

文章编号: 1000-5471(2007)05-0074-05

中国白兔 IL-6 基因的分子克隆及其表达研究^①

孟庆玲^{1,2}, 乔 军¹, 才学鹏¹

1. 中国农业科学院 兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 兰州 730046;
2. 甘肃农业大学 动物医学院, 兰州 730070

摘要: 运用 RT-PCR 技术对用 ConA 刺激的中国白兔外周血淋巴细胞 (PMBCr) 进行了扩增, 将纯化后的 PCR 产物克隆入 pMD18-T 中进行核苷酸序列测定. 结果中国白兔 IL-6 基因全长 726 bp, 编码 242 个氨基酸, 其中前 26 个氨基酸残基构成信号肽序列. 与不同物种 IL-6 基因相比, 核苷酸和推导的氨基酸序列有一定的差异. 在推导的中国白兔 IL-6 氨基酸序列中, 在 108-110 位存在 1 个潜在的 N-糖基化位点, 同时存在 9 个 Cys 残基. 将 pTIL-6 双酶切, 回收目的基因片段克隆到大肠杆菌表达载体 pET28a 中构建了重组质粒 pETIL-6, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 并用 IPTG 进行了诱导. 结果重组菌菌体裂解物经 SDS-PAGE 电泳可检测到相对分子量为 29.5 kDa 的重组目的蛋白. 经凝胶薄层扫描, 目的蛋白表达量可占菌体蛋白的 16.2%.

关键词: 中国白兔; 白介素 6 基因; 分子克隆; 表达

中图分类号: S829.1

文献标识码: A

白介素 6 (IL-6) 作为一种机体内复杂的细胞因子网络中的关键成分, 它具有多种生物学功能^[1-4], 不但能影响 B 细胞和 T 细胞的增生和分化, 还能使造血干细胞或颗粒细胞/巨噬细胞形成克隆, 并刺激其生长, 该细胞因子已引起了人们极大的关注. 为了进一步探讨 IL-6 的生物学功能, 本试验对中国白兔 IL-6 的 cDNA 进行了序列分析并在 E. coli 中对其进行了表达, 为重组兔 IL-6 的开发利用奠定基础.

1 材料和方法

1.1 主要试剂、质粒及菌株

Taq plus DNA 聚合酶、DNA gel Extraction Kit 和 dNTPs 均购自上海生物工程公司. Trizol 购自 Invitrogen 公司. 反转录酶 M-MLV、RNasin、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶和 pMD18-T 载体购自大连 TaKaRa 公司. DMEM 培养基为 GIBCO 产品; 大肠杆菌表达载体 pET28a、克隆宿主菌 JM109 和表达宿主菌 BL21(DE3) 由本室保存.

1.2 中国白兔外周血淋巴细胞的制备及总 RNA 的提取

对健康的中国白兔进行心脏采血, 肝素抗凝, 用淋巴细胞分离液分离兔外周血淋巴细胞 (PMBCr), 用 Hanks 液洗涤 3 次后进行计数, 调整 PMBCr 至 1.5×10^6 个/mL, 于 37 °C 下用 DMEM 培养液 (内含 8% 的犊牛血清, 10 mg/L ConA 以及青、链霉素 1000 IU/mL) 进行培养. 培养 24 h 后, 用 Trizol 按常规方法提取 ConA 刺激后 PMBCr 的总 RNA.

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中报道的参照已发表的欧洲兔 IL-6 cDNA 序列, 设计了特异的引物 P1 和 P2, 扩增预期长度为 726bp. 上游引物 P1: 5'-ACCGAATTCATGAACTCCTTCACAAGCGCCCTCCG-3'; 下游引物 P2: 5'-ACCAAGCTTTTATGTGTCCAATGGACAGG-3'. 为下一步克隆需要, 分别在上、下游引物中引

① 收稿日期: 2006-11-27

基金项目: 中国农业科学院兰州兽医研究所所长基金资助项目.

