

人白细胞介素 26 的基因克隆及其在大肠杆菌中的表达 Cloning and Expression of Human Interleukin-26 in *Escherichia coli*

刘义庆^{1,2}, 陈子江¹, 张 雪¹, 王来城¹, 焦玉莲¹, 张 捷¹, 马春燕¹, 崔 彬¹, 高新谱¹, 刘正敏¹, 吴 侃¹, 赵跃然^{1,2*}

LIU Yi-Qing^{1,2}, CHEN Zi-Jiang¹, ZHANG Xue¹, WANG Lai-Cheng¹, JIAO Yu-Lian¹, ZHANG Jie¹, MA Chun-Yan¹, CUI Bin¹, GAO Xin-Pu¹, LIU Zheng-Min¹, WU Kan¹, ZHAO Yue-Ran^{1,2*}

1. 山东大学山东省立医院科研中心, 济南 250021

2. 山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062

1. Medical Research Center, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250021, China

2. Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

摘 要 克隆人白细胞介素-26(human interleukin-26, hIL-26)基因, 构建高效稳定的大肠杆菌表达菌株。对 GenBank 上报道的 hIL-26 基因进行序列分析后设计合成引物, 利用 RT-PCR 技术从人外周血单个核细胞(PBMC)总 RNA 中反转录并扩增得到人成熟 IL-26 基因。将得到的基因克隆到 pMD18-T 载体中, 菌落 PCR 筛选、酶切鉴定并进行 DNA 序列分析。用 *Bam*HI 和 *Eco*R I 将目的片段切下, 插入表达载体 pBV220 相应的位点。42℃ 热诱导表达目的蛋白, SDS-PAGE 分析显示表达蛋白约占菌体总蛋白的 20%, Western 印迹法证实重组蛋白为特异性蛋白, 分子筛纯化后纯度达 90% 以上。表达的重组蛋白经谷胱甘肽复性缓冲液复性, 用 RT-PCR 检测复性的重组蛋白能促进 PBMC 合成 IFN- γ 。

关键词 白细胞介素-26, 克隆与表达, 大肠杆菌, 生物活性

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0413-05

Abstract To clone human interleukin-26(hIL-26) and express it in *E. coli* efficiently. Two pairs of primers were synthesized according to the hIL-26 gene reported on GenBank. The hIL-26 gene was cloned by nest PCR following the first round RT-PCR from human peripheral blood monocytes total RNA, and then the PCR product was cloned into pMD18-T vector. Colony PCR, restriction analysis and sequence analysis showed that the gene cloned was the same as the reported hIL-26. The recombinant was cut with *Bam*HI and *Eco*R I to obtain the hIL-26 fragment, and then the fragment was inserted into pBV220 which was cut with the same enzymes. The recombinant expression vector was induced to express hIL-26 at 42℃, SDS-PAGE analysis showed that the recombinant protein accounted for up to 20% of the whole protein of *E. coli*, and the protein was also confirmed by Western blotting. Purity of the protein was found to be above 90% after purified with molecular sieve. After renaturalized with glutathione buffer, the promoting effect of it on the production of IFN- γ in PBMC was detected by RT-PCR. A recombinant bacterial strain for expressing hIL-26 with biological activity was constructed successfully.

Key words interleukin-26, cloning and expression, *Escherichia coli*, biological activity

Received: October 26, 2005; Accepted: December 20, 2005.

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China(No.30371304).

