DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.029
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
184 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0184-03

人白细胞介素-18在大肠杆菌中的高效表达

朱永红,邹全明 (第三军医大学医学检验系临床微生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 在大肠杆菌中实现人IL-18成熟蛋白(mhIL-18)的高效表达。方法 采用RT-PCR由人肝脏Kupffer细胞中扩增mhIL-18基因,构建非融合型原核表达质粒petTT/mhIL-18,转化至大肠杆菌DH5α,用IPTG诱导重组蛋白表达,超声裂解细胞提取包涵体,采用SDS-PAGE及Western blot分析重组蛋白的表达,包涵体蛋白经8 mol/L尿素溶解,透析复性,ELISA检测重组蛋白诱导人外周血单个核细胞(PBMC)产生IFN-γ的能力。结果 所扩增的mhIL-18基因与GenBank公布的序列一到。经IPTG诱导,mhIL-18在大肠杆菌中的表达量占菌体蛋白的40%以上,在细胞中以包涵体形式存在,复性的重组蛋白具有诱生IFN-γ的能力。结论 mhIL-18可在大肠杆菌中高效表达。

关键词:白细胞介素-18;重组表达;包涵体
中图法分类号:R378.21;R392.13 文献标识码:A

High level expression of non-fusion recombinant human IL-18 in *E. coli*

ZHU Yong-hong, ZOU Quan-ming (Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct a expression vector which can produce a high level expression of mature human IL-18 (mhIL-18) in *E coli*. **Methods** The cDNA encoding mhIL-18 was amplified from human Kupffer cells with RT-PCR. The recombinant expression plasmid petTT/mhIL-18 was constructed by cloning cDNA of mhIL-18 into petTT vector and then transformed to *E. coli* DH5α. IPTG was added into the *E. coli* culture to express the recombinant mhIL-18. After the harvested bacteriawere dispersed with sonication, the inclusion bodies were extracted with centrifugation. SDS-PAGE and Western blot were used to analyze the expression of recombinant protein. The recombinant mhIL-18 inclusion bodies were dissolved with 8 mol/L urea and dialyzed against renaturing buffer. The production of IFN-γ by human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) was assayed with ELISA after cocultured with conA and renatured protein of different dosages. **Results** The cloned sequence of mhIL-18 cDNA was identical with the published sequence in GenBank. The recombinant mhIL-18 was expressed in inclusion bodies of *E. coli* and covered above 40% of total bacterial proteins. Renatured recombinant mhIL-18 could induce the IFN-γ production by PBMC. **Conclusion** mhIL-18 could be expressed as non-fusion protein at a high level in *E. coli*.

Key words: interleukin-18; recombinant expression; inclusion body

白细胞介素-18(IL-18)是日本学者Okamura等[1]于1995年发现的一种细胞因子,因其能诱导T细胞产生IFN-γ,最初被称为IFN-γ诱生因子(IGIF),1996年被正式命名为IL-18[2]。目前认为,IL-18在促进Th1型细胞免疫反应及增强NK细胞活性方面发挥着重要作用,被认为是一种特异的Th1型免疫反应诱导因子[3]。目前,有关IL-18的临床前应用研究十分活跃,其应用领域包括抗肿瘤、抗感染及治疗移植物抗宿主反应(GVHD)等,其中抗感染主要包括抗病毒、抗结核分支杆菌、抗真菌及抗寄生虫等胞内感染,具有较大的临床应用前景[3~6]。

国内于近几年开展了人IL-18(hIL-18)的克隆表达研究,但表达量不是十分理想,且多为融合表达,不适合hIL-18的药物开发与临床应用。我们从人肝脏Kupffer细胞中克隆到hIL-18成熟蛋白编码基因,构建了表达hIL-18成熟蛋白(mhIL-18)的非融合型重组表达质粒,并在大肠杆菌中获得了高效表达。

