

# 人白细胞介素 11 cDNA 的克隆、融合表达及活性测定

张 颖 刘灿辉 刘玉乐\* 田 波

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 取人胎肺做原代培养细胞, PMA 诱导后, 利用 RT-PCR 技术, 扩增出了去掉 N 端信号肽序列的 IL-11cDNA。经序列分析表明, 该序列与文献报道序列高度同源, 仅 3 个核苷酸有变化, 氨基酸序列完全一致。将此 IL-11cDNA 克隆入硫氧还蛋白基因融合表达载体 pTRXFUS 的 *trxA* 基因 3' 末端, 利用其 3' 端的蛋白肠激酶切点, 构建符合读码框的融合基因。该融合蛋白在大肠杆菌中表达量达 20% 以上。用 IL-6 依赖细胞株 7TD1 及 MTT 法测定生物学活性, 达  $2.56 \times 10^5$  u/mL 菌液, 对融合蛋白进行了 Western blot 测定, 并对表达条件作了初步研究。

**关键词** 人白细胞介素 11, 人胎肺原代培养细胞, RT-PCR, 硫氧还蛋白融合蛋白表达体系, 活性测定

中图分类号 Q753 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0353-04

人白细胞介素 11(hIL-11)是一种多功能的细胞因子, 能影响数种造血细胞的生长和分化, 包括早期多能干细胞和巨核细胞、红细胞前体细胞及巨噬细胞前体细胞。除对造血细胞的作用外, IL-11 还能抑制前脂肪细胞中脂肪的生成, 刺激肝细胞中数种急性期血浆蛋白的产生, 刺激结缔组织细胞中金属蛋白酶的抑制剂的产生并对粘膜起保护作用等<sup>[1, 2]</sup>。

人的白细胞介素 11 基因含有 5 个外显子和 4 个内含子, 定位于 19 号染色体长臂上<sup>[3]</sup>。1990 年 Paul 等人克隆了 IL-11cDNA<sup>[4]</sup>, 并随着其功能的不断阐明, 得到各国科学家的重视。FDA 于 1997 年 11 月批准重组 hIL-11 用于治疗化疗后引起的血小板减少症<sup>[5]</sup>。

本文报道了中国人 IL-11cDNA 的克隆与序列测定, 与国外报道序列进行了比较; 并将 IL-11cDNA 插入到硫氧还蛋白基因融合表达载体 pTRXFUS<sup>[6]</sup>中, 在大肠杆菌菌株 G1724 中进行了表达。pTRXFUS 含有 P<sub>L</sub> 启动子, IL-11cDNA 插入到其 *trxA* 基因的 3' 端。G1724 含有单拷贝的紧密整合在细菌染色体 ampC 位点中的 *cI* 基因。该基因处在细菌染色体中一个负责合成色氨酸(*trp*)的启动子的控制下。当培养基中缺乏 *trp* 时, *cI* 蛋白的合成阻止了 P<sub>L</sub> 启动子的启动, 而当培养基中加入 *trp* 后, *cI* 不再合成, P<sub>L</sub> 启动子启动融合蛋白 *trxA*-

hIL-11 的大量合成。合成的融合蛋白在大肠杆菌胞质中以可溶性形式存在, 并可正确折叠, 表现出全部生物学活性。

## 1 材 料

引产胎肺新鲜组织取自海淀医院。质粒 pBluescript KS(简称 pKS), pTRXFUS; 受体菌 *E. coli* 菌株 DH5  $\alpha$  和 G1724 由本实验室提供。RNA-gents<sup>®</sup>Total RNA Isolation System、AMV 反转录酶、rRNasin<sup>®</sup>、dNTPs 均购自 Premega 公司; Taq plus II 购自上海生工生物工程公司; 限制酶, T4 DNA ligase, 细胞培养基 DMEM、1640 购自 Gibco 公司; PMA 购自 Sigma 公司。IL-6 细胞依赖株 7TD1 购自军事医学科学院。IL-11 羊抗人多克隆抗体购自 R&D 公司。

