

## 重组人 IL-4 的克隆、表达和鉴定\*

王 栩, 年四季, 鄢于川, 高 燕, 叶迎春, 袁 青<sup>△</sup>

(泸州医学院基础医学院, 四川泸州 646000)

**摘要:**目的 构建人 IL-4 重组表达载体, 表达纯化并鉴定人 IL-4 重组蛋白。方法 采用巢式 PCR 技术从健康志愿者外周血单核细胞(PBMC)总 RNA 中扩增人 IL-4 开放阅读框基因, 将扩增的 IL-4 目的基因与表达质粒 pET101/D-TOPO 连接, 转化大肠杆菌 BL21, 进行表达纯化和鉴定。结果 采用巢式 PCR 扩增得到 IL-4 开放阅读框大小为 460 bp, 测序比对显示序列正确。转化 BL21 后, 通过对不同克隆子表达水平的筛选, 筛选到高表达 IL-4 的克隆子, 表达和纯化后聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)显示, 其融合蛋白大小约为  $28 \times 10^3$ , 与目的蛋白大小一致。Western blot 鉴定结果显示表达的蛋白正确, 为人 IL-4 目的蛋白。结论 成功表达纯化到人 IL-4 重组蛋白。

**关键词:**人白细胞介素 4; 表达; 纯化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)15-1881-03

## Clone, expression and identification of human recombinant IL-4\*

Wang Xu, Nian Siji, Wu Yuchuan, Gao Yan, Ye Yingchun, Yuan Qing<sup>△</sup>

(The School of Basic Medic Science, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** Construction of human IL-4 recombinant expression vector and then conduct the expression, purification and identification of human recombinant IL-4. **Methods** the open reading frame of IL-4 was amplified by nest PCR with total RNA from PBMC of healthy volunteer. And then the amplified IL-4 was inserted into pET101/D-TOPO, transformed into BL21, expressed, purified and indentified. **Results** The size of amplified open reading frame of IL-4 was about 460 bp and the sequence was correct. After transformed into BL21, the IL-4 clone with higher expression level was selected by selection of different clones inserted with IL-4 and the size of expressed, purified IL-4 was about  $28 \times 10^3$ . Western blot results showed that the size of single band was identical with the expected protein. **Conclusion** Human IL-4 recombinant protein was got successfully.

**Key words:** human interleukin-4; expression; purification

IL-4 和 IL-13 由 Th2 和肥大细胞产生, 通过激活嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞促进气道炎症, 增强成纤维细胞的增殖、活化引起气道重塑; 激活 B 细胞产生 IgE; 刺激气道上皮细胞、杯状细胞产生黏液; 激活气道平滑肌细胞引起气道高反应性, 在过敏性炎症疾病中起着重要的作用<sup>[1-6]</sup>。

IL-4 与 IL-13 共享信号途径。LaPorte 等<sup>[7]</sup>在《Cell》上发表了 IL-4、IL-13 及其受体的晶体结构, 并展示了细胞外过程如何影响信号传导的专一性。通过 IL-4 和 IL-13 进行的信号传导对 T 细胞发育和 T 细胞介导的免疫响应(过敏)十分重要<sup>[8-12]</sup>。IL-4 和 IL-13 通过一个由细胞因子和两个受体组成的杂合三聚体复合物传导信号。IL-4 的受体复合物有 I 型和 II 型 2 种类型, I 型受体复合物包括 IL-4R $\alpha$  和 链  $\gamma$ (c) 亚基。与 IL-4 结合的 II 型受体是 IL-4R $\alpha$  和 IL-13R $\alpha$ 1 的复合物, 也可作为 IL-13 结合的受体, 即 IL-4 和 IL-13 通过相同的 II 型受体传导信号途径<sup>[13-15]</sup>。基于 IL-4/IL-13 信号途径在过敏性炎症疾病中发挥重要的作用, 制备中和性抗 IL-4 和 IL-13 双特异性抗体, 从而封阻他们的生物学活性, 对于过敏性炎症疾病的治疗具有很大的潜力。本研究克隆、表达及鉴定人 IL-4 重组蛋白, 为后期双特异性抗体的构建奠定基础, 现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人外周血取自健康志愿者; 总 RNA 提取试剂盒和 cDNA 合成试剂盒购自 Takara 公司; pET101 Directional TOPO 表达试剂盒购自 Invitrogen 公司; Oligo dT15 和 MMLV 反转录酶购自 Promega 公司; Ni-NTA 亲和纯化系统

