

## 鹅 IL-2 基因在大肠杆菌中的表达及其可溶性单体的分离

齐 静<sup>1,2</sup>, 陈吉刚<sup>1</sup>, 王金勇<sup>1</sup>, 方 杰<sup>1</sup>, 吴佳俊<sup>1</sup>, 周继勇<sup>1</sup>

1 浙江大学动物预防医学研究所病毒与免疫研究室, 杭州 310029

2 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 济南 250100

**摘 要:** 将去除信号肽编码序列的鹅 IL-2 基因克隆到原核表达载体 pET-28a (+), 构建了重组表达质粒 pET-28a (+)-goIL-2, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 经 IPTG 诱导, 实现了重组鹅 IL-2(rgoIL-2)蛋白在大肠杆菌中的表达。SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析显示, 表达蛋白的分子量约为 15.0 kD, 能被抗鹅 IL-2 单克隆抗体特异识别。可溶性分析表明表达蛋白大部分以包涵体形式存在, 部分以可溶形式存在, 非变性电泳可见可溶性蛋白存在单体和多聚体组分。镍柱亲和层析法纯化的 rgoIL-2 蛋白过滤后, 利用 ÄKTA FPLC(快速蛋白分离纯化系统)进行逐级分离, 非变性电泳可见单一的鹅 IL-2 可溶性蛋白单体。体外生物学活性分析显示鹅 IL-2 可溶性蛋白单体能刺激鹅淋巴细胞增殖。这为进一步研究鹅 IL-2 的生物学功能及其临床应用奠定基础。

**关键词:** 鹅 IL-2, 原核表达, 纯化, 单体

## Expression of Goose Interleukin-2 gene in *Escherichia coli* and Isolation of Its Soluble Monomer

Jing Qi<sup>1,2</sup>, Jigang Chen<sup>1</sup>, Jinyong Wang<sup>1</sup>, Jie Fang<sup>1</sup>, Jiajun Wu<sup>1</sup>, and Jiyong Zhou<sup>1</sup>

1 Laboratory of Virology and Immunology, Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

2 Institute of Animal and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China

**Abstract:** Recombinant expression plasmid of pET-28a (+)-goIL-2 was constructed by inserting the goose IL-2 gene without the signal peptide sequence into the prokaryotic expression vector pET-28a (+), and transformed into the bacterial competent *E. coli* BL21 (DE3) cells for expression. After IPTG induction, an expected protein band with molecular weight of 15.0 kD was observed on SDS-PAGE gel, recognized by monoclonal antibody against goose IL-2 in western-blotting assay. In the pET-28a (+) expression system, much of the recombinant goose IL-2 (rgoIL-2) was found in inclusion bodies with a portion of soluble protein. The monomer and multimers of soluble goose interleukin 2 proteins were observed in native electrophoresis. The rgoIL-2 proteins were purified by Ni-NTA column under a native condition. The rgoIL-2 soluble protein monomer was isolated by a quick protein isolation and purification system of ÄKTA FPLC and identified by native PAGE. Bioactivity analysis showed that the rgoIL-2 monomer stimulated the proliferation of goose lymphocytes *in vitro*. This will establish a basis for further study about the biological function and clinical application of goose IL-2.