## 2 方法和结果

### 2.1 原代胎肺成纤维细胞的制备及诱导

新鲜胎肺组织, 用生理盐水洗净血污, 手术剪剪碎后, 加入 0.2% 胰蛋白酶 37℃ 消化 2h, 1200r/min 离心 1min, 弃上清, 沉淀加入生理盐水洗 2 次后, 加入含血清、双抗的 DMEM 洗 1 次, 再悬起, 使劲吹打, 使细胞尽量分散开, 分装入细胞培养瓶中, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。2d 后, 有长梭形细胞贴壁, 换液再培养, 直到长梭形纤维细胞长满培养瓶底部。

得到了人胎肺原代成纤维细胞。

将细胞培养基换成无血清 DMEM,加入 30μL PMA(20ng/μL) 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 中培养 4h, 弃去培养液,用无菌 PBS 洗 2 次,胰酶消化后,收集细胞,立即用于总 RNA 的提取。

### 2.2 寡核苷酸引物的设计

本研究的目的是获得 IL-11 cDNA 并在 *E. coli* 中表达融合蛋白 IL-11,故在合成 5'端克隆引物 P1 时,P1:5'CG GGTAC CCC GGG CCA CCA CCT GG3'去掉了全长 cDNA 中 N 端的信号肽序列,引入 *Kpn*I 酶切位点(上画线部分),以便于 cDNA 克隆;根据文献报道,IL-11 成熟蛋白缺少 N 端第一个 Pro 不影响其生物学活性,所以为便于融合蛋白的切割,将 IL-11cDNA 第一个氨基酸残基脯氨酸 CCT 换成 CCC,从而引入 *Sma*I 位点(虚线部分),以便于插入表达载体中。在合成 3'端引物 P2 时,首先考虑利用终止密码子 TGA 附近的序列,但这部分序列与 cDNA 内部序列高度同源,故选择了 TGA 后 3'端非编码区内的一段序列,并加入了酶切位点 *Bam*HI(下画线部分),P2:5'CGGGA TCC GAA GGA CTG TCT CTA ACT AG3'

### 2.3 总 RNA 的提取、RT-PCR 合成 IL-11cDNA 及其克隆

按 RNAgents<sup>®</sup> Total isolation system 说明书提取一瓶细胞(约 10<sup>7</sup> 个)总 RNA,冷干后,溶于 100μL 水中,加入 2uL rRNasin<sup>®</sup>(40u/μL);在引物 P2 引导下,以总 RNA 为模板,反转录合成 IL-11cDNA 第一链;再以此为模板,以 P1 和 P2 为引物,用 Taq plus II 做 PCR,反应体系 50μL,条件 94℃ 变性 5min,94℃ 40s,62℃ 40s,72℃ 1min,35 个循环,72℃ 延伸 10min。反应结束后,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测(见图 1)。PCR 产物为一 700bp 左右的片段,与预期结果相符,将此片段克隆入 pKS 中(图 2)。转化 DH5α,得到阳性克隆 pKS/hIL-11。对此插入片段进行序列分析,结果表明,中国人胎肺来源的 IL-11cDNA 与文献报道序列<sup>[4]</sup>高度同源,其中仅 111 位、183 位 G→A,210 位 A→G,氨基酸序列没有变化。

### 2.4 硫氧还蛋白 IL-11 融合蛋白表达载体的构建(图 2)

pKS/hIL-11 用 *Sma*I 和 *Bam*HI 酶切后,插入载体 pTRXFUS 的 *Kpn*I(已消平)及 *Bam*HI 之间。转化大肠杆菌 G1724,得到阳性克隆 pIL-11a。序列分析表明 IL-11cDNA 以正确的读码框架插入到

*trxA* 基因的下游,两个蛋白之间有正确的肠激酶切割位点,因此,用肠激酶切去融合蛋白中的硫氧还蛋白,可得到成熟 hIL-11。

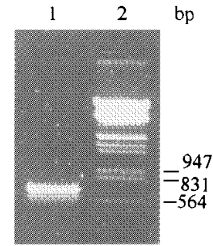


图 1 hIL-11 的 RT-PCR 产物  
Fig. 1 RT-PCR Product of hIL-11  
1. RT-PCR product; 2. λ DNA/EcoRI + HindIII

