

猪 IL-18 在杆状病毒/昆虫细胞中的表达

王振亚^{1,2}, 王彦彬^{1,2}, 陈红英^{1,2}, 邵攀峰^{1,2}, 宁晓东¹, 潘娜¹, 韩利静¹, 崔保安^{1,2}

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: IL-18 作为一种多效性细胞因子, 在机体免疫应答及各种生理功能中发挥着重要的调节作用, 根据猪 IL-18 基因序列设计 1 对引物, 将编码猪 IL-18 的成熟蛋白基因亚克隆到杆状病毒转移载体 pFastBacDual 中, 并在 C 端融合 6 个组氨酸标签以利于纯化, 然后转化到含穿梭载体 Bacmid 的感受态细胞 DH10Bac 中, 发生转座作用。将重组质粒转染昆虫细胞, SDS-PAGE 可检测到分子量为 18 kDa 左右的重组蛋白, Western blotting 证实该重组蛋白可与兔抗猪 IL-18 抗体发生特异性反应。纯化后蛋白能明显促进猪 T 淋巴细胞转化, 表明所表达的 IL-18 具有较高的生物活性。此研究为进一步开发研制新型免疫佐剂奠定了基础。

关键词: 猪白细胞介素-18, 昆虫细胞, 表达

Expression of porcine Interleukin-18 in baculovirus/insect cells

Zhenya Wang^{1,2}, Yanbin Wang^{1,2}, Hongying Chen^{1,2}, Panfeng Shao^{1,2}, Xiaodong Ning¹, Na Pan¹, Lijing Han¹, and Baoan Cui^{1,2}

1 College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2 Henan Key Laboratory of Animal-Derived Food Safety of Henan Province, Zhengzhou 450002, China

Abstract: IL-18, as a polyphonic cytokine, is important in immune response and physiologic function. We designed one pair of primers, amplified the porcine IL-18 gene fused with a C-terminal 6×Histidine tag, and then subcloned into the pFastBacDual of Baculovirus transfer vector and transformed into DH10Bac containing a shuttle vector of Bacmid. After co-transfecting the recombinant plasmid into insect cells, the 18 kDa expressed protein of porcine IL-18 was detected by SDS-PAGE; the specificity of expressed protein was confirmed by Western blotting. The purified porcine IL-18 protein induced obvious proliferation of porcine T lymphocytes *in vitro*, which indicated that the expression of IL-18 had high biological activity.

Keywords: porcine Interleukin-18, insect cells, expression

白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18) 是一种重要的细胞免疫调节因子, 能诱导 Th1 等细胞产生大量 IFN- γ , 故又称为干扰素 γ 诱生因子。研究表明 IL-18 可刺激 Th1 细胞高水平诱生 IFN- γ 、GM-CSF、

Received: April 12, 2010; **Accepted:** July 19, 2010

Supported by: Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period (No. 2006BAD06A08).

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

国家“十一五”科技支撑计划 (No. 2006BAD06A08) 资助。

IL-2 等细胞因子, 促进 T 细胞的增殖, 显著增强 Th1 细胞和 NK 细胞的细胞毒作用等免疫调节功能。1995 年日本学者 Okamura 等^[1]首次报道从中毒性休克的鼠肝脏中克隆出了该因子。1996 年 Ushio 等^[2]从鼠 cDNA 库中筛选到人 IGIF 基因, 其序列与所有已知的细胞因子不同, 并能在大肠杆菌中表达, 且生物活性多样, 如抗病毒、抗结核分支杆菌、抗真菌^[3]、抗肿瘤免疫^[4]、抗变态反应性疾病作用^[5]及前炎因子活性^[6], 故将其正式命名为白细胞介素-18。1999 年 Muneta 等^[7-8]从猪肺泡巨嗜细胞中克隆到猪 IL-18, 并证明表达的猪 IL-18 成熟蛋白比前体蛋白具有更高的活性。

