

林麝 IL-1 β 基因的克隆、表达及生物学活性检测

邹丹丹, 杨东, 姜立春, 邹方东*

(四川大学生命科学学院, 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 旨在克隆和表达林麝 IL-1 β , 为其用于林麝疾病的防治奠定基础。从林麝外周血单核细胞中提取总 RNA, RT-PCR 扩增 IL-1 β (Interleukin-1 β) 基因。将 IL-1 β 成熟肽编码序列连接到 pET32a(+) 原核表达载体进行表达, 纯化目的蛋白并检测其生物学活性。序列分析表明, 林麝 IL-1 β 开放阅读框(ORF)长 801 bp, 编码 266 个氨基酸, 且在反刍动物中高度保守。IPTG 诱导林麝 IL-1 β 融合蛋白(MB-rIL-1 β) 表达, 得到约 35 ku 的目标带, 且大部分以可溶形式存在。对上清蛋白分离纯化得到约 35 ku 的单一一条带。细胞增殖试验结果显示, 林麝 IL-1 β 融合蛋白能明显促进小鼠成纤维细胞(L929)增殖, 表明其具有生物学活性。运用大肠杆菌表达系统可高效可溶性表达具有生物学活性的 MB-rIL-1 β 融合蛋白。

关键词: 林麝; IL-1 β ; 原核表达; 蛋白纯化; 活性检测

中图分类号: S829.9; S813.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)11-1734-05

Molecular Cloning, Expression and Biological Activities Detection of Interleukin-1 β (IL-1 β) Gene from *Moschus berezovskii*

ZOU Dan-dan, YANG Dong, JIANG Li-chun, ZOU Fang-dong*

(Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology on Endangered Wildlife, Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: The aim of this study was to clone and expression IL-1 β from *Moschus berezovskii* for further study on the role of IL-1 β in infectious diseases. *Moschus berezovskii* IL-1 β (MBIL-1 β) was cloned from peripheral blood mononuclear cells using RT-PCR. The sequence encoding the IL-1 β mature peptide was ligated with pET32a(+) vector and expressed in *Escherichia coli*. The fusion protein was purified by His-Bind Column. Results showed that the length of MBIL-1 β was 801 bp, encoding 266 amino acids. Sequence analysis showed that MBIL-1 β had a high homology with other ruminants species. The *M. berezovskii* recombinant IL-1 β (MB-rIL-1 β) protein was expressed with IPTG induction and mainly in soluble form, the molecular weight was 35 ku. After purified, there was an aimed protein obtained. MTT essay confirmed that the MB-rIL-1 β protein could enhance mouse fibroblast cell (L929) proliferation obviously and had biological activities. The result provide a feasible and convenient approach to produce soluble protein MB-rIL-1 β with biological activity.

Key words: *Moschus berezovskii*; IL-1 β ; prokaryotic expression; purification; activity detection

林麝 (*Moschus berezovskii*) 是独居的反刍动物, 近几十年来由于大量捕杀和栖息地破坏, 其种群

收稿日期: 2013-05-02

作者简介: 邹丹丹(1988-), 女, 重庆人, 硕士, 主要从事动物分子生物学研究, E-mail: dandanzou88@163.com

* 通信作者: 邹方东, 教授, 博导, 主要从事分子细胞生物学研究, E-mail: fundzou@163.com

数量锐减,现已为我国一级珍惜保护动物^[1]。近年来人工圈养成为增加林麝种群数量的一个重要手段,虽取得一定成效,但仍存在很多制约因素,其中以细菌感染而引发的各种传染病为主^[2],因此对这些疾病的防御和治疗成为当前麝类保护工作的首要任务。

IL-1 β 是 IL-1 家族的重要成员,主要由活化的巨噬细胞和血液单核细胞产生,是体液免疫反应的启动因子^[3]。研究发现,所有 IL-1 β 蛋白质在其 C 末端均含有 1 个保守序列(FC)-x-S-(ASLV)-x(2)-P-x(2)-(FYLV)-(LI)-(SCA)-T-x(7)-(LIVM),K. Hofmann 等^[4] 将其定义为 IL-1 家族的标志。IL-1 β 首先以蛋白前体(pro-IL-1 β)的形式合成,由于缺少疏水的信号肽,不能分泌到细胞外,故不具备生物学活性,必需经 IL-1 β 转化酶(ICE)剪切,成为成熟肽后才能发挥其功能^[5]。IL-1 β 在病菌引起的身体防御、炎症反应、免疫应答和组织损害等免疫过程中具有重要作用^[6]。同时 IL-1 β 作为一个重要的介炎因子,在炎症反应中可诱导和增强其他许多与炎症相关的功能基因的表达,特别是细胞因子的表达^[7]。在人和其他物种中,IL-1 β 已用于病毒性感染和肿瘤等多种疾病的临床治疗,但由于种属差异性较大,现有的人和小鼠 IL-1 β 临床制剂无法用于林麝的疾病治疗。

