

荣昌猪白细胞介素10(IL-10)基因的克隆及原核表达

李晓琪 郭万柱*, 黄亚平, 张丽 (四川农业大学动物生物技术中心, 四川雅安625014)

摘要 根据 GenBank 收录的猪白细胞介素10(IL-10)设计1对特异性引物,经刀豆蛋白素A(conA)诱导猪淋巴细胞并提取总RNA,RT-PCR方法首次扩增出荣昌猪PIL10的全长基因。序列分析表明PIL10全长771 bp。设计1对引物亚克隆荣昌猪IL-10基因成熟蛋白编码基因(477 bp)。利用基因重组技术构建了PET32a(+)-PIL10融合表达载体,经酶切鉴定,DNA测序证实重组质粒构建正确。将重组质粒转化大肠杆菌BL21,IPTG诱导,SDS PAGE,重组菌的RT-PCR,Western blotting结果表明融合表达成功。

关键词 荣昌猪;白细胞介素10;克隆;原核表达

中图分类号 Q78 文献标识码 文章编号 0517-6611(2007)15-0446-02

Cloning and Prokaryotic Expression of Rongchang Pig Porcine IL-10

LI Xiaoqi et al (Center of Animal Biotechnology, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014)

Abstract The cDNA sequence encoding Rongchang pig porcine interleukin 10 (PIL1) was cloned from the lymphocyte stimulated with Con A by means of the specific primers based on the reported sequence in GenBank. Sequence identification indicated the full length of cloned cDNA was 771 bp. Another pair of primers was designed to sub-clone gene coding porcine IL-10 mature protein. The PET32a(+)-IL-10 was identified and analyzed with enzymatic digestion and DNA sequencing and was confirmed. The recombinant strain was transformed into E. coli BL21, induced by IPTG, SDS PAGE and the RT-PCR result of recombinant strain confirmed PIL-10 was presented successfully.

Key words Rongchang porcine; IL-10; Clone; Prokaryotic expression

IL-10 是 Th 细胞(Th1/Th2/Th0)、单核细胞、巨噬细胞、B 细胞及角质细胞等多种细胞产生的免疫调节性细胞因子^[1-2]。IL-10 作为细胞免疫的负调节因子,抑制活化的 Th 和 NK 细胞分泌 IFN^[3-4], 下调炎症细胞因子的合成分泌^[4-5]、MHC 类分子和共刺激分子 B7 的表达^[6]。新近研究发现,IL-10 还参与调节机体天然免疫和 DC 细胞的分化发育及功能^[7-8]。作为内源性的免疫抑制因子,IL-10 能抑制机体炎症反应,对某些自身免疫病和移植排异反应具有潜在的预防和治疗作用^[2]。荣昌猪是国家重点保护品种,具有肉质好,适应性强,性成熟早,母性强,世代间隔短,耐粗饲,杂交配合好等优点。该研究通过刺激猪外周血单核细胞,利用 RT-PCR 技术首次克隆出荣昌猪的 IL-10 基因,并通过对基因序列改造后进行原核表达,即将信号肽切除后表达成熟蛋白,以提高表达蛋白质的效率。这为进一步了解 IL-10 在荣昌猪免疫系统及免疫应答中的作用和猪器官作为异源器官的免疫移植提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料及试验动物 RPM1640 培养基购自 Hyclone 公司; Trizol 购自 Introgen 公司; pMD18-T 载体试剂盒、EcoR 和 Xho 限制性内切酶、RT-PCR 试剂盒购自 TaRaKa 公司; PCR 产物回收试剂盒购自 V-gene 公司; 淋巴细胞分离液购自天津血液研究所; PET32a(+) 表达载体和 DH5 以及 BL21 均为实验室保存; Con A 上海华舜公司分装; Hs-Tag (27E8) Mouse mAb 购于深圳晶美公司; 山羊抗小鼠二抗购于成都科比特公司; 荣昌猪购于重庆市养猪研究所。