作者简介:朱永红(1966—),男,湖北省荆门市人,博士,讲师,主要从事基因工程药物与开发方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752315

收稿日期:2001-03-28;修回日期:2001-05-19

1 材料和方法

1.1 主要试剂

淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品;TriPure分离试剂为Boehringer Mannheim公司产品;Access RT-PCR试剂为Promega公司产品;Pfu DNA聚合酶为上海生工产品;内切酶 *Nde*Ⅰ、*BamH*Ⅰ及T4 DNA连接酶为华美公司产品;质粒petTT、菌株DH5α为本室保存;质粒抽提、胶回收试剂盒为上海生工产品;鼠抗hIL-18单克隆抗体为美国Biosource公司产品。

1.2 细胞总RNA的提取

获取4月龄人胎肝脏,经Ⅳ型胶原酶灌注消化,50×*g*离心2 min去除肝细胞,以淋巴细胞分离液进行密度梯度离心获得肝脏非实质细胞,将肝脏非实质细胞接种于玻璃培养瓶,2 h后换液,去除非贴壁细胞,加LPS(1 μg/ml)作用2 h,收集贴壁细胞,加入2 ml TriPure试剂,制成匀浆,按说明书提取总RNA,紫外测定RNA的纯度及含量。

1.3 RT-PCR扩增hIL-18 cDNA

根据GenBank中hIL-18 cDNA序列(Access No. D49950)设计PCR引物,采用RT-PCR扩增目的片段,引物序列如下:

P1:5′-GGAATTCCATATGTACTTTGGCAAGCT-3′

P2:5′-CGGGATCCTTAGTCTTCGTTTTGAAC-3′

P1的5′端含*Nde*Ⅰ位点,P2的5′端含*BamH*Ⅰ位点。RT-PCR扩增采用一步法Access RT-PCR试剂盒,按操作说明书进行,PCR扩增条件为94 ℃,5 min;94 ℃,1 min;55 ℃,1 min;

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

72 ℃, 1 min; 35 个循环; 72 ℃, 10 min 延伸。

1.4 重组表达质粒的构建

以 Silver Beads 胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物, 经 *Nde* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ 酶切及纯化后, 通过 T4 DNA 连接酶与经同样酶切及纯化的质粒 petTT 进行连接, 转化 *E. coli* DH5α, 酶切鉴定阳性重组子, 对阳性重组质粒插入片段进行 DNA 序列测定。

1.5 重组蛋白的诱导表达

挑取单菌落接种于 LB 培养基(含 Amp 100 μg/ml), 37 ℃振摇过夜, 将饱和菌液以 1∶100 的比例接种于新鲜培养基, 振摇培养至 D_{600} = 0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 诱导培养 5 h, 离心收集细菌。超声破菌后离心收集沉淀, 以 10 mmol/L TE 缓冲液(pH 8.0)洗涤 1 次。取全菌及超声破菌沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 Western blot 分析

样品经 SDS-PAGE 后, 电转移至硝酸纤维素膜, 以封闭液(5%脱脂奶粉溶于 TBS, pH 7.5)封闭 1 h, 然后将膜浸入含一抗(鼠抗 hIL-18 单抗, 1∶4 000, 封闭液稀释)的封闭液中, 室温孵育 1 h, 以 TBS 洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1∶10 000, TBS 稀释), 室温孵育 1 h, 以 TBS 洗膜 3 次, 每次 10 min, 最后以 DAB 显色, 水洗终止。

1.7 包涵体蛋白溶解及透析复性

将超声破菌沉淀以 10 mmol/L TE 缓冲液(pH 8.0)洗涤 2 次, 用含 8 mol/L 尿素的 TE 缓冲液溶解, 用复性缓冲液(20 mmol/L Tris·HCl, 2 mmol/L EDTA, 20 mmol/L β-巯基乙醇, pH 8.0) 超滤透析去除尿素, 使变性蛋白自然复性。

