

研究报告

鸭白介素-18 基因重组真核表达载体的构建及其表达产物的生物学活性

陈红英^{1,2}, 李新生¹, 崔保安^{1,2}, 夏平安¹, 张红英¹, 杨明凡¹

1 河南农业大学 牧医工程学院, 郑州 450002

2 河南省动物性食品安全重点实验室, 郑州 450002

摘要: 从克隆质粒 pGEM-DuIL-18 扩增出鸭 IL-18 全基因片段, 克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+) 中, 构建重组质粒 pcDNA3.1/DuIL-18 (简称 pDuIL-18)。将重组质粒 pDuIL-18 转染 Cos7 细胞, 转染细胞中含鸭 IL-18 基因的 mRNA。SDS-PAGE 分析表明, 表达产物是与鸭 IL-18 相符的约 23 000 的蛋白条带。鸭淋巴细胞转化试验表明, 表达产物对鸭淋巴细胞具有明显诱导转化作用。重组质粒 pDuIL-18 对 H₉ 亚型禽流感灭活疫苗免疫增强作用的研究表明重组质粒 pDuIL-18 能够提高禽流感灭活疫苗诱发的细胞免疫应答, 为研究能够更好地防制禽流感的新型疫苗提供了新的思路。

关键词: 白介素 18(IL-18), 鸭, 真核表达, 淋巴细胞转化试验, HI 试验

Construction of Eukaryotic Express Vector of Duck Interleukin 18 Gene and Identification of Bioactivity of Its Expressed Protein

Hongying Chen^{1,2}, Xinsheng Li¹, Baoan Cui^{1,2}, Ping'an Xia¹, Hongying Zhang¹, and Mingfan Yang¹

1 The College of Animal Husbandry And Veterinary, He'nan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2 Animal Food Safety Key Laboratory, He'nan Province, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Duck IL-18 gene was amplified from plasmid pGEM-DuIL-18 by PCR. The PCR product digested with *Pst* I and *Xho* I was inserted into eukaryotic express vector pcDNA3.1(+) to generate an recombinant expression plasmid pcDNA3.1/DuIL-18 (pDuIL-18), and transformed into *Escherichia coli* JM109. The recombinant colonies were identified by restriction enzyme digestion, PCR and sequencing. DNA sequence confirmed the correct sequence of the recombinant eukaryotic expression plasmid pDuIL-18 in the reading frame and the ligation part. After the transfection of pDuIL-18 into Cos7 cells, duck IL-18 mRNA was expressed in Cos7 cell. The SDS-PAGE analysis showed that the expressed duck IL-18 protein had molecular weight of 23 000 D. The results of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay showed that duck IL-18 protein expressed in Cos7 cell could induce significantly transformation of duck T lymphocytes. Immunoenhancement effect of recombinant expression plasmid pDuIL18 on avian influenza vaccine was observed by proliferation response of the T lymphocytes from spleen. It can obviously enhance the cell-mediated immune response.

Keywords: interleukin-18, duck, eukaryotic expression, lymphocyte transformation test, HI test

白细胞介素-18 (Interleukin-18, IL-18)是一种 1995 年首次报道的新型细胞免疫调节因子^[1], 由于

Received: January 12, 2008; Accepted: March 27, 2008

Corresponding author: Baoan Cui. Tel/Fax: +86-371-63558878; E-mail: baoancui@henau.edu.cn

它具有诱导 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ ^[2], 促进 T 细胞增殖, 增强 Th1 细胞及 NK 细胞的细胞毒活性等多种生物学功能^[3]及在增强免疫、抗肿瘤等方面所具有的极大的潜在应用价值^[4-6], 已成为近年来人们在细胞因子方面研究的一个热点。