作者简介: 孟庆玲 (1971-), 女, 江苏徐州人, 博士研究生, 主要从事寄生虫分子生物学研究.

通讯作者: 才学鹏, 博士生导师.

入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点, 并加有 3 个保护碱基. 引物由大连 TaKaRa 公司合成.

1.4 中国白兔 IL-6 基因 RT-PCR 扩增、克隆及序列测定

以提取的总 RNA 为模板, 以 P2 和 Oligo-T 为引物按常规方法用反转录酶 M-MLV 进行 RT 反应. 取 RT 产物 2 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L、引物 P1(25 pmol/ μ L)、P2(25 pmol/ μ L)各 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 各 4 μ L, 水 32.7 μ L, Taqplus DNA 聚合酶 0.3 μ L(5U/ μ L)混匀. PCR 反应条件为 96 $^{\circ}$ C 预变性 200 s; 94 $^{\circ}$ C, 40 s; 56 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 70 s, 35 个循环; 然后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min. PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析. 切下目的 DNA 片段, 按 DNA gel Extraction Kit 说明书进行回收. 取回收 DNA 片段, 与 pMD18-T 载体 16 $^{\circ}$ C 过夜连接; 将连接产物转化大肠杆菌 JM109, 然后按常规方法涂在预制好的含适量 Amp 的 LB 琼脂平板上培养 12 h. 用限制性内切酶酶切和 PCR 方法鉴定获得阳性重组质粒 pTIL-6, 送上海生工进行序列测定. 所测序列用 DNASTAR 进行分析, 并与不同生物物种 IL-6 基因进行遗传进化分析.

1.5 原核表达载体 pETIL-6 的构建

用 *EcoR* I 和 *Hind* III 同时分别双酶切 pTIL-6 和 pET28a, 然后回收目的片段和载体片段, 用 T₄ 连接酶连接进行定向克隆, 构建原核表达载体 pETIL-6, 并用酶切和 PCR 进行鉴定.

1.6 重组质粒 pETIL-6 在大肠杆菌中的表达及表达产物的鉴定

将 pETIL-6 转化于感受态菌 BL21(DE₃) 后, 挑选单菌落, 接种含卡那霉素(30 mg/L)的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇荡培养至 D600=0.6-1.0, 加 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)诱导 3~7 h. 离心收集菌体, 重悬于 200 μ L TE 中, 加等体积 2 倍 SDS 凝胶加样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸变性 5 min, 在 12% 的凝胶上进行 SDS-PAGE 电泳以检测目的蛋白的表达情况, 并用双波长非点扫描仪对上述凝胶电泳的蛋白带进行扫描.

2 结 果

2.1 中国白兔 IL-6 基因 RT-PCR 扩增结果

经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 中国白兔 IL-6 基因 RT-PCR 产物大小为 726 bp(图 1).

2.2 重组质粒 pTIL-6 的鉴定

以重组质粒 pTIL-6 为模板, PCR 可扩增得到 726 bp 的核酸片段. 将重组质粒 pTIL-6 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 可得到 2692 bp 和 726 bp 两个片段, 与预期结果一致(图 2), 表明目的基因已克隆到 T 载体中.