1.8 生物学活性检测

淋巴细胞分离液分离正常人外周血单个核细胞(PBMC), RPMI1640 洗 2 次, 用含 10% FBS 的 RPMI1640 将细胞配成 3×10^6/ml, 加 0.5 μg/ml conA 和不同浓度(0.1、1.0、10 nmol/L)的重组 mhIL-18, 培养 24 h 后, 收获培养上清, ELISA 法检测 IFN-γ。实验中设阴性对照。

2 结果

2.1 mhIL-18 cDNA 的 RT-PCR 扩增

经 RT-PCR 扩增, 得到大小约 490 bp 的 DNA 片段, 与预期的目的片段大小一致, 见图 1。

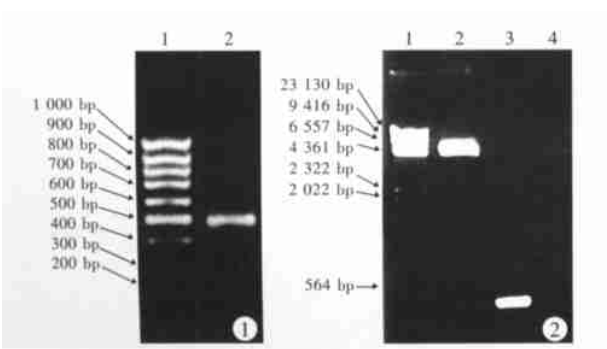


图 1　RT-PCR 扩增 mhIL-18 cDNA 电泳结果

Fig 1　Electrophoresis of mhIL-18 cDNA with RT-PCR

1: Ladder DNA marker; 2: PCR amplified mhIL-18 gene fragment

图 2　重组质粒酶切鉴定结果

Fig 2　Identification of recombinant plasmid with restriction endonuclease analysis

1: λDNA/*Hind* Ⅲ DNA marker; 2: Recombinant plasmid petTT/mhIL-18/*Nde* Ⅰ, *BamH* Ⅰ; 3: PCR amplified mhIL-18 gene fragment; 4: Plasmid petTT/Nde, *BamH* Ⅰ

2.2 非融合型 mhIL-18 表达载体的构建

以 *Nde* Ⅰ 和 *BamH* Ⅰ 双酶切阳性重组质粒(命名为 petTT/mhIL-18), 能切下一条与 PCR 扩增产物大小一致的片段, 见图 2, DNA 序列测定证实插入片段序列与 GenBank 收录序列完全一致。

2.3 重组蛋白的诱导表达

携带 petTT/mhIL-18 的 *E. coli* DH5α 菌株经 IPTG 诱导后, 出现外源蛋白的表达, 其分子量约 19× 10^3, 表达量达菌体总蛋白的 40%以上, 可溶性分析表明, 外源蛋白为不溶性表达, 在菌体中以包涵体形式存在, 包涵体经洗涤后, 重组蛋白纯度达 80%以上, 见图 3。

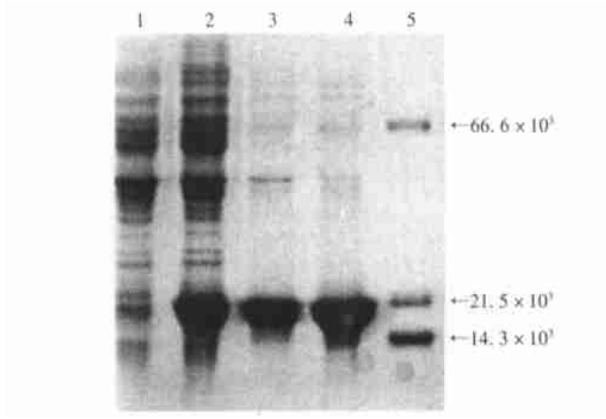


图 3　SDS-PAGE 分析重组 mhIL-18 在大肠杆菌中的表达

Fig 3　SDS-PAGE analysis of recombinant mhIL-18 expressed in *E. coli*

1: Lysate of DH5α(petTT); 2: Lysate of DH5α(petTT/mhIL-18) after induced by IPTG; 3: Pellet of IPTG induced DH5α(petTT/mhIL-18) after sonication; 4: Pellet after wash; 5: Protein MW marker