购自 Invitrogen 公司。

## 1.2 方 法

**1.2.1 IL-4 基因扩增** 从健康志愿者外周血中分离单个核细胞, 提取总 RNA, 采用 Takara cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。从美国国家生物技术信息中心(NCBI)中下载人 IL-4 mRNA 序列, 采用巢式 PCR 扩增 IL-4 cDNA。首先采用 IL-4 上游引物: 5'-TCC CTC GGT TTC AGC AAT-3' 和下游引物 2: 5'-ATC GTC TTT AGC CTT TCC-3' 扩增 IL-4 基因。采用 TA 克隆的方式将扩增片段克隆至 pGM-T 载体中, 蓝白斑筛选及菌落 PCR 验证阳性克隆子。提取质粒, 送上海生物技术有限公司测序正确后, 以质粒为模板, 采用 IL-4 上游引物 2: 5'-CAC CAT GGG TCT CAC CTC CCA ACT GCT T-3' 和下游引物 2: 5'-GCT CGA ACA CTT TGA ATA TTT CTC-3' 扩增 IL-4 开放阅读框。PCR 扩增程序均为 94 °C 2 min; 然后 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 次循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

**1.2.2 重组质粒构建与鉴定** 取新鲜扩增的 PCR 产物 2  $\mu$ L, 加入 pET Directional TOPO expression kits 中的 pET101/D-TOPO 载体 1  $\mu$ L, 反应缓冲液 1  $\mu$ L, 加水补足 6  $\mu$ L。轻柔混匀反应混合液, 室温 22~23 °C 连接 30 min。反应结束后, 置冰上进行后续转化实验。取大肠埃希菌(E. coli) TOPO10 CaCl<sub>2</sub> 感受态 50  $\mu$ L 冰上融化后, 加入 6  $\mu$ L 连接产物于感受态中, 轻柔混匀后, 冰上孵育 30 min, 然后于 42 °C 温育 30 s。于冰上放置 2 min 后加入 250  $\mu$ L SOC 培养基, 37 °C, 180 r/min 培养 1 h,

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31000415); 四川省青年基金资助项目(2012JQ0018); 四川省教育厅基金资助项目(13ZB0262)。

作者简介: 王栩(1974—), 讲师, 本科, 主要从事细胞免疫学研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel: 18383000039; E-mail: yuanqing\_ok@hotmail.com。

取 100~200  $\mu\text{L}$  涂含氨苄西林的 LB 固体平板, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。挑取平板上 5~10 个单菌落, 进行菌落 PCR 验证质粒中是否插入了 IL-4 目的基因。然后将菌落 PCR 阳性的克隆子在含氨苄西林(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 液体培养基中 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养, 提取重组质粒 DNA, 送上海生物技术有限公司进行测序验证插入序列的正确性。

