

• 基础实验研究 •

PET32a-IL-1R I 重组质粒的构建及表达*

徐 宁, 张战锋, 黄宪章, 陈炜烨, 何 敏, 庄俊华[△]

(广州中医药大学第二附属医院检验科 510120)

摘要:目的 构建含有编码白细胞介素 1 I 型受体(IL-1R I)胞外区蛋白基因的 PET32a-IL-1R I 重组质粒,利用原核表达体系表达 IL-1R I 的胞外区蛋白。方法 从人白细胞中提取总 RNA,采用聚合酶链反应(PCR)从总 RNA 中扩增出 IL-1R I 胞外段基因,并将其插入 PET32a 质粒,构建重组质粒,化学法转化大肠杆菌 DH5 α 进行克隆。将克隆得到的 PET32a-IL-1R I 重组质粒转化入表达菌株 BL21(DE3),通过异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导其蛋白表达,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western-Blot 鉴定蛋白表达效果。结果 菌落 PCR 及 DNA 测序证实 IL-1R I 胞外段基因已正确克隆到载体中;重组质粒成功转入表达菌株 BL21(DE3),SDS-PAGE 和 Western-Blot 结果显示表达菌经 IPTG 诱导后表达出相对分子质量为 67×10^3 左右的蛋白。结论 成功地克隆了人 IL-1R I 胞外段基因并在大肠杆菌中进行了表达,为 IL-1R I 的进一步研究打下了基础。

关键词:受体,白细胞介素 1; 重组质粒; 原核表达

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)09-0964-03

Construction and expression of recombinant PET32a- IL-1R I plasmid*

Xu Ning, Zhang Zhanfeng, Huang Xianzhang, Chen Weiye, He Min, Zhuang Junhua[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou

Traditional Chinese Medicine University, 510120, China)

Abstract:Objective To construct recombinant plasmid PET32a- IL-1R I and express extracellular region of human IL-1R I protein in E. coli. **Methods** Total RNA was extracted from human white blood cells and used as template to amplify the extracellular region of human IL-1R I gene fragments amplified by PCR. Recombinant plasmids were constructed by insert the PCR products into vector plasmid and then were cloned by being transformed into E. coli DH5 α . Recombinant plasmid PET32a-IL-1R I was transformed into BL21(DE3), the expression of proteins, encoded by recombinant plasmid, was induced with isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), and expressed proteins were identified by SDS-PAGE and Western-Blot. **Results** Recombinant plasmid PET32a-IL-1R I, constructed by inserting the extracellular region of IL-1R I gene into vector plasmid, was confirmed by colony PCR and DNA sequencing, and was transformed into expression strain BL21(DE3). The expression of prokaryotic protein, with a relative molecular mass about 67×10^3 , induced by IPTG, in transformed BL21(DE3) was confirmed by SDS-PAGE and Western-Blot. **Conclusion** The extracellular region of IL-1R I gene was successfully cloned and expressed in BL21(DE3) and the elementary expression conditions were obtained, which lays a basis on the further research of IL-1R I.

Key words: receptors, interleukin-1; recombinant plasmid; prokaryotic expression

以炎症反应为标志性特征的先天性免疫,是机体防御感染的第一道防线。当受到伤害或者病原体侵袭时,机体就会率先调动非特异的先天性免疫系统保护机体,维护自身的稳定。促炎因子,是启动和调节炎症反应必需的信号分子,由活化的巨噬细胞或单核细胞合成或分泌。促炎因子包括白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)、肿瘤坏死因子(TNF)、趋化因子等细胞因子^[1-3]。IL-1 不仅参与胸腺细胞的增殖、B 细胞的生长与分化、白细胞介素(IL-2)和 IL-6 的生成,而且参与炎症反应、神经紊乱、睡眠调节等^[4]。IL-1 与靶细胞表面特异受体及 IL-1 受体辅助蛋白(IL-1RacP)结合形成复合体,触发下游信号通路而产生生理效应^[5]。近来研究发现,越来越多的白细胞介素 1 I 型受体(IL-1R I)参与 IL-1 的生理调节。