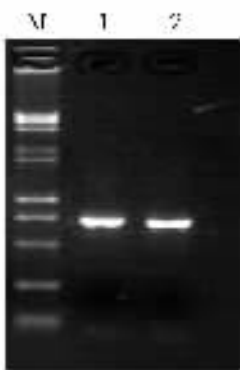


图 1 中国白兔 IL-6 基因的扩增

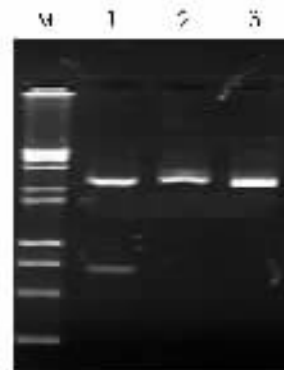


图 2 重组质粒 pTIL-6 的酶切鉴定

2.3 中国白兔 IL-6 基因 cDNA 序列测定结果及其推导的氨基酸序列

经测序, 中国白兔 IL-6 cDNA 的阅读框全长 726 bp, 编码 242 个氨基酸(图 3). 此序列已被 GenBank 收录, 登录号为 DQ680161. 与欧洲兔 IL-6 相比, 两者核苷酸和氨基酸的同源性均为 100%. 用 Signal IP 软件分析表明, 在推导的中国白兔 IL-6 氨基酸序列中前 26 个氨基酸残基构成信号肽, 后面 216 氨基酸构成成熟 IL-6 蛋白. 用 PROSITE 软件分析发现, 第 108-110 位氨基酸残基上存在一个潜在的 N-糖基化位点; 同时还存在 9 个 Cys 残基, 其中 8 个在成熟蛋白上, 推测可能会形成二硫键结构.

2.4 不同物种 IL-6 基因的遗传进化分析

中国白兔与 GenBank 报道的欧洲兔 IL-6 基因的核苷酸和氨基酸的同源性均为 100%. 同时发现, 中国白兔 IL-6 基因与沙漠棉尾兔、山棉尾兔、黑尾野兔、白尾野兔 IL-6 的同源性相对较高(图 4), 核苷酸和推

导的氨基酸序列的同源性分别为 91.9%、91.0%、90.9%、88.0%和 92.6%、92.3%、91.5%、89.9%；与犬、红狐、猫、马、双峰驼等动物表现出明显的种属差异，核苷酸的同源性在 51.2%~58.7%之间，推导的氨基酸序列的同源性在 54.2%~60.5%之间。

```

1.....ATGAAGCTCTTCACAAGCCCTCCGCCAGGTCGCCCTCGGCTGCTGCTGGCCTGCTCCTGGTGGTGGCTACCGCTTCCCCACTTCA-
1.....M N S F T S A L R P G P L G Q S L A L L L V V A T A F P T S
91.....GCACCCGTGAGGGAGGACTCCAACACCAAGGCCAGCCCGACAAAACCCCTCACGCCCGCAGGCAGAACCATCGAGAGCATCCGGAGCATC-
31.....A P V R E D S N T K A S P D K T L T P P G R T I E S I R S I
181.....CTGGAGACCATCAAGGAGCTGAGGAAAGAGATGTGTGACCATGATGTCAACTGCATGAACAGAAAGGAGGCACCTGGCGGAAGTCAATCTG-
61.....L E T I K E L R K E M Q D H D V N Q C M N R K E A L A E V N L
271.....CACCTTCCAAGGCTGATAGAAAGACGGATGCTTCCCGCCGGGGTGAATAATGAGACCTGCCTGCTGAGAATCACTTCGGGGCTGATG-
91.....H L P R L I E E D G Q F P P A V N N E T C L L R I T S G L M
361.....GAGTTCGGATGTATCTCGAGCACCTTCAGGCCAAGTTCAGGAGTGACGAAGAAACACCAGGCTCAGCATGGTCTGAAGAACATCCAA-
121.....E F R M Y L E H L Q A K F R S D E E N T R V S M V L K N I Q
451.....CACCTGATCAAGACCCCTGAGGCCAAAGGTCAAGAATTTGAATGAAGAAGCCACCTCAAGCCAGCCGTTGCGGTCAGCCTGATGGAGAAC-
151.....H L I K T L R P K V K N L N E E A T L K P A V A V S L M E N
541.....CTGCAGCAGAAAAACAGTGGCTGAAGACGACCACGATCCACTTTCATCCTCGCGGGCTCACAAACTTCTGAGTTCACCCCTGCCTGCC-
181.....L Q Q K N Q W L K T I I I H F I L R G L T N F L E F T L R A
631.....GTGGACCTGATGGAGTGCGGGTGCTCTTCTTGGGAAATTTGATGGGCTCTGCCTCCCAAGGTCAGAACACACCATCTCTGTCATTGGAC-
211.....V D L M E Q G Q P Q L R N F M G S A S H G Q N T P S Q P L D
721.....ACATAA
241.....T