IL-18 作为一种多效性细胞因子^[6], 在机体免疫应答和各种生理功能的调节作用及其临床应用受到重视, 迄今已成功克隆了人和多种动物的 IL-18 基因, IL-18 mRNA 在多种器官、组织、细胞中均可测到, 如胸腺、肝脏、脾脏等。在抗肿瘤、抗感染及免疫调节、抗超敏反应、抗自身免疫性糖尿病、抗类风湿性关节炎等方面有着积极的作用^[3-5], 具有潜在的应用前景。IL-18 也具有抗多种病毒功能, 尤其是对甲型流感病毒、单纯疱疹病毒(HSV-1)、牛痘病毒及脑心肌炎病毒(EMCV)的复制和表达具有抑制作用。

本实验室前期在 IL-18 方面做了大量的工作。猪 IL-18^[9]、鸡 IL-18^[10]、鸭 IL-18^[11]在原核细胞和真核细胞都已经作了大量的基础研究。为了研究猪 IL-18 在昆虫细胞中真核表达的特征, 探索其作为免疫佐剂在生物工程制品中的应用, 本实验从已经构建的 pGEM-pIL-18 重组载体中克隆出猪 IL-18 成熟蛋白基因, 并在昆虫细胞中进行了表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

pGEM-pIL-18 重组质粒由本实验室构建; 转座质粒 pFastBacDual 和 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞购

自 Invitrogen 公司。

1.1.2 细胞

SF-9 昆虫细胞由中国科学院武汉病毒研究所王汉中研究员惠赠。

1.1.3 酶类和主要试剂

Ex Taq DNA 聚合酶、*EcoR* I、*Pst* I 限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 鼠抗猪 6×His 单克隆抗体和 LipofectamineTM2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司; 兔抗猪 IL-18 单克隆抗体和羊抗兔 IgG-HRP 均为 Bioszune 公司产品; GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; Grace's 培养基和胎牛血清购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计与合成

应用 Primer (Version 5.0) 基因分析软件, 参照 pGEM-pIL-18 基因序列设计一对引物。上游引物 5' 端引入 *EcoR* I 酶切位点和起始密码子, 下游引物 5' 端引入 *Pst* I 酶切位点、终止密码子和 6×His 标签序列。上游引物 P1: 5'-CGCGAATTCATGTACTTTGGCAAGCTT-3'; 下游引物 P2: 5'-CGCCTGCAGTTA GTGATGGTGATGGTGATGCTAGTTCCTGTTTTG-3' (下划线为酶切位点, 粗体为密码子, 加框为 6×His 标签序列)。该引物扩增长度为 491 bp, 含猪 IL-18 成熟蛋白基因。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 重组载体的构建及鉴定

PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切后, 克隆到同样处理的 pFastBacDual 载体中, 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 提取重组质粒进行 PCR 鉴定和酶切鉴定, 最后将阳性的重组质粒进行测序。

1.2.3 转染及高滴度重组杆状病毒的获得

转化到含穿梭载体 Bacmid 的感受态细胞 DH10Bac 中, 发生转座作用。按照转染试剂盒说明

书将重组质粒 rBacmid-IL-18 转染生长状态良好的 SF-9 昆虫细胞。待细胞出现明显病变后收集细胞液，离心取上清作为第 1 代重组病毒，按 1:10 稀释后，感染处于对数生长期 SF-9 细胞，27 °C 培养 2~3 d，至细胞出现明显病变时收集上清即得第 2 代病毒，用同样的方法再传一代，筛选到高滴度的含有猪 IL-18 基因的重组杆状病毒。提取 DNA，进行 PCR 鉴定。

1.2.4 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达

收集不同时间 1 mL 有明显病变的细胞液，5 000 r/min 离心 5 min，沉淀加入 80 μ L 的去离子水悬浮，加入 20 μ L 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液混合，煮沸 5 min，进行 SDS-PAGE。