而 IL-1R I 是 IL-1 主要的功能受体,对多种免疫细胞的分化、生长、活化和增殖有重要的调节作用,并参与造血、压力反应、神经内分泌等多种生理过程。并且发现 IL-1R I 与多种疾病有关,如类风湿关节炎^[6]、子宫内膜异位症^[7]等。

深入研究 IL-1R I 有助于炎症疾病的发病机制探讨和辅

助诊断。本实验在大肠杆菌中表达 IL-1R I 胞外段基因,为 IL-1R I 的进一步研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 大肠杆菌 DH5 α 、原核表达载体 PET32a 和表达菌 BL21(DE3)均由广东省中医院大学城检验科提供;反转录试剂盒、KOD-Plus 高保真聚合酶购自 Toyobo 公司,核酸胶回收试剂盒购自 Omega 公司;DNA Ladder、质粒小提试剂盒、限制性内切酶 NOT1、EcoRI 以及 T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司;蛋白梯(protein ladder)购自 Fermentas 公司;琼脂糖、胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂购自 Oxoid 公司;IL-1R I 单抗和羊抗兔辣根过氧化物酶抗体购自 Abcam 公司;其余试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增 根据 NCBI 检索,确定 IL-1R I 胞外段的编码区序列,使用 Primer 5 软件设计引物。P1:5'-CCG G'AA TTC ATG AAA GTG TTA CTC AGA CTA TTT GT-3';P2:5'-TTA TGC' GGC CGC CTT CTG GAA ATT AGT GAC TGG AT-3'。划线部分分别为 EcoRI 和 Not I 酶切位

* 基金项目:广东省科技计划资助项目(83027);广东省自然科学基金资助项目(10151040701000031、07004832)。

△ 通讯作者,E-mail: zjh2208@163.com。

点。用引物 P1 和引物 P2 进行聚合酶链反应(PCR),反应体系:10×缓冲液(Buffer) B 2.0 μ L,引物 P1(10 μ mol/L)和引物 P2(10 μ mol/L)各 0.6 μ L,三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP, 2.5 mmol/L)2.0 μ L, KOD-PLUS 酶 0.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 0.8 μ L, cDNA 1 μ L, 加去离子水补充总体积至 20 μ L。PCR 扩增仪上进行反应:先于 94 $^{\circ}$ C 条件下进行 4 min 变性,然后按 94 $^{\circ}$ C 30 s; 56 $^{\circ}$ C 30 s; 68 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环后, 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 置于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存。PCR 产物通过 0.7% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

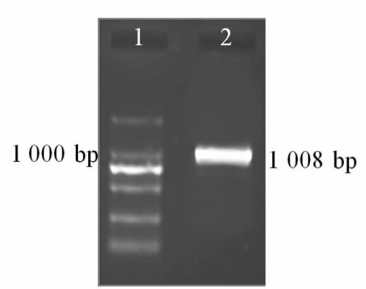
1.2.2 重组质粒的构建 PCR 产物胶回收后与 PET32a 质粒同时进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,酶切后产物经琼脂糖凝胶电泳后回收纯化进行连接反应,按 10 μ L 反应体系:10×连接缓冲液 1 μ L、PET32a 载体 1 μ L、PCR 产物 4 μ L、T4 DNA 连接酶 1 μ L, 去离子水补充至 10 μ L。混匀后瞬时离心,置 22 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接产物化学法转化入大肠杆菌 DH5 α ,使用含终浓度为 50 mg/L 氨苄西林的 LB 平板进行筛选,对平板上生长单菌落进行 PCR 鉴定,挑选 PCR 阳性克隆送广州英伟捷基公司测序。

1.2.3 重组质粒 PET32a-sIL-1R I 转化 BL21(DE3) 及阳性克隆的筛选 对测序阳性菌进行培养提取重组质粒,将重组质粒化学法转化表达菌株 BL21(DE3),用含氨苄西林的 LB 平板进行筛选,对平板上生长单菌落进行 PCR 鉴定,PCR 阳性克隆送广州英伟捷基公司测序。

