材料

原核表达质粒 pET32a(+)、大肠杆菌 DH5α 菌株和大肠杆菌 BL21(DE3)由潍坊医学院医学检验实验室保存。昆明小鼠、新西兰大白兔购自潍坊医学院实验动物中心。DL2000 Marker、RNAiso Plus、DNA Ligation Kit Ver.2.1、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase、限制性核酸内切酶、DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 片段回收试剂盒及质粒抽提试剂盒等购自 TaKaRa 公司，细胞生长液 RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品，鼠抗 6×His 单克隆抗体为圣克鲁斯生物技术公司产品，HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体为博士德生物工程有限公司生产；蛋白质相对分子质量（molecular weight，Mr）Marker、过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自上海生工生物工程股份有限公司；小鼠外周血淋巴细胞分离液、新生小牛血清、ECL 超敏发光溶液购自北京索莱宝生物科技有限公司；小鼠 IL-27 纯化蛋白购自北京义翘神州生物技术有限公司；NovagenHis·BindBuffer Kit 购自 Novagen 公司，其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中的小鼠 EBI3（登录号：NM015766）和 p28（登录号：NM145636）基因序列设计引物用于克隆小鼠 EBI3 和 p28 成熟肽基因片段 cDNA。EBI3 上游引物 P1：5'端含 *Nco* Ⅰ 酶切位点（划线部分），5'-CATCCATGGATTACACTGAAACAGC-3'；EBI3 下游引物 P2：去掉终止密码子 TGA，5'-GGGCTTATGGGGTGCACTTTCTACT-3'。p28 上游引物 P3：5'-TTCCCAACAGACCCCCTGAGCCTTC-3'；IL-27p28 下游引物 P4：5'端含有 *Hind* Ⅲ酶切位点（划线部分），5'-GCTAAGCTTTTAGGAATCCCAGGCTGAG-3'。用于 SOE PCR 的两条重叠延伸引物，EBI3-linker 下游重叠引物 P5（划线部分为 linker）：5'-GCTGCCGCCACCGCCGCTTCCGCCACCGCCGCTTCCACCGCCACCGGGCTTATGGGGTGC-3'；IL-27p28-linker 上游重叠引物 P6（划线部分为 linker）：5'-GGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCTTCCCAACAGACCCC-3'。以上引物由宝生物工程（大连）有限公司合成。

1.2.2 重叠延伸 PCR 构建小鼠 IL-27 单链融合基因 无菌操作取小鼠的脾脏，研磨后用 RPMI1640 培养基培养小鼠脾细胞，加入终浓度为 10 μg/mL 的植物血凝素（phytohemagglutinin，PHA）于 37 ℃培养，诱导 12 h 后收集细胞（用于扩增 EBI3）；加入终剂量为 2 μg/mL 伴刀豆球蛋白 A（concanavalin A，ConA）于 37 ℃培养，诱导 6 h 后收集细胞（用于扩增 p28）。按照总 RNA 提取试剂说明书提取脾细胞总 RNA，按 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明合成 EBI3 与 p28 成熟肽片段的 cDNA 第一链。分别以上述 cDNA 为模板，加入特异性引物扩增 EBI3 及 p28 基因片段。以 EBI 为模板，P1 和 P5 为引物通过 PCR 扩增得到 EBI3-linker；以 p28为

模板，P4 和 P6 为引物通过 PCR 扩增得到 linker-p28。进行重叠延伸 PCR 反应：以凝胶回收后的 EBI3-linker 和 linker-p28 作为拼接模板，以 P1 和 P2 为上下游引物，进行 PCR 扩增连接，反应条件为：95 ℃预变性 4 min，进行 30 个循环：98 ℃变性 10 s，60 ℃退火 10 s，72 ℃延伸 105 s，最后 72 ℃延伸 10 min。用胶回收试剂盒回收 1 300 bp 左右的 PCR 产物，-20 ℃保存备用。