1.2 方 法

1.2.1 猪 PBMC 的分离和诱导表达。 无菌采取荣昌猪抗凝血 10 ml, 用等量 D Hank's 液稀释。取稀释的外周血缓慢加于等量的淋巴细胞分离液上, 2 000 r/min 室温离心 20 min; 用巴

氏滴管吸取中间雾状白色淋巴细胞层, 加入 D Hank's 液 2 000 r/min 离心洗涤 2 次; 淋巴细胞用含 15% 胎牛血清 RPM1640 (含 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 的链霉素) 培养液稀释至 1×10^7 个/ml, 5 μg/ml Con A 诱导刺激培养, 淋巴细胞在 5% CO₂ 条件下 37℃ 培养 24 h。

1.2.2 淋巴细胞总 RNA 的抽提。 淋巴细胞培养 24 h 后, 离心收取淋巴细胞, 收集细胞培养物用 Trizol 试剂(GIBCO BRL 公司)按厂商提供的方法提取总 RNA。电泳观察所提取 RNA 的完整性, 加 RNA 酶抑制剂后置 -70℃ 备用。

1.2.3 引物设计。 所有引物根据文献报道序列设计, 由大连宝生物公司合成。

IL-10 全基因序列的上游引物 P1: CGACTCAACGAA-GAAGGCACAG; IL-10 全基因序列的下游引物 P2: ATAGTTCACAGAGAGGCTCGGTAA; 亚克隆编码 IL-10 成熟多肽的上游引物 P3: TGCGAATTCATGAGCAITTAAGTCT; 亚克隆编码 PIL-10 成熟多肽的下游引物 P4: TCGGAGCTCTCAGTTG TTCTCC。

1.2.4 RT-PCR 扩增 PIL10。 参照 TaRaKa 公司 RT-PCR 一步法试剂盒说明, RNA 模板 2 μl, MgCl₂ 10 μl, 2 × mRNA Selective PCR Buffer 25 μl, dNTP Mixture 5 μl, RNase Inhibitor 1 μl, AMV 反转录酶 1 μl, 上下游引物(P1、P2)各 1 μl, RNase Free H₂O 3 μl, 按以下条件反应: 50℃ 40 min, 85℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环后, 延伸 10 min。

1.2.5 PCR 产物回收和克隆。 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切下 770 bp 处的目的条带, 用凝胶回收试剂盒回收后连接 pMD18-T 载体, 并转化 DH5 感受态细胞, 挑取经 Amp、X-gal、IPTG 筛选的白色菌落, 接种于含 Amp (100 μg/ml) 的 LB 培养基, 37℃ 振荡培养 20 h, 提取质粒, 进行质粒 PCR 和酶切鉴定, 将鉴定的阳性质粒送至大连宝生物公司测序。

1.2.6 IL-10 的原核表达。 由于荣昌猪 IL-10 序列改造后进行原核表达, 因此用特异性引物亚克隆切信号肽序列, 引物 2 段分别加 EcoR 和 Xho 酶切位点。将扩增产物和 PET32a(+) 表达载体同时双酶切后连接, 转化 BL21 宿主菌。挑取

基金项目 国家“973”项目(2004CCA01800)。

作者简介 李晓琪(1982-), 女, 四川绵竹人, 硕士研究生, 研究方向: 动物传染病与病原分子生物学。* 通讯作者, E-mail: wzgu@126.com。