本研究对林麝 IL-1 β 基因进行克隆,并成功表

达出了具有生物学活性的林麝 IL-1 β 融合蛋白,为实现 IL-1 β 对林麝免疫疾病的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

林麝外周血样采自四川省理县米亚罗林麝养殖场。

1.2 方法

1.2.1 林麝外周血淋巴细胞分离及总 RNA 提取

于林麝外周静脉采血,用人淋巴细胞分离液分离外周血淋巴细胞,在 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Con-A 诱导下,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,TRIzol 法抽提总 RNA,利用 TaKaRa 反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱待用。

1.2.2 林麝 IL-1 β 基因的 PCR 扩增及序列分析

根据水牛 IL-1 β 基因的 cDNA 全序列设计 1 对引物(F1: 5'-ATGGCAACCGTACCTGAACC-3', R1: 5'-GGGAGAGAGGGTTTCCATTC-3')进行 PCR 扩增。纯化扩增片段并将该片段克隆到 pMD19-T 载体上,随后转化 *E. coli* JM109,菌落 PCR 鉴定阳性克隆后送华大基因(BGI)测序。利用在线分析软件(<http://www.expasy.ch/tools/>)分析林麝 IL-1 β 蛋白基本特征。本研究用到的 IL-1 β 基因序列 GenBank 登录号见表 1。

表 1 序列分析所用 IL-1 β 序列的 GenBank 登录号

Table 1 GenBank accession number of IL-1 β sequences analyzed

物种 Species	名称 Common name	GenBank 登录号 GenBank accession No.
林麝 <i>Moschus berezovskii</i>	Forest musk deer	KC417343
马鹿 <i>Cervus elaphus</i>	Red deer	AAA62234
水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	Water buffalo	AAR99054
非洲水牛 <i>Syncerus caffer</i>	African buffalo	BAJ11607
绵羊 <i>Ovis aries</i>	Sheep	NP_001009465
牛 <i>Bos Taurus</i>	Cattle	NP_776518
白鲸 <i>Delphinapterus leucas</i>	Beluga Whale	AF320322
猪 <i>Sus scrofa</i>	Pig	NP_001005149

1.2.3 林麝 IL-1 β 原核表达及目的蛋白的分离纯化

根据林麝 IL-1 β 成熟肽编码序列设计原核表达引物(F2: 5'-CGGAATTCCGCAGCCGGCAGT-

CAGTA-3', R2: 5'-CCGCTCGAGTTAGGGAGA-GA GGGTTTC-3'),引物上分别添加 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线表示)。PCR 扩增片段和

pET32a(+)分别进行双酶切,连接后转化 JM109 感受态细胞,筛选阳性克隆并测序鉴定。将构建成功的 pET32a(+)-IL-1 β 载体转化 BL21 感受态细胞,菌落 PCR 及酶切鉴定后,将菌液接种于新鲜的含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、240 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养至菌液 OD_{600 nm} 值为 0.4 时,加入 IPTG(异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷)至终浓度为 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导过夜。收集诱导后的菌体,PBS 溶液重悬,加溶菌酶至终浓度为 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,冰浴条件下超声破碎,10 000 g 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,收集上清。用 His 亲和层析柱 Ni-NTA Agarose 对上清蛋白进行纯化,杂蛋白洗脱液(20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole, pH7.0)洗去杂蛋白,目的蛋白洗脱液(20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole, pH7.0)洗脱得到 MB-rIL-1 β 融合蛋白。用 Amicon Ultra-15 超滤管对 MB-rIL-1 β 融合蛋白进行浓缩,紫外分光光度计测定其浓度。SDS-PAGE 对全菌、上清和纯化后蛋白进行分析。

1.2.4 融合蛋白生物学活性检测 复苏小鼠 L929 细胞,培养 48 h 后调节细胞浓度至 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。将该细胞悬液加至 96 孔板中,100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$;然后加入 MB-rIL-1 β 融合蛋白,使其终浓度分别为 1、10、100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,不加 MB-rIL-1 β 蛋白组作为阴性对照。加好后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 56 h,加入 MTT(四甲基偶氮唑盐),让其终浓度为 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,继续培养 4 h,吸去上清,加入 DMSO(二甲基亚砷),150 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,吹打混匀后用酶标仪检测 A_{570 nm} 值。按下式计算细胞增殖率,细胞增殖率 = (OD_{试验组} - OD_{阴性对照组}) / OD_{阴性对照组}。