1.2.3 原核表达载体 pET-32a-IL-27 的构建及其在大肠杆菌中的表达 将获得的小鼠 IL-27 单链融合基因用 *Nco* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ进行双酶切，同样将 pET-32a(+)进行双酶切，取酶切后的 msIL-27DNA 片段与 pET-32a 于 16 ℃连接过夜。将连接产物转化 DH5α 感受态细胞，挑取菌落进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定，将阳性重组质粒送交上海生工生物工程有限公司进行测序。取测序正确的阳性重组质粒转化 BL21(DE3)感受态细胞，菌液 PCR 鉴定。挑取转化 pET32a-IL27 重组质粒的 BL21(DE3)菌落接种于 5 mL Lria-bertain(LB)液体培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素)中，37 ℃摇菌培养过夜。取该菌液 1 mL 接种于含有 50 μg/mL 氨苄青霉素的 100 mL LB 液体培养基中，37 ℃条件下 300 r/min 振摇培养至菌液 A 600 nm 为 0.6~0.9。加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside，IPTG)进行诱导。于 IPTG 诱导后 4 h 后，收集菌液进行菌体总蛋白 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 重组蛋白的鉴定及纯化 将终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的菌液超声碎菌，离心后分别收集上清及沉淀进行 SDS-PAGE 分析，以确定重组蛋白的表达形式。将 SDS-PAGE 分析后的蛋白进行电转移至硝酸纤维素膜，脱脂奶粉封闭 2 h，然后加入小鼠抗 6×His 单克隆抗体 4 ℃过夜，再加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(稀释度为 1:2 000)，室温反应 2 h；最后，进行 ECL 化学发光并拍照。同时设 pET32a(+)空载体转化菌作为对照。取 IPTG 诱导的菌液超声破碎，12 000 r/min 离心 20 min，用 1×结合缓冲液将沉淀中包涵体重悬裂解，冰浴 12 h。按照 NovagenHis·BindBuffer Kit 说明书操作纯化表达产物，最后进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 小鼠 IL-27 融合蛋白的复性及多克隆抗体的制备 将纯化的蛋白装入透析袋中浸没于复性缓冲液中，进行稀释复性，最终将变性液透析到 pH7.5 的 PBS 缓冲液中，10 000 r/min 离心 30 min，取上清 0.22 μm 滤膜过滤除菌，于-80 ℃保存备用。新西兰大白兔正常饲养半个月，免疫前进行耳缘静脉采血作为阴性对照。首次免疫按 500 μg/只的剂量，将纯化蛋白加等量 Freund 完全佐剂，剧烈振荡使之充分乳化，于兔子背部皮下进行多点注射。初次免疫 10 d 后进行第 2 次免疫，采用 Freund 不完全佐剂乳化后皮下注射，以后每隔 7 d 免疫 1 次，共免疫 5 次。末次免疫后 1 周内耳缘静脉采血及心脏采血后保存血清。

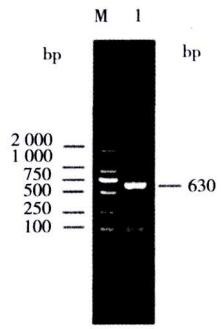
1.2.6 多克隆抗体的特异性检测 将制备的小鼠 IL-27 融合蛋白及商品纯化的 IL-27 进行 SDS-PAGE，然后 PVDF 膜进行转膜，室温下脱脂奶粉封闭 2 h，洗涤后将制备的兔血清用脱脂奶粉进行 100 倍稀释，4 ℃过夜，洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(稀释度为 1:4 000)，室温孵育 2 h，最后 ECL 发光显色。

1.2.7 间接 ELISA 检测多克隆抗体的效价 将纯化的 IL-27 蛋白作为抗原，每孔为 5 μg 包被于 ELISA 板，4 ℃过夜。经洗涤、封闭后加入不同稀释度的兔血清 37 ℃孵育 1 h，洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(稀释度为 1:2 000)，最后加入底物显色。同时设立免疫前兔血清为阴性对照，稀释液为空白对照，酶标仪 450 nm 处读取吸光度(absorbance，A)值，判断血清效价。

