DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.023
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
428 2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)04-0428-03

人IL-16在大肠杆菌中的融和表达

曹廷兵,叶治家,甘立霞,钟小林,巩 燕,彭家和 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 将人IL-16 cDNA克隆至原核融合表达载体Pinpoint™Xa-3上,并进行表达研究。方法 含IL-16 cDNA的质粒IL-16/PGEM-3ZF(+)和Pinpoint™Xa-3原核融合表达载体经酶切消化、目的DNA片段的分离、重组连接、筛选、序列分析等系列操作,获得重组质粒Pinpoint™Xa-IL-16,将质粒Pinpoint™Xa-IL-16转化至大肠杆菌JM109,用IPTG诱导表达JM109工程菌,Western blotting检测表达产物。结果 IL-16 cDNA成功克隆至融合表达载体Pinpoint™Xa-3,Western blotting检测经诱导含有Pinpoint™Xa-IL-16质粒的JM109细菌,有IL-16融合蛋白的表达.结论 成功地表达了IL-16融合蛋白。

关键词:IL-16;克隆;融合表达
中图法分类号:R392.13;R378.21 文献标识码:A

Fusion expression of human interleukin-16 in *E. coli*

CAO Ting-bing, YE Zhi-jia, GAN Li-xia, ZHONG Xiao-lin, GONG Yan, PENG Jia-he (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the plasmid Pinpoint™Xa-IL-16 and then observe the expression of fused IL-16 in *E. coli*. Methods IL-16 cDNA was isolated from plasmid IL-16/PGEM-3Zf(+) and ligated to the expression vector Pinpoint™Xa-3 after enzyme digestion, target DNA fragment isolation, recombinant ligation, and screening. After the DNA sequence of plasmid Pinpoint™Xa-IL-16 was analyzed, it was transfected to *E. coli* strain JM109 with the inducement of IPTG. The expression of IL-16 was identified with Western blotting. Results Pinpoint™Xa-IL-16 was constructed successfully and IL-16 fused with the biotin was expressed in *E. coli*. Conclusion IL-16 is expressed in *E. coli*, which found a basis for batch production of the fusion protein.

Key words: interleukin-16; cloning; fusion expression

白细胞介素-16(Interleukin-16, IL-16)是1995年被正式命名的新的细胞因子[1],因其具有诱导人和大鼠CD_4^+淋巴细胞游走应答的效应,故过去被称为淋巴细胞趋化因子(Lymphocyte chemoattractant factor, LCF)。IL-16前体其C端130个氨基酸的分泌型多肽通过靶细胞表面的CD_4分子广泛参与了体内的免疫调节及炎症反应,并且具有抑制HIV复制等多种功能[2~4]。本研究把我室前期获得的IL-16 cDNA的克隆质粒IL-16/pGEM-3Zf(+)和原核融合表达载体Pinpoint™Xa-3进行重组,得到融合表达质粒Pinpoint™Xa-IL-16,把此重组质粒转化到大肠杆菌JM109中,然后经IPTG诱导表达,产生了分子量约33×10^3的特异蛋白带。这些实验结果为重组IL-16蛋白的大量获得并进行后续研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Pinpoint™ Xa融合表达系统、T4DNA快速连接试剂盒、T7DNA测序试剂盒均购自Promega公司,羊抗IL-16多克隆抗体购自Santa Cruz公司,免疫组化染色S-P试剂盒购自中山生物技术有限公司。

1.2 IL-16 cDNA和融合表达载体Pinpoint™Xa-3的构建

取5μg IL-16/pGEM-3Zf(+)质粒DNA先以2μl *EcoR* Ⅰ(20U/μl)酶切5 h,酶切体积50μl,然后进行酚抽提,乙醇沉淀纯化,沉淀溶解于50μl 1xSI外切核酸酶缓冲液中,加2.5U SI外切核酸酶消化2 min,立即加入等体积饱和酚终止反应,然后进行常规纯化;再用2μl Hind Ⅲ(20 U/μl)酶切,这样就产生一端平头另一端为Hind Ⅲ粘性末端的IL-16 cDNA片段。1.2%琼脂糖凝胶电泳分离后,用透析袋法回收IL-16 cDNA片段[5]。沉淀溶解于10μl快连kit的溶解缓冲液中,置-20 ℃备用。

