

重组斑马鱼 IL-10 蛋白的真核表达

娄婧婧, 陈伟民, 赵广才 (广州市体育科学研究所, 广东广州 510620)

摘要 [目的]在昆虫 S2 细胞中重组表达斑马鱼 IL-10 蛋白。[方法]PCR 扩增斑马鱼 IL-10 蛋白编码基因, 连接到分泌表达载体 pMT/Bip/V5-His A 中与辅助质粒 pCoBlast 共转染 S2 昆虫胚胎细胞, 通过 Blasticidin 加压筛选, 获得稳定表达斑马鱼 IL-10 的细胞系。用硫酸铜诱导 IL-10 蛋白表达, 收集无血清的细胞表达上清, 采用 SDS-PAGE 及 Western 鉴定目的蛋白。[结果]目的蛋白在昆虫细胞中获得表达, SDS-PAGE 结果表明相对分子质量为 23 kD, 与预期结果相一致。[结论]获得了重组斑马鱼 IL-10 蛋白, 为进一步在蛋白水平上研究其功能和调控机制奠定了基础。

关键词 斑马鱼; IL-10 蛋白; S2 细胞; 真核表达

中图分类号 S965.119 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)23-07769-04

Restructuring and Expression of Zebrafish Eukaryotic IL-10 Protein

LOU Jing-jing et al (Guangzhou Sport Scientific Institute, Guangzhou, Guangdong 510620)

Abstract [Objective] Restructure and express Zebrafish IL-10 protein in insect S2 cells. [Method] A pair of primers was designed to amplify IL-10 gene with PCR. The product was cloned into Drosophila Expression System to get recombinant expressed vector (pMT/Bip/V5-His A-IL-10). Then pMT/Bip/V5-His A-IL-10 and pCoBlast were co-transfected into S2 cells. The positive S2 cells were further screened with Blasticidin. IL-10 protein was induced by copper sulfate. At last, serum-free supernatant was collected and detected by SDS-PAGE and Western blotting. [Result] The objective protein has been expressed. SDS-PAGE shows 23 kD relative molecular mass is detected. [Conclusion] The restructuring zebrafish IL-10 protein was obtained, which lays a foundation for further studying its function and regulation mechanism in protein level.

Key words Zebrafish; IL-10 protein; S2 cell; Eukaryotic expression

细胞因子由造血系统、免疫系统或炎症反应中的活化细胞产生, 能调节细胞分化增殖和诱导细胞发挥功能, 是高活性功能的多肽、蛋白质或糖蛋白。细胞因子及其构成的网络在免疫调节方面起着重要。白细胞介素 10 (IL-10) 是一种细胞因子, 主要由 Th2 细胞产生, 是能抑制 Th1 细胞释放细胞因子 (IFN- γ 和 IL-2 等) 的免疫调节性细胞因子^[1]。研究表明, IL-10 能抑制炎症介质的分泌, 是非常有效的抗炎介质, 在体液免疫中起重要作用^[2]。动物和人体的各种体内研究表明, IL-10 治疗可以降低炎症的严重程度^[3]。

在人类和鱼类的基因组中, IL-10 基因的大小大约为 2 kb。第 1 个外显子编码信号肽和 A 螺旋结构。第 2 个外显子编码 AB 鲁普结构和 B 螺旋结构。第 3 个外显子编码 C 和 D 螺旋结构。第 4 个外显子编码 DE 鲁普结构和 E 螺旋结构。第 5 个外显子编码 F 螺旋和羧基端的尾巴以及 1 个不翻译的包括 AUUUA 的片段, 当这个片段与 AUF1 结合时, 会降低 IL-10mRNA 的稳定性^[4]。

鳊鱼传染性脾肾坏死病毒 (Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 是近年来广东鳊鱼养殖业爆发性流行病的主要病因之一, 造成了巨大的经济损失。ISKNV 以鳊鱼脾和肾为主要侵入组织, 引起脾肾细胞的肿大和坏死。近年来, 越来越多的学者通过研究 ISKNV 病毒作用机制来探讨鱼类天然免疫机制。国内研究表明, ISKNV 感染斑马鱼后斑马鱼体内的 IL-10 含量迅速升高^[5]。据此推测, IL-10 参与了鱼类的免疫调节, 但其作用机制有待进一步研究。为此, 笔者构建了斑马鱼 IL-10 基因真核表达载体, 融合表达并纯化了 IL-10 蛋白, 以期为进一步的生物学功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由实验室保存; 真核表达载体 pMT/Bip/V5-His A 购自英俊公司, PCR 胶回收、质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; DNA Marker、限制性内切酶 *Kpn*I、*Xho*I 及 T4 DNA 连接酶、高保真 DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司; Schneider's Drosophila Medium 和 FBS、Cellfectin 转染试剂均购自 Invitrogen 公司; anti-V5 antibody 购自 Sigma 公司; 低分子量标准蛋白购自大连宝生物公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂, 购自威佳公司。