* Corresponding author. Tel: 86-531-85186905; E-mail: yrzha@jnn.com

国家自然科学基金资助项目(No.30371304)。

白细胞介素 26 是 2000 年由 Knappe 等^[1]用扣除杂交(subtractive hybridization)方法在 saimiri 疱疹病毒(Herpesvirus saimiri, HVS)转染的 T 淋巴细胞中首先发现的。除了在松鼠猴属疱疹病毒转染的 T 淋巴细胞中高表达外,在其他的 T 细胞系和天然外周血细胞中表达水平均较低。IL-26 的受体与其他已知的 IL-10 家族新成员(IL-19, IL-20, IL-22, MDA7/IL24)的受体一样,都属于 II 型细胞因子受体家族(the Class II cytokine receptor family, CRF2)^[2]。IL-26 受体复合体是由配体结合链 IL-20R1 和非配体结合链 IL-10R2 组成的异二聚体,IL-26 与其受体复合体的高亲和力结合导致 STAT1 和 STAT3 的快速磷酸化,从而传递活化信号^[3]。尽管 IL-26 受体复合体是 IL-26 高度特异的,不能被其它 II 型细胞因子激活,但是 IL-26 受体复合体的亚单位却是构成别的 II 型细胞因子受体复合体的重要组成部分。IL-10R2(CRF2-4)也是 IL-10、IL-22 和 IFN- λ (IL-28A, IL-28B 和 IL-29)受体复合体的一个受体亚单位,而 IL-20R1(CRF2-8),好像是 IL-26、IL-19、IL-20 和 IL-24 共用的^[3-6]。虽然 IL-26 具体的生物学功能现在还不清楚,由于共用受体,IL-26 很可能与另外几个 CRF2 细胞因子有着相似的功能,另外,IL-26 基因可能与哮喘的发生有关。为了深入研究 IL-26 的生物学作用及其分子机制,本文应用 RT-PCR 技术成功克隆了 hIL-26cDNA,并构建了其高效原核表达载体。

1 材料和方法

1.1 外周血来源及质粒、菌株

健康正常人外周血取自山东省立医院健康体检标本, pMD18-T vector 购于大连宝生物有限公司; pBV220、大肠杆菌 *E. coli*-DH5 α 由本室保存。

1.2 酶和主要试剂

逆转录酶、*Taq* DNA 聚合酶购于大连宝生物工程有限公司(TAKARA 产品); T4DNA 连接酶、*Eco*R I、*Bam*HI 为 MBI 产品; DNA Extraction Kit 购于上海生工生物工程公司; 羊抗人 IL-26 多克隆抗体为 R&D 产品; HRP-兔抗羊-IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 淋巴细胞分离液、PHA 等其它生化试剂为国产或进口分析纯。

1.3 引物设计及合成

根据 GenBank 上 hIL-26cDNA 成熟肽序列及 pBV220 多克隆位点,自行设计两对引物,其中内侧引物 P1、P2 包括了翻译起始密码、终止密码及

*Eco*R I 和 *Bam*HI 识别序列。内侧引物 P1: 5'-GCGAATTCTATGGCCAAGCACAAAG CAATCTTC-3' 在 5' 端引入 *Eco*R I 酶切位点和保护碱基 GC, P2: 5'-TAGGATCCTGGCTTTGGTTTACTGACTGC-3' 在 5' 端引入 *Bam*HI 酶切位点和保护碱基 TA; 外侧引物: P3: 5'-TGAGTGACACACGCTGAG-3', P4: 5'-ACCTAACATGCC GTCAGT-3'。人 IFN- γ 上、下游引物分别为: 5'-ATGA AATATACACTTATATCTTGGGTTT-3'; 5'-GATGCTCTT CGAGGTCGAAACAGCAT-3'; 人 β -actin 上、下游引物分别为: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'; 5'-CTCC TTAATGTCACCCACGATTT-3'。所有引物由上海博亚生物工程有限公司合成。

1.4 RNA 的提取及 RT-PCR

抽取正常人外周血 5mL,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞。参照文献[7]异硫氰酸胍一步法提取外周血总 RNA,以随机六聚体为引物合成 cDNA,以此 cDNA 为模板,以 P3、P4 为引物,先 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,再以 94 $^{\circ}$ C 45s, 48 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min 进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。以此次 PCR 产物为模板,以 P1、P2 为引物,先 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,再以 94 $^{\circ}$ C 45s, 58 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min 进行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。1%的琼脂糖凝胶电泳分离分析 PCR 产物,用 DNA Extraction Kit 纯化回收扩增的目的基因。

1.5 基因克隆与测序

将纯化回收 PCR 片段与载体片段按摩尔数 5:1 加入连接反应体系内,16 $^{\circ}$ C 连接过夜;转化感受态 *E. coli*-DH5 α , 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取菌落 PCR 阳性的单个菌落于 LB + Amp 的培养液 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,小量提取质粒 DNA,经 *Bam*HI、*Eco*R I 双酶切初步鉴定后,由本室采用 ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer 全自动 DNA 测序仪完成测序。