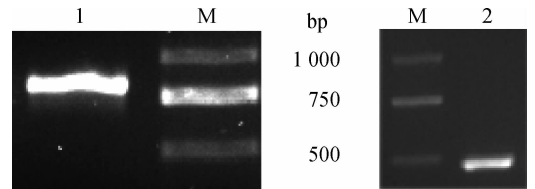
2 结果

2.1 林麝 IL-1 β 基因的克隆及序列分析

图 1 为林麝 IL-1 β PCR 产物电泳检测图。测序结果表明,林麝 IL-1 β 开放阅读框长 801 bp,编码 266 个氨基酸残基,蛋白分子质量为 30.5 ku,将该序列提交 GenBank,获得登录号为 KC417343。林麝 IL-1 β 成熟区编码序列长 462 bp。

IL-1 β 序列比对和各功能位点预测结果如图 2 所示。序列比对显示林麝 IL-1 β 基因和其他哺乳动物一样,N 端没有信号肽序列,在 113~114 氨基酸

之间有 1 个 ICE 切割位点。切割后其成熟肽含 153 个氨基酸残基,分子质量为 17.64 ku,等电点 6.96。序列比对结果显示,林麝 IL-1 β 与赤鹿、水牛、非洲野牛、牛和羊基因氨基酸序列同源性分别为 94.0%、95.9%、95.5%、94.4% 和 94.4%,表明该基因在反刍动物中高度保守;与白鲸和猪的同源性分别为 76.7% 和 70.3%。林麝 IL-1 β 有 6 个保守的半胱氨酸残基(Cys)分别在 34、112、121、137、156 和 184 位点上,1 个潜在的 N-端糖基化位点在 58 位上。与其他反刍动物相比,第 16、146、240 位的氨基酸是林麝 IL-1 β 基因所特有的,这是否具有特殊意义,还有待进一步研究。



M. DNA 相对分子质量标准 DL2000;1. IL-1 β 开放阅读框序列;2. IL-1 β 成熟肽编码序列

M. DL2000 marker; 1. The ORF of IL-1 β ; 2. The mature encoding peptide sequence of IL-1 β

图 1 林麝 IL-1 β PCR 产物电泳检测

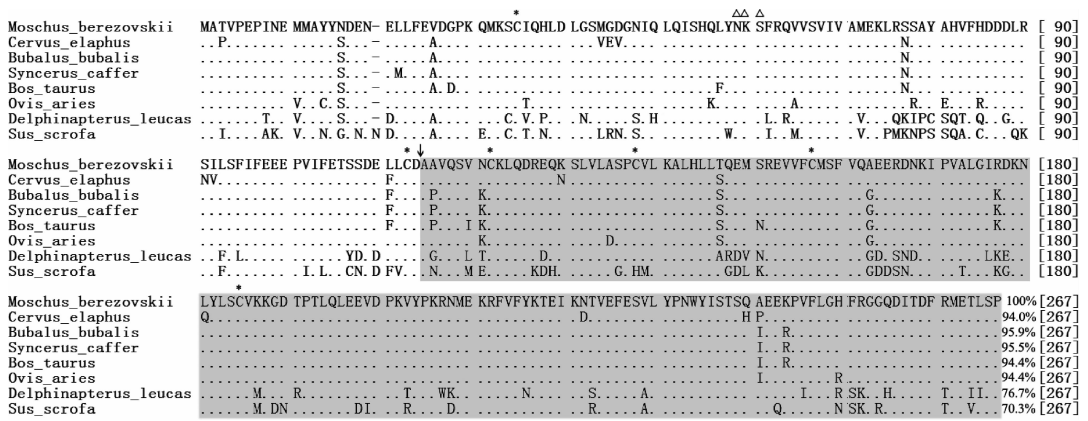
Fig. 1 PCR products of IL-1 β from *Moschus berezovskii*

2.2 林麝 IL-1 β 的原核表达及融合蛋白的纯化

IPTG 诱导结束后收集表达菌体,SDS-PAGE 分析融合蛋白表达情况(图 3)。结果显示,表达菌在 35 ku 有 1 条特异带,大小与预期相符,其中 pET32a(+)载体上的标签 Trx 和 His 大小约为 18 ku,IL-1 β 成熟肽约为 17 ku,说明成功表达 MB-rIL-1 β 融合蛋白。菌液经超声破碎后,收集上清蛋白,对该融合蛋白表达形式进行分析,结果显示融合蛋白部分存在于上清中,以可溶形式存在。上清蛋白经纯化后,SDS-PAGE 显示在 35 ku 处有单一条带,表明分离纯化成功,得到了特异的 MB-rIL-1 β 融合蛋白(图 3)。蛋白溶液浓缩后测得其浓度为 3.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 融合蛋白生物活性检测