1.2 斑马鱼 IL-10 基因真核表达载体的构建 从斑马鱼脾脏组织中提取 RNA 反转录成 cDNA, 以此 cDNA 为模板, 结合真核表达载体 pMT/Bip/V5-His A 的多克隆位点和 IL-10 基因的限制性酶切位点, 根据 NCBI 网站上斑马鱼 IL-10 基因的编码序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增引物。在上下游引物的 5' 端分别加上 *Kpn*I 和 *Xho*I 的酶切位点, 引物序列为: DIL10-PF: 5'-GGGGTACCcAGGAGAGTCGAATG-CAAAAC-3'; DIL10-PR: 5'-CCGCTCGAGTGCTTAAC-CCTCTTTGAG-3'。

PCR 反应体系包括 0.5 μ mol/L 正向/反向引物, 2 ng cDNA 模板, dNTP 混合液各 2.5 mmol/L、缓冲液 (添加 Mg^{2+})、Kodplus DNA 聚合酶 0.025 U, 用灭菌三蒸水补齐至 50 μ l。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 49 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 45 s 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 用试剂盒回收目的片段的扩增产物。分别用 *Xho*I 和 *Kpn*I 双酶切纯化产物和真核表达载 pMT/Bip/V5-His A, 回收双酶切片段, T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 构建 pMT/Bip/V5-His A-IL-10 的真核表达质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α , 在氨苄青霉素抗性平板上挑取单克隆 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 菌液 PCR 筛选阳性克隆后测序^[6]。引物合成和

作者简介 娄婧婧 (1986-), 女, 湖南长沙人, 研究实习员, 硕士, 从事食品安全生物学研究。

收稿日期 2014-07-10

测序均由上海英俊生物工程有限公司完成。

1.3 IL-10 蛋白的真核表达及稳定细胞系的筛选 用试剂盒提取测序验证无误的目的重组菌的无内毒素质粒待用。取无血清 SDM 培养基培养的 S2 单层细胞转板后培养待其贴壁生长并达到一定密度后,将无内毒素质粒及 Cellfectin 转染细胞,28 ℃ 下培养 18 h,弃去旧培养液,加入含 10% FBS 的培养基(添加双抗)继续培养。转染后的细胞培养约 3~5 d,待其生长到分裂期,将原培养基换成添加抗生素(Blasticidin)的 10% FBS 的 SDM 培养基继续培养,筛选稳定表达的细胞系。筛选细胞过程中约 4~5 d 换液 1 次,筛选 14 d 后开始扩大培养。在转染后筛选细胞前和筛选细胞并扩大培养后,分别用硫酸铜诱导蛋白表达。在培养基中加入 500 μg/ml 的硫酸铜,将细胞置于 28 ℃ 条件下继续培养。

1.4 IL-10 蛋白的纯化 取筛选后诱导的细胞,在诱导后第 4 天开始收集细胞上清,将上述滤液过 Ni²⁺ 金属螯合层析柱,用 Novagen 公司的 His. Bind 纯化试剂盒,通过镍螯合层析纯化 His-Tag 融合蛋白。用含不同浓度咪唑(60 和 120 mmol/L)的洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,6 mol/L 尿素,pH8.0)梯度洗脱后,进行 SDS-PAGE 蛋白检测。