1.2.5 表达蛋白的纯化和 Western blotting 检测

收集表达猪 IL-18 的病变细胞，PBS (50 mmol/L, pH 7.4) 液悬浮后，超声波裂解细胞，5 000 r/min 离心 5 min。经镍亲和层析柱纯化，进行 SDS-PAGE 电泳，电转印至硝酸纤维素膜，将转印好的 NC 膜用 5% 脱脂乳封闭，然后与兔抗猪 IL-18 单克隆抗体作用，经 TBST 洗涤后与工作浓度的 HRP 标记羊抗兔 IgG 作用，最后以 DAB 显色，观察特异性条带。

1.2.6 表达蛋白的生物学活性测定

分离猪淋巴细胞，用 RPMI1640 培养液稀释后，调整细胞浓度到 $1\times 10^5\sim 5\times 10^5$ 个/mL，加入纯化后的蛋白，使终浓度为 200 μ g/mL，加入到 96 孔细胞培养板中培养，第 1 行每孔 50 μ L 淋巴细胞液，第 2、3 行设为阴性和空白对照。37 °C 培养 48 h，然后每孔加入 20 μ L MTT (5.0 mg/mL)，37 °C 继续培养 4 h，加入 100 μ L DMSO，混匀，振荡 3 min，以空白对照孔调零为止，用酶标仪测定 OD_{570} 的值。

2 结果

2.1 良杂猪 IL-18 基因的 PCR 扩增

利用 RT-PCR 技术扩增 pGEM-pIL-18，经琼脂糖凝胶电泳初步检测表明，获得了 492 bp 的 DNA 条带，其大小与预期结果一致 (图 1)。

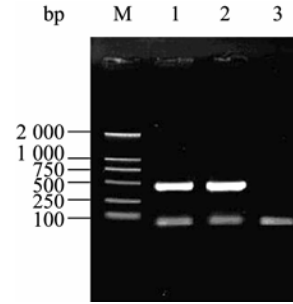


图 1 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis map for RT-PCR product. M: DL2000 marker; 1, 2: RT-PCR product; 3: negative control.

2.2 重组载体的构建与鉴定

PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切后插入到同样处理的 pFastBacDual 载体中，构建重组转座质粒，命名为 pFB-IL-18。转化 *E. coli* JM109 感受态细胞，提取重组质粒，进行 PCR 扩增，电泳出现有 1 条 450 bp 左右的目的条带。重组质粒经 *EcoR* I 酶切，切出 1 条大小约为 5 700 bp 的条带；经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切，电泳出现 2 条带：一条带为载体，约为 5 200 bp，另一条为插入的目的条带，约为 490 bp，与预期结果相符 (图 2)。序列测序显示，该转化菌的质粒中确实含有目的基因片段，且读码框正确，表明重组质粒 pFB-IL-18 构建成功。

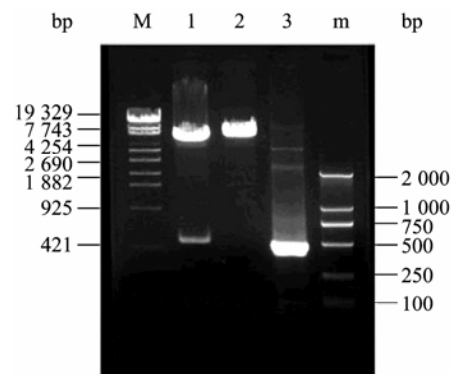


图 2 重组转座质粒的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant transfer plasmid by digestion and PCR. M: λ -*EcoT* 14 I digest; 1: recombinant transfer plasmid digestion by *EcoR* I + *Pst* I; 2: recombinant transfer plasmid digestion by *EcoR* I; 3: recombinant transfer plasmid PCR product; m: DL2000 marker.