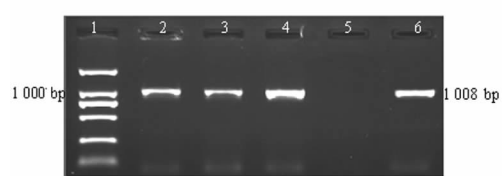
1.2.4 重组蛋白的优化诱导表达及鉴定 挑取筛选出的阳性 BL21(DE3)单克隆菌株,于新鲜含氨苄西林的 LB 培养基中过夜培养。各取 500 μ L 过夜培养菌液于 3 个均含 10 mL 无抗生素新鲜 LB 培养基的烧瓶中,置于摇床内以 37 $^{\circ}$ C、240 r/min 剧烈摇动 2 h 后加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至 IPTG 终浓度分别为 0.5、1、2 mmol/L 并继续以 37 $^{\circ}$ C、240 r/min 摇动培养。在加入 IPTG 的 0、1、2、3、4 h 各取 1 mL 菌液离心后取菌体进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定,在 1 000 bp 处可见一清晰条带,目的片段为 1 008 bp,见图 1。



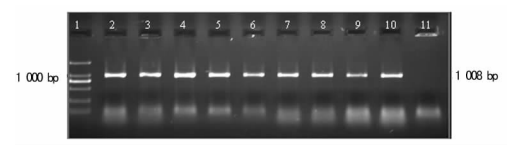
1:DNA 梯形 DL2000;2:IL-1R I 编码基因扩增产物。
图 1 PCR 扩增胞外段 IL-1R I 编码基因序列



1:DNA 梯形 DL2000;2~4:挑取平板上不同单菌落 PCR 结果;5:空质粒为模板阴性对照。
图 2 PET32a-IL-1R I 重组质粒的 PCR 鉴定

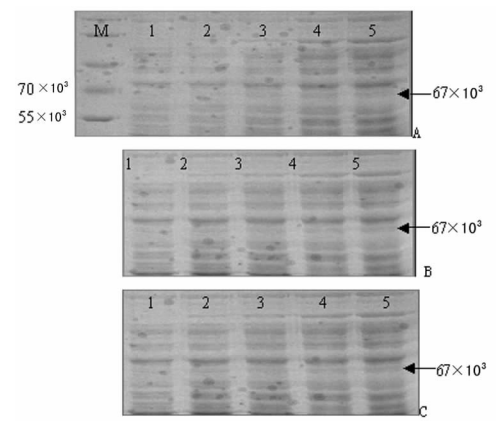
2.2 PET32a-IL-1R I 重组质粒转化 DH5 α 后菌落 PCR 鉴定 对平板上生长的单菌落进行 PCR 鉴定,在 1 000 bp 有特异片段,目的片段为 1 008 bp(图 2)。DH5 α 菌株测序结果与目的基因系列一致。

2.3 含重组质粒 PET32a-IL-1R I 的 BL21(DE3) 菌株的筛选 重组质粒转化 BL21(DE3)后对平板上生长单菌落进行 PCR 鉴定,在 1 000 bp 有特异片段,目的片段为 1 008 bp(图 3)。BL21(DE3)菌株测序结果与目的基因系列一致。



1:DNA 梯形 DL2000;2~9:平板上不同单菌落 PCR 结果;10:阳性对照;11:空质粒为模板阴性对照。
图 3 重组质粒 PET32a-IL-1R I 转化入 BL21(DE3) 菌株挑取单克隆菌落 PCR 检测结果电泳图

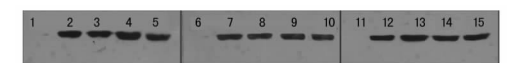
2.4 IPTG 诱导表达 BL21(DE3) 菌株产物的 SDS-PAGE 检测 挑选 PCR 阳性 BL21(DE3)菌株进行 3 个浓度 IPTG 诱导表达,对不同诱导浓度和不同诱导时间收集的菌液离心后取菌体进行 SDS-PAGE 检测,在相对分子质量为(55~70) $\times 10^3$ 之间有随着诱导时间的延长逐渐增强的条带,目的蛋白相对分子质量为 67 $\times 10^3$ (胞外段 IL-1R I 为 49 $\times 10^3$,质粒 PET32a 表达的标签蛋白为 18 $\times 10^3$),见图 4。