2.4 Western blot 分析

以鼠抗 hIL-18 单抗进行免疫印迹发现, 在分子量约 19× 10^3 的位置出现一特异显色条带, 与 SDS-PAGE 显示的目的蛋白条带位置对应, 见图 4。

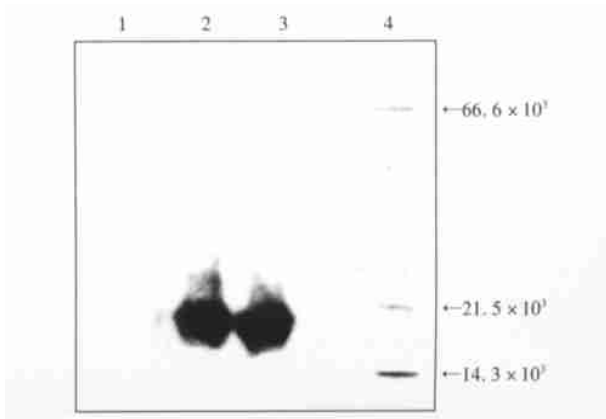


图 4　免疫印迹分析重组 mhIL-18 在大肠杆菌中的表达

Fig 4　Western blot of recombinant mhIL-18 expressed in *E. coli*

1: Lysate of DH5α(petTT/mhIL-18) after induced by IPTG; 2: Inclusion bodies; 3: Lysate of DH5α(petTT); 4: Protein MW marker

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

2.5 生物学活性检测

重组 mhIL-18 作用于经 conA 刺激的正常人 PBMC 24 h 后，细胞培养上清中检测到了 IFN-γ。随着 IL-18 浓度的增高，上清中 IFN-γ 的含量也随之增加，在浓度为 0.1、1.0 和 10.0 nmol/L 时，诱导产生 IFN-γ 的量分别为 51.7、128.3、497.0 IU/ml。

3 讨论

有活性的成熟的 hIL-18（即 mhIL-18）是由 157 个氨基酸组成的单条多肽，分子量约 19×10^3，不含疏水信号肽序列及糖基化位点，适合于在大肠杆菌中表达[2]。国内已有多家单位开展 hIL-18 的基因克隆及其在大肠杆菌中表达的研究，但多为融合型表达，融合型表达虽然有助于重组蛋白的分离与纯化，但不适合于进行基因工程药物的研究与开发。进行非融合型表达的，表达量又不甚理想。为此，有必要构建一种 hIL-18 的非融合型高效表达载体，为大量获得非融合型重组 hIL-18 打下基础。

该研究首先从人肝脏 Kupffer 细胞扩增到编码 mhIL-18 的 DNA 片段。DNA 测序分析表明，由肝脏 Kupffer 细胞来源的 hIL-18 cDNA 序列与从外周血及全肝组织来源的 hIL-18 cDNA 序列完全一致。

选择有效的表达系统是进行外源基因高效表达的重要前提。pet 原核表达质粒是最有效的原核表达系统之一，它利用噬菌体 T7 启动子与 T7 RNA 聚合酶之间作用的高度特异性及高效性使外源基因在细胞中呈现高效表达，利用该载体，mhIL-18 基因未经修饰即在大肠杆菌中获得了高效表达。且表达产物以包涵体形式存在，有利于目的蛋白的纯化。纯化的包涵体中，目的蛋白的纯度已达 80%以上，透析复性后包涵体蛋白具有透导人 PBMC 产生 IFN-γ 的能力，为后续的工程菌发酵及大规模分离纯化打下了很好的基础。

参考文献：

[1] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, *et al*. Cloning of a new cytokine that induce IFN-gamma production by T cells[J]. Nature, 1995, 378(6 552): 88－91.