1.6 原核表达载体 pBV220/hIL-26 的构建

*Bam*HI、*Eco*R I 双酶切重组 pMD18-T/hIL-26,低熔点琼脂糖法回收目的片段,与经同样处理的 pBV220 按摩尔数 5:1 的比例进行 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,将连接产物转化感受态大肠杆菌 *E. coli*-DH5 α ;挑取 PCR 阳性的单个菌落于 LB + Amp 的培养液 30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,小量提取质粒 DNA, *Eco*R I、*Bam*HI 双酶切鉴定。

1.7 重组 hIL-26 在大肠杆菌中的诱导表达

将单个阳性菌落在 5mL LB 培养基中 30 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养后,再以 1:100 的比例稀释,200r/min 振荡培养至对数生长中期,迅速转移至 42 $^{\circ}$ C 摇床

180r/min继续培养 2~5h。10000r/min 离心 2min 收集细菌。

1.8 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western 印迹

菌体用 100 μ L 1 \times 电泳上样缓冲液悬起,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10min,15% SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色,重组蛋白表达量及纯度分析采用柯达凝胶成像。表达产物 SDS-PAGE 后电转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭,与羊抗人 IL-26 多克隆抗体和酶标二抗反应后,DAB 显色。

1.9 包涵体的提取及分子筛纯化

按本室建立的常规方法进行,菌体悬浮于 0.1mol/L Tris-HCl,EDTA,pH8.5 液,洗涤 2 次,反复冻融 2 次后,于冰浴中超声破碎细菌,10000r/min 离心 10min,用 1mol/L 尿素,0.05mol/L Tris-Hcl(PH8.0)洗涤 2 次,再以 8mol/L 尿素溶解包涵体沉淀,离心后收集上清。将上清加入已经平衡好的 Sephacryl S100HB 层析柱,洗脱液洗脱,流速为 2mL/min,收集纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析其纯度。

1.10 包涵体的复性

用复性液(50mmol/L Tris-Hcl,0.12 mol/L 盐酸胍,0.05mmol/L GSH,pH8.5)进行 1:25(V/V)透析,GSSG 终浓度为 0.05mmol/L,室温置 10~24h。离心去沉淀,PEG20000 浓缩,用 20mmol/L Tris-HCl,20mmol/L NaCl 透析,过滤除菌。

1.11 hIL-26 的生物学活性测定

于 96 孔板加入 0.1mL 人 PBMC(3×10^5),终浓度为 0.1 μ g 的 PHA-P 和不同稀释度的 hIL-26,每个稀释度设 3 个复孔,于 37 $^{\circ}$ C 5%的 CO₂ 温育 48h。收集细胞,提取总 RNA,以随机六聚体引物进行逆转录,用 RT-PCR 检测细胞 IFN- γ 表达水平,同时以 β -actin 为内参照。PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图像经生物图像分析仪分析,用相对指数(Relative index, RI)计算 IFN- γ 的相对表达水平。RI = IFN- γ 产物的强度/ β -actin 产物的强度。

2 结果

2.1 人 IL-26cDNA 的扩增

逆转录产物经巢式 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳可见一条约 465bp 条带,与预期相符(图 1)。

2.2 hIL-26 基因克隆与酶切鉴定

挑取 PCR 鉴定为阳性菌落的重组质粒,经 *EcoR* I、*Bam*HI 双酶切鉴定,电泳分析可见约 2700bp 和 465bp 大小两条带(图 1)。以 M13-forward 为引物正向测序,DNA 测序结果与 GenBank 上报道

的序列完全一致(测序结果略)。

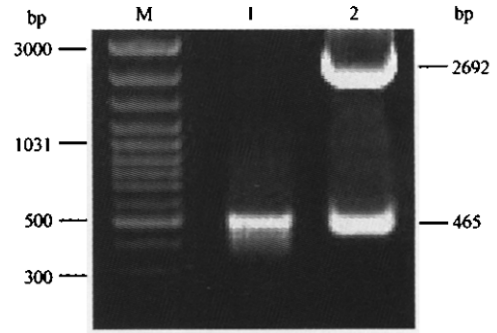


图 1 质粒 pMD18-T/hIL-26 的酶切鉴定

Fig.1 Enzyme analysis of plasmid pMD18-T/hIL-26

M: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus; 1: Nest PCR product; 2: pMD18-T/hIL-26 digested with *EcoR* I and *Bam*HI.