M:蛋白梯;A 1~5:0.5 mmol 浓度 IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h 后菌体 SDS-PAGE;B 1~5:1 mmol 浓度 IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h 后菌体 SDS-PAGE;C 1~5: 2 mmol 浓度 IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h 后菌体 SDS-PAGE。

图 4 含重组质粒 BL21(DE3)经不同浓度 IPTG 诱导 0~4 h 后对其表达蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

2.5 IPTG 诱导表达 BL21(DE3) 菌株产物的 Western-Blot 检测 挑选 PCR 阳性 BL21(DE3)菌株进行 3 个浓度 IPTG 诱导表达,对不同诱导浓度和不同诱导时间收集的菌液进行 Western-Blot 检测,在相对分子质量为(55~70) $\times 10^3$ 之间有荧光条带,目的蛋白相对分子质量为 67 $\times 10^3$,见图 5。



1~5:0.5 mmol 浓度 IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h 后菌液 Western-Blot;6~10:1 mmol 浓度 IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h 后菌液 Western-Blot;11~15:2 mmol 浓度 IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h 后菌液 Western-Blot。

图 5 含重组质粒 BL21(DE3)经不同浓度 IPTG 诱导 0~4 h 后对其表达蛋白的 Western-Blot 鉴定

3 讨 论

在蛋白研究方面,现国内多用细菌表达体系获得所需蛋白。当利用基因工程方法表达蛋白质时,除了考虑外源蛋白表达后的性质,还要考虑目的蛋白是否为胞外蛋白、表达量,以及有无简单易行的纯化方法对表达的蛋白质进行纯化以获得高纯度蛋白质。外源蛋白质的高效表达与表达系统、表达条件密切相关。

大肠杆菌表达系统是较为常用的一种。其优点是遗传背景比较清楚、表达水平较稳定、易操作、有许多菌株突变体和含强启动子的载体可供选择,并且成本低、蛋白表达量高、容易纯化等。本实验从人外周血单核细胞中提取总 RNA,通过 PCR 得到了人胞外段 IL-1R I 基因,并将其插入原核表达质粒 pET32a(+),构建了重组表达载体 pET32a-IL-1R I。在重组质粒的构建过程中,本实验是通过化学法将 IL-1R I 和质粒连接反应液转化 DH5 α 感受态,感受态是本实验室通过 CaCl₂ 法制备获得,由于多种原因导致转化效率较低,将转化后菌液涂布到含抗生素平板上过夜培养后平板上只生长 5 个单菌落,挑取各个单菌落进行 PCR 检测后发现均有特异性条带,但是有 2 个单菌落的 PCR 产物条带在阳性对照的下方(结果未给出),其他 3 个单菌落的 PCR 产物条带位置正确。每个菌落均转制新鲜的 LB 液体培养基过夜培养后送广州英伟捷基公司测序,测序所用引物为自备 P1、P2。测序结果在 NCBI 网站上进行比对,发现 PCR 产物条带位置正确的菌中均含有与胞外段 IL-1R I 基因完全符合的序列,而 PCR 产物条带在阳性对照条带下方的菌中只含有部分胞外段 IL-1R I 基因,可能是由于在转化过程中质粒发生基因缺失的突变所致。挑取阳性菌落至 5 mL 新鲜 LB 液体培养基过夜培养,第 2 天提取质粒。由于不能确定回收后质粒浓度,所以在进行表达菌株转化的时候分别取回收后质粒 2、5、8 μ L 进行转化。B21(DE3)感受态是本实验室通过 CaCl₂ 法制得。转化完成后置掌上离心机上离心 2 min 后弃去部分上清,留 200 μ L 上清于管底用移液枪轻柔混匀后涂布平板过夜培养。发现加 2 μ L 质粒进行转化所涂布平板和加 5 μ L 质粒进行转化所涂布平板长满单菌落,8 μ L 质粒进行转化所涂布平板无菌落生长。原因可能是 8 μ L 中质粒含量过高对感受态存在毒害作用,导致转化效率降低。在两个长菌的平板上分别挑取 8 个单菌落进行 PCR 鉴定,PCR 结果均有特异性条带并且位置正确。取其中 1 个单菌落