```

图 3 中国白兔 IL-6 基因 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

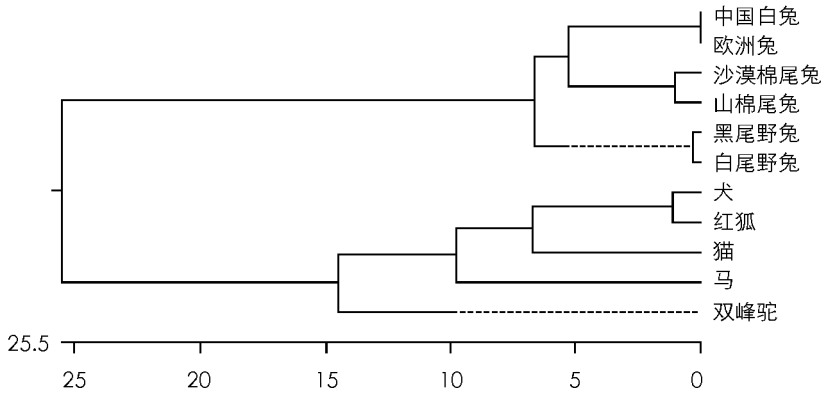


图 4 不同物种 IL-6 基因的遗传进化分析

2.5 原核表达载体 pETIL-6 的鉴定

以重组质粒 pETIL-6 为模板，PCR 可扩增出目的基因片段(图 5)；pETIL-6 分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切，可得到 5369 bp 和 726 bp 两个片段(图 6)，与预期结果相一致，表明该重组质粒构建正确。

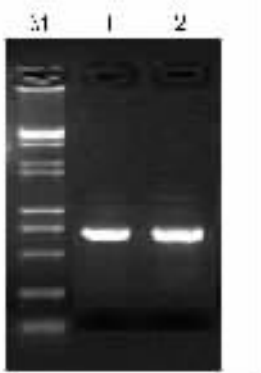


图 5 重组质粒 pETIL-6 的 PCR 鉴定

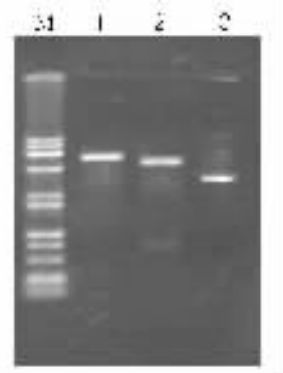


图 6 重组质粒 pETIL-6 的酶切鉴定

2.6 中国白兔 IL-6 基因在 E. coli 中的表达

SDS-PAGE 检测可见, pETIL-6 转化菌的诱导产物在约 29.5 kDa 处有一条与预期值大小相符特异的蛋白带(图 7 箭头处), 而 pET-28a(+)转化菌的诱导产物和 pETIL-6 转化菌的非诱导菌在该处没有蛋白带, 表明中国白兔 IL-6 在 E. coli 中实现了表达. 凝胶薄层扫描结果显示, pETIL-6 转化的 BL21(DE3)在 IPTG 诱导 6h 后的 IL-6 蛋白的最高表达量可占菌体总蛋白量的 16.2%.