2.3 原核表达载体的构建

重组表达质粒经 *EcoR* I、*Bam*HI 双酶切鉴定,电泳分析可见约 465bp 和 3660bp 两条带(图 2),与预期结果相符。

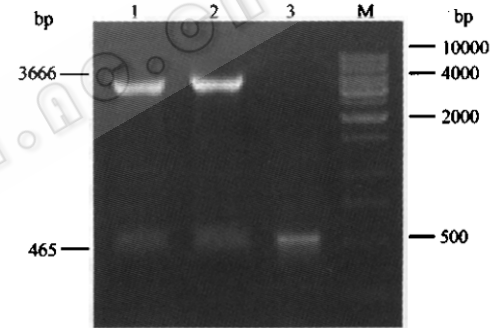


图 2 质粒 pBV220/hIL-26 的酶切鉴定

Fig.2 Enzyme analysis of plasmid pBV220/hIL-26

M: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder; 1,2: pBV220/hIL-26 digested with *EcoR* I and *Bam*HI;3: Nest PCR product.

2.4 hIL26 的表达

将诱导后收集的不同时相的菌体裂解变性后,经 15% SDS-PAGE 后染色,与对照菌和未诱导菌相比,诱导菌在相对分子量约为 18kD 处可见一明显异常条带,与预期结果相符。当 OD₆₀₀ 值为 0.5 时,诱导 5h,表达量最高,经柯达凝胶成像分析,表达蛋白约占菌体总蛋白的 20%(图 3)。

2.5 重组蛋白的鉴定

以羊抗人 IL-26 为一抗和 HRP-兔抗羊-IgG 为二抗,对重组蛋白行 Western blotting 检测,结果显示仅重组蛋白能和羊抗人 IL-26 特异性结合(图 4)。

2.6 重组蛋白的初步纯化

重组蛋白主要以不溶性包涵体形式存在,比较了不同洗涤液对包涵体洗涤效果的不同,其中 1mol/L 尿素洗涤效果较好,洗涤后的包涵体纯度达

60%, 以 Sephacryl S100HB 层析柱进一步纯化, 重组蛋白纯度可达 90% (图 5)。

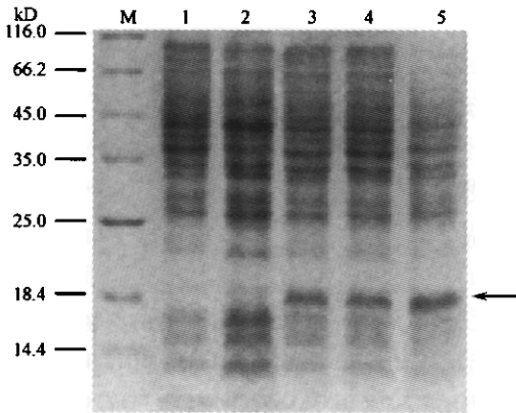


图 3 重组 hIL-26 的表达结果

Fig. 3 Recombinant hIL-26 expression in *E. coli*

M: protein molecular weight Marker; 1: DH5 α /pBV220-hIL26 induced for 0 h; 2: DH5 α /pBV220 induced for 5 hours; 3-5: DH5 α /pBV220-hIL26 induced for 2, 3, 5h.

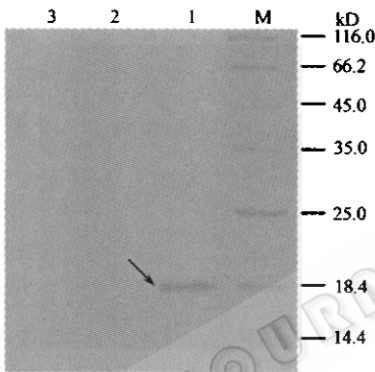


图 4 Western 印迹法检测 hIL-26 的表达

Fig. 4 hIL-26 expression confirmed by Western blotting

M: protein molecular weight Marker; 1: DH5 α /pBV220-hIL26 induced for 5 hours; 2: DH5 α /pBV220 induced for 5 hours; 3: DH5 α /pBV220-hIL26 induced for 0 hours.