MTT 法细胞增殖试验结果显示,纯化后的 MB-rIL-1 β 蛋白能促进 L929 细胞增殖,促进效果有显著统计学意义($P < 0.01$)。在 1~100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内增殖效果和蛋白浓度呈正相关,表现出明显的剂量依赖性(图 4)。

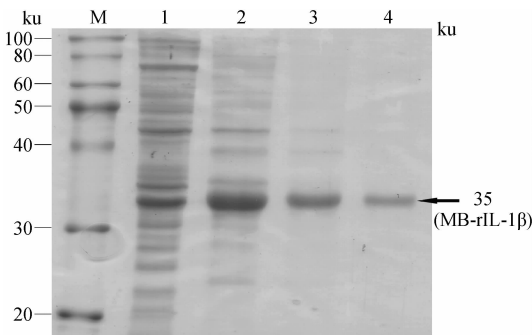


△. 表示糖基化位点; * . 表示保守半胱氨酸位点; ↓. 所示处为 ICE 剪切位点; 灰色区域为成熟 IL-1 β 多肽的 153 个氨基酸

△. The triangle indicate potential N-linked glycosylation sites; * . The asterisk indicate cysteine residues; ↓. The arrow indicate the ICE cut site; The grey area indicate the mature IL-1 β peptide

图 2 林麝 IL-1 β 蛋白与其他物种序列比对分析

Fig. 2 Alignment of deduced amino acid sequence of IL-1 β of *Moschus berezovskii* with other species



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. IPTG 诱导后的全菌蛋白; 2. 上清蛋白; 3、4. 纯化后 MB-rIL-1 β 蛋白(3 是 40 mmol · L⁻¹ 的咪唑洗脱杂蛋白, 4 是 50 mmol · L⁻¹ 的咪唑洗脱杂蛋白)

M. Molecular weight marker; 1. The total protein from crushed cells induced with IPTG; 2. Supernatant from crushed cells; 3, 4. Purified MB-rIL-1 β proteins

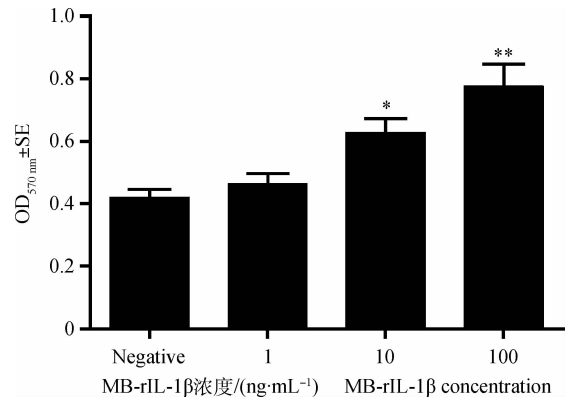
图 3 融合蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of protein extracted from the *E. coli*

3 讨论

IL-1 β 序列比对发现, 所有的反刍动物均有 6 个保守的半胱氨酸残基、1 个 N-糖基化位点, 半胱氨酸残基形成的二硫键对于蛋白质成熟肽的形成和分泌有重要作用^[8], 糖基化位点对于信号转导、蛋白质稳定性及功能发挥具有重要意义^[9], 这些区域的重要功能决定了其在反刍动物中的保守性。J. Carl 等^[10]对人 IL-1 β 进行结构功能分析, 发现了影响该基因活性的氨基酸残基位点和受体结合位点, 人 IL-1 β 成熟肽含有 3 个特殊结构域, 其中包括

Arg¹¹⁷、Cys¹²¹、Arg¹²⁴、His¹⁴³、Cys¹⁸⁴、Glu²⁰⁹、Trp²³³ 和 Asp²⁵⁸ 氨基酸残基。因为这些氨基酸残基对于 IL-1 β 功能的发挥具有重要作用, 因此他们在哺乳动物中非常保守。但序列比对发现在反刍动物、猪和白鲸的 IL-1 β 序列中, 117 和 124 号位不带电的谷氨酸代替了带电荷的精氨酸。这表明反刍动物 IL-1 β 与猪、白鲸的遗传进化关系更近, 它们之间具有较强的交叉生物学活性。林麝 IL-1 β 生物制剂可能也适用于它们细菌性疾病的防治, 为这些濒危动物和经济动物的保护奠定基础。