**Keywords:** goose interleukin 2, prokaryotic expression, purification, monomer

**Received:** April 24, 2007; **Accepted:** June 14, 2007

**Supported by:** the National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar (No.30625030).

**Corresponding author:** Jiyong Zhou. Tel: +86-571-86971698; E-mail: jyzhou@zju.edu.cn

国家杰出青年科学基金资助(No.30625030)。

IL-2 主要由激活的 T 细胞产生, 对抗原诱导的 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞具有刺激增殖或者分化的作用<sup>[1]</sup>。由于 IL-2 具有明显的种属特异性<sup>[2,3]</sup>, 很多成功的应用于人和哺乳动物 IL-2 的研究方法对禽类没有作用或作用很小, 因此禽类 IL-2 的研究起步较晚, 直到 1997 年 Sundick 等<sup>[4]</sup>利用构建 cDNA 文库的方法首次克隆了鸡 IL-2 cDNA 序列, 随后利用同源克隆策略, 在短短不到十年的时间里获得了大量禽 IL-2 cDNA 序列, 包括火鸡、鸭、鹅和鹌鹑等<sup>[3,5-7]</sup>, 且从蛋白水平上对其功能进行了初步的研究与探索。IL-2 可以提高禽类对病毒、细菌、真菌、原虫和寄生虫等感染的免疫应答, 并具有抗肿瘤作用, 在畜禽用作天然的疫苗佐剂和免疫治疗剂<sup>[8-11]</sup>。本室 2004 年首次克隆得到鹅 IL-2 cDNA 序列[AY392557], 本研究以此序列为基础, 构建 pET-28a (+)原核表达重组质粒, 实现了在大肠杆菌中的表达, 镍柱亲和层析法纯化后进一步逐级分离得到单一的蛋白单体组分, 为研究该蛋白特性和功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和菌株

受体菌 *E.coli* Top10 和表达菌 *E.coli* BL21(DE3)、表达载体 pET-28a (+)为本室保存; 克隆用重组质粒 T-Easy-goIL-2 为本室构建保存。

### 1.2 酶和主要试剂

*Nco* I、*Not* I、Taq Plus DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、dNTP Mix、DNA Marker、DNA 琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒、1 mg/mL 的 BSA 标准品、卡那霉素、IPTG、蛋白 Marker 购自上海生工生物工程技术服务有限公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; 转膜滤纸购自英国 Whatman 公司; 抗鹅 IL-2 单克隆抗体由本室制备保存; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自晶美生物技术有限公司; AEC 显色试剂盒购自河南华美生物工程有限公司; 镍琼脂糖凝胶 FF 柱购自北京卓冠科技有限公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.3 引物设计及合成

根据本室已克隆到的第一条鹅 IL-2cDNA 序列及 pET-28a (+)多克隆位点, 设计如下引物。

Up: 5'-GCCATGGCACCTCTATCAGAGA -3', 引入 *Nco* I 酶切位点。

Down: 5'-TAGCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGTTTTCAGATA GATCTCAG -3', 引入 *Not* I 酶切位点和 6-His 纯化标签。引物由上海博亚生物工程有限公司合成。

### 1.4 鹅 IL-2 原核表达载体的构建

以 T-Easy-goIL-2 为模板, 用上述 Up 和 Down 引物对进行 PCR 扩增。PCR 产物电泳回收纯化, 经 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切, 与经同样酶切处理的 pET-28a (+)质粒连接、转化感受态 *E.coli* Top10 细胞, 并利用卡那霉素抗性平板初步筛选阳性克隆, 挑阳性克隆并小量提取质粒, 利用 PCR 法及 *Nco* I、*Not* I 双酶切法确定转化是否成功。

### 1.5 重组鹅 IL-2 的诱导表达

利用携带目的基因的重组质粒 pET-28a (+)-goIL-2 转化表达受体菌 *E.coli* BL21(DE3), 挑选单个阳性克隆接种于 LB 培养基(含 Kan 40 µg/mL), 37 °C, 250 r/min, 振荡培养过夜, 次日按 1:100 比例接种于含 10 mL 新鲜 LB 培养基(含 Kan 40 µg/mL)的 100 mL 锥形瓶中, 37 °C, 250 r/min 振荡培养, 当菌液 OD<sub>600</sub> 值达 1.0 左右时加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h, 同时取诱导 0 h 的菌液作对照, 于 4 °C, 8000 r/min 离心 10 min 收集细菌。

### 1.6 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析

取 1 mL 菌液离心获得菌体沉淀, 弃上清, 然后用 100 µL PBS 悬浮, 加入 25 µL 的 5×SDS-PAGE 上样缓冲液充分混匀, 100 °C 煮沸 8 min, 15% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 观察蛋白表达的结果。表达产物经 SDS-PAGE 后电转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜), 5%脱脂奶封闭, 与鼠抗鹅 IL-2 单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 反应后, AEC 显色试剂盒显色。

