134-138

维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第2期 中国病毒学 Vol.13 No.2
1998年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1998

人白细胞介素-18基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达*

徐东刚[1] 牛建章[2] 孟宗达[2] 逯好英[1]
陈淑芬[2] 崔 泽[2] 朱会宾[2] 孟文华[1]

[1](军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)
[2](河北省卫生防疫站,保定 071000)

R392.11

摘 要 利用反转录PCR(RT-PCR)法从人肝组织中分离人白介素18(hIL-18)基因。克隆到T vector easy载体中,经酶切初步鉴定后进行DNA序列分析,结果表明与文献报道完全一致。以pBV220为表达载体,在大肠杆菌中高效表达了hIL-18基因,重组蛋白占菌体总蛋白的27.2%。为进一步研究其生物活性奠定了重要基础。

关键词 人白介素-18,cDNA克隆,表达,大肠杆菌 白细胞介素18

白细胞介素18(IL-18)即γ干扰素诱导因子(IGIF)[1],是最近发现的一种新细胞因子,其生物活性与IL-12相似。它具有促进T、B淋巴细胞的分化增殖、激活NK细胞,以及诱导产生IFN-γ、IL-2和GM-CSF的作用[2]。研究表明IL-18作为一种多效性细胞因子,是以一种免疫调节因子起作用。由于IL-18在传染病和肿瘤免疫治疗上具有广阔的应用前景,已成为医学和免疫学的研究热点。我们从人胎肝细胞中分离了人IL-18基因,序列分析结果表明与文献报道完全一致,并在大肠杆菌中高效表达了hIL-18基因。

材料和方法

1 工具酶 BamHI,EcoRI限制性内切酶,T_4DNA连接酶和cDNA合成试剂盒均购自Promega公司。

2 质粒和菌株 质粒pGEM-T(easy)购自Promega公司。质粒pBV220,大肠杆菌 *E. coli* JM109,DH5α由军事医学科学院分子遗传室保存。

3 引物合成 参考Ushio S.等[2]报道的hIL-18基因序列,设计合成引物。为便于克隆与表达在引物的两端分别加入了EcoR Ⅰ、BamH Ⅰ酶切位点和起始密码子ATG。引物序列为F1:GGAATTCATG-TACTTTGGCAAGCTTG,R1:CGGGATCCCTAGTCTTCGTTTTGAAC。

4 cDNA合成与RT-PCR RNA提取:胎肝组织采自水囊引产的胎儿,无菌手续剖取肝标本。用异硫氰酸胍一步法[3],从肝组织中提取总RNA。cDNA合成选用美国Promega公司产cDNA合成试剂盒(Reverse Transcription System, PCR-Related, A3500, Promega Corporation),使用Oligo(dT)引物。基因扩增采用RT-PCR方法,42℃反转录45 min;PCR反应条件为:94℃40 s,50℃40 s,72℃ 60 s,进行30个循环。

5 DNA序列分析 用ABI 310自动测序仪及配套试剂,由解放军302医院基因工程室进行全序列分析。

6 重组表达质粒的构建 RT-PCR产物直接克隆到pGEM-T(easy)载体中构建pGEM-T-IL18重组质粒,将

收稿日期:1997-10-20,修回日期:1997-12-26
* 本课题受河北省科委资助

维普资讯 http://www.cqvip.com

其与pBV220分别用EcoR I和BamH I消化，玻璃奶法回收，4℃下过夜进行连接反应，连接产物转化DH5α感受态细胞。

7　重组蛋白的诱导表达　将带有重组质粒的Dh5α新鲜过夜培养物按1:10接种10 mL的LB培养基中(含80μg/ml氨苄西林)，30℃摇床培养至D_{600}为0.5，转至42℃继续培养5 h。用10%SDS-PAGE电泳对培养物进行分析。