在禽类, 2000 年 Schneider 等^[7]首次获得鸡 IL-18 cDNA, 并在大肠杆菌中表达, 表达产物能诱导雏鸡脾细胞 IFN- γ 的合成, 证明鸡 IL-18 具有生物活性。此后关于鸡 IL-18 的研究报告相继出现^[8-10], 水禽 IL-18 的研究相对滞后。笔者曾对河南饲养的固始鸭 IL-18(DuIL-18)全基因进行了克隆和测序^[11], 结果是固始鸭的 IL-18 基因序列与 Mannes 和 Chan 等在 GenBank 中注册北京鸭和北京鸭 M2 杂系 IL-18 核苷酸序列同源性达 97%以上。为进一步对鸭 IL-18 基因的结构和功能进行研究, 本研究构建了 DuIL-18 基因重组真核表达质粒, 并对其表达产物的生物学活性做了初步鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒及细胞系

真核表达载体 pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司。鸭 IL-18 基因的克隆质粒 pGEM-DuIL-18 质粒由河南省动物性食品安全重点实验室构建并保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 由河南省动物性食品安全重点实验室保存。Cos7 细胞系由郑州牧业高等专科学校动物医学系曹素芳博士惠赠。

1.1.2 试验鸭

1 日龄雏鸭购自河南省固始县某鸭场。

1.1.3 疫苗和血清

H₉ 亚型禽流感(AI)灭活疫苗、HA 抗原、阳性血清和阴性血清购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

1.1.4 主要试剂

T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; Ex Taq DNA 聚合酶, Xho I、Pst I 限制性内切酶等购自宝生物工程(大连)有限公司。EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit 购自 BBI 公司, Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 为 MBI 公司产品。PCR 产物凝胶回收试剂盒为 V-gene 公司产品。LipofectamineTM 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司。RPMI1640,

DMEM 培养基, MTT 试剂和淋巴细胞分离液等购自华美生物工程公司。

1.2 鸭 IL-18 基因重组真核表达质粒的构建

根据 pGEM-DuIL-18 质粒的鸭 IL-18 基因序列设计 1 对引物, 上、下游引物分别加入 Pst I 和 Xho I 酶切位点(下划线部分)。上游引物为 5'-CCCCTGCAGATGAGATGTGAATTGATG-3'; 下游引物为 5'-TGCCTCGAGTAGTAATCACAGGTTGTAC-3'。该对引物扩增长度为 610 bp, 含鸭 IL-18 基因全序列。反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 36 个循环; 最后 72°C 延伸 8 min。用 Pst I 和 Xho I 双酶切 PCR 产物, 电泳、回收鸭 IL-18 基因片段。将鸭 IL-18 基因片段定向插入到同样处理的真核表达载体 pcDNA3.1 中, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 涂布于含 Amp 的 LB 琼脂板上, 37°C 温箱培养 12~16 h。挑选白色菌落接种含有 Amp(50 g/mL)的 LB 肉汤培养基, 37°C 振荡培养 12~16 h。用碱性裂解法小量提取重组质粒进行 PCR 鉴定和用 Pst I 和 Xho I 进行酶切鉴定, 最后将 PCR 鉴定和酶切鉴定为阳性的重组质粒送上海生物工程有限公司进行测序。

1.3 转染

以质粒提取试剂盒提取质粒 DNA, 经紫外分光光度计测定所提质粒的含量。参照 Aubin 等^[12]的方法用 LipofectamineTM 2000 Reagent 进行转染。同时做转染空载体 pcDNA3.1 和不转染质粒细胞 2 组对照。

1.4 瞬时表达产物的鉴定

1.4.1 RT-PCR 鉴定

以 EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit 提取转染后 48 h 及阴性对照的 Cos7 细胞总 RNA, 参照 Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录, 接着按照 1.2 扩增鸭 IL-18 基因的引物和条件进行 PCR 扩增。取 5 μ L PCR 产物, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.2 瞬时表达产物的 SDS-PAGE