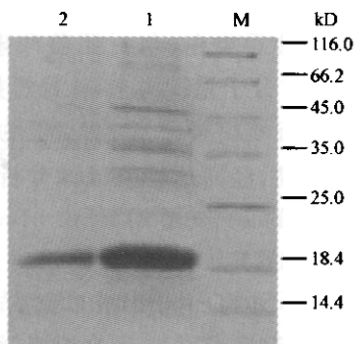


图 5 包涵体及其纯化产物的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE of the inclusion body and purified hIL-26

1: inclusion body; 2: purified hIL-26; 3: protein molecular weight marker.

2.7 hIL-26 的生物学活性

提取 hIL-26 包涵体, 用氧化还原型谷胱甘肽复性。用 RT-PCR 检测其对 PBMC 表达 IFN- γ 的影响。结果显示, 获得的 hIL-26 明显促进 PBMC 表达 IFN- γ , 提示获得的 hIL-26 具有生物学活性 (图 6)。

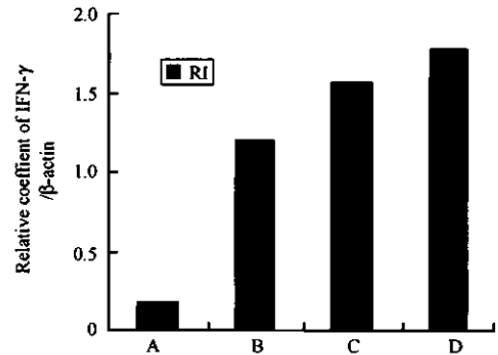


图 6 hIL-26 对 PBMC 表达 IFN- γ 的促进作用

Fig. 6 Promoting effect of hIL-26 on the expression of IFN- γ in PBMC

A: un-stimulated; B: stimulated with PHA; C: PHA + hIL-26 (10 μ g/mL); D: PHA + hIL-26 (20 μ g/mL).

3 讨论

由于外周血单个核细胞 IL-26 mRNA 丰度很低^[1], 我们在从健康正常人外周血中克隆 hIL-26 cDNA 时设计了两对引物进行巢式 PCR 扩增, 第一次 PCR 扩增时使用较低的退火温度, 1% 琼脂糖凝胶电泳后可见一条模糊片状条带, 再以此 PCR 产物为模板提高退火温度进行第二次 PCR 扩增。结果表明, 用巢式 PCR 技术成功的从未受刺激的新鲜外周血中扩增出 hIL-26 全长 cDNA, 所设计的引物特异性强, 确保了 PCR 结果的特异性。

作为最近新发现的 IL-10 家族成员之一, IL-26 基因定位于染色体 12q15^[1], 这是自身免疫性疾病和变态反应性疾病易感区域, 与肠炎性疾病和哮喘有关。目前已经证实 IL-10 能抑制抗原提呈和接下来的前炎症因子释放, 可以用来有效治疗慢性肠炎性疾病^[8]。基于 IL-26 与 IL-10 家族其它成员的紧密相关性, 推测它们的生物学功能有很大一部分是交叉的。本文在成功克隆 hIL-26 成熟肽基因的基础上构建了其高效原核表达载体, 并且表达的蛋白复性后可促进 PBMC 表达 IFN- γ , 具有生物活性。这不仅为进一步研究 hIL-26 的具体生物学作用及其分子机制奠定了基础, 还将会为自身免疫性疾病和变态反应性疾病等的治提供新的方法和途径。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Knappe A, Hor S, Wittmann S *et al.* Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. *J Virol*, 2000, **74**(8):3881 - 3887
- [2] Kotenko SV. The family of IL10 related cytokines and their receptors: Related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, **13**(3):223 - 240
- [3] Sheikh F, Baurin VV, Lewis-Antes A *et al.* Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J Immunol*, 2004, **172**(4): 2006 - 2010
- [4] Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D *et al.* Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J Immunol*, 2001, **167** (7):3545 - 3549
- [5] Blumberg H, Conklin D, Xu WF *et al.* Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*, 2001, **104**(1):9 - 19
- [6] Wang M, Tan Z, Zhang R *et al.* Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. *J. Biol Chem*, 2001, **277**(9):7341 - 7347
- [7] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [8] Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2004, **10**(5): 620 - 625