结　　果

1　hIL-18基因的克隆

从人胎肝组织中提取mRNA，经RT-PCR扩增后，用1%琼脂糖电泳分析扩增结果，产物长度为492 bp(图1)。

2　重组质粒的酶切鉴定

PCR产物直接克隆到pGEM-T(easy)载体中，经EcoR I酶切鉴定插入片段大小约500 bp，初步证实所克隆基因为IL-18基因片段(图2)。

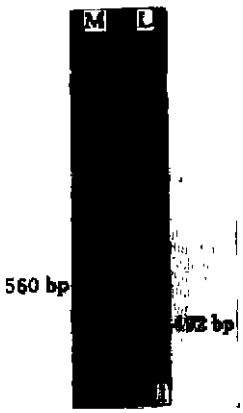

图1　RT-PCR法分离hIL-18基因的电泳鉴定

Fig 1　Agarose gel electrophoresis of hIL-18 gene amplified by RT-PCR

L：Human liver tissue M：λDNA EcoRI/Hind Ⅲ Marker

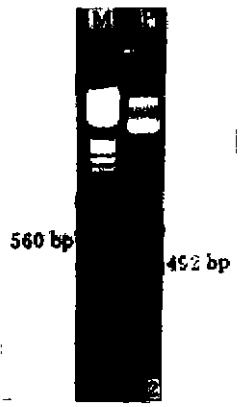

图2　重组质粒pGEM-T-IL18的酶切鉴定图谱

Fig 2　Identification of recombinant plasmid pGEM-T-IL18 digested by restriction edonuclease

M：λDNA EcoRI/Hind Ⅲ Marker

P：recombinant plasmid pGEM-T-IL18

3　hIL-18基因片段的序列分析

采用pGEM通用引物，以变性的重组质粒双链DNA为模板对其进行了全自动序列分析，所获基因片段为492 bp(包括两端的酶切位点)，结果与Gene Bank中序列完全一致(图3)。

4　重组蛋白的表达

利用体外重组技术构建含有hIL-18基因的重组表达质粒(图4)，转化宿主菌DH5α，经热诱导后，表达了一个分子量约为17 000D的特异蛋白。重组蛋白以包涵体形式存在，薄层扫描结果表明，表达的重组蛋白占细菌总蛋白的27.2%(图5)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

TACTTTGGCAAGCTTGAATCTAAATTATCAGTCATAAGAAATTTGAATGACCAAGTTCTC
TTCATTGACCAAGGAAATCGGCCTCTATTTGAAGATATGACTGATTCTGACTGTAGAGAT
AATGCACCCCGGACCATATTTATTATAAGTATGTATAAAGATAGCCAGCCTAGAGGTATG
GCTGTAACTATCTCTGTGAAGTGTGAGAAAATTTCAACTCTCTCCTGTGAGAACAAAATT
ATTTCCTTTAAGGAAATGAATCCTCCTGATAACATCAAGGATACAAAAAGTGACATCATA
TTCTTTCAGAGAAGTGTCCCAGGACATGATAATAAGATGCAATTTGAATCTTCATCATAC
GAAGGATACTTTCTAGCTTGTGAAAAAGAGAGAGACCTTTTTAAACTCATTTTGAAAAAA
GAGGATGAATTGGGGGATAGATCTATAATGTTCACTGTTCAAAACGAAGACTAG .

图3 hIL-18 cDNA 序列分析结果

Fig 3 Nucleotide sequence of hIL-18 gene

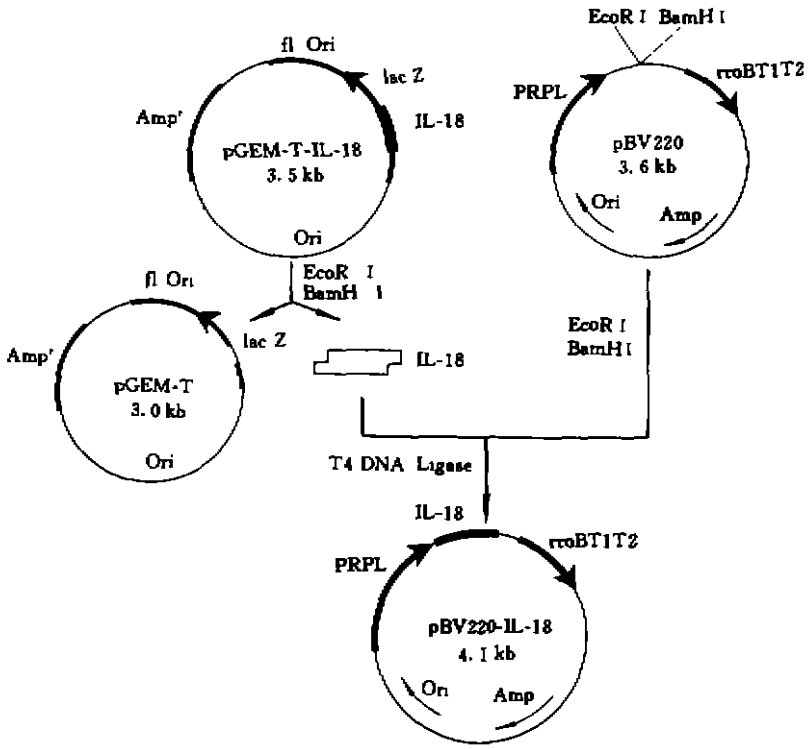

图4 重组质粒 pBV220-IL-18 构建示意图

Fig 4 Strategy for construction of recombinant plasmid pBV220-IL-18

讨 论

1996年，Ushio S等[2]用鼠源 IGIF cDNA 为探针，从正常人肝细胞 cDNA 文库分离到了人 IL-18cDNA 克隆，并在大肠杆菌中进行表达。研究表明它广泛分布于人体组织和细胞，包括肝、肾及活化的单核/巨噬细胞等，同时发现未经处理和刺激的枯氏细胞中也有 IL-18mRNA