### 1.7 可溶性分析及亲和层析法纯化

将诱导 4 h 的菌液离心沉淀按湿重 1 mg/mL 比例悬浮于亲和层析法纯化蛋白裂解液中, 组织匀浆器充分匀浆后, 置冰水浴进行超声波破碎, 设置程序为每超声 2 s, 间隔 1 s, 功率 400 W, 总时间为 90 s。菌液裂解液于 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清和沉淀分别进行 15%的 SDS-PAGE 分析。

按 QLAGEN 公司的 QLAexpressionist™ 蛋白纯化系统操作指南进行亲和层析法纯化并稍加改进: 按每 3 g 菌体沉淀湿重加入 20 mL 的裂解缓冲液(添加 1 mmol/L β-巯基乙醇、5%甘油和 10 mmol/L 咪唑)

进行超声波破胞,然后将上清与 2 mL 镍琼脂糖凝胶混合,冰上振荡 30 min,使重组蛋白与镍充分结合后过柱,用 10 mL 的洗涤缓冲液(含 30 mmol/L 咪唑)洗涤杂蛋白,最后用 10 mL 洗脱缓冲液(含 250 mmol/L 咪唑)洗脱目的蛋白,非变性 PAGE 电泳鉴定洗脱蛋白的各种组分。

### 1.8 鹅 IL-2 可溶性单体的分离与定量

镍柱亲和层析法纯化的可溶性鹅 IL-2 蛋白离心后用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤,经葡聚糖凝胶 Superdex 75 HR 26/60 层析柱进一步层析分离,连于 ÄKTA FPLC(快速蛋白分离纯化系统)上,缓冲液用 0.85% 的生理盐水(含 5% 的甘油),流速设置为 1 mL/min。分离组分进行非变性电泳分析,单体的浓度通过 UV 光谱法测定 [Concentration goIL-2(mg/mL) =  $1.5 \times OD_{280}$ ], 其中 1.5 是通过 OMIGA 软件分析目的蛋白得出的吸光系数。鹅 IL-2 单体进一步通过 Sephadex G-50 分子筛过柱脱盐,更换为实验用缓冲液体系(生理盐水或细胞用 PBS 溶液)。

### 1.9 鹅 IL-2 可溶性单体的生物学活性测定

按文献[6]的方法制备鹅的单核细胞,将细胞制成  $5 \times 10^6$  个/mL 的细胞悬液,转入 96 孔细胞培养板,加入 2 倍梯度稀释的 rgoIL-2 单体待检样品(100  $\mu$ L/孔),培养 48 h,每个样品设 3 个重复。每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20  $\mu$ L,培养 4 h。尔后每孔加入 100  $\mu$ L 含 0.01 mol/L HCl 的异丙醇,40  $^\circ$ C 反应 8 h,室温下放置 20 min,读取  $OD_{570nm}$  的光密度值。活性的判定按周继勇等<sup>[6]</sup>已建立的标准进行,即  $OD_{chIL-2}/OD_{negative}$  1.5 判为阳性。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pET28a (+)-goIL-2 的构建及鉴定

重组质粒 pET28a (+)-goIL-2 构建如图 1a 所示。重组质粒经 PCR 和双酶切鉴定,均可以得到 380bp 左右的目的条带,与预期相符(图 1b)。

### 2.2 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析

将诱导表达的 *E. coli* BL21(DE3)菌体总蛋白及载体 pET28a (+)空白对照菌体总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,以抗鹅 IL-2 的单克隆抗体为一抗,HRP 标记羊抗鼠 IgG 为二抗,AEC 显色。表达产物经 SDS-PAGE 分析显示,在 14.4 kD 附近出

现特异的显色条带,大小与预期相符(15.0 kD),而 pET28a (+)空载体对照无此特异性条带,Western-blotting 分析显示表达蛋白能被其特异性的单克隆抗体识别,证实鹅 IL-2 在 pET28a (+)表达系统中获得成功表达(图 2)。