[2] Ushio S, Namba M, Okura T, *et al*. Cloning of the cDNA for human IFN-γ-inducing factor, expression in Escherichia coli and studies on the biological activities of the protein[J]. J Immunol, 1996, 156(10): 4 274－4 279.

[3] Dinarello C A. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family[J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 101(1): 11－24.

[4] Golab J. Interleukin-18-interferon gamma inducing factor-a novel player in tumor immunotherapy[J]. Cytokine, 2000, 12(4): 332－338.

[5] Ohkusu K, Yoshimloto T, Takeda K, *et al*. Potentiality of IL-18 as a useful reagent for treatment and prevention of Leishmania Major infection[J]. Infect Immun, 2000, 68(15): 2 449－2 456.

[6] 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, 164(11): 6 067－6 074.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)02-0186-01

子宫阔韧带结石和卵巢巨大结石 2 例报告

Report of a case with calculus of broad ligament of uterus and another great calculus of ovary

钱 锋，蔡志民，姜 军 （第三军医大学附属西南医院普通外科，重庆 400038）

病例 1：女，55 岁，因反复右下腹痛半年，加重 20 d 于 1994-05-05 入院。腹痛为持续性隐痛，阵发加重，向会阴部放射，感肛门坠胀，排便后症状可稍缓解。腹部、直肠、阴道三合诊检查于直肠子宫陷窝位置可触及一 8 cm×8 cm×6 cm 包块，质硬，光滑，固定，有触痛。B 超提示：子宫后方实质不均质肿块。腹部 X 线片见盆腔内有一 8 cm×7 cm×6 cm 分叶状高密度影（较骨密度高），位于耻骨联合上缘 4 cm、骶尾椎前 1 cm。硬膜外麻醉下行剖腹探查发现：盆腔内有一包块，与子宫直肠粘连，将直肠推向左后方，子宫推向右前方，游离后见包块位于左侧卵巢内。切除包块及左卵巢、输卵管。术后检视：包块为卵巢内结石，外观为椭圆体，9 cm×7 cm×6 cm，重达 235 g，表面呈结节状，质地异常坚硬，锯开见剖面为灰白色实心组织，硬若骨皮质。病理诊断：卵巢结石。

病例 2：女，60 岁，因下腹隐痛不适 2 d 就诊，于 2000-08-20 入院。检查：下腹部明显膨隆，如妊娠 7 个月大小。B 超提示：下腹部巨大囊肿。CT 示：下腹部低密度肿块，CT 值 16～18 Hu，最大截面为 25 cm×14 cm；另外发现在子宫上方位置有一 2 cm×2 cm 高密度钙化灶。在硬膜外麻醉下行剖腹探查，见腹腔肿块为左侧卵巢囊肿，切除后测量大小为 23 cm×21 cm×15 cm，内为清淡液体，总重量为 3 150 g；在右侧子宫阔韧带内有一质硬肿块，分离切除，见一 2 cm×2 cm×2 cm 结石，表面呈结节状，质地坚硬，重 6.21 g。病理诊断：①卵巢囊肿；②右侧子宫阔韧带结石。

讨论

卵巢结石和子宫阔韧带结石相当罕见，追朔近 10 年国内文献仅有个别零星报道，亦多为卵巢钙化斑或畸胎瘤。卵巢钙化斑或卵巢畸胎瘤内的钙化物一般都很小，很少超过 1 cm，影

（下转 188 页）

作者简介：钱 峰（1967－），男，云南省祥云县人，硕士，主治医师，主要从事腹腔感染及胃癌方面的研究，发表论文 6 篇。电话：(023)68753793

收稿日期：2001-01-20；修回日期：2001-09-20

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