取2μg Pinpoint™Xa-3载体质粒DNA分别加1μl Hind Ⅲ(20 U/μl)和Nru Ⅰ(10 U/μl)进行双酶切,反应体积50μl,酶切反应5 h。酶切后得到的载体与目的片段IL-16 cDNA具有相同末端,即一端为平头而另一端为Hind Ⅲ的粘性末端。凝胶电泳分离后,用透析袋法回收载体DNA片段[5],沉淀溶解于10μl快连kit的溶解缓冲液中,置-20 ℃备用。

1.3 IL-16 cDNA同载体Pinpoint™Xa-3的连接转化及鉴定

IL-16 cDNA和Pinpoint™Xa-3载体,按3∶1的摩尔浓度比且总量约500 ng,按T4DNA快连kit说明书进行连接,于室温(25 ℃)连接30 min,把连接产物转化于用$CaCl_2$制备的JM109感受态细胞中,然后取200μl转化菌液涂布于氨苄青霉素平板上,在含有氨苄青霉素的转化平板上挑取10个单菌落,按常

基金项目:全军"九五"医药卫生基金资助项目(96L031);重庆市攻关项目(97043)
作者简介:曹廷兵(1968-),男,重庆市璧山县人,实验师,主要从事真核基因表达调控方面的研究。电话:(023)68752261
收稿日期:2001-04-15;修回日期:2001-10-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

规方法对质粒进行提取和酶切鉴定[5]。

取 4 个经酶切鉴定的重组质粒进行序列测定, 测序采用 T7DNA 测序试剂盒说明书方法进行。

1.4　重组质粒的诱导表达及重组表达产物的免疫印迹

取经鉴定的含有重组质粒 Pinpoint™Xa-IL-16 的工程菌按照 Pinpoint™Xa 表达系统操作手册, 用 IPTG 诱导 IL-16 的表达; 表达的重组蛋白经 SDS-PAGE 分离后转印至 NC 膜上, 抗原抗体反应中的第一抗体为羊抗人 IL-16 多抗, 第二抗体是生物素标记-抗羊 Ig, 第三步反应采用辣根过氧化物酶标记-链霉卵白素, DAB 显色。

2　结果

2.1　重组质粒的酶切鉴定

在连接转化的氨苄青霉素平板上挑取 10 个单菌落, 选用 SalI 和 HindIII双酶切, 经电泳鉴定 10 个质粒有 7 个释放出 737 bp 的 DNA 片断, 如图 1。

2.2　重组质粒 Pinpoint™Xa-IL-16 的序列测定

在 7 个酶切鉴定的质粒中, 取 4 个质粒进行序列分析, 结果发现: 所分析的 4 个重组质粒中有 3 个质粒的阅读框架是正确的, 如图 2。

2.3　重组蛋白的免疫印迹

用羊抗人 IL-16 的多抗对表达产物进行免疫学鉴定, 可以看出转化有重组质粒的细菌, 经 IPTG 诱导表达后, 其表达产物中有与抗 IL-16 抗体反应的蛋白带(融合表达部分是 14×10^3 的生物素化多肽, 而 IL-16 的分子量为$(17\sim 20)\times 10^3$ 左右[6,7], 所以 IL-16 融合蛋白的分子量约 33×10^3, 而在 Pinpoint™Xa 的对照质粒中的相应位置则没有特异性的抗原抗体复合物条带出现, 如图 3。