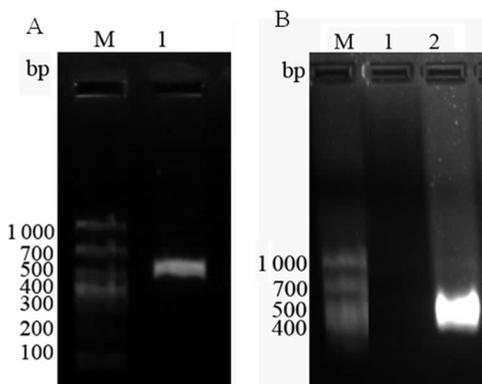
**1.2.3 高表达量克隆子的筛选** 取来自不同克隆子测序正确的重组质粒 DNA IL-4/PET101 10 ng 加入 100  $\mu\text{L}$  BL21 感受态中, 冰浴 30 min, 然后 42  $^{\circ}\text{C}$  热击 30 s, 立即放冰上孵育 2 min, 加入 250  $\mu\text{L}$  SOC 培养基后, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 振荡培养 30 min。将所有培养产物加入 10 mL 含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  羧苄西林的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。次日, 接种 1 mL 过夜培养的细菌培养物到含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  羧苄西林的 10 mL LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  250 r/min 培养至细菌  $OD_{600}$  = 0.5 左右, 加入终浓度 1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 5 h, 取 1 mL 细菌悬液, 5 000 r/min 离心 5 min, 沉淀加入 1 $\times$  聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液 50  $\mu\text{L}$ , 煮沸 5 min, 加样进行 SDS-PAGE 分析。

**1.2.4 IL-4 重组蛋白的表达与纯化** 将过夜培养的高表达 IL-4 的克隆子细菌培养液 2 mL 接种到含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  羧苄西林的 100 mL LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 培养至  $OD_{600}$  = 0.5, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 5 h 后, 8 000 r/min 离心培养液 10 min, 收集细菌沉淀用于蛋白纯化。按 Invitrogen 公司的 Ni-NTA 纯化试剂盒的变性条件纯化蛋白。

**1.3 IL-4 蛋白的鉴定** 将表达的 IL-4 蛋白粗提物进行 SDS-PAGE 电泳后, 转尼龙膜(NC); 然后用封闭液(1 $\times$  PBS 中含 2% BSA, 0.05% Tween20) 室温封闭 NC 膜 1 h。由于 pET101/D-TOPO 载体带有 6 $\times$  组氨酸酸标签, 所以加入用封闭液 1 000 $\times$  稀释的抗组氨酸单克隆抗体(GE Healthcare, 来源于小鼠) 室温孵育 1 h; 洗涤后加入 5 000 $\times$  稀释的马抗小鼠 IgG HRP 标记抗体(Promega) 室温孵育 1 h, 最后加入化学发光剂(Minipore) 进行显色。

## 2 结 果

**2.1 IL-4 cDNA 的扩增** 本研究根据 NCBI 数据库中的 IL-4 序列分别设计引物对 1、2。采用引物对 1 扩增得到大小为 545 bp 的 IL-4 基因片段, 将扩增得到的 IL-4 基因片段克隆到 T 载体 pGM-T, 以提取的质粒 DNA 为模板, 采用引物对 1、2 扩增到 IL-4 开放阅读框, 其大小为 460 bp 左右, 见图 1。

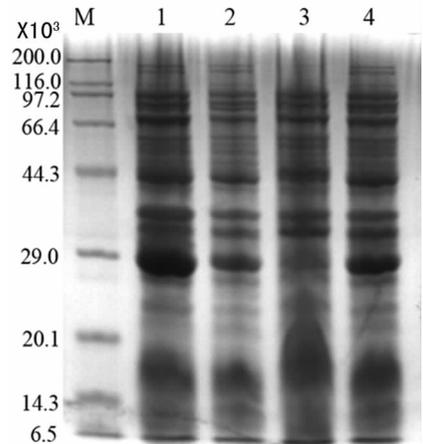


A: 采用 IL-4LF/IL-4LR 引物扩增 IL-4 基因; B: 将图 1A 中 PCR 扩增产物克隆至 pGM-T, 提取质粒 DNA 作为模板, 采用巢氏 PCR 扩增 IL-4 开放阅读框。M: DNA 分子标记物(1 000 bp)。

