

IL-1 β 的基因克隆及在原核中的表达

唱韶红 吴军 巩新

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 :从人外周血中分离出白细胞 ,提取其总 RNA ,根据文献报道的 IL-1 β 的核苷酸序列合成 5'和 3'端引物 ,用 RT-PCR 的方法获得了 IL-1 β 的基因 cDNA ,并在大肠杆菌中获得了高效表达 ,表达量占全菌的 40% ,并对表达产物进行了分离纯化和活性分析 ,获得了纯度大于 98% 的样品 ,该样品表现出明显的生物学活性。

关键词 :IL-1 β ,克隆 ,大肠杆菌

中图分类号 :Q933 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2002)03-0311-05

IL-1 是一种重要的细胞因子 ,具有广泛的生物学活性。不仅对多种免疫活性细胞有重要调节作用 ,而且参与造血、神经内分泌及抗肿瘤等多种生理过程^[1] ,并与发热、炎症以及某些疾病的病理变化有关。IL-1 参与介导炎症反应 ,是重要的炎症介质 ,能促进骨髓释放中性粒细胞 ,诱导单核细胞和多核细胞趋化浸润到炎症局部 ,在局部释放溶酶体酶 ,IL-1 还具有破坏结缔组织的作用^[2] ,能诱导成纤维细胞增殖 ,并能诱导上皮细胞、成骨细胞产生胶原蛋白 ,诱导破骨细胞、成纤维细胞和软骨细胞等释放胶原酶分解胶原蛋白 ,并能促进骨质吸收 ,促进平滑肌细胞增殖。

IL-1 对代谢也有较大的影响^[2] ,它能参与恶液质的形成 ,有致氮平衡的效应 ,可刺激骨骼肌细胞分解蛋白质 ,它还具有降低血糖的作用 ,这与它能刺激胰岛素分泌、增强胰岛素的活性和促进葡萄糖转运到胞浆有关。并且 IL-1 对血浆中的微量元素也有影响 ,包括引起铜离子增加和锌离子、铁离子的减少。

另外 IL-1 在免疫细胞的激活中也发挥着重要作用 ,它可以作用于巨噬细胞和单核细胞 ,诱导其产生对肿瘤细胞的细胞毒活性 ,并且还促进原始骨髓造血干细胞的集落增殖 ,同时能够促进人体其他细胞释放造血生长因子而促进造血。依据以上机理 ,国外试用 IL-1 β 治疗肿瘤^[3] 以及治疗高剂量化疗和同源骨髓移植后^[4,5] 促进造血功能恢复的临床 I 期试验。

本工作是从人外周血中分离白细胞 ,经 PHA 活化后提取其总 RNA ,用 RT-PCR 的方法获得了 IL-1 β 基因的 cDNA ,在大肠杆菌中获得了高效表达 ,并对表达产物进行了分离纯化和活性分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 DH5 α ,本室保存 ;人外周血白细胞 ,取自正常成年人 ;EL-4 细胞株 ,购自中

中国科学院上海细胞研究所 ;CTLL-2 细胞株 ,本室保存 ;pBV220 载体 ,含有 P_{LPR} 温度诱导启动子 ,本室保存 ;限制性内切酶 ,TaqDNA 聚合酶 ,T4DNA 连接酶 ,总 RNA 提取试剂盒 ,RT-PCR 试剂盒 ,质粒快速提取试剂盒分别购自华美公司、博大公司 ;分离纯化介质 CM-Sepharose FF , Sephadex G-25 fine , DE-Sepharose FF ,为 Pharmacia 公司产品。

1.2 人外周血白细胞总 RNA 的制备

静脉抽取正常成年人血液 5mL ,肝素钠抗凝。将血液用 1640 培养基对倍稀释后 ,加入淋巴细胞分层液 2000 r/min 离心 20min ,吸取白细胞环 ,用含 10% 小牛血清的 1640 培养基洗细胞 3 次 ,将细胞数调整为 1×10^6 /mL ,加入终浓度 $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PHA ,于 37°C 5% CO_2 培养箱中活化 5h ,收集细胞。用总 RNA 提取试剂盒从细胞中提取总 RNA 用于反转录反应。