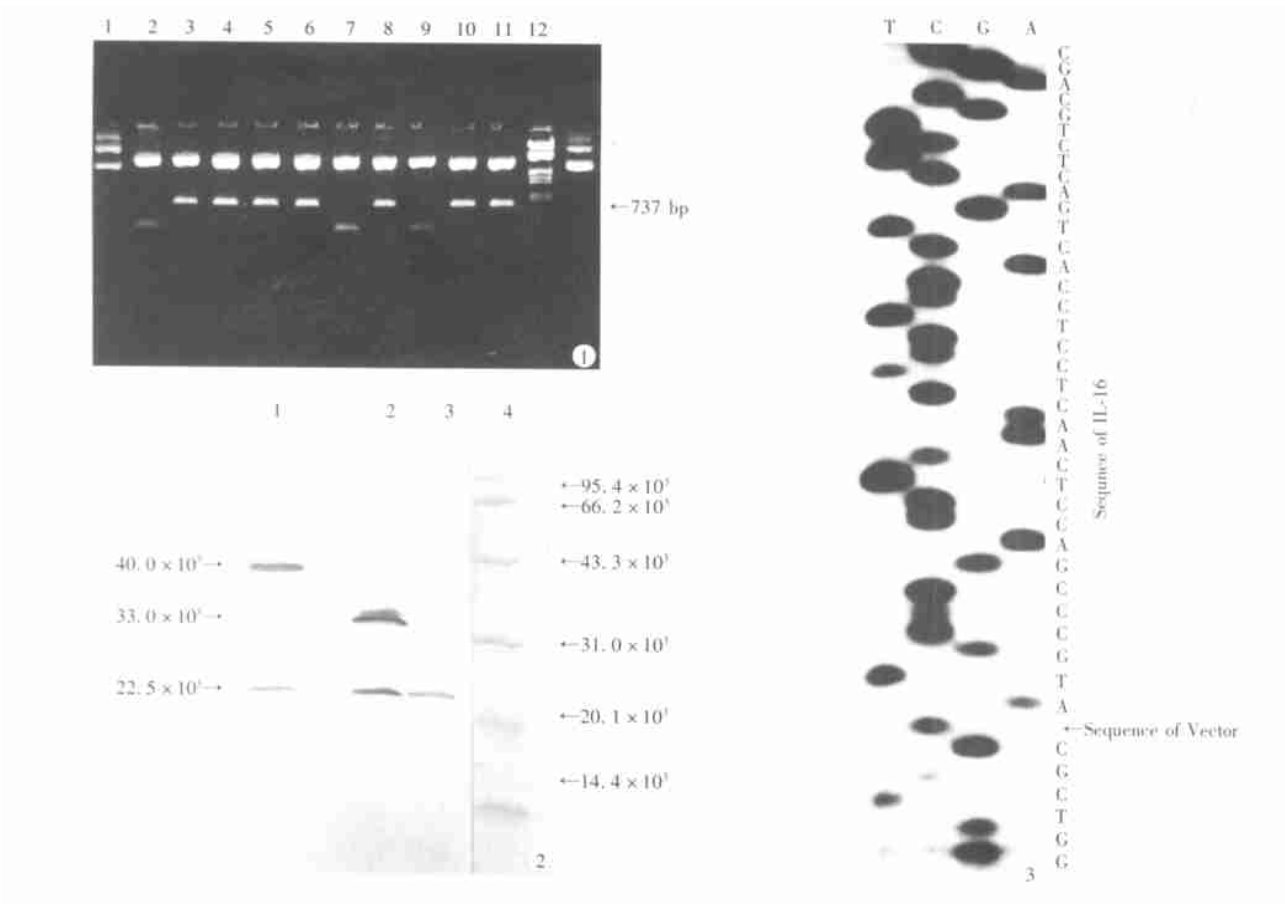


图 1　重组质粒的 *Sal* I 和 *Hind* III酶切图谱

Fig 1　Restriction analysis of recombinants with *Sal* I and *Hind* III

1, 12: Undigested recombinants; 2　3～10: Recombinants with *Sal* I and *Hind* III digestion; 11: DNA molecular mass standards