收稿日期 2007-02-08

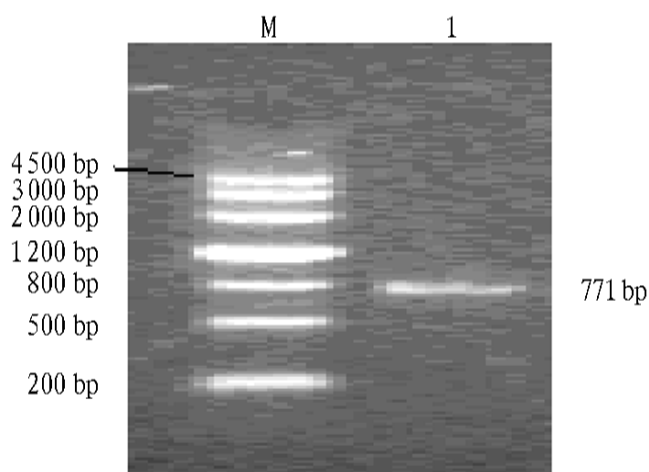
阳性克隆到5 ml 含Amp(60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的LB中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。取0.5 ml 培养液接种50 ml 含Amp(60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的LB中,37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养至 OD_{600} 为0.6,加入1 ml/L的IPTG到终浓度为1.0 mmol/L,继续培养3 h,分别在诱导后3、4、5 h,各取1.5 ml 样品进行检测。设空白质粒对照样品、未诱导样品,将1.5 ml 菌液加入Eppendorf管中,离心沉淀细菌。在菌体沉淀中加入20 μl 双蒸水重悬,然后加入20 μl 含DTT的2XSDS上样缓冲液,混匀,沸水中处理5 min,短暂离心,取样进行SDS-PAGE电泳分析。

1.2.7 重组菌的RT-PCR。取表达成功的重组菌液1.5 ml,按抽提细菌RNA试剂盒的说明进行,抽提重组菌的RNA,按前面同样的条件进行RT-PCR,得到的产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.8 Western blotting 分析。用上述方法电泳后,用电转化法将凝胶转印至硝酸纤维膜上,用Hs-Tag(27E8) Mouse mAb (CST公司)按照免疫学常用实验方法中的Western印迹法稍作改进进行Western blotting检测^[9]。

2 结果与分析

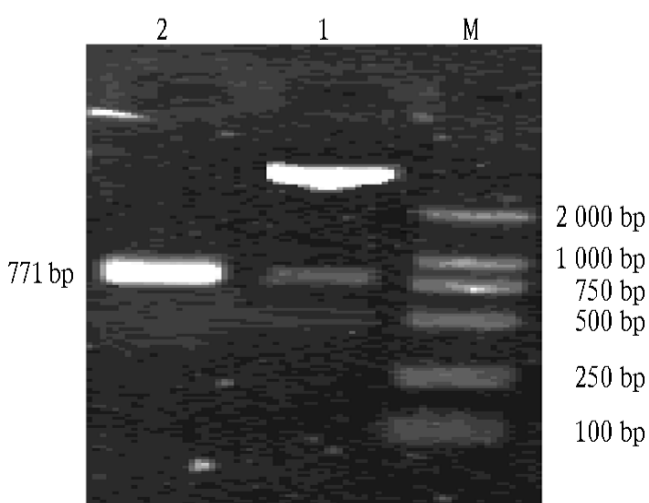
2.1 荣昌猪IL-10 基因的RT-PCR 扩增 RT-PCR扩增后得到一特异的扩增片段,通过1%琼脂糖凝胶电泳,与预期的PCR产物大小相近,约为771 bp(图1)。



注:1.IL-10 RNA 反转录扩增产物;M.DNA 分子质量标准。

图1 荣昌猪IL-10 RT-PCR 电泳图谱

2.2 重组质粒的酶切及PCR 鉴定 将重组质粒进行EcoR、Sma 酶切及PCR 扩增鉴定,得到与目的基因大小一致的片段,说明该实验中所克隆的目的基因已成功插入到pMD18-T载体。