将转染 48 h 的 Cos7 细胞及阴性对照细胞上清, 经透析浓缩后, 进行 SDS-PAGE 检测。

1.4.3 表达产物的生物学活性鉴定

参照文献[10]方法采用鸭 T 细胞转化试验(MTT 法)对表达产物的生物学活性进行鉴定。方法

如下: 无菌操作取 35 日龄健康鸭脾脏剪碎, 120 目钢网中磨碎过滤, 用淋巴细胞分离液分离的淋巴细胞, 用 RPMI1640 培养液调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 细胞/mL, 加入重组真核表达质粒转染 Cos7 细胞后培养的上清浓缩液, 并加入灭活小牛血清 2%, 双抗 100IU/mL。将细胞悬液转移到 96 孔细胞培养板第一行 1~12 孔中, 每孔 100 μ L 细胞悬液, 做 12 个重复孔。另设阴性对照 12 孔和空白对照孔。将 96 孔板置于 37°C 5% CO₂ 培养箱培养 40~48 h; 每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL), 再 37°C 5% CO₂ 培养箱培养 3~4 h; 每孔加入 100 μ L 10% SDS-0.01 mol/L HCl 溶液, 混匀, 轻轻吹打, 继续 37°C 5% CO₂ 培养箱培养 3~4 h。以空白对照孔调零, 测定 OD_{570nm} 值。以方差分析检验试验组与对照组之间 OD_{570nm} 值的差异性。

1.5 真核表达质粒对 H₉ 亚型禽流感灭活疫苗免疫增强作用的研究

将雏鸭在严格消毒条件下饲养至 14 日龄, 免疫前, 先测定全鸭群的 AI 母源抗体水平, 经检测母源抗体滴度均 ≤ 2.5 。将鸭群分成 4 组, 每组 15 只。具体分组及免疫情况见(表 1)。4 组鸭均于接种后第 1、2、3、4、5、6、7 周时随机抽取 5 只翅静脉采血, 分离血清进行血凝抑制(Hemagglutination inhibition, HI)抗体检测, 以观察 HI 抗体的动态变化; 同时, 无菌采取各试验鸭脾脏制备淋巴细胞悬液, 以 MTT 法进行淋巴细胞转化试验。

表 1 试验分组及免疫情况
Table 1 Test grouping and Vaccination

Groups	Animal no	Vaccine or recombinant plasmid dose vaccinated intramuscularly
1	35	pDuIL-18(1 μ g/ μ L)200 μ L and AI inactivated vaccine 2 doses
2	35	AI inactivated vaccine 2 doses
3	35	pDuIL-18(1 μ g/ μ L)200 μ L
4	35	Saline

Note: ducks of 1 and 2 groups were vaccinated with inactivated vaccine first at 14 days, second at 28 days. Ducks of 1 and 3 groups were vaccinated with recombinant plasmid pDuIL-18 at 14 days, 200 μ g/duck.

1.6 统计学分析

利用 SPSS 软件包按生物统计学的方差分析法对试验数据进行统计学比较处理。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建与鉴定

以克隆质粒 pGEM-DuIL-18 为模板, 用鸭 IL-18 基因特异性引物进行 PCR 扩增。用 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切、回收的 PCR 产物插入到同样处理的真核表达载体 pcDNA3.1 中, 构建重组表达质粒 pcDNA3.1/DuIL-18(简称 pDuIL-18)。对 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组菌进行测序, 结果表明重组质粒 pDuIL-18 中含有鸭 IL-18 基因的核苷酸序列及阅读框完全正确。

2.2 DuIL-18 基因在哺乳动物细胞中的表达

2.2.1 pDuIL-18 转染 Cos7 细胞后的 RT-PCR 鉴定

应用 DuIL-18 基因特异性引物进行 RT-PCR 检测, 结果重组质粒转染组在约 0.6 kb 左右处出现 1 条特异性带, 与 DuIL-18 基因大小相符, 而空质粒载体 pcDNA3.1 转染组无此条带(图 1)。