2 结 果

2.1 EBI3 和 p28 基因的获取及 IL-27 单链融合基因的构建

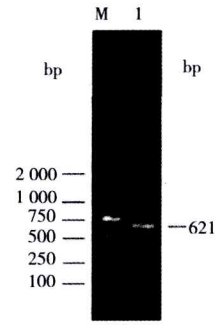
以小鼠脾细胞提取的 mRNA 为模板经反转录 PCR 扩增出 EBI3 和 p28 成熟肽基因片段，所得的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见在约 630 bp 和 621 bp 处有目的条带，与预期大小一致(图 1、图 2)。SOE PCR 将 EBI3 和 p28 融合后得到的 PCR 产物约 1 310 bp，与预期大小一致(图 3)。



M 为 DL2000 DNA Marker；1 为小鼠 EBI3 PCR 产物

图 1 小鼠 EBI3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

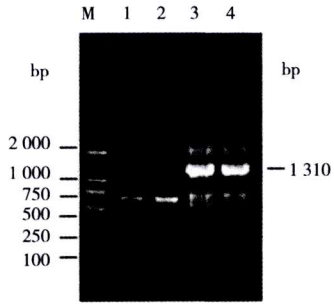
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of mouse EBI3



M 为 DL2000 DNA Marker；1 为小鼠 p28PCR 产物

图 2 小鼠 p28 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR product of mouse p28



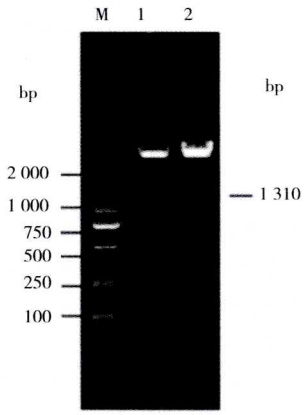
M 为 DL2000 DNA Marker；1 为 EBI3-linker PCR 产物；2 为 linker-p28PCR 产物；3、4 为 mscIL-27 融合基因 PCR 产物

图 3 重叠延伸 PCR 构建 mscIL-27 融合基因

Fig.3 SOE PCR product of mscIL-27 fusion gene

2.2 pET32a(+)-IL-27 原核表达载体的鉴定

将 pET32a(+)-IL-27 重组质粒经 *Nco* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切，电泳可见在近 5 900 bp 和 1 310 bp 处有目的条带(图4)；转化该质粒的 DH5α 菌液经 PCR 反应后凝胶电泳可见约 1 310 bp 处有基因片段；测序结果显示与预期序列一致(图5)；转化该质粒的 BL21 菌液经 PCR 反应后电泳也可见到约 1 310 bp 处有基因片段(图 6)。



M为 DL2000 DNA Marker；1 为重组质粒 pET32a(+)-IL-27 进行 *Nco* Ⅰ和 Hind Ⅲ双酶切；2 为 pET32a(+)进行 *Nco* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切