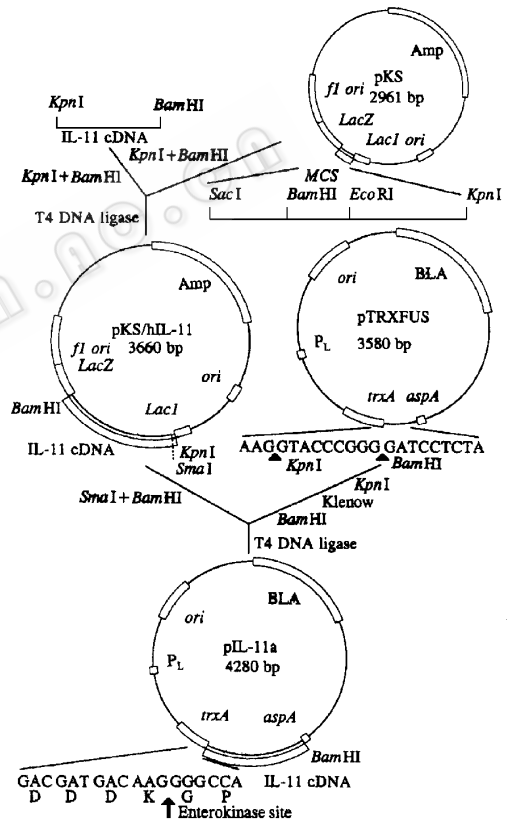


图 2 硫氧还蛋白 IL-11 融合蛋白表达载体的构建  
Fig. 2 Construction of the *trxA* and hIL-11 fusion expression vector

### 2.5 硫氧还蛋白 IL-11 融合蛋白的表达及表达条件初步研究

将构建好的含重组质粒 pIL-11a 的 IL-11 硫氧还蛋白表达菌株接种 IMC<sup>[6]</sup>(加 Amp)培养基中,30℃ 摇过夜,次日按 1% 接种量转接 IMC(Amp)培养基,30℃ 分别培养 1h、1.5h、2h、2.5h、3h、4h、5h、6h、7h 后,加入色氨酸(终浓度 100μg/mL)诱导,转入 37℃ 培养 4h,收菌体,在 10% SDS-PAGE<sup>[7]</sup>上检

测硫氧还蛋白 IL-11 融合蛋白的表达情况。结果表明, 30℃ 培养 2~3h 后, 表达效果最好。而 30℃ 培养 2.5h, 诱导表达不同时间发现, 4h 时, 表达效果最佳, 图 3。表达量经扫描达 20%, 分子量约 35kD。

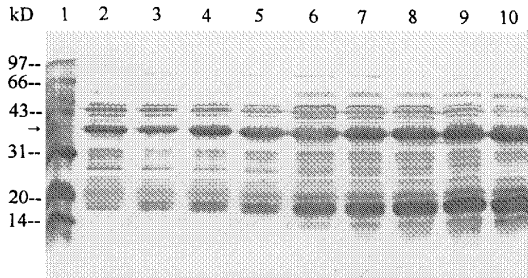


图 3 不同诱导时间 hIL-11 融合蛋白表达量

Fig.3 Expression of fusion hIL-11 at different expression hours

1.Marker; 2~10. 2.5h 3h 3.5h 4h 4.5h 5h 6h 7h 8h

## 2.6 hIL-11 融合蛋白的生物学及免疫学活性测定

用 IL-6 依赖细胞株 7TD1 和 MTT 色素还原法测定 hIL-11 融合蛋白的生物学活性<sup>[8]</sup>, 以标准品 Genetics Institute 的 Neumega 做对照, 以引起 7TD1 细胞 1/2 最大刺激时的浓度定为 u/mL。1 mL 表达菌液经离心, 释放后, 稀释至 1L 1×PBS 中, 测活, 结果如图 4。活性达  $2.56 \times 10^5$  u/mL 菌液。

