

hIL - 10 在大肠杆菌中的表达及其生物学活性鉴定

王旻东¹ 孙自勇² 陈俊勇² 吴盛² 智强² 刘建宁²

(1. 南京市公安局刑警支队, 江苏 南京 210012)

(2. 南京大学分子医学研究所, 江苏 南京 210093)

[摘要] 构建了含有人白细胞介素 - hIL - 10(Human Interleukin 10, hIL - 10) 基因的重组质粒, 在大肠杆菌中的高效表达, 并对其生物学活性进行了鉴定. 用 RT - PCR 扩增 hIL - 10 cDNA, 并插入原核表达载体 PET - 32b. 将重组质粒转入 BL21(DE3) 感受态细胞, 在 37℃ 用 IPTG 诱导 hIL - 10 表达. 表达的重组蛋白经复性纯化后, 用夹心 ELISA 法检测其对外周血单核细胞(PBMC) 合成 IFN - γ 的抑制作用. 重组质粒 PET - 32b/hIL - 10 的 DNA 序列分析显示, 克隆的 DNA 序列和文献报道的 hIL - 10 cDNA 序列一致. SDS - PAGE 表明, 重组蛋白相对分子质量为 18 000. 活性测定结果显示, 重组蛋白能显著抑制 PBMC 合成 IFN - γ . 这表明构建的 PET - 32b/hIL - 10 可以在大肠杆菌中高效表达, 经复性和纯化后, 获得了具有高纯度和活性的 hIL - 10.

[关键词] 人白细胞介素 - 10(hIL - 10), 克隆, 表达, 大肠杆菌, 生物学活性, 夹心 ELISA

[中图分类号] Q78 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2006)03-0062-04

Expression of hIL - 10 in *E. coli* and Identification of its Biological Activity

Wang Mindong¹, Sun Ziyong², Chen Junyong², Wu Sheng², Zhi Qiang², Liu Jianning²

(1. Criminal Police department of Nanjing City Public Security Bureau, Nanjing 210012, China)

(2. Institute of Molecular Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract This paper aims at constructing a recombinant hIL - 10 plasmid expressed in *E. coli* and to examine the biological activity of recombinant hIL - 10. An hIL - 10 cDNA fragment amplified with PCR is inserted into the prokaryotic expression vector PET - 32b. The plasmid transformed host cell strain *E. coli*——BL21(DE3) is induced by IPTG at 37℃ to produce the recombinant hIL - 10. After the expressed product is renaturalized and purified, the inhibitory effect of hIL - 10 protein on the production of IFN - γ by PBMC is detected by sandwich ELISA. The DNA sequence analysis of the recombinant plasmid PET - 32b/hIL - 10 reveals that the cloned DNA sequence is identical with the reported one. The molecular weight of recombinant product is 18 000, determined by SDS - PAGE. The activity assay proves that the expressed protein could inhibit the production of IFN - γ by PBMC remarkably. All the results show that the designed plasmid PET - 32b/hIL - 10 can be expressed successfully in *E. coli*, and the recombinant hIL - 10 has the expected biological activity.

Key words interleukin 10(hIL - 10), clone, expression, *E. coli*, biological activity, sandwich ELISA

1989 年, Fiorentino 等人发现小鼠 Th2 细胞株 D10. G4. 1 产生一种能抑制 Th1 细胞株细胞因子 mRNA 转录的因子, 称为细胞因子合成抑制因子(cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF), 同年被命名为 IL - 10 (Interleukin - 10, μ L - 10)^[1]. 随着与 IL - 10 极其相似的 Epstein - Barr 病毒基因 BCRF1(vIL - 10) 的发现, 鼠源和人源 IL - 10(mIL - 10, hIL - 10) 的 cDNA 相继得以报道^[2].

IL - 10 具有抑制 T 细胞、单核细胞以及巨噬细胞活化的效应因子功能, 是一种对大多数造血细胞具有

收稿日期: 2005-09-16.

基金项目: 南京大学分子医学研究所资助项目.

作者简介: 王旻东, 1976—, 法医师, 主要从事刑事科学中 DNA 的检测及其鉴定. E-mail: wangmd7611@sina.com

通讯联系人: 刘建宁, 1962—, 教授, 博士生导师, 主要从事心脑血管发病及血栓的分子机理的教学与研究.