转至新鲜 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养,第 2 天送广州英伟捷基公司测序。测序结果在 NCBI 网站进行比对后发现所测菌中含有与胞外段 IL-1R I 基因完全符合的序列。对测序正确单菌落进行 IPTG 诱导,成功在大肠杆菌中表达出了人胞外段 IL-1R I 蛋白,该重组蛋白主要以包涵体形式存在。对工程菌表达条件进行了初步的优化,结果显示,IPTG 浓度(0.5~2.0 mmol/L)对胞外段 IL-1R I 蛋白表达量的改变无明显影响,而 1 h 之后随着诱导时间的延长蛋白表达量并无上升趋势。

该研究结果为进一步获得人 IL-1R I 重组蛋白,并研究其结构、功能活性和抗体制备等奠定了一定的实验基础。

参考文献

[1] Dinarello CA. The role of interleukin-1 in host responses to infectious diseases[J]. Infect Agents Dis,1992,1(5):227-236.

[2] Hunter CA,Chizzonite R,Remington JS. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens[J]. J Immunol,1995,155(9):4347-4354.

[3] Guzeldemir E, Gunhan M, Ozcelik O, et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in Turkish patients with localized aggressive periodontitis[J]. J Oral Sci,2008,50(2):151-159.

[4] Loddick SA,Liu C,Takao T, et al. Interleukin-1 receptors:cloning studies and role in central nervous system disorders[J]. Brain Res Brain Res Rev,1998,26(2/3):306-319.

[5] Sumathi S,Christine S,Charles C. The interleukin 1 receptor family[J]. Dev Comp Immunol,2004,28(5):415-428.

[6] 黄宪章,王前,郑磊,等. 类风湿性关节炎患者外周血 IL-1R I 水平的变化[J]. 广东医学,2008,29(2):233-234.

[7] Holder AL,Wolf S,Walshe C, et al. Expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1 is determined by genotype:effects on efficiency of leukocyte adhesion to human endothelial cells[J]. Hum Immunol,2008,69(2):71-78.

(收稿日期:2011-02-11)

(上接第 961 页)

2.3 血浆置换治疗前后患者肝功能的影响 经血浆置换治疗后肝功能明显改善,TBIL、DBIL 下降明显($P<0.01$),ALT、AST 下降明显($P<0.01$),ALB 明显上升。结果见表 2。

3 讨 论

重型肝炎的发生是多种因素共同作用的结果,多数患者有明显的出血症状,若救治不及时极容易导致死亡^[3],因此即时补充凝血因子,改善患者凝血机制是危急症重型肝炎患者治疗的有效方法。血浆置换疗法作为新的治疗手段,不仅可以清除中分子的毒性物质(氨、假神经递质、胆红素、内毒素、炎性细胞因子)、减轻肝内炎症,同时还补充了血浆清蛋白和凝血因子,解决低血压及水电解质紊乱,减轻患者的出血及水肿,改善肝脏生存的内环境,促进肝细胞再生和肝功能恢复^[4]。

本研究结果显示,46 例患者经 3~4 次血浆置换后,肝功能及凝血功能明显提高,临床症状大大缓解。表明人工肝疗法可有效减轻肝脏负担,改善机体凝血功能,对重型肝炎疗效满意,是一种有效的肝脏替代疗法。

参考文献

[1] Montejo Gonzalez JC,Catalan Gonzalez M,Meneu Diaz JC, et al. Artificial liver support system in acute liver failure patients waiting liver transplantation[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(90):456-461.

[2] 中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝病杂志,2000,8(6):324-329.

[3] Takahashi K,Umeshara Y,Umeshara M, et al. Plasma exchange-based plasma recycling dialysis system as an artificial liver support[J]. Ther Apher Dial,2008,12(4):264-270.

[4] Inoue K,Kourin A,Watanabe T, et al. Artificial liver support system using large buffer volumes removes significant glutamine and is an ideal bridge to liver transplantation[J]. Transplant Proc, 2009,41(1):259-261.

(收稿日期:2011-02-19)