图 1 PCR 扩增 IL-4 基因

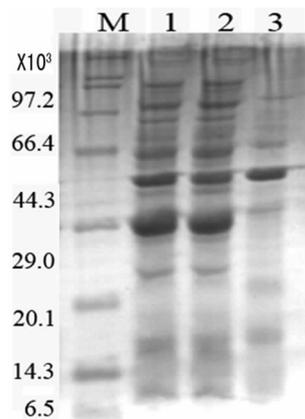
**2.2 IL-4 的表达** 将扩增后的 IL-4 开放阅读框基因与载体 pET101 连接后, 转化 E. coli TOPO10。采用菌落 PCR 技术验

证阳性克隆子, 并进行测序。将测序正确的 4 个克隆子过夜培养后, 提取质粒转化入 E. coli BL21 进行小量表达, 并进行 SDS-PAGE。结果表明: 诱导表达后的蛋白条带大小为  $28 \times 10^3$  左右, 与目的条带大小一致。相同条件下 4 个克隆子中 IL-4-1 表达量最高, 其次是 IL-4-2 和 IL-4-4, IL-4-3 基本无表达(图 2)。选取表达量最高的 IL-4-1 进行大量表达, 以不加 IPTG 诱导产物作为对照, 进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。结果显示: IL-4-1 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导 5 h 后, 在  $28 \times 10^3$  处有明显条带, 而无 IPTG 诱导组在  $28 \times 10^3$  处无明显条带, 见图 3。



M: 蛋白质分子量标记物; 1: IL-4-1; 2: IL-4-2; 3: IL-4-3; 4: IL-4-4。

图 2 挑取不同克隆子表达 IL-4 蛋白

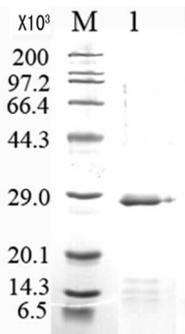


M: 蛋白分子量标记物; 1、2: IPTG 诱导表达; 3: 无 IPTG 诱导表达。

图 3 表达 IL-4-1

**2.3 IL-4 的纯化** 将大量表达的 IL-4-1 采用 Ni-NTA 亲和纯化柱在变性条件进行了纯化。结果表明, 在  $28 \times 10^3$  处出现了单一条带, 与目的蛋白大小一致, 见图 4。

**2.4 IL-4 蛋白的鉴定** 为了确定表达的蛋白即为目的蛋白 IL-4, 对表达的 IL-4-1 蛋白进行了 Western blot 鉴定。结果显示, 得到的条带大小与诱导表达的蛋白条带大小一致, 融合蛋白为  $28 \times 10^3$  左右, 说明表达的蛋白正确, 为 IL-4 目的蛋白。图 5 中, 进行 SDS-PAGE 电泳时, 分别上样 IL-4 表达产物粗提物 2  $\mu\text{L}$ (泳道 1), 5  $\mu\text{L}$ (泳道 2) 和 10  $\mu\text{L}$ (泳道 3), 然后转膜进行 Western blot, 上样量比较合适, 只出现了特异性的 IL-4 条带; 随着上样量的增加, 泳道 2 和泳道 3 出现了少量非特异性的条带, 见图 5。



M: 蛋白分子量标准参照物(Broad, Takara)

图 4 纯化 IL-4-1



图 5 Western blot 鉴定表达的 IL-4-1

### 3 讨论

IL-4 和 IL-13 享用一条受体链和信号传导系统,因此 IL-4 和 IL-13 功能部分重叠,并在过敏性疾病发病过程中存在一定的相互关系。IL-4 能促进 B 细胞分泌 IgE,促进 TH0 细胞向 TH2 细胞分化,从而促进 IL-4、IL-5 和 IL-13 的分泌。IL-13 能使 B 细胞合成的免疫球蛋白向 IgE 转化,诱导炎症反应。有研究证明,采用受体蛋白同时封阻 IL-4 和 IL-13 的活性,可有效缓解过敏性炎症疾病的症状,抑制疾病的进一步发展<sup>[15]</sup>。本研究克隆表达了人 IL-4 蛋白,可用作抗原为后期筛选全人源抗 IL-4、IL-13 双特异性抗体奠定基础。