图 4 重组质粒 pET32a-IL-27 酶切鉴定

Fig.4 Identification of pET32a-IL-27 by digestion

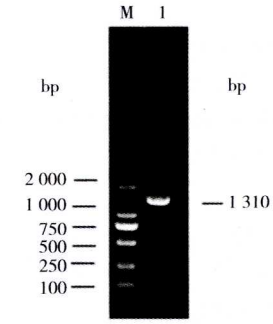
ccatggattacactgaaacagctctcgtggctctaagccagcccagagtgcaatgccatgcttctcggtat
cccgtggccgtggactgctcctggactcctctccaggctcccaactccaccagatccacgtccttcattgc
cacttacaggctcggtgtggccacccagcagcagagccagccctgcctacaacggagcccccaggcct
cccgatgcaccatccccgacgtgcacctgttctccacggtgccctacatgctaaatgtcactgcagtgca
cccaggcggcgccagcagcagcctcctagctttgtggctgagcgaatcatcaagccggaccctccgga
aggcgtgcgcctgcgcacagcgggacagcgcctgcaggtgctctggcatccccctgcttcctggccctc
ccggacatcttctctctcaagtaccgactccgctaccggcgccgaggagcctctcacttccgccaggtgg
gacccattgaagccacgactttcaccctcaggaactcgaaaccccatgccaagtattgcatccaggtgtc
agctcaggacctcacagattatgggaaaccaagtgactggagcctccctgggcaagtagaaagtgcacc
ccataagcccggtggcggtggaagcggcggtggcggaagcggcggtggcggcagcttcccaacagacc
ccctgagccttcaagagctgcgcagggaattcacagtcagcctgtaccttgccaggaagctgctctctga
ggttcagggctatgtccacagctttgctgaatctcgattgccaggagtgaacctggacctcctgccccctggg
ataccatcttcccaatgtttccctgactttccaggcatggcatcacctctctgactctgagagactctgcttc
ctcgctaccacacttcggcccttccctgccatgctgggagggctggggacccaggggacctggaccagc
tcagagagggagcagctgtgggccatgaggctggatctccgggacctgcacaggcacctccgctttcag
gtgctggctgcaggattcaaatgttcaaaggaggaggaggacaaggaggaagaggaagaggaggaaga
agaagaaaagaagctgccctagggggctctgggtggccccaatcaggtgtcatcccaagtgtcctggcc
ccagctgctctatacctaccagctccttcactcccctggagcttgtcctgtctcgggctgttcgggacctgctg
ctgctgtccctgcccaggcgcccaggctcagcctgggattcctaaaagctt

图 5 pET32a(+)-IL-27 重组质粒测序结果

Fig.5 DNA sequencing result of pET32a(+)-IL-27

2.3 重组蛋白的诱导表达

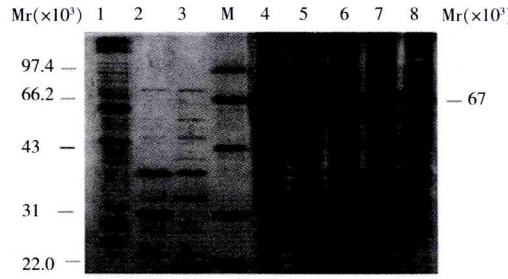
菌体总蛋白 SDS-PAGE 电泳分析显示，在 Mr 为 67 000 左右处有蛋白条带，与预期值相符，而对照无此条带。但IPTG 不同浓度对表达量的影响无明显差异(图 7)。



M为 DL2000 DNA Marker；1 为菌液 PCR 结果

图 6 pET32a(+)-IL-27/BL21(DE3)菌液的 PCR 鉴定

Fig.6 PCR identification of pET32a(+)-IL-27/BL21(DE3) rom bacterial fluid



M为预染色蛋白质 Mr Marker；1 为 IPTG 诱导 BL21（DE3）的产物；2 为 IPTG 诱导 pET32a（+）/BL21(DE3)的表达产物；3 为 pET32a（+）-IL-27/BL21（DE3）未经 IPTG 诱导的产物；4~8 为不同浓度 IPTG（0.5 mmol/L、1 mmol/L、1.5 mmol/L、2 mmol/L 以及 3 mmol/L）诱导 pET32a（+）-IL-27/BL21（DE3）的表达产物

图 7 不同浓度 IPTG 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

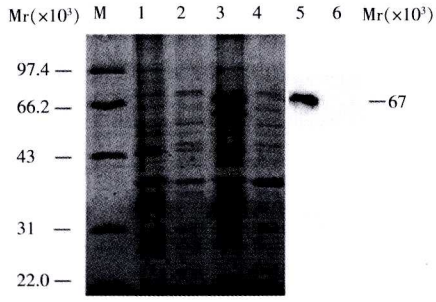
Fig.7 SDS-PAGE analysis of expressed product induced by IPTG at different concentrations

2.4 重组蛋白的鉴定与纯化

经 IPTG 诱导后的 pET32a(+)-IL-27/BL21(DE3)菌液超声碎菌，离心收集沉淀及上清，SDS-PAGE 分析显示融合蛋白出现在沉淀中。沉淀进行 Western blot 分析，在 Mr 约 67 000 处有明显的条带，而对照处无此条带(图 8)，表明目的蛋白以包涵体形式表达，且能够被小鼠抗 6×His 单克隆抗体所识别。诱导的菌液经超声破碎，溶解沉淀后用 Ni-NTA 亲和层析法纯化，纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 显示 Mr 在 67 000 处出现清晰的蛋白条带(图 9)。