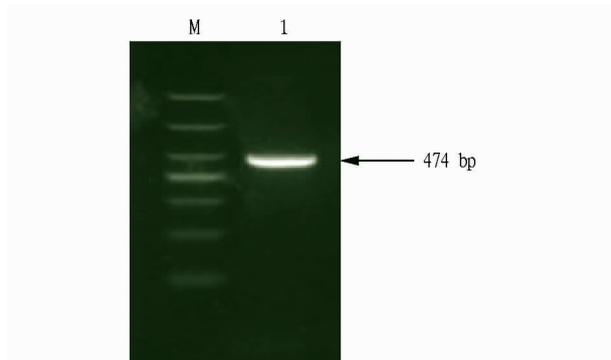
1.5 IL-10 蛋白的检测及 Western blotting 分析 按照常规方法处理样品进行 SDS-PAGE,检测蛋白的表达情况。Western blot 分析,将 SDS-PAGE 凝胶上的条带转移到硝酸纤维素膜上,用 50 g/L 脱脂乳封闭,用 anti-V5 抗体作为一抗,以 1:5 000 倍稀释的羊抗兔 IgG(碱性磷酸酶标记)作为二抗,经 NBT/BCIP 显色,观察特异性条带^[7]。

2 结果与分析

2.1 IL-10 基因的 PCR 扩增 以提取斑马鱼脾脏组织 RNA 反转录的 cDNA 作为模板,利用设计的上游引物 PF 和下游引物 PR 进行扩增,产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳可见清晰的目的片段扩增条带,条带大小为 474 bp 与设计长度相符,且未出现其余杂带,扩增的特异性良好(图 1)。

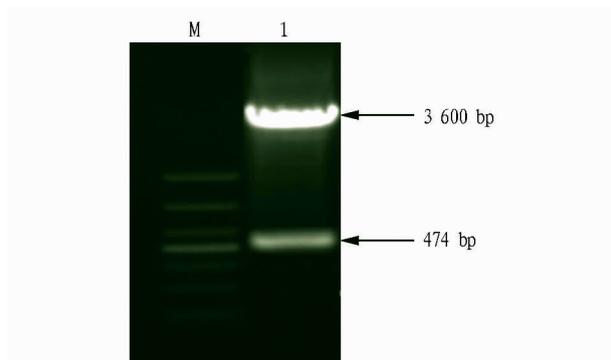
2.2 pMT/Bip/V5-His A-IL-10 的真核表达质粒的酶切鉴定 从图 2 可以看出,酶切后产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电

泳可见 2 条清晰条带,1 条为 pMT/Bip/V5-His A 载体条带 3.6 kb,另 1 条为 IL-10 基因目的片段(474 kb),证明 pMT/Bip/V5-His A-IL-10 真核表达载体构建成功,测序验证目的片段序列也与 IL-10 的序列相符。



注:M. DL1000 Marker;1. PCR 扩增产物。

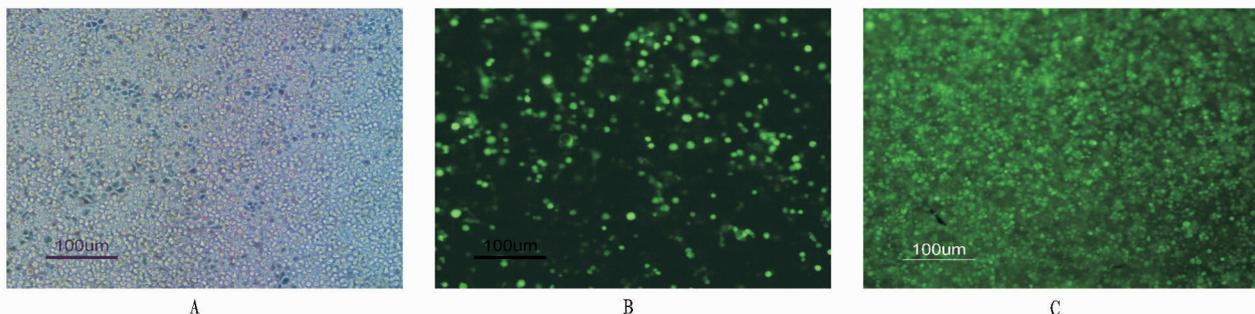
图 1 IL-10 基因的 PCR 扩增结果



注:M. DL1000 Marker;1. 阳性克隆的产物。

图 2 重组质粒的双酶切鉴定

2.3 筛选稳定表达的细胞系 培养 S2 细胞待其生长良好贴壁达到一定密度后拍照,转染细胞后与筛选初期和后期分别拍照。发出荧光的细胞均为成功转染的细胞。从图 3 中可以看出,细胞转染效率较高;加压筛选后,荧光细胞的密度显著增大。