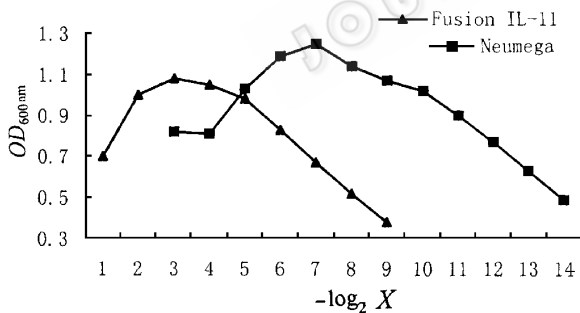


图 4 白细胞介素 11 融合蛋白表达菌液生物学活性测定

Fig.4 Bioactivity of fusion hIL-11 on 7TD1 cell line  
X indicates dilution

对硫氧还蛋白 IL-11 融合蛋白及 Neumega 标准品进行 Western blot 分析(图 5), 表明融合蛋白有免疫学活性。

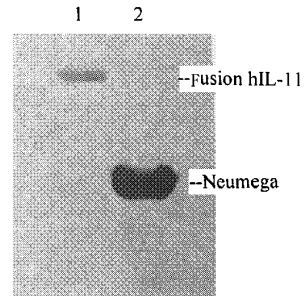


图 5 hIL-11 融合蛋白 Western blot 鉴定

Fig.5 Western blot of fusion hIL-11

1. Fusion hIL-11; 2. Neumega

## 3 讨论

我们用新鲜的胎肺组织培养原代成纤维细胞, 经过 PMA 诱导, RT-PCR 得到了 hIL-11cDNA。我们曾用 IL-1 $\beta$  诱导, 但没能得到 hIL-11cDNA。所得到的 cDNA 除了 3 个核苷酸与文献报道不同外, 没有发现氨基酸的变化。

许多外源蛋白在大肠杆菌胞内不能正确折叠获得天然空间结构和生物功能, 而是以无活性的不可溶的包涵体形式存在。要获得具有生物活性的目的蛋白需首先将包涵体溶解后进行重组蛋白复性, 这些复杂操作极大增加了获得高活性纯品的难度和成本, 由于 hIL-11 成熟蛋白前 8 个氨基酸中含有 6 个脯氨酸, 内部 Pro 含量也很高, 对其在大肠杆菌中的表达及后处理可能影响很大, 又因 IL-11 成熟蛋白不含 Cys 及可能的糖基化位点, 我们选择了硫氧还蛋白融合表达体系。这样 hIL-11 以硫氧还蛋白融合蛋白的形式在大肠杆菌细胞周质空间中, 以可溶性形式高效表达, 融合蛋白有完全生物学活性, 表明融合蛋白在胞质中能折叠成正确的空间构象, 从而避免了纯化时对重组蛋白进行变性、复性等复杂操作, 为后处理带来方便, 更适于放大生产。

## 参 考 文 献

- [1] Du X X, Williams D A. *Blood*, 1997, **89**(11):3897
- [2] Leng S X, Elias J A. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, **29**(8/9):1059
- [3] McKinley D, Wu Q, Yang-Feng T et al. *Genomics*, 1992, **13**:314
- [4] Palu S R, Bennett F, Calvetti J A et al. *PNAS*, 1990, **87**:7512

- [ 5 ] Business and Regulatory News. *Nature Biotechnology* Jan. 1998, **16** :7
- [ 6 ] 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南,第二版,北京 科学出版社 :1990
- [ 7 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular Cloning :A Laboratory Manual. 2nd ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- [ 8 ] 苗继红,王嘉玺,彭善云等. 中国科学 B 辑, 1995, **25**(6) :616~622

## cDNA Cloning, Fusion Expression in *Escherichia coli* and Activity Assay of hIL-11

ZHANG Ying LIU Can-Hui LIU Yu-Le TIEN Po

( Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080 )

**Abstract** Human Interleukin-11 ( hIL-11 ) is a multifunctional cytokine which plays an important role in regulating the proliferation and differentiation of cells in the hematopoietic lymphoid system *etc.* To obtain the IL-11 cDNA, a primary culture of Chinese fetal lung fibroblast was prepared from fresh tissue. Then the human IL-11 cDNA without the N-terminal signal peptide sequence was cloned by RT-PCR from the cells induced by PMA. The sequence indicated that there are three bases different from those previously reported, but with no change of the amino acids. The cDNA was inserted into the 3' end of *trxA* gene in thioredoxin gene fusion expression system pTRXFUS to construct the *trxA* and hIL-11 fusion expression vector, and expressed in *E. coli*. The fusion hIL-11 accounts for more than 20% of the total bacteria proteins. The expression product is present in soluble forms and has the full biological and immunological activities.

**Key words** Human interleukin 11 ( hIL-11 ), primary culture of Chinese fetal lung fibroblast, RT-PCR, thioredoxin gene fusion expression system, activity assay