*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$

图 4 不同浓度 MB-rIL-1 β 蛋白对 L929 细胞增殖的影响
Fig. 4 The effect of different doses of MB-rIL-1 β protein on proliferation of L929 cell

由于 IL-1 β 成熟肽不需要糖基化修饰就具有生物学活性, 因此本研究选用大肠杆菌表达体系来实

现目的蛋白的表达^[11]。已有研究表明,IL-1 β C 端的 153 个氨基酸多肽是决定其生物学活性的区域^[10],因此本试验克隆了林麝 IL-1 β 成熟肽序列并对其进行表达。由于大肠杆菌表达速度快,不能对表达的真核蛋白进行翻译后修饰和正确的折叠,所以大部分融合蛋白都是以包涵体的形式存在,不具备生物学活性^[12]。为了让融合蛋白以具有活性的可溶的形式表达,本试验对表达条件进行了分析和研究。研究发现,诱导剂 IPTG 的浓度和表达温度是影响融合蛋白可溶性的关键因素。降低诱导剂浓度和温度能降低融合蛋白表达速度,让其更好的折叠从而增加其可溶性。另外,有研究表明,带有 *trxB/gor* 突变型的菌株比只有 *trxB* 突变型的菌株更有利于融合蛋白的可溶表达;在诱导剂的选择上,因为乳糖对细胞没有毒性,所以比 IPTG 更适合作为诱导剂;另外载体上的 GST 标签也能增加融合蛋白的可溶性^[13]。研究显示,氨基酸同源性为 60% 是物种间存在交叉生物学活性的阈值^[14],林麝与小鼠间为 61.2%,且它们 β 折叠区氨基酸序列更为保守,因此本研究采用小鼠 L929 细胞来检测 MB-rIL-1 β 的生物学活性。研究报告,IL-1 β 在体外试验中的用量为 10 ng \cdot mL⁻¹^[15],本研究测得 10 ng \cdot mL⁻¹ 的 MB-rIL-1 β 蛋白能够明显促进淋巴细胞增殖,因此可以满足后续研究需要。

4 结 论

本试验克隆了林麝 IL-1 β 基因,并在大肠杆菌中成功表达其可溶性的成熟肽,利用 His 亲和层析柱对融合蛋白进行分离纯化,淋巴细胞增殖试验证明纯化后的融合蛋白具有生物学活性,为实现 IL-1 β 对林麝免疫疾病的防治奠定基础。

参 考 文 献:

- [1] YANG Q S, MENG X X, XIA L. Conservation status and causes of decline of musk deer (*Moschus spp.*) in China [J]. *Biol Conserv*, 2003, 109: 333-342.
- [2] 张道永, 王文贵, 林 毅. 麝地方流行性肺炎病原分离鉴定及防治研究[J]. 中国兽医学报, 2005, 17(5): 463-466.
- [3] BIRD S, ZOU J, WANG T, et al. Evolution of interleukin-1 β [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13: 483-502.
- [4] HOFMANN K, BUCHER P, FALQUET L, et al. The PROSITE database, its status in 1999 [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 215-219.
- [5] RUBARTELLI A, COZZOLINO F, TALIO M, et al. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence [J]. *EMBO*, 1990, 9(15): 3-10.
- [6] SMITH D, RENSHAW B, KETCHEM R, et al. Four new members expand the interleukin-1 superfamily [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(11): 69-75.
- [7] DINARELLO C. Interleukin-1 [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1997, 8(2): 53-65.
- [8] SATO A, PERLAS E, BEN-MENACHEM D, et al. Cysteine knot of the gonadotropin subunit is critical for intracellular behavior but not for *in vitro* biological activity [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(18): 98-103.
- [9] FOX K M, DIAS J A, VAN ROEY P. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone [J]. *Mol Endocrinol*, 2001, 15: 378-389.
- [10] CARL J, MARCH, BRUCE M, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs [J]. *Nature*, 1985, 315: 641-647.
- [11] CLORE G M, WINGFIELD P T, GRONENBORN A M. High-resolution three-dimensional structure of interleukin 113 in solution by 3- and 4-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(23): 15-23.
- [12] JIANG S, ZHANG D, LI J, et al. Molecular characterization, recombinant expression and bioactivity analysis of the interleukin-1 beta from the yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24: 323-336.
- [13] DU C H, HAN L, XIE Z H. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and purification of soluble recombinant duck interleukin-2 [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28: 1495-1501.
- [14] SCHEERLINCK J. Functional and structural comparison of cytokines in different species [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999, 72: 39-44.
- [15] ZHENG X, BIAN F, MA P, et al. Induction of Th17 differentiation by corneal epithelial-derived cytokines [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 222(1): 95-102.