注:A. 正常生长的 S2 细胞;B. 转染后未经筛选的 S2 细胞;C. 加压筛选后的细胞。

图 3 S2 转染细胞的筛选结果

2.4 细胞表达上清的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定 从图 4 可以看出,纯化前细胞上清的电泳条带中可见目的条带和杂带;纯化后 23 kD 处出现清晰的条带,大小与重组 IL-10 蛋白相符;经 Western blot 后,在纤维素膜的预期位置出现特

异性条带,进一步验证了细胞表达的正确性。

3 讨论

3.1 斑马鱼 IL-10 基因的序列分析 几种脊椎动物的 IL-10 基因已经被克隆出来,比如人、老鼠、鸟类和鱼类。结果表

优越性。首先,许多种类的载体都可以在 S2 细胞中表达目的重组蛋白,选择 pMT/Bip/V5-His A 载体是因为 IL-10 是分泌到细胞外的蛋白,而 pMT/Bip/V5-His 载体包括果蝇细胞分泌信号,可诱导表达分泌目的蛋白^[11]。其次,此系统为真核表达系统,可以对目的蛋白进行真核表达系统的修饰。由于该试验的研究对象是斑马鱼,使用真核表达系统来表达 IL-10 就比使用原核表达系统更好,更适用于斑马鱼的研究。再次,此表达系统能在半个月获得稳定表达目的蛋白的细胞系,比起其他真核表达系统耗时较短。国内已有人已经成功运用这个表达系统获得了干扰素有活性的蛋白,且表达的蛋白量大约为 1 ml 上清中有 2 μg 目的蛋白^[12],因此通过这一表达系统便于获取有活性的斑马鱼 IL-10 蛋白,为进一步研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 杨红,罗少洪,彭立胜,等.人白细胞介素 10 的克隆及分泌表达[J].广东药学院学报,2003,19(1):48-50.
 [2] ALEXANDER Z. Structural features of the interleukin-10 family of cytokines[J]. Curr Pharm Des,2004,10:3873-3884.

(上接第 7756 页)

- [32] LKEDA H,TSUCHIYA Y,NAGATA N,et al. Altitudinal life-cycle and body-size variation in ground beetles of the genus *Carabus* (subgenus *Ohomopterus*) in relation to the temperature conditions and prey earthworms[J]. Pedobiologia,2012,55(2):67-73.
 [33] RAINIO J,NIEME LA J. Ground beetles as bioindicators[J]. Biodiver Conserv,2003,12(3):487-506.
 [34] DAVIES K F,MARGNLES C B. Effects of habitat fragmentation on carabid beetles;experimental evidence[J]. J Anim Ecol,1998,67(3):460-471.
 [35] BURKE D,GOULET H. Landscape and area effects on beetle assemblages in Ontario[J]. Ecography,1998,21(5):472-479.
 [36] DE VRIES H H. Size of habitat and presence of ground beetle species [M]//DESENDER K,DUFRENE M,LOREAU M,et al. Carabid Beetles;Ecology and Evolution. Dordrecht,Boston,London:Kluwer Academic Publishers,1994:253-259.
 [37] LÖVEI G L,MAGURA T,TOTHMERESZ B,et al. The influence of matrix and edges on species richness patterns of ground beetles in habitat islands [J]. Glob Ecol Biogeogr,2006,15(3):283-289.
 [38] USHER M B,FIELD J,BEDFORD S. Biogeography and diversity of ground-dwelling anhrpods in farm woodlands[J]. Biodiver Lett,1993,1(2):54-62.
 [39] THOMAS C F G,MARSHALL E J P. ArthroPod abundance and diversity in differently vegetated margins of arable fields[J]. Agriculture,Ecosystems and Environment,1999,72:131-144.
 [40] ROSENZWIG M L. Species diversity in space and time[M]. Cambridge: Cambridge University Press,1995:127-156.
 [41] 于晓东,周红章,罗天宏.东灵山地区大步甲属物种分布和季节变化的多样性格局[J].生态学报,2002,22(10):1724-1733.
 [42] KOTZE D J,SAMWAYS M J. Invertebrate conservation at the interface between the grassland matrix and natural Afromontane forest fragments [J]. Biodiversity and Conservation,1999,8(10):1339-1363.
 [43] LENSKE R E. The impact of forest cutting on the diversity of ground beetles (Coleoptera;Carabidae) in southern Appalachians[J]. Ecological Entomology,1982,7:385-390.
 [44] JENNINGS D T,HOUSEWEART M W,DUNN G A. Carabid beetles (Coleoptera; Carabidae) associated with strip clearcut and dense spruce- fir