图 2　重组 **Pinpoint™ Xa-IL-16** 质粒 5′端阅读框架测序

Fig 2　Sequening of 5′ reading frame of recombinant plasmid Pinpoint™ Xa-IL-16

图 3　融合 **IL-16** 蛋白的 **Western blotting** 分析

Fig 3　Western blotting of fused IL-16 proteins

1: Pinpoit™Xa control vector which produces a 40×10^3 biotinylated fusion protein; 2: Pinpoit™Xa-3 vector containing IL-16 cDNA which produces 33×10^3 specific biotinylated fusion protein; 3: Host cell JM109 which produces an endogenous 22.5×10^3 biotinylated protein; 4: Protein molecular mass standards

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

在分子克隆实验中，常常需要把酶切产生的粘性末端用 SI 外切核酸酶削成平头末端，再与其它的平端进行连接。SI 外切核酸酶从 3′→5′方向水解 DNA 单链。在反应中酶的用量及反应时间较难掌握，很容易产生“星号”活性，导致双链 DNA 的水解。因为这些原因影响了 SI 外切核酸酶的应用。我们在大量的实验中摸索出了可控制其活性的使用方法：首先，被 SI 外切核酸酶处理的 DNA 片段用量尽量大一些；其次，把 SI 外切核酸酶稀释至 1 U/μl（试剂公司售出的 SI 外切核酸酶通常为 100 U/μl），以便于酶量的准确吸取；另外，严格控制消化时间，终止反应时立即加入饱和酚混匀，以便将酶完全、快速灭活，然后再进行后续纯化步骤处理核酸。经此处理的 DNA 片段在克隆实验时效果理想。

据文献报道，IL-16 的全长 mRNA 是一个 2.6 kb 分子，编码 80×10^3 无生物活性的蛋白质前体，之后经加工修饰产生 C 端 130 个氨基酸的分泌型多肽，并进一步自聚成有生物活性的四聚体。关于 IL－16 抑制 HIV 复制的活性是 1995 年 Bauer 等[2] 首次报道的。他们发现 rIL-16C 端 130 个氨基酸能抑制人免疫缺陷病毒（HIV）及其相关病毒－猴免疫缺陷病毒（SIV）的活性。此后 Zhou 等将 IL－16 C 端这 130 个氨基酸的 cDNA 导入 HIV-1 敏感的 CD_4^+ jurkat 细胞后，发现在这种稳定表达和分泌 IL-16 的细胞中，HIV-1 病毒虽可侵染，但几乎不能复制，因而引起了人们对 IL-16 的极大关注。

此外，目前认为 IL-16 还是一个早期的促炎细胞因子，在过敏性哮喘病人及类肉瘤病人的肺泡灌洗液，类天疱疮病人的水疱液中都检测到了高水平的 IL-16[8]。在炎症反应中，IL-16 可作为趋化因子吸引 CD_4^+ T 淋巴细胞、嗜酸性细胞和单核细胞等，诱导它们表达 IL-2R 并释放细胞因子，从而加强炎症过程。IL-16 的促炎作用提示以 IL-16 为靶标筛选其特异性抑制剂有可能用于 IL-16 为主要炎症介质疾病的防治有重要意义。

本研究成功地将 IL-16 cDNA 克隆至原核融合表达载体 Pinpoint™ Xa 上，得到重组质粒 Pinpoint™ X-IL-16，再将重组质粒转化至大肠杆菌 JM 109 中，得到的工程菌经 IPTG 诱导表达，表达的重组蛋白经 Western 免疫印迹检测，确有与 IL-16 抗体结合，分子量约为 33×10^3 的新增蛋白带出现。这为后面的 IL-16 的功能和活性的研究打下了良好的基础。

参考文献：

[1] Cruikshank W W, Center D M, Nisar N, *et al*. Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: Association of biologic function with CD_4 expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(11): 5 109－5 113.

[2] Baier M, Warner A, Bannert N, *et al*. HIV suppression by interleukin-16 [J]. Nature, 1995, 378(6 557): 563.

[3] Center D M, Kornfeld H, Cruikshank W W. Interleukin-16 and its function as a CD_4 ligand[J]. Immunology Today, 1996, 17(10): 476－481.