2.3 转染后细胞 PCR 检测

将 rBacmid-IL-18 转染对数生长期的昆虫细胞后, 分别收集重组杆状病毒和野生杆状病毒感染的病变细胞, 提取 DNA, 用 M13 引物进行 PCR 扩增, 电泳可见重组杆状病毒在约 3 000 bp 处出现了特异性条带, 而野生杆状病毒只在 300 bp 处出现了特异性条带 (图 3), 与预期结果一致。

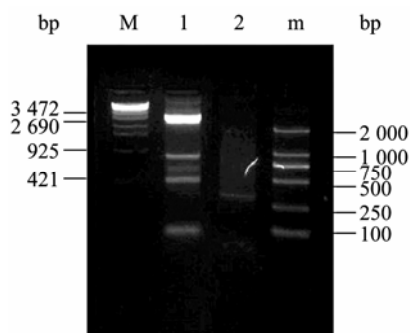


图 3 转染 rBacmid-IL-18 后 PCR 产物鉴定图

Fig. 3 Identification of PCR product after transfected with Bacmid-IL-18. M: λ -EcoT 14 I digest; 1: PCR products of rBacmid-IL-18 with primer M13; 2: PCR products of Bacmid with primer M13; m: DL2000 marker.

2.4 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达

将获得的第 3 代重组病毒接种到处于对数生长期的 SF-9 细胞, 感染 2 d 后, 于不同时间收获细胞, 与 5×SDS-PAGE 上样缓冲液混匀后, 煮沸 5 min, 进行电泳, 电泳结果显示, rBacmid-IL-18 重组杆状病毒在约 18 kDa 处出现了一条特异性条带, 可见猪 IL-18 基因在昆虫细胞中成功得到了表达 (图 4)。

2.5 表达蛋白的纯化和 Western blotting 检测

收集表达猪 IL-18 的病变细胞, 超声波裂解后, 镍柱过滤, 然后用不同咪唑浓度的洗脱缓冲液进行阶段洗脱, SDS-PAGE 检测发现洗脱出了目的条带 (图 5), 表达的蛋白成功进行了纯化。使用兔抗猪 IL-18 单克隆抗体作为一抗, 对上述表达产物进行 Western blotting 分析, 结果表明, 重组表达产物可被单克隆抗体所识别, 证明本试验所得的表达蛋白具有特异性, 为所需的蛋白 (图 5)。

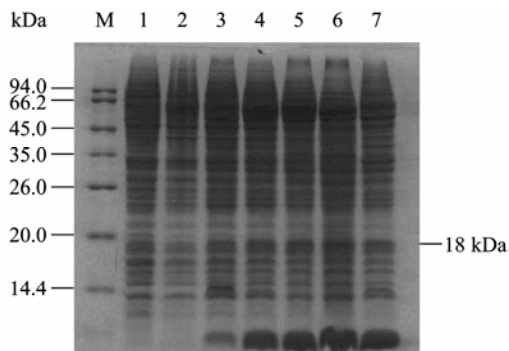


图 4 IL-18 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of IL-18 protein by SDS-PAGE. M: protein marker; 1-7: IL-18 protein expressed in Sf-9 insect cells.

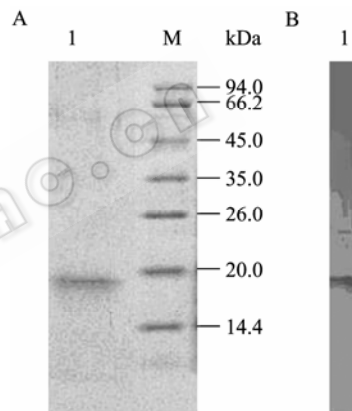


图 5 纯化 IL-18 蛋白的 Western blotting 鉴定图

Fig. 5 Identification of purified IL-18 protein by Western blotting. M: protein marker; A1: SDS-PAGE of purified IL-18 protein expressed in Sf-9 insect cells; B1: Western blotting of IL-18 protein expressed in Sf-9 insect cell.