E-mail: jianingliu2000@yahoo.com

多重效用的多功能细胞因子,但其最根本的功能还是限制并最终终止炎症反应. 体内外研究表明,IL-10 在调节 B 细胞、NK 细胞、细胞毒及 Th 细胞、肥大细胞、粒细胞、树突细胞、角质细胞和内皮细胞的生长和/或分化中起着重要的作用. 对于在体内控制免疫反应和耐受中起重要作用的 T 调节细胞,IL-10 在其分化及功能发挥时也起着重要的作用^[3]. 造血细胞因子中,IL-10 是唯一和几个病毒基因组具有相关的同源性,而这种同源性被证实与其调节免疫和炎症反应时的重要作用密切相关.

临床上,hIL-10 可应用于风湿性关节炎、肠炎、败血症休克、癌症、器官移植等. 本文主要研究了 hIL-10 在 pET-32b 中的克隆和表达,及其生物活性的测定.

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌扩增菌株 DH 5 α 、大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)由本实验室保存,大肠杆菌表达载体 pET 32b 购自 Invitrogen 公司.

1.2 主要试剂

限制性内切酶 Nde I 和 BamH I、T4 DNA Ligation Kit、Taq 酶、dNTP、DNA marker DL2000 购自 Takara 公司. 人 IFN- γ Mabs Kit 购自 eBioscience. Avidin-HRP 购自 Pierce 公司. 柱式质粒(少量)纯化试剂盒购自 Sigma 公司. 柱式离心式胶回收试剂盒购自鼎国公司. BCA Protein Assay Kit 购自 Pierce 公司. 其它所需试剂为国内分析纯常用试剂.

1.3 引物的设计与合成

引物根据 NCBI 数据库中人的 Interleukin-10 cDNA 序列设计,由北京三博公司合成.

5'端引物 5'-gat ata cat atg agt cca ggt caa ggt act c-3'

3'端引物 5'-gtt ggt gga tcc tea gtt tea tat ctt cat tgt cat gta gg-3'

其中 catatg 和 gga tcc 分别为 Nde I 和 BamH I 酶切位点.

1.4 基因的扩增和克隆

扩增基因的 PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 1 min、55 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 30 次. 用 Nde I/BamH I 双酶切 PCR 扩增产物及表达载体 pET 32b,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳纯化回收酶切产物,混匀,加入 T4 连接酶,置 16 $^{\circ}$ C 反应过夜.

1.5 重组质粒的鉴定

将过夜连接产物转化大肠杆菌 DH 5 α ,并将转化细菌涂在含 50 μ g/mL ampicillin 的琼脂糖平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜. 挑取单克隆,用 PCR 和 Nde I/BamH I 双酶切鉴定. 将 PCR 和双酶切鉴定正确的克隆进行 DNA 测序分析.

1.6 pET32b/hIL-10 在大肠杆菌中的表达

将含有正确 DNA 序列的重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3),挑单克隆于 LB 培养基中(含 50 μ g/mL ampicillin),37 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜. 取过夜菌液按 1:50 接种,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0,加入 IPTG(1 mmol/L),诱导 4 h,6 500 r/min,4 $^{\circ}$ C 条件下收菌.

1.7 SDS-PAGE 分析

收集的菌体以 5% 堆积胶和 13% 分离胶分析^[4].

1.8 包涵体制备及洗涤

按每克菌体 8 mL 裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mmol/L PMSF, pH 8.0)的比例悬浮菌体,在冰浴中超声 10 min 破碎菌体,9 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min 后,得到沉淀,即为包涵体.

在包涵体中加入 100 mL 洗涤液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mmol/L PMSF, 1%~2% Triton 100, pH 8.0),超声 10 min,9 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,弃上清. 重复 3 次.

1.9 包涵体的变复性

将 2 g 包涵体用 25 mL 变性液(6 mol/L 盐酸胍, 50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.5)溶解,加入 40 倍体积的复性液(50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L GSSG, 1 mmol/L GSH, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0),混匀后,4 $^{\circ}$ C 静置 24 h. 对 CM 纯化系统的平衡缓冲液(20 mmol/L NaAc-HAc, pH 4.5)透析 24 h,换液

3 次. 将复兴样品上样至 CM 柱纯化, 经洗涤缓冲液(20 mmol/L NaAc-HAc, 0.5 mmol/L NaCl, pH4.5)充分洗涤后, 用洗脱液(20 mmol/L NaAc-HAc, 500 mmol/L NaCl, pH 4.5)洗脱, 收集洗脱液, 进行 13% SDS-PAGE^[4].