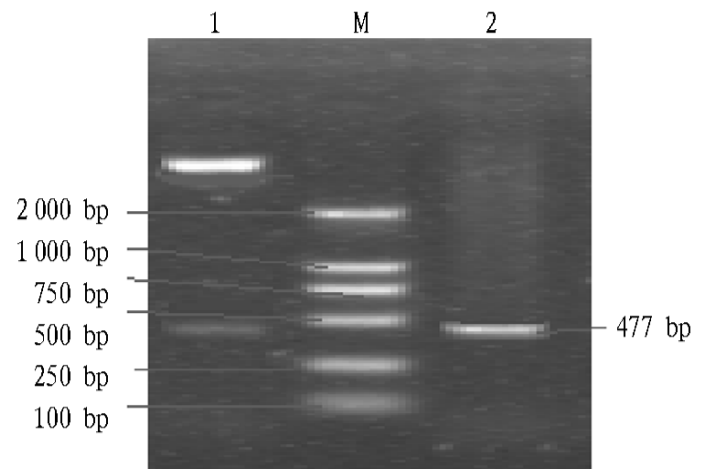


注:1.酶切鉴定;2.PCR 鉴定;M.DNA 分子质量标准。

图2 重组质粒的EcoRI 和Sma II 酶切鉴定

2.3 荣昌猪IL-10 成熟蛋白基因的亚克隆及重组表达载体的鉴定 应用引物P3 和P4 扩增出成熟蛋白基因(477 bp),将扩增出的基因连接PET32a(+)表达载体,转化BL21 宿主

菌,挑取转化细菌,抽提质粒,用EcoRI,Xho I 双酶切和PCR 扩增鉴定后,从电泳结果可见单纯的表达载体大小为5 600 bp,酶切和PCR 扩增的基因为477 bp 左右(图3)。将阳性质粒送至大连宝生物公司测序,结果和理论设计一致。

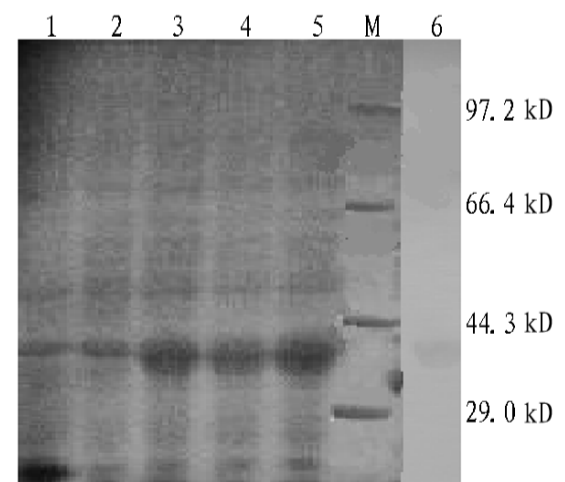


注:1.酶切鉴定;2.PCR 鉴定;M.DNA 分子质量标准。

图3 PET32a(+)-IL-10 重组质粒的EcoRI,Xho I 双酶切鉴定

2.4 将获得表达的重组菌抽提RNA 经RT-PCR,琼脂糖凝胶电泳,在约500 bp 处有一条带,与预期目的相符。

2.5 荣昌猪IL-10 基因的诱导表达鉴定和免疫印迹 收集不同诱导培养时间的工程菌,处理后SDS PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色鉴定。转化的重组BL21 菌株经IPTG 诱导培养后,表达的融合蛋白表观分子量约为38 kD,12%SDS-PAGE 电泳结果表明,表达质粒经诱导后均有明显的特异性条带产生,而PET32a(+)未插入IL-10 基因的融合蛋白在约20 kD 处有特异性条带出现。光密度扫描结果显示,诱导5 h 后,表达蛋白条带约占菌体总蛋白的48.5%。免疫印迹实验证实重组蛋白可以被组氨酸特异性单抗所识别(图4),表明重组蛋白以带有组氨酸标签的融合蛋白形式表达。



注:M.蛋白质分子质量标准;1.PET32a(+)诱导;2.PET32a(+)-IL-10 未诱导;3-5.IPTG 分别诱导PET32a(+)-IL-10 3、4、5 h;6.免疫印迹。

图4 融合蛋白的SDS PAGE 分析以及免疫印迹分析

3 讨论

IL-10 是一种重要的细胞因子,具有多种生物学功能,在免疫网络调节中发挥独特的作用。例如它可抑制巨噬细胞产生细胞因子,抑制巨噬细胞的抗原提呈功能;促进单核巨噬细胞表达IL-1Ra,因而具有抗炎作用;可刺激B 细胞的分化,上调其MHC 类分子表达和抗体产生;抑制Th1 细胞介导的细胞免疫应答,抑制Th1 细胞产生IL-12,从而间接抑制NK 细胞活性等。