2.5 多克隆抗体的特异性及效价检测

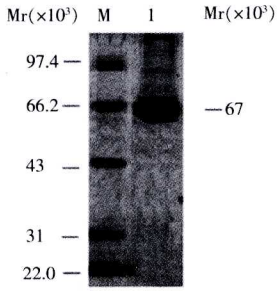
用 1:100 稀释的免疫兔血清对小鼠 IL-27 融合蛋白进行 Western blot 分析，结果显示在 Mr 约 67 000 的位置有清晰的免疫条带(图 10)，表明抗血清可识别自己制备的 IL-27 融合蛋白以及纯化商品小鼠 IL-27 蛋白。间接 ELISA 检测用重组蛋白免疫产生的抗血清的效价，结果显示抗血清的效价可达 1:3 200(图 11)。



M为预染色蛋白质 Mr Marker；1 为经 IPTG 诱导的 BL21(DE3)菌体沉淀；2 为经 IPTG 诱导的 pET32a/BL21(DE3)上清；3 为经 IPTG诱导的 pET32a-IL-27/BL21(DE3)菌体沉淀；4 为经 IPTG 诱导的 pET32a-IL-27/BL21(DE3)上清；5 为经 IPTG 诱导的 pET32a-IL-27/BL21(DE3) Western blot 分析；6 为未经诱导的 pET32a/BL21(DE3)Western blot 分析

图 8 重组蛋白的表达形式分析及 Western blot 分析

Fig.8 Western blot analysis of recombinant protein



M为预染色蛋白质 M_r Marker；1 为经镍柱纯化的 IL-27 融合蛋白

图 9 重组蛋白的纯化

Fig.9 Purification of recombinant protein



1为商品纯化的小鼠 IL-27；2 为制备的小鼠 IL-27

图 10 多克隆抗体的特异性分析

Fig.10 Specificity analysis of polyclonal antibody

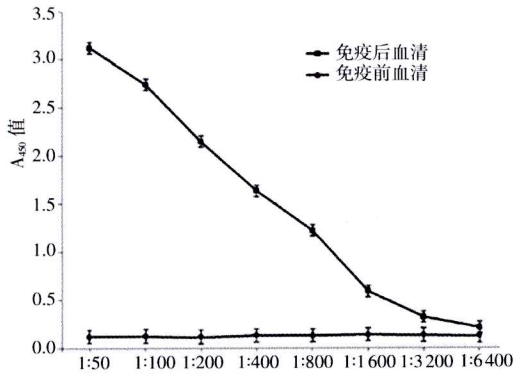


图 11 间接 ELISA 测血清多克隆抗体的效价

Fig.11 ELISA result of polyclonal antibody in serum

3 讨 论

IL-27 在机体的免疫系统发挥广泛而复杂的调节作用，其与受体结合后激活不同的 JAK/STAT 信号通路，引起不同的生物学反应[6]。IL-27 不仅可诱导初始 CD4+T 细胞向 Th1 细胞分化，也可以对 Th1 型免疫发挥负调控作用，IL-27 还可以通过抑制 Th17、促进 IL-10 分泌等发挥抗炎作用[7]。IL-27 是白介素中少数的异源二聚体，两亚基相结合才能实现其生物学功能。编码疏水性多肽的接头$(Gly_4Ser)_n$常用于 IL-12 家族中两亚基的连接，且能够促进其保持活性[8]。合理使用 linker 可以将细胞因子的亚单位分割开，促进其正确融合，有利于增强细胞因子的生物学活性及稳定性[9]。本研究采用 SOE PCR 将小鼠 EBI3 和 p28 成熟肽基因通过$(Gly_4Ser)_3$进行连接，得到完整的 IL-27 一级结构序列。通过原核表达得到 IL-27 融合蛋白，将此融合蛋白免疫兔子后获得效价高、特异性好的兔抗鼠 IL-27 多克隆抗体。