2.6 表达蛋白的生物学活性测定

提取猪脾淋巴细胞后, 用终浓度为 200 μ g/mL 的纯化蛋白作用 48 h, MTT 和 DMSO 作用后, 测定 OD_{570} 的值。结果显示, 加有蛋白的试验组平均数值 0.609 ± 0.017 , 对照组平均数值为 0.303 ± 0.024 , 试验组数值明显高于对照组, 差异极显著 ($P < 0.01$)。表明猪 IL-18 表达蛋白能明显提高猪淋巴细胞的转化率, 具有较高的生物学活性 (表 1)。

3 讨论

IL-18 是一种强有力 IFN- γ 诱导剂, 其生物学活性主要通过调节 IFN- γ 的表达来提高机体的细胞免

表1 猪淋巴细胞转化试验结果 (OD_{570})Table 1 The result of chicken's lymphocyte transforms test (OD_{570})

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x} \pm s (A_{570})$
IL-18	0.589	0.601	0.623	0.610	0.633	0.587	0.599	0.628	0.611	0.609±0.017
Control	0.286	0.297	0.322	0.310	0.301	0.267	0.323	0.278	0.343	0.303±0.024

An obvious difference exists between experiment group and negative control group ($P<0.01$).

疫水平。通常情况下，机体内 IL-18 表达量甚微，不可能直接提取纯化，只有通过基因工程技术才能大量生产重组 IL-18。杆状病毒表达系统是 20 世纪 80 年代发展起来的真核基因表达系统^[12]，杆状病毒在昆虫细胞内复制，昆虫细胞的蛋白质后加工系统与哺乳动物细胞接近，能识别和切除信号肽^[13]，能对表达的真核基因产物更好地进行糖基化、磷酸化、脂肪酶化、酰胺化、切割信号肽以及形成三级或四级结构等^[14]。在昆虫细胞中表达的外源蛋白接近天然蛋白，表达产物的生物学活性、结构与功能特点、抗原性和免疫原性等与天然外源基因产物极其相似^[15]。所以，用杆状病毒/昆虫细胞表达系统表达猪 IL-18 非常值得去探索。

影响蛋白表达量的因素有许多，宿主细胞的生长状态是影响病毒转染和蛋白表达的首要因素，生长状态良好，密度合适的细胞最容易转染成功，并获得良好的表达量。培养昆虫细胞时，培养基里面一般不加抗生素，所以，细胞很容易被细菌、支原体等污染，为了获得状态良好的细胞，首先，在培养细胞时要严格无菌操作，防止出现污染；其次，由于昆虫细胞比较脆弱，所以在传代时要小心轻柔地吹打，最好在吹打前轻轻拍打瓶底，使其自然脱落；最后，转染时要掌握好细胞的密度和生长状态。通过反复试验发现，在转染前 24 h 细胞铺板，当密度达到 70%~80%，细胞处在拉丝状态时转染最容易成功。另外，为了获得较高的表达量，病毒不易传代过多，一般传 3~5 代最好。同时，选择优良的培养基和胎牛血清对细胞的培养也至关重要。

IL-18 的基因克隆与表达已成功，分子结构特点初步明确，在动物试验阶段表现出明显的免疫增强

作用。虽然 IL-18 要应用于大规模的生产还有待于进一步的深入研究，但是 IL-18 作为疫苗佐剂应用于动物新型疫苗的开发，在提高猪体抗感染力、增强灭活苗或基因工程苗免疫作用方面具有广阔的应用前景。本研究将编码猪 IL-18 成熟蛋白基因重组于杆状病毒表达载体中，成功地构建了能够表达猪 IL-18 成熟蛋白的重组杆状病毒。Western blotting 表明该病毒表达的猪 IL-18 成熟蛋白可被免抗猪 IL-18 单克隆抗体所识别，这表明用该系统表达的猪 IL-18 成熟蛋白具有免疫原性和生物学活性。纯化后蛋白能明显促进猪 T 淋巴细胞转化，表明所表达的 IL-18 具有较高的生物活性。此研究为进一步研究猪 IL-18 功能性蛋白作为分子佐剂在疫苗免疫中的促进作用及开发研制新型免疫增强剂定了基础。