该研究应用RT-PCR 技术从ConA 诱导培养的猪外周血

(下转第4459 页)

(上接第4447页)

淋巴细胞总RNA中扩增出荣昌猪IL-10的全基因。测序结果与GenBank上公布的序列同源率为99.38%，说明IL-10基因较为保守。PIL-10核苷酸编码蛋白序列全长528 bp，含一个完整开放阅读框(ORF)，共编码174个氨基酸，N端18个氨基酸形成信号肽，成熟蛋白为157个氨基酸，分子量约为18.11 kD。此次克隆到的PIL-10基因与兰文升等^[10]报道的PIL-10基因核苷酸序列完全一致。将猪IL-10核苷酸序列与人、大鼠和小鼠的IL-10序列进行比较，其同源性分别为84%、79%、79%，说明了与这两种动物的IL-10具有交叉反应相一致^[11]。

真核生物的信号肽在原核生物中进行表达时大部分不具有分泌功能，并且它始终与活性蛋白融合在一起从而可能在一定程度上影响了成熟蛋白生物活性的正常发挥。为了在后续的试验中进一步研究蛋白的活性，因此在试验的原有途径表达蛋白时，切除其信号肽进行表达量。从两种途径表达蛋白的量比较来看，切除信号肽后提高了蛋白的表达量。仇华吉等^[11]曾用PET表达系统对猪IL-10基因进行了反复表达尝试，但没有获得成功，可能是该基因的独特性不适合于在该体系中表达^[12]。但笔者的试验证明猪IL-10基因能在PET表达系统中获得表达。

该试验首次克隆出重庆荣昌猪IL-10基因，并通过对其基因序列改造后表达出融合蛋白，这为进一步研究荣昌猪IL-10在体内外的作用，并为研究其生理活性及在疾病和疫苗免疫中的作用提供了条件。同时荣昌猪IL-10的深入研究，

可以为荣昌猪作为免疫移植的供体提供参考。

参考文献

- [1] VHRAP, MALEFYT R, DANG M, et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1 [J]. PNAS, 1991, 88: 1172-1176.
- [2] MOOR KW, MALEFYT R, COFFMAN R L, et al. Interleukin 10 and the interleukin 10 receptor [J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 683-765.
- [3] MALEFYT R, JAANEN H, SHTS M G, et al. Interleukin 10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression [J]. J Exp Med, 1991, 174: 915-924.
- [4] TRIP CS, WOLF S F, UAUER ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor- α are costimulators of interferon- γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiological antagonist [J]. PNAS, 1993, 90: 3725-3729.
- [5] HORENINO D F, ZLOMK A, MOSMANN TR, et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages [J]. The JI, 1991, 147: 3185-3193.
- [6] DING L, HINSLEY PS, HUANG LY, et al. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression [J]. The JI, 1993, 151: 1224-1234.
- [7] SHIBATA Y, FOSTER L, KURIMOTO M, et al. Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of interferon-inducing factors but enhances NK cell production of interferon- γ [J]. The JI, 1998, 161: 4283-4288.
- [8] CORNINI S, ALBANANI C, SALA A, et al. Regulatory activity of Artocaine IL-10 on dendritic cell functions [J]. The JI, 2001, 166: 4312-4318.
- [9] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法 M. 北京: 人民军医出版社, 2000: 84-87.
- [10] 兰文升, 董光志, 仇华吉, 等. 猪白细胞介素10的分子克隆与序列测定 J. 中国预防兽医学报, 2002, 24(2): 113-115.
- [11] HAWKINS D L, MACKAY R J, MACKAY S L D, et al. Human interleukin 10 suppresses production of inflammatory mediators by LPS-stimulated equine peritoneal macrophages [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1998, 66: 1-10.
- [12] 仇华吉, 金吉东, 兰文升, 等. 高效表达重组猪IL-10D的基因工程菌株的构建 J. 畜牧兽医学报, 2003, 34(4): 385-388.