pET 表达系统是大肠埃希菌中克隆和表达重组蛋白的最强大系统,由 T7 启动子驱动系统,可高水平的表达外源目的基因。pET101 表达载体是 Invitrogen 公司在 pET 表达载体系列上改进的新产品。其 C 端带有 His tag 标签,用于蛋白的纯化和鉴定。商业线性化的 pET101 载体带有 GTGG 突出序列,只需在引物设计时在引物 5' 端加入 CACC 序列,就可直接将 PCR 产物与载体连接、转化,省去了繁琐的酶切步骤,并且表达的蛋白产量高,完全满足于后期筛选抗体时大量抗原的需求。

pET101 表达载体携带有氨苄西林抗性基因。而本实验中采用了羧苄西林作为抗性选择标记是因为氨苄西林抗性基因编码 β-内酰胺酶分泌到培养基中可水解氨苄西林,使抗生素失活。由于 β-内酰胺酶的催化作用可使培养基中的氨苄西林快速去除,导致非选择性条件,如果质粒不稳定,则会导致质粒丢失或低表达。羧苄西林通常比氨苄西林更为稳定,用羧苄西林代替氨苄西林有助于增加表达量,具有防止质粒丢失的作用,可保证重组质粒的正确性及质量。

### 参考文献:

[1] Brightling CE, Symon FA, Birring SS, et al. TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 110(6): 899-905.

[2] Nakajima H, Takatsu K. Role of cytokines in allergic airway inflammation [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2007, 142(4): 265-273.

[3] Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web [J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 111(4): 677-690.

[4] Barlow JL, Bellosi A, Hardman CS, et al. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity[J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(1): 191-198.

[5] Long Aidan A. Immunomodulators in the treatment of asthma[J]. Allergy Asthma Proc, 2009, 30(2): 109-119.

[6] O' Byrne PM, Naji N, Gaurreau GM. Severe asthma: future treatments[J]. Clin Exp Allergy, 2012, 42(5): 706-711.

[7] LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, et al. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the the interleukin-4/13 system [J]. Cell, 2008, 132(2): 259-272.

[8] Muntiz M, Brandt EB, Mingler M, et al. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor α 1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis [J]. PNAS, 2008, 105(20): 7240-7245.

[9] Yang XX, Li FX, Wu YS, et al. Association of TGF-beta1, IL-4 and IL-13 gene polymorphisms with asthma in a chinese population [J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2011, 29(3): 273-277.

[10] Minton K. Allergy and Asthma; What 'drives' IL-4 versus IL-13 signalling [J]. Nature Rev Immunol, 2008, 8: 166-167.

[11] Larry B. IL-4 and IL-13 Dual Antagonism, A promising approach to the dilemma of generating effective asthma biotherapeutics[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(8): 769-770.

[12] Moynihan BJ, Tolloczko B, Bassam SE, et al. IFN-γ, IL-4 and IL-13 modulate responsiveness of human airway smooth muscle cells to IL-13[J]. Respir Res, 2008, 9: 84.

[13] Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps [J]. Science, 2003, 300(5625): 1527-1528.

[14] Kabesch M, Schedel M, Carr D, et al. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(2): 269-274.

[15] Oh CK, Geba GP, Molfino N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma [J]. Eur Respir Rev, 2010, 115(19): 46-54.

[14] Eser O, Fidan H, Sahin O, et al. The influence of dexamethomidine on ischemic rat Hippocampus[J]. Brain Res, 2008, 1218(7): 250-256.

[15] Misthos P, Katsaragakis S, Milingos N, et al. Postresection al pu lm onaryoxidat ive stress in lung cancer patients

(收稿日期: 2013-11-23 修回日期: 2014-02-24)

(上接第 1880 页)

The role of one-lung ventilation[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2005, 27(3): 379-383.

[16] 陈仲群, 温凤金. 不同单肺通气模式对肺内分流及氧合的影响[J]. 现代预防医学, 2005, 32(11): 1576-1577.

(收稿日期: 2014-01-18 修回日期: 2014-03-22)