REFERENCES

- [1] Okamura H, Tsutsui H. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cell. *Nature*, 1995, 378(6552): 88-91.
- [2] Dinarello CA, Novick DY. Overview of interleukin-18: more than an interleukin- γ inducing factor. *Leukocyte Biol*, 1998, 63: 658-664.
- [3] Tanaka H, Narita M, Teramoto S, et al. Role of interleukin-18 and T-helper type 1 cytokines in the development of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adults. *Chest*, 2002, 121(5): 1493-1497.
- [4] Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw*, 2000, 11(3): 483-486.
- [5] Yamanaka R, Tsuchiya N, Yajima N, et al. Induction of an antitumor immunological response by an intratumoral injection of dendritic cells pulsed with genetically engineered Semliki Forest virus to produce interleukin-18 combined with the systemic administration of interleukin-12. *Neurosurg*, 2003, 99(4): 746-753.

- [6] Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, et al. IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *Immunol*, 2000, 164(11): 6067–6074.
- [7] Muneta Y, Shimoji Y, Yokomizo Y, et al. Molecular cloning of porcine interleukin-1 beta converting enzyme and differential gene expression of IL-1beta converting enzyme, IL-1 beta, and IL-18 in porcine alveolar macrophages. *Interferon Cytokine Res*, 1999, 19(11): 1289–1296.
- [8] Muneta Y, Mori Y, Shimoji Y, et al. Porcine interleukin18: cloning, characterization of the cDNA and expression with the baculovirus system. *Cytokine*, 2000, 12(6): 566–572.
- [9] Zheng LL, Jia YF, Cui BA, et al. Gene cloning, expression and activity detection of porcine Interleukin-18 mature protein in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(2): 214–219.
郑兰兰, 贾云飞, 崔保安, 等. 猪白细胞介素 18 基因的克隆、表达及生物学活性检测. *生物工程学报*, 2008, 24(2): 214–219.
- [10] HY Chen, Huang QY, Cui BA, et al. Construction of recombinant fowlpox virus coexpressing HA from subtype H₅ of avian influenza virus and chicken interleukin-18. *Acta Microbiol Sin*, 2008, 48(8): 1025–1030.
陈红英, 黄青云, 崔保安, 等. 表达 H₅ 亚型禽流感病毒 HA 基因和鸡 IL-18 基因重组禽痘病毒的构建. *微生物学报*, 2008, 48(8): 1025–1030.
- [11] Chen HY, Cui BA, Xia PA, et al. Cloning, in vitro expression and bioactivity of duck interleukin-18. *Vet Immunol Immunop*, 2008, 123(3/4): 205–214.
- [12] Tessier DC, Thomas DY, Khouri HE, et al. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene*, 1991, 98(2): 177–183.
- [13] Theilmann DA, Chantler JK, Stewart S, et al. Characterization of a highly conserved baculovirus structural protein that is specific for occlusion-derived virions. *Virology*, 1996, 218(1): 148–158.
- [14] Jarvis DL, Howe D, Aumiller JJ. Novel Baculovirus expression vectors that provide sialylation of recombinant glycoproteins in lepidopteran insect cells. *Virology*, 2001, 75(13): 6223–6227.
- [15] Liu YP, Wang FH, Su ZJ, et al. Progress of studies and application on baculovirus expression vector system. *Chin Bull Entomol*, 2006, 43(1): 1–5.
刘永平, 王方海, 苏志坚, 等. 昆虫杆状病毒表达载体系统的研究及应用. *昆虫知识*, 2006, 43(1): 1–5.