近年来不断有报道用白介素抗体阻断白介素来治疗某些疾病。例如，徐靓等[10]研究提示应用抗 IL-17 的多克隆抗体注射狼疮小鼠可通过抑制 IL-17 的表达而抑制狼疮性肾炎的炎症免疫反应，减轻肾脏病理损害。国外有研究报道，临床试验结果显示人源化抗 IL-17 单克隆抗体能够显著减少中度至重度银屑病的症状和体征[11]。Shang 等[12]研究通过阻断 IL-22 可以干扰血管内皮细胞和子宫内膜机制细胞的相互作用，提示阻断 IL-22 可能是一个潜在的治疗子宫内膜异位的策略。此外还有研究报道，应用 IL-1 抗体治疗自身免疫性疾病导致的继发性淀粉样变性[13]，应用人源化 IL-6R 抗体治疗子宫内膜异位症模型大鼠[14]，或是应用 IL-6R 抗体治疗一种罕见的遗传病[15]。以上研究提示阻断某种疾病相关的细胞因子可能是一种新的疾病治疗策略。并且随着抗体制备技术的不断改进，抗体可应用于治疗肿瘤、自身免疫性疾病及变态反应等疾病[16]。

IL-27 在免疫调节中呈多重效应，大量研究发现 IL-27 可通过多种信号通路促进或抑制肿瘤[17]，IL-27 在自身免疫性疾病以及感染性疾病中均发挥多重效应[18]。因此，调控 IL-27 的信号通路或许能为病因的研究提供新思路。Cao 等[19]研究发现流感病毒感染后导致肺部组织 IL-27 含量升高，应用 IL-27p28 抗体腹腔注射能够有效激发 γδT 细胞来对抗继发肺炎球菌感染。Sharma 等[20]实验研究显示 IL-

27在结核分枝杆菌感染的巨噬细胞阻碍 IFN-γ 的产生，能够抑制巨噬细胞的自噬作用，从而导致结核杆菌在胞内持续存在。Torrado 等[21]利用基因敲出的小鼠感染结核杆菌，提示 IL-27 及其受体 IL-27R 阻碍机体的抗结核免疫。大量研究显示，IL-27 通过作用于固有免疫及适应性免疫细胞，而抑制机体的抗结核分枝杆菌感染[22]。因此，在结核感染及其他慢性感染中适当中和 IL-27 可能有益于疾病的控制[23]。Kraft 等[24]研究提示阻断 IL-27 能够提高 CD4+产生 IFN-γ 的量。Dietrich 等[25]利用可溶性 IL-27 受体 α（soluble IL-27 receptor α，sIL-27Rα）拮抗 IL-27 信号通路，研究结果显示其有浓度依赖性并且只能阻断一部分 IL-27 信号通路。本实验是将 IL-27 的 2 个亚基连接，免疫兔子而得到的多克隆抗体，具有更广的识别位点。

总之，通过本实验本研究制备了兔抗小鼠 IL-27 的多克隆抗体，其效价较高、特异性较好，为进一步研究 IL-27 抗体的应用奠定了基础。本实验制备的 IL-27 抗体拟应用于结核杆菌慢性感染过程中阻断 IL-27，以观察其对感染性疾病的影响。由于 IL-27 在机体的免疫系统发挥广泛而复杂的调节作用，其调控网络有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells[J]. Immunity, 2002, 16(6): 779-790.

[2] Yoshida H, Hunter CA. The immunobiology of interleukin-27[J]. Annu Rev Immunol, 2015(33): 417-443.

[3] Stumhofer JS, Tait ED, Quinn WJ, et al. A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling[J]. Nat Immunol, 2010, 11(12): 1119-1126.

[4] Baeten D, Sieper J, Braun J, et al. Secukinumab, an interleukin-17A inhibitor, in ankylosing spondylitis[J]. N Engl J Med, 2015, 373(26): 2534-2548.