1.3 hIL-1 β 基因的 RT-PCR 扩增

据文献报道的 hIL-1 β 基因^[6,7] ,设计引物 :5' 端引物 : ATGAATTCAATG-GCACCTGTACGATCACTGAACT 3' 端引物 : ACGTCGACTTAGGAAGACACAAATTGCATGG 在 5' 引物中加入 *Eco*RI 位点 ,在该位点的下游加入起始密码子 ATG ,并在 ATG 前加入了一个 A ,以适当调整 SD 序列。在 3' 引物中加入了 *Sal*I 位点 ,在该位点的上游加入终止密码子 TAA。按照 RT-PCR 试剂盒的方法进行反转录反应 ,获得的反转录产物即可作为 PCR 反应的模板。

PCR 反应条件为 96°C 预变性 3min ,然后按 94°C 1min , 52°C 1min , 72°C 1.5min 进行 35 个循环 ,最后 72°C 延伸 7min。

1.4 hIL-1 β 表达载体的构建及表达

用 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切 PCR 产物和 pBV220 载体 ,电泳纯化 ,回收 hIL-1 β 基因和线性化的 pBV220 载体 ,然后用 T4 DNA 连接酶连接 hIL-1 β 基因和线性化载体 ,转化大肠杆菌 DH5 α , 30°C 培养 16h 后 ,挑取单克隆 ,进行酶切鉴定及测序 ,将测序正确的单克隆接种于 Ap^+ 的 LB 培养基中 , 30°C 培养 4h ,然后 42°C 诱导 5 ~ 6h ,离心收集菌体 ,进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 表达产物的分离纯化

菌体经超声破碎后 ,离心取上清 ,用乙酸调 pH 至 5.8 ,采用 CM-Sepharose FF 柱 (ϕ : 1.6cm \times 15cm) 分离纯化 ,流动相 A 液为 0.02mol/L HAC-NaAC 缓冲液 , B 液为 1mol/L NaCl/0.02mol/L HAC-NaAC 缓冲液 (pH5.8) , 30min 内由 100% A 至 100% B 进行梯度洗脱 ,流速 8mL/min。分步收集流出液 , SDS-PAGE 分析 , 合并含 hIL-1 β 的组份 ,用 Sephadex G-25 fine (ϕ : 1.6cm \times 20cm) 柱脱盐 ,流动相为 0.02mol/L Tris-HCl , pH7.0 ,流速 8mL/min。脱盐后样品再用 DEAE-Sepharose FF (ϕ : 1.6cm \times 18cm) 柱做进一步纯化 ,流动相为 0.02mol/L Tris-HCl , pH7.0 ,流速 8mL/min ,收集穿过峰 ,即为目的蛋白。

1.6 hIL-1 β 的生物活性测定^[8]

制备的 hIL-1 β 纯品 $100 \mu\text{L}$ 上板 ,作倍比稀释后 ,加入 $100 \mu\text{L}$ EL-4 细胞 ,细胞浓度为 2×10^6 /mL , 37°C 5% CO_2 培养箱培养 24h 后 ,每孔吸出 $50 \mu\text{L}$ 培养上清依次加入另一块 96 孔板中 ,同时吸取未经 hIL-1 β 诱导的 EL-4 细胞培养上清在同一块板上 ,加入 $50 \mu\text{L}$ CTLL-2 细胞 ,细胞浓度为 1×10^6 /mL , 37°C 5% CO_2 培养箱中继续培养 ,显微镜下观察细胞的生长

状态。

2 结果和讨论

2.1 表达载体的构建

以人外周血白细胞总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 方法扩增。扩增产物经琼脂糖电泳发现在约 0.5kb 处有一明显扩增片段(图 1),用 DNA 回收试剂盒回收该片段,用 *Eco*RI/*Sal*I 双酶切后,克隆至 pBV220 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α ,经 30 $^{\circ}$ C 培养后,挑取单克隆,分别用 *Eco*RI、*Eco*RI/*Sal*I 酶切鉴定(图 2),双酶切结果显示,有一约 0.5kb 片段,取该质粒测序,序列正确。

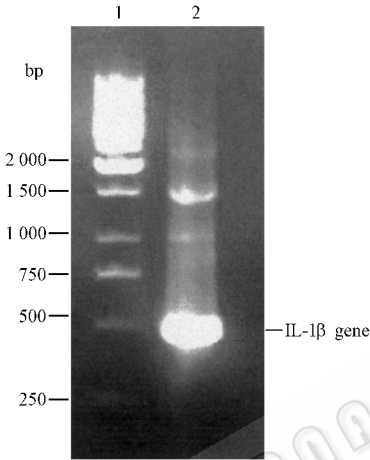


图 1 RT-PCR 扩增结果

Fig.1 RT-PCR result

1.1.1kb DNA ladder 2. Product of RT-PCR.