[4] Mathy N L. Cutting edge: CD_4 is not required for the function activity of IL-16[J]. J Immunol, 2000, 164(9) 4 429－4 432.

[5] 卢圣栋，马清钧，刘德培，等. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京：中国协和医科大学出版社. 1999, 12: 128－129; 111－112.

[6] Zhang Y, Center D M, Wu D M, *et al*. Processing and activation of pro-interleukin 16 by caspase-3[J]. J Biol Chem, 1998, 273(2): 1 144－1 149.

[7] Krautwald S. IL-16 activates the SAPK signaling pathway in CD_4^+ Macrophage[J]. J Immunol, 1998, 160(12): 5 874－5 879.

[8] Kazatchkine M D. Terminology: Interleukin 16(IL-16)[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1996, 80(1): 102－103.

（编辑 汪勤俭）

（上接 427 页）

讨论

宫颈小细胞癌（SCCC）是一种罕见而独特的原发恶性肿瘤，属于神经内分泌系统肿瘤，是最侵袭性的妇科恶性肿瘤，占宫颈恶性肿瘤的 1%6%[1]，国内尚未见相关的病例报道。宫颈小细胞癌主要症状为不规则阴道流血或排液或月经间期出血。目前 SCCC 的临床诊断主要依赖光镜检查，其镜下表现与小细胞肺癌相似，细胞体积小，短梭形或圆形，大小较一致，胞浆少，核浓染，染色质呈细颗粒状，无核仁或核仁不明显，电镜下可见胞浆内电子高密度核心的膜被神经内分泌颗粒。免疫组化可有神经内分泌标记阳性结果，如神经特异性烯醇化酶（NSE）、CgA、突触素（Syn）和 CD57 等，也通常有上皮性标记物阳性，如 CK。近年已有针对膜抗原 CD56 的单克隆抗体 123C3，据报道诊断 SCCC 敏感性达 99%[2]。鉴别诊断主要包括淋巴瘤、类癌和分化良好的神经内分泌肿瘤。细胞神经内分泌癌增殖快，倍增时间短，易早期发生转移，可转移至骨、肺、肝、脑、膀胱、尿道、胰腺等。早期患者盆腹腔淋巴结转移及淋巴血管受侵率明显高于常见类型宫颈癌[3]。本例患者术后诊断为Ⅱb 期，右髂外淋巴结有转移。

由于 SCCC 发病率低，恶性程度高，迄今尚无较统一的治疗方案。传统宫颈癌治疗方法即手术及放疗对 SCCC 的疗效差，目前多主张综合治疗，即手术联合放化疗，化疗多采用 VAC/PE 和 PDD＋5FU 方案。但总体疗效仍不理想，5 年生存率仅为 14%[3]。影响预后的因素主要有淋巴结有无转移和病灶大小，有淋巴结转移和病灶直径＞2 cm 者生存时间显著缩短[4]。本例患者盆腔淋巴结有转移，尽管对其进行了手术联合放化疗治疗，术后 8 月即出现复发。对 SCCC 的治疗尚需进行更多的研究。

关键词：宫颈小细胞癌
中图法分类号：R737.33 文献标识码：B

参考文献：

[1] Sheridan E, Lorigan P C, Goepel J, *et al*. Small cell carcinoma of the cervix[J]. Clin Oncol (R-Coll-Radiol), 1996, 8(2): 102－105.

[2] Kaufmann O, Georgi T, Dietel M. Utility of 123c3 monoclonal antibody against CD56(NCAM) for the diagnosis of small cell carcinomas on paraffin sections[J]. Hum Pathol, 1997, 28(12): 1 373－1 378.

[3] Chang T C, Hsueh S, Lai C H, *et al*. Phase Ⅱ trial of neoadjuvant chemotherapy in early-stage small cell cervical cancer[J]. Antican Drug, 1999, 10(7): 641－646.

[4] Park T K, Kim S N, Kim S W, *et al*. Concurrent chemotherapy and radiotherapy in invasive cervical cancer patients with high risk factors[J]. J Korean Med Sci, 2000, 15(4): 436－441.

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net