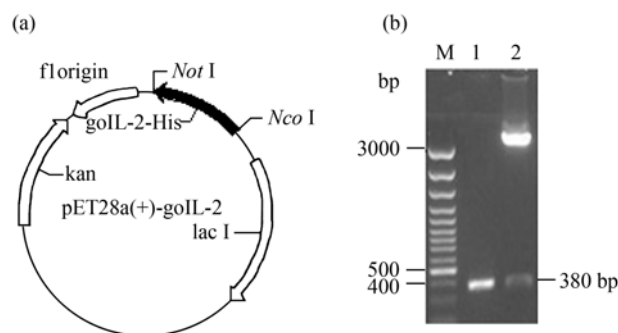


图 1 重组表达载体 pET28a (+)-goIL-2 构建(a)及 PCR 和酶切鉴定(b)

Fig. 1 Schematic map (a) and PCR and restriction enzyme analysis (b) of recombinant plasmid pET28a (+)-goIL-2  
M: 100 bp DNA ladder; 1: PCR identification of pET28a (+)-goIL-2;  
2: pET28a (+)-goIL-2 digested with Nco I/Not I

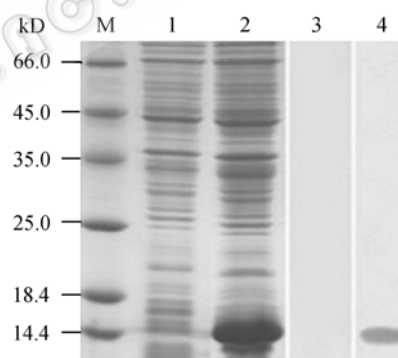


图 2 SDS-PAGE 和 Western-blotting 鉴定鹅 IL-2 在 pET28a (+)表达系统中的表达

Fig. 2 SDS-PAGE and Western-blotting analysis of goIL-2 expressed in pET28a (+) system

M: protein molecular weight marker; 1: BL21(DE3)/pET28a (+)-goIL-2 induced for 0h; 2: BL21(DE3)/pET28a (+)-goIL-2 induced for 4h; 3: extracts of negative control bacteria didn't react with mAb against goIL-2; 4: rgoIL-2 protein recognized by mAb against goIL-2

### 2.3 可溶性分析

将 rgoIL-2 转化菌株的培养液超声波裂解后,其上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析,结果显示, pET28a (+)系统表达的目的蛋白主要以包涵体形式存在,在裂解上清中也有部分目的蛋白存在(图 3)。

### 2.4 rgoIL-2 蛋白的非变性纯化

非变性条件下,用  $Ni^{2+}$  亲和层析纯化经 pET28a (+)

系统表达的 rgoIL-2 蛋白, 250 mmol/L 的咪唑基本能将目的蛋白洗脱下来, 在 4 条件下对洗脱蛋白非变性电泳, 可见镍柱初提的可溶性蛋白具有两种形式: 图 4-1/2 中 A 为多聚体组分, B 为单体组分。相同样品 SDS-PAGE 电泳鉴定后, 多聚体组分都被还原得到单一条带(图 4-3)。

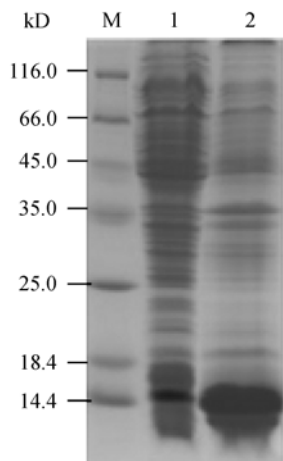


图 3 SDS-PAGE 分析 rgoIL-2 蛋白的可溶性  
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of rgoIL-2 protein solubility

M: protein molecular weight marker; 1: supernatants;  
2: inclusion bodies

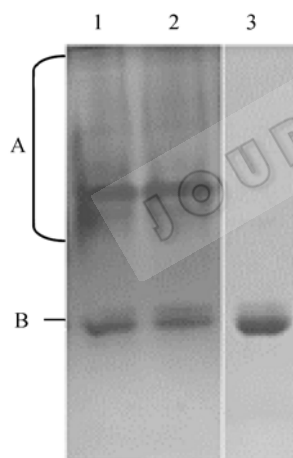


图 4 可溶性 rgoIL-2 非变性及对应变性电泳

Fig. 4 Soluble rgoIL-2 by native-PAGE and SDS-PAGE  
(1, 2)A: rgoIL-2 multimers; B: monomer; 3: reduced electrophoresis of soluble rgoIL-2 multimers