[5] Hilvering B, Xue L, Pavord ID. Evidence for the efficacy and safety of anti-interleukin-5 treatment in the management of refractory eosinophilic asthma[J]. Ther Adv Respir Dis, 2015, 9(4): 135-145.

[6] Hunter CA, Kastelein R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity[J]. Immunity, 2012, 37(6): 960-969.

[7] Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, et al. Interleukin-27 in T cell immunity[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(2): 2851-2863.

[8] Belladonna ML, Grohmann U. Bioengineering heterodimeric cytokines: turning promiscuous proteins into therapeutic agents[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 2013(29): 149-174.

[9] Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(10): 1357-1369.

[10] 徐 靓，张慧涛，郑 晶，等. 白细胞介素 17 在狼疮性肾炎小鼠中的表达及抗白细胞介素 17 抗体的干预作用[J]. 中国病理生理杂志，2014，30(2)：343-346.

[11] Blauvelt A. Ixekizumab: a new anti-IL-17A monoclonal antibody therapy for moderate-to severe plaque psoriasis[J]. Expert Opin Biol Ther, 2016, 16(2): 255-263.

[12] Shang WQ, Yu JJ, Zhu L, et al. Blocking IL-22, a potential treatment strategy for adenomyosis by inhibiting crosstalk between vascular endothelial and endometrial stromal cells[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(10): 1782-1797.

[13] Topaloglu R, Batu ED, Orhan D, et al. Anti-interleukin 1 treatment in secondary amyloidosis associated with autoinflammatory diseases[J]. Pediatr Nephrol, 2016, 31(4): 633-640.

[14] Taskin MI, Gungor AC, Adali E, et al. A humanized anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody, tocilizumab, for the treatment of endometriosis in a rat model[J]. Reprod Sci, 2016, 23(5): 662-669.

[15] Musters A, Tak PP, Baeten DL, et al. Anti-interleukin 6 receptor therapy for hyper-IgD syndrome[J]. BMJ Case Rep, 2015[Epub ahead of print].

[16] Caaveiro JM, Kiyoshi M, Tsumoto K. Structural analysis of Fc/FcγR complexes: a blueprint for antibody design[J]. Immunol Rev, 2015, 268(1): 201-221.

[17] Yoshimoto T, Chiba Y, Furusawa J, et al. Potential clinical application of interleukin-27 as an antitumor agent[J]. Cancer Sci, 2015, 106(9): 1103-1110.

[18] Moudgil KD. Adaptive and innate immune modulators of inflammation and autoimmunity[J]. Cytokine, 2015, 75(2): 5-9.

[19] Cao J, Wang D, Xu F, et al. Activation of IL-27 signaling promotes development of postinfluenza pneumococcal pneumonia[J]. EMBO Mol Med, 2014, 6(1): 120-140.

[20] Sharma G, Dutta RK, Khan MA, et al. IL-27 inhibits IFN-γ induced autophagy by concomitant induction of JAK/PI3 K/Akt/mTOR cascade and up-regulation of Mcl-1 in Mycobacterium tuberculosis H37Rv infected macrophages[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 55: 335-347.

[21] Torrado E, Fountain JJ, Liao M, et al. Interleukin 27R regulates CD4+ T cell phenotype and impacts protective immunity during Mycobacterium tuberculosis infection[J]. J Exp Med, 2015, 212(9): 1449-1463.

[22] Abdalla AE, Li Q, Xie L, et al. Biology of IL-27 and its role in the host immunity against Mycobacterium tuberculosis[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(2): 168-175.

[23] Robinson CM, Nau GJ. Interleukin-12 and interleukin-27 regulate macrophage control of Mycobacterium tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2008, 198(3): 359-366.

[24] Kraft JD, Horzempa J, Davis C, et al. Neonatal macrophages express elevated levels of interleukin-27 that oppose immune responses [J]. Immunology, 2013, 139(4): 484-493.

[25] Dietrich C, Candon S, Ruemmele FM, et al. A soluble form of IL-27Rα is a natural IL-27 antagonist[J]. J Immunol, 2014, 192(11): 5382-5389.

（责任编辑：冉明会）