3 讨 论

IL-6 最初是由平野等于 1986 年克隆成功. 目前的研究表明, 除了 T 淋巴细胞能产生 IL-6 外, 成纤维细胞、巨噬细胞、单核细胞、B 细胞、心脏粘液瘤细胞等在 PHA 或 ConA 的刺激下, 也能分泌产生 IL-6. 从理化特性来看, IL-6 是一种糖蛋白, 由 180~260 个氨基酸组成, 其分子量约为 24~30kDa. 人成熟 IL-6 分子为 184 个氨基酸残基, 分子量 26 kDa., 由 4 个 α 螺旋和 C 端(175~181 位氨基酸)受体结合点所组成, 其中 179 位精氨酸残基对于与受体的结合非常重要. 分子中 2 个 N-糖基对生物学活性功能并非必需, N 端 23 个氨基酸残基虽不直接与 IL-6 生物学活性有关, 但对整个 IL-6 分子组成起稳定作用. IL-6 分子有 4 个半胱氨酸, 形成 2 对二硫键(Cys44-Cys50, Cys73-Cys83). 小鼠 IL-6 成熟分子为 187 个氨基酸残基, 人与小鼠 IL-6 氨基酸序列同源性为 42%, 人的 IL-6 分子对小鼠某些细胞有刺激作用^[2,4].

IL-6 是机体内复杂细胞因子网络中的关键成分, 在天然情况下, IL-6 通过旁分泌和自分泌形式在局部发挥作用. 在病理情况下, 也可通过内分泌形式在全身发挥作用. 它除影响 B 细胞和 T 细胞的增生和分化之外, 还能刺激肝细胞产生急性期蛋白, 使造血干细胞或粒细胞/巨噬细胞形成克隆, 并刺激其生长, 促进细胞瘤及杂交瘤分裂繁殖. 目前的研究表明^[5-12], IL-6 主要具有以下生物学活性: ①对 B 细胞的作用, 诱导 B 细胞增殖分化并产生抗体, 主要作用于成熟的 B 细胞, 产生免疫球蛋白 IgM、IgG、IgA; ②对 T 细胞的作用, IL-6 起辅助信号的作用, 促进 PHA 或 ConA 激活的 T 细胞增殖生长, 被认为可能是一种细胞生长因子或促进因子; ③参与细胞毒性 T 细胞(CTL)分化过程, 诱生成熟或不成熟的 T 细胞或胸腺细胞生成 CTL, 在此过程中有 IL-2 参与; ④对粒细胞和巨噬细胞的作用, IL-6 具有刺激粒细胞/吞噬细胞(G/M)克隆形成的作用. ⑤对肝细胞的作用, IL-6 能诱导肝细胞合成急性期蛋白, Castell 等报道重组人 IL-6(rhIL-6)是成人肝细胞合成急性期蛋白质的强力诱导剂^[13,14], 如将 1.5×10^5 肝细胞和 100 u/mL rhIL-6 一起孵育 20 h, 结果发现可增加肝细胞合成并分泌急性期蛋白 1.4 倍. 据此推测, IL-6 可能通过上述增强效应, 而介入炎症反应的发生.

本试验利用大肠杆菌成功表达了 IL-6, 为下一步探讨重组蛋白的生物学活性奠定了良好的基础.

参考文献:

- [1] Medunitsin N V, Avdeeva J I, Acolzina S E, et al. Presence of cytokines in biological preparations [J]. *Biologicals*, 2002, 30(1): 1-6.
- [2] 张风蕴. 炎症因子 [J]. 国外医学免疫学分册, 1992, 82: 479-482.
- [3] Kabaroff L, Boermans H, Karrow N A. Changes in ovine maternal temperature, and serum cortisol and interleukin-6 concentrations after challenge with Escherichia coli lipopolysaccharide during pregnancy and early lactation [J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(8): 2083-2088.
- [4] 陈英, 李晓文, 耿军. 人胚胎植入与激素-免疫-细胞因子及粘附分子网络系统 [J]. *中华妇产科杂志*, 1996, 34(6): 382-384.
- [5] Zhang J G, Matthews J M, Ward L D, et al. Disruption of the disulfide bonds of recombinant murine interleukin-6 induces formation of a partially unfolded state [J]. *Biochemistry*, 1997, 36(9): 2380-2389.
- [6] Parsa M, Najafi S N, Jafari N J, et al. Diagnostic relevance of interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in discrimi-