将洗脱液对 5 mmol/L NH₄HCO₃ 透析 24 h, 冷冻干燥. ddH₂O 溶解至 0.5 mg/mL, 0.22 μm 滤器过滤除菌.

1.10 hIL-10 活性检测

1.10.1 PBMC 的提取

将柠檬酸钠加入人外周血中至终浓度 0.38%, 用等体积生理盐水稀释. 向 50 mL 离心管中加入 12 mL 混匀的淋巴细胞分离液, 再缓慢加入 15 mL 稀释的人外周血. 于吊篮式离心机 19℃ 2 000 r/min 离心 20 min. 吸取白色的淋巴细胞层, 并用 PBS 于 19℃ 洗涤 2 次. 加入 1 mL 红细胞裂解液, 室温保持 105 s, 用适量 PBS 终止反应并洗涤.

1.10.2 细胞培养

计数淋巴细胞, 用含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基重悬细胞, 并以 1 × 10⁵/孔接种 96 孔培养板. 空白组不加 Con A, 对照组加 Con A 至终浓度 5 μg/mL, 试验组加 Con A 至 5 μg/mL, 同时加系列浓度的 rhIL-10(10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 000 ng/mL). 将细胞于 37℃、5% CO₂ 孵箱培养 48 h, 收集细胞上清液.

1.10.3 夹心

ELISA 检测细胞上清中的 IFN-γ. 将抗 hIL-10 的捕获抗体用 PBS 稀释至 2 μg/mL, 每孔 50 μL, 4℃ 过夜. PBS 洗涤 3 次, 用含 1% BSA 的 PBST^[5]溶液封闭, 37℃ 保温 2 h. PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 50 μL 细胞上清, 室温静置 1 h. PBST 洗涤 3 次, 加入用含 1% BSA 的 PBST 稀释至 2 μg/mL 的生物素标记的抗 hIL-10 抗体, 每孔 100 μL, 室温静置 1 h. PBST 洗涤 3 次, 用含 1% BSA 的 PBST 以 1:2 500 稀释的 avidin-HRP 稀释, 每个加样孔加入 100 μL, 室温静置 1 h. PBS 洗涤 3 次后, 用 TMB 底物显色, 于 450 nm 测 OD 值.

2 实验结果

2.1 利用 RT-PCR 反应扩增 hIL-10 基因

将 hIL-10 基因 cDNA 进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳分离, 所得目的条带相对分子质量与预期值一致.(图 1)

2.2 pET 32b/IL-10 表达载体的构建

利用 T4 DNA 连接酶连接经 Nde I 和 Bam HI 双酶切消化的 hIL-10 基因片断和 pET 32b 载体, 连接产物转入大肠杆菌 DH5α 克隆菌株, 在含有 Amp 的 LB 平板上培养. 挑取单菌落经 PCR 和酶切鉴定, 筛选含有 pET 32b/hIL-10 的阳性克隆, 并用 DNA 序列测定进一步验证, 结果表明, 重组质粒中 DNA 序列和 NCBI 数据库中的基因序列一致.

2.3 目的蛋白的表达

将含有正确 DNA 序列的重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)中, 经 IPTG 诱导, IL-10 的表达量约占菌体总蛋白的 15%(图 2).

