

梭鱼白细胞介素-22 原核表达及活性蛋白的制备

王资生^{1,2} 齐志涛^{1,2} 黄 贝³ 张启焕^{1,2} 仇 明^{1,2} 邵 荣²

1. 盐城工学院海洋技术系/江苏省沿海池塘养殖生态重点实验室, 盐城 224051;

2. 盐城工学院化学与生物工程学院, 盐城 224051;

3. 中国科学院水生生物研究所/淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

摘要 根据梭鱼 IL-22 cDNA 序列设计特异性引物,从梭鱼脾脏中扩增 IL-22 用于表达片段,连接至载体 pUC57。分别以 *Bam*H I 和 *Kpn* I 对含有目的基因的质粒和 pQE-30 进行酶切,连接并转化到大肠杆菌 M15 中,以 IPTG 进行诱导表达。表达产物通过 Ni-NTA 亲和层析进行纯化。经 SDS-PAGE 对表达产物进行鉴定。SDS-PAGE 显示该 IL-22 表达质粒经 IPTG 诱导后,IL-22 重组蛋白主要在菌体培养上清中表达。通过优化蛋白表达及纯化方法,成功获得了梭鱼 IL-22 活性蛋白。

关键词 梭鱼; 白细胞介素-22; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号 S 917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)06-0752-04

白细胞介素(interleukin, IL)-22, 又称 IL-10 相关的 T 细胞衍生的可诱导因子(IL-10 related T cell-derived inducible factor, IL-TIF), 由 Dumoutier 等^[1]用 IL-9 刺激的 T 淋巴细胞瘤细胞中得到。IL-22 主要由活化 T 细胞、NK(nature killer)细胞、肥大细胞、B 细胞及嗜酸性粒细胞分泌^[2]。IL-22 能够诱导 BD-1(β -defensin-1)、S100A7 (psoriasin)、S100A8 和 S100A9 等抗炎基因及抗菌蛋白 RegIII β 、RegIII γ 、lipocalin-2 及一氧化氮合酶(iNOS)的表达^[3-6], 提示哺乳类 IL-22 在炎症反应及细菌免疫中具有重要的免疫调节作用。

然而,直到近年才有低等脊椎动物 IL-22 基因的相关报道。2006 年, Igawa 等^[7]首次在斑马鱼中发现了 IL-22 基因,发现斑马鱼 IL-22 与哺乳类 IL-22 具有相同的基因组结构(5 个外显子/4 个内含子)。Qi 等^[8]报道了两栖类模式动物非洲爪蟾 IL-22 基因,该基因与人和斑马鱼的相似性分别为 40.6% 和 14.1%。但目前关于鱼类 IL-22 的研究多局限在基因克隆及表达分析上,关于 IL-22 对下游基因的表达调控的研究相对较少。获得某些基因的活性蛋白,能够在蛋白质水平上对某些基因的功能进行阐述。真核表达系统操作流程相对复杂、价格

昂贵。因此,构建合适的原核表达载体,通过优化表达及纯化方法来获得 IL-22 蛋白,对于深入研究某些基因的功能具有重要的意义。

梭鱼(*Liza haematocheila*), 为鲮科鱼类,肉细味美、营养丰富,是我省沿海地区重要的经济鱼类之一。梭鱼具有广盐、广温性及食性广、食物链短、生长快等优点。随着梭鱼人工育苗和淡化放养技术的研究成功,梭鱼已成为淡水养殖尤其是沿海滩涂的重要养殖对象^[9]。正是由于梭鱼良好的经济和食用价值,国际生物学计划海洋生产力组(IBM/PM)与联合国粮农组织一起将梭鱼等鲮科鱼类的研究列为国际生物学的研究课题之一。笔者在前期克隆获得梭鱼 IL-22 cDNA 全长序列的基础上,构建原核表达质粒,通过改良蛋白纯化及洗脱的方法,获得了梭鱼 IL-22 活性蛋白,旨在为深入研究低等脊椎动物 IL-22 的生物学活性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 所需溶液、培养基及缓冲液

K-phosphate 溶液(1 L): 含 K_2HPO_4 125.4 g, KH_2PO_4 23.1 g, pH 6.8, 高压蒸汽灭菌(126 $^{\circ}C$, 15 min)。

收稿日期: 2012-04-05

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2011418)、江苏省省属高校自然科学基金项目(10KJB240001)和盐城工学院人才引进项目(XKR2011007)

王资生, 博士, 副教授。研究方向: 鱼类病理学与分子生物学。E-mail: wzs@ycit.cn

TB培养基(1 L):蛋白胨 12 g;酵母抽提物 24 g;甘油 4 mL,灭菌后加入 100 mL K-phosphate 溶液。

裂解缓冲液(Lysis buffer, LB)(1 L):Tris-HCl 50 mmol/L;NaCl 5 mmol/L;MgCl₂ 5 mmol/L; β -巯基乙醇 5 mmol/L;甘油 20%;NP-40 0.1%;加入咪唑至 2 mmol/L,调节 pH 至 8.0,过滤除菌。