## 2.5 rgoIL-2 可溶性蛋白单体的分离与定量

利用 ÄKTA FPLC(快速蛋白分离纯化系统)对可溶性单体进行分离后得到 3 个主要的峰, 经天然电泳分析得知, 峰 1 为一些细胞碎片的污染物, 峰 2 为 rgoIL-2 多聚体和单体的混合组分, 峰 3 为可溶性 rgoIL-2 的单体组分(图 5)。UV 光谱法测定单体的浓

度为 0.8 mg/mL。

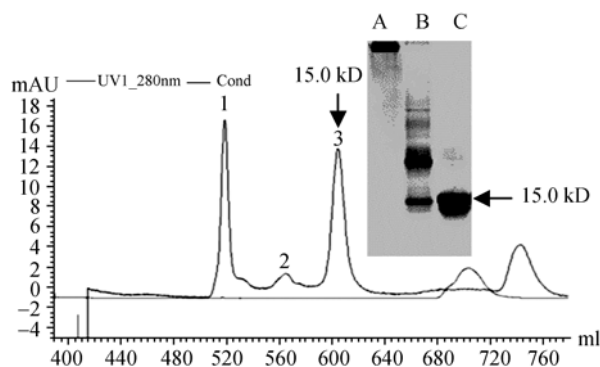


图 5 色谱和天然电泳分析可溶性 rgoIL-2 蛋白

Fig. 5 Chromatogram and native electrophoresis analysis of the soluble rgoIL-2 fractioned by ÄKTA FPLC

1: cell debris contaminant; 2: rgoIL-2 multimers; 3: rgoIL-2 monomer  
A: fractions from peak 1; B: fractions from peak 2; C: fractions from peak 3

## 2.6 rgoIL-2 可溶性蛋白单体的体外淋巴细胞增殖活性

对获得的 rgoIL-2 单体蛋白进行倍比稀释, 采用 MTT 比色法进行活性测定, 结果显示: rgoIL-2 单体具有刺激鹅 T 淋巴细胞增殖的生物学活性, 且为剂量依赖性, 鹅 T 淋巴细胞增殖所需 rgoIL-2 的最低量为 1.6 ng(图 6)。上述结果说明 rgoIL-2 单体具有生物学活性。

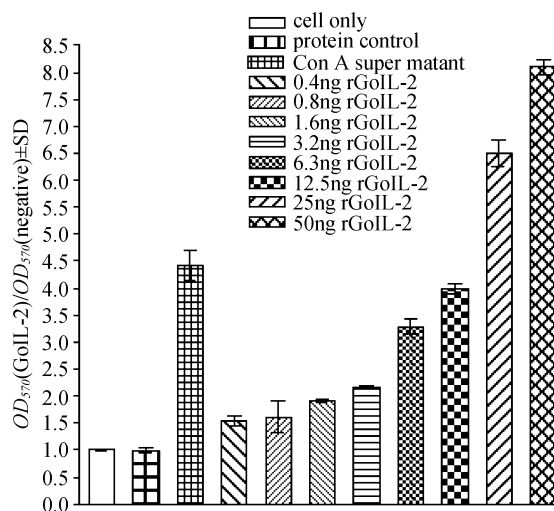


图 6 重组鹅 IL-2 蛋白活性的检测(MTT 法)

Fig. 6 *In vitro* lymphocyte proliferation assay of recombinant goose IL-2

## 3 讨论

本室陈吉刚等根据鸡、鸭和火鸡的核苷酸序列

之间的同源性, 在保守区设计引物, 首次克隆得到了鹅 IL-2cDNA 序列, 在 pBAD/HisB 系统中表达并用镍柱亲和层析法纯化获得了可溶性蛋白<sup>[7]</sup>, 在一定程度上能促进鹅脾淋巴细胞增殖。但都没有对蛋白中的单体组分进行分离, 这在重组鸡和鸭 IL-2 的纯化存在同样的问题<sup>[6,8]</sup>。由于分离的蛋白中多聚体的存在对活性有一定影响, 因此我们尝试用 pET28a(+) 载体系统表达鹅 IL-2, 对可溶性蛋白的单体组分进行分离。