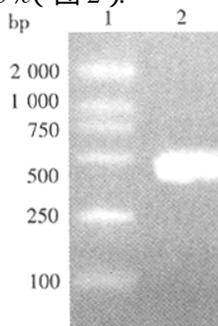


图 1 hIL-10 基因扩增

Lane 1: DNA marker; Lane 2: hIL-10 基因 PCR 结果

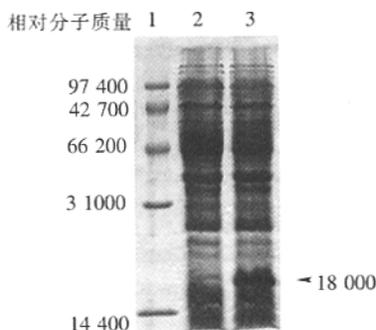


图 2 hIL-10 诱导表达 SDS-PAGE

Lane 1: 蛋白 marker; Lane 2: 未经 IPTG 诱导 control; Lane 3: IPTG 诱导表达

2.4 包涵体的制备

IL-10 包涵体经过 3 次洗涤后,其纯度达 75%(图 3)。

2.5 蛋白质变复性、CM 柱纯化浓缩

IL-10 样品经复性和 CM 柱纯化后,其纯度达 93%。从每升培养液中可回收 IL-10 3.5 mg(图 3)。

2.6 hIL-10 生物学活性检测结果

夹心 ELISA 结果显示,hIL-10 可以显著抑制 Con A 诱导的 PBMC IFN- γ 的分泌(表 1),且该抑制作用与 hIL-10 的浓度呈剂量依赖关系。当 hIL-10 的浓度达 1 mg/mL 时,抑制效率达 83%。

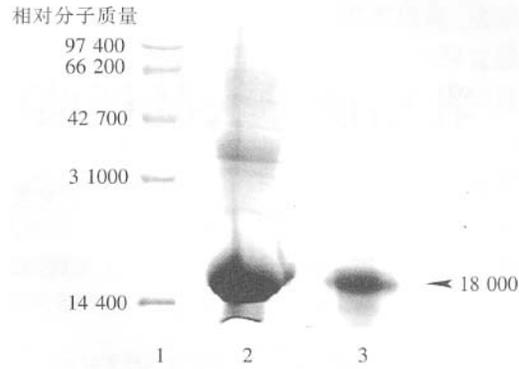


表 1 hIL-10 对 Con A 诱导的 PBMC 表达 IFN- γ 的抑制 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

实验组	1	2	3	4	5
(样品浓度:ng/mL)	(Blank)	(Control)	(10)	(100)	(1000)
OD _{450nm}	0.330 \pm 0.071	0.647 \pm 0.025	0.623 \pm 0.021	0.501 \pm 0.021*	0.387 \pm 0.047**

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ vs control.

3 讨论

hIL-10 是一种重要的免疫调节因子,具有抑制 T 细胞、单核细胞以及巨噬细胞活化的效应因子功能,对大多数造血细胞都具有免疫调节作用。在抗炎症、肿瘤治疗、抗器官移植排斥以及抗自身某些免疫疾病中具有广阔的应用前景。因而,获得大量的、高纯度的 hIL-10 显得具有重要的意义。

运用大肠杆菌表达外源基因,具有成本低、效率高、周期短等特点,但同时也会受到各种因素的影响。启动子对外源基因的表达具有很大的影响。本文采用 T7 启动子,加入 IPTG 进行诱导,可获较高效率的表达。虽然大肠杆菌表达的产物没有糖基化位点,但成熟 hIL-10 也没有糖基化,因而本实验中影响不是很大。

IL-10 具有多向免疫活性,其中比较稳定的是抑制 PHA、Con A 诱导 PBMC 的 IFN γ 的分泌^[6],本文采用此法测定表达的 hIL-10 的活性,得到较好的结果。

本文研究说明,载有 hIL-10 的 pET 32b 可在大肠杆菌中稳定地表达,表达的 hIL-10 具有较好的生物学活性,可用于进一步的研究。

[参考文献]

[1] Fiorentino D F , Bond M W , Mosmann T R. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones[J]. J Exp Med , 1989 , 170 :2081 - 2095.

[2] Moore K W , Vieira P , Fiorentino D F , et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL - 10) to the Epstein Barr virus gene BCRF1[J]. Science , 1990 , 248 :1230 - 1234.

[3] MacNeil I , Suda T , Moore K W , et al. IL - 10 : a novel cytokine growth cofactor for mature and immature T cells[J]. J Immunol , 1990 , 145 :4167 - 4173.

[4] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用[M]. 3 版. 北京 科学出版社 2002.

[5] J 萨姆布鲁斯克, D W 拉塞尔. 黄培堂 等译. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京 科学出版社 2002.

[6] Vieira P , de-Waal-Malefy R , Dang M N , et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clone : Homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1[J]. Pro Natl Acad Sci USA , 1991 88(4) :1172 - 1176.

[责任编辑 孙德泉]