漂洗缓冲液-1(Washing buffer-1, WB-1):在 LB 溶液中加入咪唑浓度至 20 mmol/L,pH 为 8.0。

漂洗缓冲液-2(Washing buffer-2, WB-2):Tris-HCl 20 mmol/L;NaCl 100 mmol/L;KCl 100 mmol/L;MgCl₂ 5 mmol/L; β -巯基乙醇 5 mmol/L;甘油 20%;NP-40 0.1%;加入咪唑至 50 mmol/L,调节 pH 至 7.5,过滤除菌。

漂洗缓冲液-3(Washing buffer-3, WB-3):在 WB-2 溶液中加入咪唑浓度至 100 mmol/L,pH 为 7.5。

洗脱缓冲液-1(EB-1):Tris-HCl 20 mmol/L;NaCl 100 mmol/L;MgCl₂ 5 mmol/L;KCl 100 mmol/L; β -巯基乙醇 5 mmol/L;甘油 20%;NP-40 0.1%;加入咪唑至 250 mmol/L,调节 pH 至 7.5,过滤除菌。

洗脱缓冲液-2(EB-2):在 EB-1 溶液中加入咪唑浓度至 500 mmol/L,pH 为 7.5。

1.2 梭鱼 IL-22 基因原核表达载体的构建

根据梭鱼 IL-22 cDNA 序列(GenBank 登录号: JF960524)设计特异性引物 Ex₋₂₂F: GGATCCACCCGCTGAATCAAC(含有 *Bam*H I 酶切位点)和 Ex₋₂₂R: GGTACCTCACTGAT-TCTTCTTC(含有 *Kpn*I 酶切位点),以梭鱼脾脏 cDNA 为模板扩增目标序列。PCR 反应条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 90 s,35 个循环;72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测,回收纯化目的片段。之后将目的片段克隆至 pUC57 载体上,转化大肠杆菌 M15。提取质粒,以 *Bam*H I 和 *Kpn*I 对目的序列和 pQE-30 质粒分别进行双酶切,37 °C 过夜。将酶切产物进行连接(16 °C,过夜),10 μ L 连接体系包括:6 μ L xelFN- λ 1 cDNA 酶切产物,2 μ L pQE-30 酶切产物,1 μ L 10 \times T4 ligase buffer,1 μ L T4 DNA 连接酶。连接产物转化大肠杆菌 M15 感受态细胞,PCR 筛选重组克隆,测序检查有无移码或突变。

1.3 梭鱼 IL-22 重组蛋白表达检测

测序正确的表达菌株按照 1:100 接种于 10 mL 含卡那霉素(50 μ g/mL)和 100 μ g/mL 氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)的 LB 培养液中,30 °C 200 r/min 培养至菌液 D_{600} 为 0.4~0.6。取出 1 mL 菌液分别作为阴性对照,剩余菌液加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,然后继续以上述条件进行培养。培养 3 h 后,取出 1 mL 作表达分析。为了检测融合蛋白的表达形式,另外取出诱导后的重组质粒菌液 2 mL,离心收集菌体,用 200 μ L PBS 重悬,超声波处理(15 W,超声 10 s,间隔 10 s)20 min。破碎产物于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集上清,沉淀用 100 μ L 的 PBS 重悬。表达产物用变性不连续 SDS-PAGE 电泳分析。

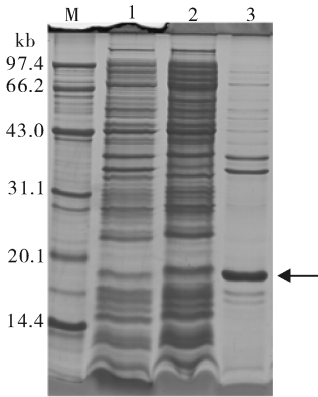
1.4 梭鱼 IL-22 重组蛋白的纯化

扩大培养 500 mL 表达菌液,收集的菌液用裂解缓冲液(LB)重悬(每 100 mL 菌液加入 1 mL 裂解溶液),4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 离心收菌,超声波破碎(15 W,超声 10 s,间隔 10 s)20 min,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,收集上清。将 Ni-NTA 树脂加到蛋白纯化重力柱中,加入 600 μ L LB 溶液进行平衡纯化柱。将细胞裂解上清液加到纯化柱中,于冰上静置 30 min 后,流出液相,收集流出液。重新将流出的液体上柱,重复过柱 1 次并收集流出液备用。依次加入 LB(5 mL)、WB-1、WB-2 和 WB-3 进行漂洗(每个 WB 溶液重复 5 次,每次 5 mL);然后加入 EB-1 和 EB-2(每个溶液重复 3 次,每次 1 mL),对所收集的溶液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