- [3] 任大宾,孙仁宇.白介素 10 的抗炎功能及其分子机制[J].国外医学·呼吸系统分册,2005,25(3):175-178.
 [4] 李明才,何韶衡.白细胞介素 10 超家族的研究进展[J].现代免疫学,2004,24(1):83-86.
 [5] ASADULLAH K,STERRY W,VOLK H D. Interleukin-10 therapy-review of a new approach[J]. Pharmacol Rev,2003,55:241-269.
 [6] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1996:343-3491.
 [7] 郑玉姝,赵朴,赵宏坤.鸡 IL-10 基因的扩增、表达及生物学活性鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2006,22(5):591-593.
 [8] MOY F J,DIBLASIO E,WILHELM J,et al. Solution structure of human IL-13 and implication for receptor binding[J]. J Mol Biol,2001,310(1):219-230.
 [9] MUELLER T D,ZHANG I,SEBALD W,et al. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system[J]. Biochim Biophys Acta,2002,1592(3):237-250.
 [10] WALTER M,COOK W J,ZHAO B G,et al. Crystal structure of recombinant human interleukin-4[J]. J Biol Chem,1992,267(28):20371-20376.
 [11] WANG J Q,LI L C, LIN S G, et al. Cloning and characterization of p8 homolog cDNA in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. Biochem Genet, 2010,48(5/6):504-515.
 [12] 任慧英,郭鑫,杨汉春,等.猪 γ -干扰素基因真核重组表达质粒的构建[J].中国兽医杂志,2005,41(3):5-7.

- forests of Maine[J]. The Coleopterists Bulletin,1986,40(3):251-263.
 [45] 谷卫彬,宇振荣,胡敦孝.华北盐渍化改造区农田步甲群落及其动态研究:以河北省曲周县为例[J].生物多样性,2004,12(2):262-268.
 [46] LIU Y H,AXMACHER J C,WANG C L,et al. Ground beetles (Coleoptera;Carabidae) in the intensively cultivated agricultural landscape of Northern China;Implications for biodiversity conservation[J]. Insect Conservation and Diversity,2010(3):34-43.
 [47] 刘云慧,宇振荣,刘云.北京东北旺农田景观步甲群落结构的时空动态比较[J].应用生态学报,2004,15(1):85-90.
 [48] CARCAMO H A,SPENEE J R. Crop type effects on the activity and distribution of ground beetles (Coleoptera; Carabidae) [J]. Environmental Entomology,1994,23:684-692.
 [49] WEISS M J,BALSBAUGH E U,FRENCH E W,et al. Influence of tillage management and cropping system on ground beetle (Coleoptera; Carabidae) fauna in the Northern Great Plains [J]. Environmental Entomology, 1990,19:1388-1391.
 [50] ALDERWEIRELDT M,DESENDER K. Microhabitat preference of spiders (Araneae) and carabid beetles (Coleoptera; carabidae) in maize fields [J]. Mededelingen van de Faculteit Land bouwwetenschappen van de Rijksuniversiteit Gent,1990,55:501-510.
 [51] LUFF M L. Starvation capacities of some carabid larvae [M]//DESENDER K,DUFRENE M,LUFF M L,et al. Carabid Beetles, Ecology and Evolution (Series Entomologica). Kluwer Academic Publishers,1994:171-175.
 [52] STASSART P M,WIBO G,FRANKINET M. Influence du travail du sol sur les populations de carabides engrande culture;resultats preliminaires [J]. Mededelingen van de Facuheit Landbouwwetenschappen van de Rijksuniversiteit Gent,1983,48(2):465-474.
 [53] TONHASC A. Carabids assemblage under diversified agroecosystems [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata,1993,68:279-285.
 [54] HELENIUS J,TOLONEN T. Enhancement of generalist aphid predators in cereals;effect of green manuring on recruitment of ground beetles (Coleoptera;Carabidae) [J]. IOBC/WPRS Bulletin,1994,17(4):201-210.
 [55] NASH M A,THOMSON L J,HOFFMANN A A. Effect of remnant vegetation, pesticides, and farm management on abundance of the beneficial predator *Notonomus gravis* (Chaudoir) (Coleoptera; Carabidae) [J]. Biol Control,2008,46(2):83-93.