维普资讯 http://www.cqvip.com

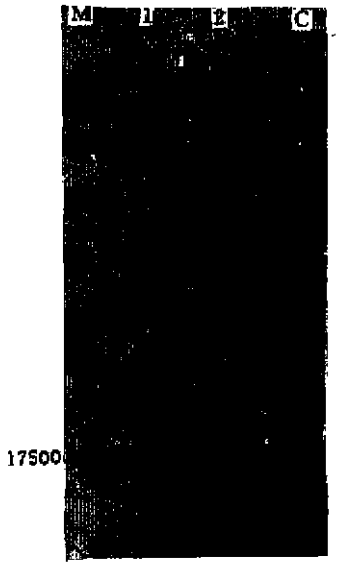

图 5　hIL-18 基因在 DH5α 中表达的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig 5　DSD-PAGE analysis of the rIL-18 protein expressed in DH5α

M: Protein Marker 1～2: pBV220-IL-18 in DH5α C: Control strain

的高表达，而用 LPS 处理后对表达量没有影响[5]。已有越来越多的研究表明细胞因子的作用不是独立的，而是处在一个十分复杂的网络中。目前对 IL-18 功能的研究刚刚起步，发现它的生物活性与 IL-12 相似，对 NK 细胞具有明显的激活作用，同时重组人 IL-18 具有提高 IFN-γ、IL-2 和 GM-CSF 分泌量的作用。从 IL-18 在不同淋巴细胞群中所表现的生物学活性看，在自然状态下，这种细胞因子是多效性的，在促进 Th1 型免疫应答中起非常重要的作用。目前对 IL-18 在体内的加工和免疫调节作用机制目前尚不清楚，推测 IL-18 通过促进 Fas L 的表达，在免疫应答中起调节作用[6-8]。

IL-18 在抗病毒和肿瘤免疫治疗方面具有广泛的应用潜力，我们在大肠杆菌中高效表达了 hIL-18，为获得大量的有生物学活性的重组蛋白和进一步开展 hIL-18 功能研究奠定了重要基础。

参 考 文 献

1　Okamura H, Tsutsui H, Komatus T *et al*. Cloning of a new cytokine that induces IFN-γ production by T cells. Nature. 1995, 378: 88

2　Ushio S, Namba M, Okura T *et al*. Cloning of the human IFN-γ-inducing factor expression in Eschrichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. J Immunol. 1996 Jun 1, 156(11): 4274

3　Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analy Biochemistry. 1987, 162: 156

4　Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

5　Conti B, Jahng JW, Tinti C *et al*. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. J Biol Chem. 1997 Jan 24, 272(4): 2035

6　Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T *et al*. INF-gamma-inducingn factor is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. J Immunol. 1997 Feb 15, 158(4): 1541

维普资讯 http://www.cqvip.com

7 Dao T, Ohasi K, Kayano T *et al*. Interferon-γ-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cell Celluar Immunology 1996, 173:230

8 Gu Y, Kuida K, Tsutsui H *et al*. Activation of interferon-gamma inducion factor mediated by interleukin-1beta convertion enzyme Science. 1997 Jan 10, 275(5297):206

Cloning of Human Interleukin 18 Gene and Its Expression *in E. coli*

Xu Donggang Lu Haoying Meng Wenhua

(*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing* 100850)

Niu Jianzhang Meng Zongda Chen Shufen Cui Ze Zhu Huibin

(*Hebei Provincial Hygiene and Anti-epidemic Station, Baoding* 071000)

Abstract Human interleukin-18 gene was isolated from human liver tissue by reverse transcription polymerase chain reaction. hIL-18 gene was cloned into plasmid pGEM-T (Easy) and pBV220. The gene was sequenced and showed no difference with that reported and expresed in *E. coli* in the form of inclusion bodies. The recombinant protein amounts to 27.2% of total bacterial protein.

Key words Human interlukin-18, cDNA cloning, Gene expression, *E. coli*