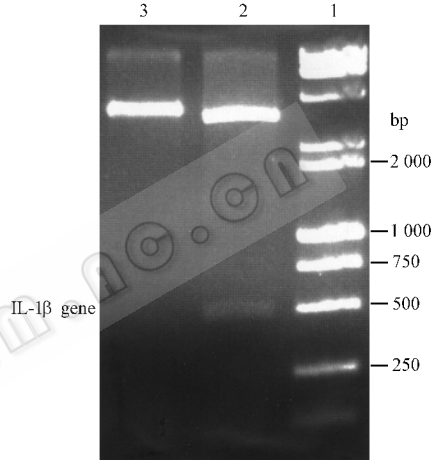


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig.2 Characterization of recombinant plasmid

1. DL2000 ladder ;2. IL-1 β digestion by *Eco*RI/*Sal*I 3. IL-1 β digestion by *Eco*RI.

2.2 重组人 IL-1 β 的高效表达

将 IL-1 β 质粒转化 DH5 α ,按方法 1.7 节诱导工程菌表达。SDS-PAGE 分析,发现诱导后在 18.5kD 处出现一条新蛋白质条带,证实为重组蛋白(图 3)。薄层扫描分析表明,重组蛋白的含量约占菌体总蛋的 40%。

2.3 重组蛋白的分离纯化

将菌体超声破菌后,SDS-PAGE 分析上清和沉淀,发现重组蛋白为胞内可溶性表达,离心收集上清液。由于大肠杆菌内多为酸性蛋白,而 IL-1 β 的等电点为 pI7.5 左右,因此我们将超声破菌后上清调 pH 值至 5.8,用 CM-sepharoseFF 柱进行纯化,大部分杂蛋白不被吸附而穿过,目的蛋白被吸附在柱上,用 1mol/L NaCl 溶液梯度洗脱,约在 0.3mol/L NaCl 浓度时,目的蛋白被洗脱下来。将洗脱样品用 G25 fine 柱脱盐后,再用 DEAE-Sephacel 柱做进一步纯化,流动相选择 pH7.0 的 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液,在这种 pH 状态下,IL-1 β 不被吸附而穿过,收集穿过峰样品,SDS-PAGE 分析,在 18.5kD 左右明显可见目的蛋白条带(图 4),经扫描分析,纯度大于 98%。

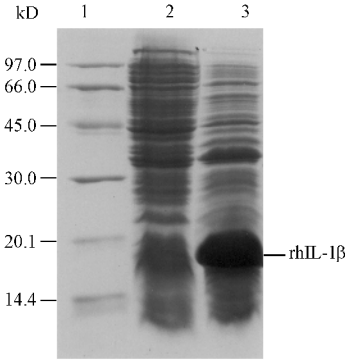


图3 IL-1β在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression of IL-1β *E. coli*

1. Molecular weight marker 2. DH5 α (IL-1β) without induction 3. Induced DH5 α (IL-1β).

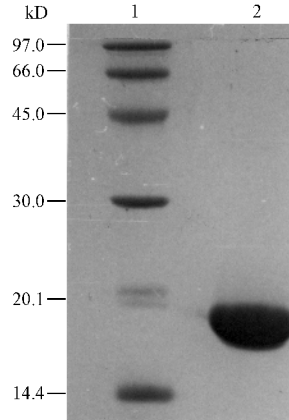


图4 IL-1β纯品的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE analysis of final products

1. Molecular weight marker 2. Purified rhIL-1β.

2.4 hIL-1β 的生物活性测定

依据 IL-1β 能够诱导 EL-4 细胞分泌产生 IL-2 ,并且在一定浓度范围内 ,产生的 IL-2 的量与加入的 IL-1β 有一定的量效关系^[8] ,因而 ,我们按材料方法中的细胞测活方法 ,对 hIL-1β 纯品的生物学活性进行了分析 ,发现经 hIL-1β 诱导后的 EL-4 细胞的培养上清能明显地促进 CTLL-2 细胞的增殖 ,细胞生长状态良好(图 5-A) 。而未经 hIL-1β 诱导的 EL-4 细胞的培养上清则不能促进 CTLL-2 细胞的增殖 ,细胞萎缩 ,破碎(图 5-B) 。由此可知我们制备的 hIL-1β 纯品表现出明显的生物学活性。