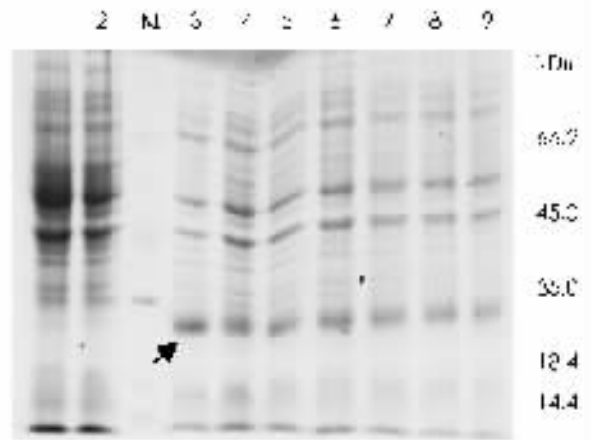


图 7 中国白兔 IL-6 基因在 E. coli DE3(BL21)中的表达

- nating high risk and low risk groups in febrile patients with neutropenia [J]. *Journal of Biological Sciences*, 2007, 7(2): 338 – 342.
- [7] Lauta V M. Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma; an overview of clinical and experimental data [J]. *Cytokine*, 2001, 16(3): 79 – 86.
- [8] 向强, 文亮, 刘明华. 出血性脑卒中出血灶 IL-1、IL-6、IL-8 动态变化的临床观察 [J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(14): 1288 – 1290.
- [9] Siddiqui A A, Shattock R J, Harrison T S. Role of capsule and interleukin-6 in long-term immune control of *Cryptococcus neoformans* infection by specifically activated human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(9): 5302 – 5310.
- [10] Sehgal P B. Interleukin-6-type cytokines in vivo: regulated bioavailability [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1996, 213(3): 238 – 247.
- [11] 周仁江. 毛细支气管炎患儿血清 IL-6、IL-8、INF- γ 和 TNF- α 水平动态变化与病情关系的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(12): 1261 – 1262.
- [12] Nishimichi N, Aosasa M, Kawashima T, et al. Biological activity of recombinant chicken interleukin-6 in chicken hybridoma cells [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 106(1–2): 97 – 105.
- [13] Chida D, Osaka T, Hashimoto O, et al. Combined interleukin-6 and interleukin-1 deficiency causes obesity in young mice [J]. *Diabetes (New York)*, 2006, 55(4): 971 – 977.
- [14] Castell J V, Gomez-Lechon M J, David M, et al. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6 [J]. *Hepatology*, 1990, 12(5): 1179 – 1186.

Molecular Cloning and Expression of Chinese White Rabbit Interleukin-6 Gene

MENG Qing-ling^{1,2}, QIAO Jun¹, CAI Xue-peng¹

1. State Key Lab of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China;

2. Department of Animal Medical Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Chinese white rabbit IL-6 gene was amplified by RT-PCR method from the PMBCr stimulated by ConA. Then the PCR product was purified and ligated with pMD18-T vector. The positive recombinant was used for sequencing. The complete length of Chinese white rabbit IL-6 gene was 726 bp, which encoded 242 amino acids. The front 26 amino acids consist of signal peptide. Compared the IL-6 genes with other species, there were some differences in the nucleotide sequence and deduced amino acid sequence. There were one N-glycosylation sites and 9 Cys in the deduced amino acid sequence. Meanwhile, the IL-6 gene was subcloned into the prokaryotic expressing vector pET28a and transformed into host *E. coli* strain BL21 (DE3) for expression under the induction of IPTG. The expression of IL-6 protein was detected by SDS-PAGE. The results revealed that it had a molecular weight of 29.5 kDa, which amounts to 16.2% in the total protein of the induced bacteria by the assaying of gel scanning.

Key words: Chinese white rabbit; IL-6 gene; molecular cloning; expression

责任编辑 夏娟