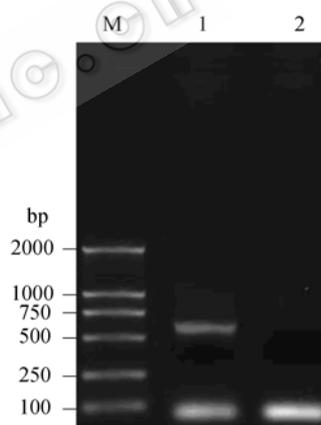


图 1 重组质粒 pDuIL-18 转染 Cos7 细胞后的 RT-PCR 鉴定

Fig. 1 RT-PCR products of mRNA from Cos7 cells transfected by pDuIL-18 plasmid

M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of recombinant plasmid; 2: pcDNA3.1 control

2.2.2 pDuIL-18 转染 Cos7 细胞上清液的 SDS-PAGE 检测

取瞬时转染细胞和对照细胞上清进行 SDS-PAGE, 电泳结果表明, 转染重组质粒组得到了大小约 23 000 的条带, 其余组均没条带, 证明 DuIL-18 基因在 Cos7 细胞中得到了瞬时表达(图 2)。

2.2.3 表达产物的生物学活性鉴定

与对照组($OD_{570\text{ nm}} = 0.261 \pm 0.0197$)相比, pDuIL-18 转染 Cos7 细胞培养上清液促进鸭 T 细胞转化的试验

组 ($OD_{570\text{ nm}}=0.652\pm 0.0161$) 的平均值, 差异显著 ($P<0.05$) 提高。表明 DuIL-18 重组表达载体 pDuIL-18 转染 Cos7 细胞的表达产物具有显著诱导鸭 T 淋巴细胞转化的生物学作用。

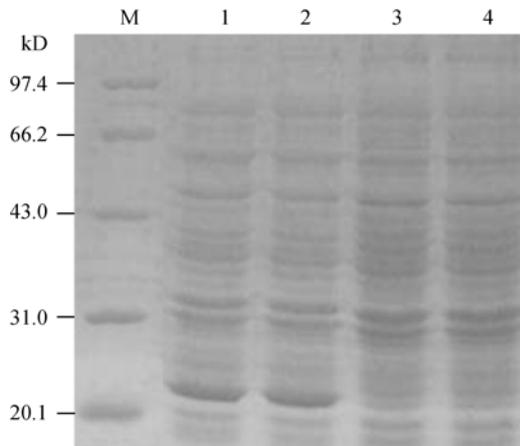


图 2 转染重组质粒 pDuIL-18 的细胞上清 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of supernatant of transfected Cos7 cells by pDuIL-18

M: low MW standard protein marker; 1,2: supernatant of transfected Cos7 cells by pDuIL-18; 3: supernatant of Cos7 cells; 4: supernatant of transfected Cos7 cells by pcDNA3.1

2.3 鸭 IL-18 表达质粒对禽流感 HI 抗体的影响

各组试验鸭在免疫接种后的不同时期, 其 HI 抗体效价如图 3。由图 3 可以看出, 第 1 组以重组质粒 pDuIL-18 和 AI 灭活苗免疫后 HI 抗体水平稳定地上升, 第 4 周时达到高峰, 第 7 周仍保持较高水平, 第 2 组只用 AI 灭活免疫的抗体水平同样稳定地上升, 比第 1 组稍低但差异不明显 ($P>0.05$)。第 3 和第 4 组保持未免疫的抗体水平, 第 4 周后逐渐下降至 0。