本研究设计引物时分别添加 *Nco* I 和 *Not* I 酶切位点, 不带有载体上大的标签序列(上游 His 标签、凝血酶蛋白和 T7 tag 标签), 只在蛋白 C 端添加 6-His 标签, 不会影响蛋白的活性。通过优化培养条件, 当诱导前菌液  $OD_{600}$  达到 1.0 左右时用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h 后表达量达到最大, 且获得了相对较多的可溶性鹅 IL-2 蛋白。利用镍柱特异性亲和 6-His 的特点, 用镍柱亲和层析技术对超声波处理后的可溶性蛋白进行天然纯化, 亲和层析法纯化的缓冲液中添加 5% 的甘油, 对蛋白的稳定性大大提高, 同时在整个纯化过程中均添加 1 mmol/L 的  $\beta$ -巯基乙醇作为还原剂, 防止二硫键被氧化, 使整个过程维持在还原的环境中, 对于维持蛋白活性也起到很好的保护作用。

镍柱初步纯化的蛋白通过非变性电泳分析可知具有单体和各种多聚体组分, 由于多聚体的存在能影响蛋白的活性, 因此为了进一步分离得到可溶性蛋白单体, 利用快速蛋白分离纯化系统和葡聚糖凝胶层析分离技术, 设置各种参数体系, 成功分离得到了单一的鹅 IL-2 单体组分, 生物学活性实验结果显示鹅 IL-2 单体具有生物学活性, 这为其后续体内外生物学功能研究及其临床应用奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Swain SL. Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. *Curr Opin Immunol*, 1991, **3** (3): 304–310.
- [2] Zelus D, Robinson-Rechavi M, Delacre M, Auriault C, Laudet V. Fast evolution of interleukin-2 in mammals and positive selection in ruminants. *J Mol Evol*, 2000, **51** (3): 234–244.
- [3] Lawson S, Rothwell L, Kaiser P. Turkey and chicken interleukin-2 cross-react in *in vitro* proliferation assays despite limited amino acid sequence identity. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, **20** (2): 161–170.
- [4] Sundick RS, Gill-Dixon C. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *J Immunol*, 1997, **159** (5): 720–725.
- [5] Sreekumar E, Premraj A, Rasool TJ. Duck (*Anas platyrhynchos*), Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and other avian interleukin-2 reveals significant conservation of gene organization, promoter elements and functional residues. *Int J Immunogenet*, 2005, **32** (6): 355–365.
- [6] Zhou JY, Wang JY, Chen JG, Wu JX, Gong H, Teng QY, Guo JQ, Shen HG. Cloning, *in vitro* expression and bioactivity of duck interleukin-2. *Mol Immunol*, 2005, **42** (5): 589–598.
- [7] Zhou JY, Chen JG, Wang JY, Wu JX, Gong H. cDNA cloning and functional analysis of goose interleukin-2. *Cytokine*, 2005, **30** (6): 328–338.
- [8] Chen JG, Chen WH, Zhou JY, Wang JY, Qi J, Zheng XJ, Yu ZZ, Sun HX. In vitro expression and bioactivity of chicken interleukin-2. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, **38** (5): 1034–1039.
- [9] 陈吉刚, 陈维虎, 周继勇, 王金勇, 齐静, 郑肖娟, 俞兆正, 孙红霞. 鸡白细胞介素 2 的体外表达及生物学活性测定. *中国农业科学*, 2005, **38** (5): 1034–1039.
- [9] Hilton LS, Bean AG, Kimpton WG, Lowenthal JW. Interleukin-2 directly induces activation and proliferation of chicken T cells *in vivo*. *J Interferon Cytokine Res*, 2002, **22** (7): 755–763.
- [10] Lowenthal JW, Lambrecht B, van den Berg TP, Andrew ME, Strom AD, Bean AG. Avian cytokines - the natural approach to therapeutics. *Dev Comp Immunol*, 2000, **24** (2-3): 355–365.
- [11] Thiagarajan D, Ram GC, Bansal MP. Optimum conditions for *in vitro* chicken IL-2 production and its *in vivo* role in Newcastle disease vaccinated chickens. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999, **67** (1): 79–91.