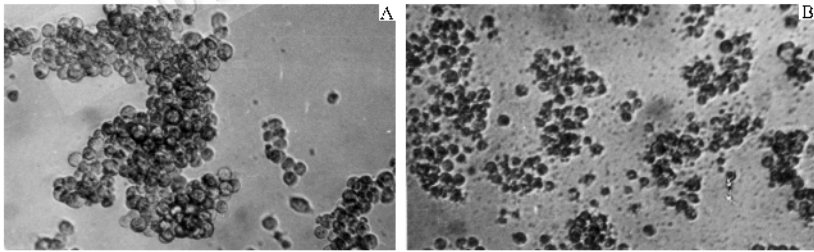


图5 经 hIL-1β 诱导的 EL-4 细胞培养上清对 CTLL-2 细胞的增殖作用

Fig.5 The effect of proliferation of CTLL-2 cells stimulated by the culture solution of EL-4 cells induced by hIL-1β

A. Cultivate the CTLL-2 cells with the culture solution of EL-4 cells induced by hIL-1β ;
B. Cultivate the CTLL-2 cells with the culture solution of EL-4 cells.

参 考 文 献

[1] Oppenheim J J , Kovacs E J. *Immunol Today* , 1986 , 7 : 45 ~ 56 .
 [2] 孙卫民 , 王惠琴 . 细胞因子研究方法论 . 北京 : 人民卫生出版社 , 1997 . 376 ~ 377 .
 [3] Rinehart J , Hersh E. *Cancer Invest* , 1997 , 15 (3) : 403 ~ 410 . 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [4] Elkordy M , Crump M. *Bone Marrow Transplant* , 1997 , 19(4) 315 ~ 322.
- [5] Gershanovich M L , Filatova L V. *Vopr Onkol* , 2001 **46** (3) 354 ~ 360.
- [6] 黄传书 , 金伯泉 , 汪美先 . 中国免疫学杂志 , 1991 **5** (5) 286.
- [7] March C J , Mosley B. *Nature*(Lond.) , 1985 **315** 641 ~ 647.
- [8] 孙卫民 , 王惠琴 . 细胞因子研究方法学 . 北京 : 人民卫生出版社 , 1997. 381 ~ 383.

Cloning of IL-1 β Gene and Expression in *E. coli*

Chang Shaohong Wu Jun Gong Xin

(*Institute of Biotechnology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100071 , China*)

Abstract : IL-1 β cDNA was obtained by RT-PCR with the template of the total RNA extracted from leukocytes which was separated from human peripheral blood. 5' and 3' primers were synthesized according to literatures reported sequence of IL-1 β . IL-1 β gene was highly expressed in *E. coli* and the expression level reached to about 40% of total bacteria proteins. Separation , purification and bioactivity analysis of the expressed products was performed. The purity of the final products reach more than 98% , and the culture solution of EL-4 cells induced by hIL-1 β can promote the proliferation of CTLL-2 cells obviously.

Key words : IL-1 β , Clone , *E. coli*

《微生物学报》承接广告业务

《微生物学报》创刊于 1953 年 , 双月刊 , 双月 4 日出版 , 由中国微生物学会和中科院微生物研究所主办。他是我国微生物学领域唯一的综合性学报级刊物。主要报道我国普通微生物学 , 工业、农业、医学、兽医微生物学 , 病毒学 , 免疫学和生物工程等方面的研究论文、研究简报和短篇综述等。

本刊历史悠久 , 发行量大 , 内容涵盖面广 , 深受国内外科研工作者、高等院校师生和企业事业科研管理人员的欢迎。他是我国自然科学核心期刊 , 被国内外一些重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。2001 年《微生物学报》入选“中国科技期刊方阵”。

凡与微生物学及其各分支学科有关的试剂、药品、仪器、设备 , 以及与微生物有关的信息等均欢迎在本刊刊登广告。本刊服务热情 , 信守协议 , 保证质量 , 价格合理 , 竭诚为广大用户服务。

联系电话 (010) 62630422 邮编 : 100080 E-mail : gesg@sun.im.ac.cn

通讯地址 : 北京市海淀区中关村北一条 13 号《微生物学报》编辑部