2.4 鸭 IL-18 表达质粒对鸭 T 淋巴细胞增殖反应的影响

各组试验鸭在免疫接种后的不同时期 T 淋巴细胞增殖动态如图 4。由图 4 可见, 重组质粒 pDuIL-18 和 AI 灭活疫苗联合注射组的 OD 值明显高于只接种 AI 灭活疫苗组, 差异极显著 ($P<0.01$); 单独注射 pDuIL-18 组的 OD 均值也明显高于注射生理盐水组, 差异极显著 ($P<0.01$)。结果表明用常规 AI 灭活苗与重组质粒 pDuIL-18 联合注射, 比只用常规 AI 灭活苗免疫鸭 T 淋巴细胞转化功能有明显提高, 单独应用重组质粒 pDuIL-18 注射的鸭 T 淋巴细胞转化功能也比注射生理盐水组的明显增强。

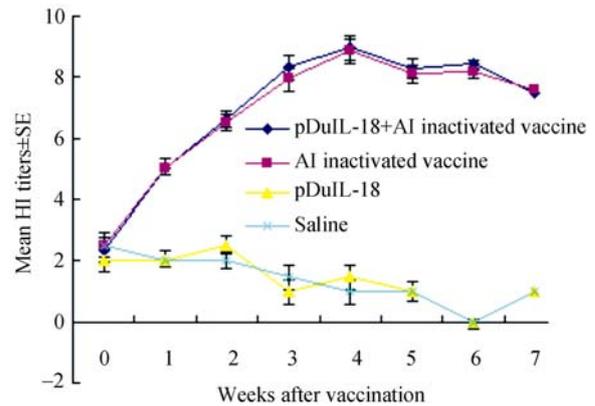


图 3 各组血清 HI 抗体动态变化 ($n=5$)

Fig. 3 Kinetics changes of HI antibody of ducks post-inoculation ($n=5$)

n =number of times the test was repeated. Values are expressed as mean HI titers±standard error

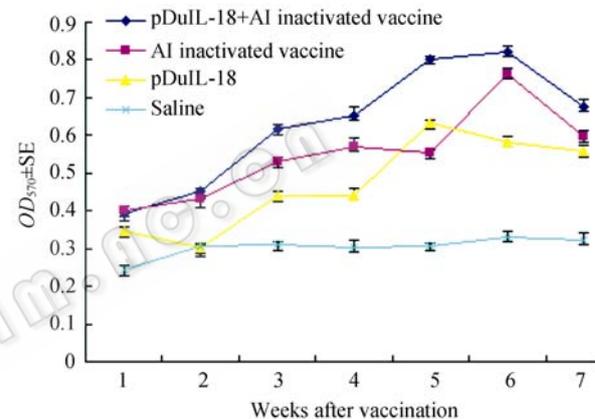


图 4 各组鸭 T 淋巴细胞转化反应动态变化 ($n=5$)

Fig. 4 Kinetics changes of T lymphocytes proliferative response of ducks post-inoculation ($n=5$)

n =number of times the test was repeated. Values are expressed as mean counts±standard error

3 讨论

油乳剂灭活苗虽对动物传染病的控制发挥了重要作用, 但在兽医临床上仍有许多疫病不断发生, 严重地威胁着畜牧业的发展。随着现代免疫学、分子-生物学技术的快速发展及其在免疫预防研究中的应用, 新型疫苗不断出现, 从较早的禽霍乱荚膜亚单位疫苗开始, 多种载体(如大肠杆菌质粒、酵母、禽痘病毒、腺病毒、昆虫杆状病毒等)表达的基因工程苗、抗独特型抗体疫苗, 以及新近出现的 DNA 裸体疫苗等, 这些疫苗在实验室中有一定的免疫效力, 但如何在临床上广泛应用仍有许多工作要做, 这给人们在疫苗研制和开发中提供了思路, 如何提高传

统灭活疫苗和新型疫苗的免疫效果,成为当前研究热点。最近几年对新发现的 IL-18 的研究显示,IL-18 是具有应用前景的新型细胞免疫增强剂。

白细胞介素-18 是机体免疫应答,尤其是细胞免疫应答中的一种重要细胞因子,可作为疫苗的免疫佐剂^[8,9]。笔者已构建了鸭 IL-18 基因重组原核表达质粒,并在大肠埃希氏菌中进行了表达。但由于原核表达的 IL-18 需要纯化和复性,所以其生物活性受到限制。因此,本研究应用引物所设计的 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切位点,将鸭 IL-18 基因片段定向连接到 pcDNA3.1 的相应位点,成功地构建了鸭 IL-18 真核表达质粒 pDuIL-18。结果表明,以重组质粒 pDuIL-18 转染 Cos7 细胞后,表达产物具有明显转化鸭 T 淋巴细胞的生物学活性。重组质粒 pDuIL-18 与 H₉ 亚型禽流感灭活疫苗联合接种试验鸭所产生的 HI 抗体在接种 2 周后到第 6 周稍高于单纯 H₉ 亚型禽流感灭活疫苗免疫组,差异不显著($P>0.05$);而鸭 T 淋巴细胞增殖试验表明,接种重组质粒 pDuIL-18 的试验鸭 T 淋巴细胞对 ConA 的反应强于单纯疫苗免疫组,差异极显著($P<0.01$)。其中, T 淋巴细胞的增殖反应从接种后第 1 周开始一直高于单纯疫苗免疫组,且从第 2 周后,两组之间均表现为差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)。这些足以证明,鸭 IL-18 的真核表达质粒 pDuIL-18 在鸭体内得到了良好表达,表达产物具有明显地增强禽流感灭活疫苗诱导细胞免疫的作用。

REFERENCES

- [1] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature*, 1995, **378**(6552): 88-91.
- [2] Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, *et al.* IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *Journal of Immunology*, 1997, **158**(4): 1541-1550.
- [3] Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, *et al.* Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *European Journal of Immunology*, 1996, **26** (7): 1647-1651.
- [4] Fujioka N, Akazawa R, Ohashi K, *et al.* Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type 1 infection. *Journal of Virology*, 1999, **73**(2): 2401-2409.
- [5] Kanda T, Tanaka T, Sekiguchi K, *et al.* Effect of interleukin-18 on viral myocarditis enhancement of interferon-gamma and natural killer cell activity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2000, **32**(12): 2163-2171.
- [6] Marshall DJ, Rudnick KA, McCarthy SG, *et al.* Interleukin-18 enhances Th1 immunity and tumor protection of a DNA vaccine. *Vaccine*, 2006, **24**(3): 244-253.
- [7] Schneider K, Puehler F, Baeuerle D, *et al.* cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2000, **20**(10): 879-883.
- [8] Degen WG, van Zuilekom HI, Scholtes NC, *et al.* Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigens by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18). *Vaccine*, 2005, **23**(33): 4212-4218.
- [9] Puehler F, Göbel T, Breyer U, *et al.* A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed interferon-gamma. *Journal of Immunological Methods*, 2003, **274**(1-2): 229-232.
- [10] Wen NX, Huang QY, Chen RG, *et al.* Construction of eukaryotic express vector of chicken-18 gene and identification of bioactivity of its expressed protein. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2005, **35**(7): 547-550.
温纳相, 黄青云, 陈荣光, 等. 鸡 IL-18 基因重组真核表达载体的构建及其表达产物的生物学活性. *中国兽医科技*, 2005, **35**(7): 547-550.
- [11] Chen HY, Li XS, Cui BA, *et al.* Cloning and phylogenetic analysis of the interleukin-18 gene in gushi duck. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2007, **29**(9): 676680.
陈红英, 李新生, 崔保安, 等. 固始鸭白细胞介素-18 全基因克隆与分子进化分析. *中国预防兽医学报*, 2007, **29**(9): 676-680.
- [12] Aubin RA, Weinfeld M, Taghavi M, *et al.* Highly effective delivery of foreign DNA to adherent cells via polybrene/DMSO-assisted gene transfer. *Methods in Molecular Biology*, 1997, **62**: 319-342.