2 结果与分析

2.1 梭鱼 IL-22 诱导表达检测

采用特异性引物 Ex₋₂₂F 和 Ex₋₂₂R,以梭鱼脾脏 cDNA 为模板,扩增到约 462 bp 与预期长度一致的特异性条带,经过测序验证是梭鱼 IL-22。分别以 *Bam*H I 和 *Kpn*I 对 IL-22 和 pQE-30 进行双酶切,酶切产物连接并转化大肠杆菌 M15。经 IPTG 诱导后 3 h 后,SDS-PAGE 电泳显示在 17 ku 处出现了 1 条明显的新增蛋白条带,分子质量大小与预计大小一致。对诱导表达细胞进行超声波破碎,检测上清液和沉淀中 IL-22 表达情况,结果显示 IL-22 在上清和沉淀中均有表达,但主要集中在上清中(箭头所示,图 1)。



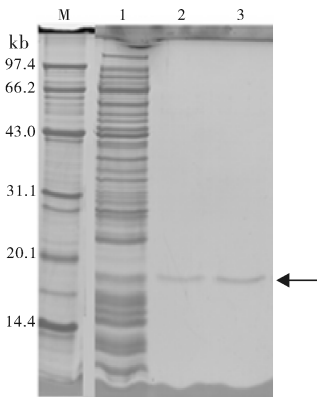
1:未诱导的表达菌株 Uninduced M15 transfected with pQE-30-IL-22 plasmid; 2:超声波破碎菌体沉淀 The sediment of M15 after ultrasonication treatment; 3:超声波破碎菌体上清 Supernate of M15 after ultrasonication treatment; M: 蛋白标记 Protein marker.

图 1 重组梭鱼 IL-22 诱导表达的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the induced expression of IL-22 in *E. coli*

2.2 重组蛋白的纯化

SDS-PAGE 电泳显示,在将含有 IL-22 重组蛋白的 LB 溶液加到 Ni-NTA 树脂中,流出的液体中并不含有 IL-22 重组蛋白(图 2)。在经过漂洗缓冲液 WB_1 、 WB_2 、 WB_3 的漂洗后,以 EB-1 和 EB-2 溶液对目的蛋白进行洗脱。结果显示,EB-1 和 EB-2 溶液均能将 IL-22 重组蛋白从 Ni-NTA 树脂上洗脱,而且洗脱的蛋白呈单一性,大小与 IL-22 重组蛋白预期大小一致(箭头所示,图 2)。



1:上柱流穿 The solution flow the column; 2:EB-1 洗脱 Solution washed by EB-1; 3:EB-2 洗脱 Solution washed by EB-2; M:蛋白质标记 Protein marker.

图 2 梭鱼 IL-22 蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein of IL-22

2.3 重组蛋白质量浓度测定

以 Nano Top(Thermal)在 260 nm 处检测纯化蛋白吸光度,并换算成蛋白质的质量浓度。结果显示,所纯化的蛋白质量浓度为 0.12 mg/mL。进一步以不同浓度的 BSA 为参照,采用 SDS-PAGE 方法验证了纯化蛋白纯度及浓度,结果显示,所纯化的蛋白为单一条带,浓度与 Nano Top 所检测的质量浓度一致(图 3)。

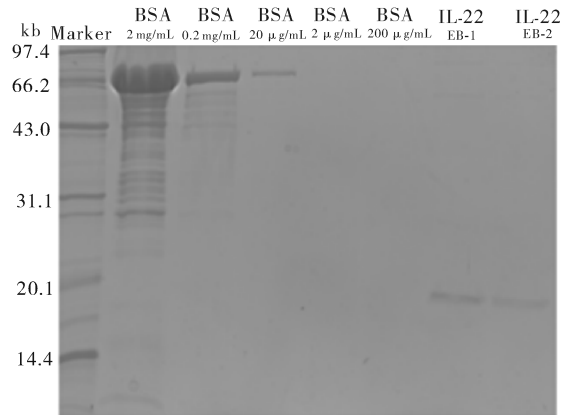


图 3 梭鱼 IL-22 重组蛋白浓度检测

Fig. 3 The concentration of recombinant protein of IL-22

3 讨论

目前,对于低等脊椎动物 IL-22 的研究主要集中在基因克隆和表达分析上,而对于 IL-22 功能的研究则相对较少。Qi 等^[8]发现非洲爪蟾 IL-22 在 LPS 和 PolyI:C 在脾脏和肠中呈上调表达。Monte 等^[10]制备了虹鳟 IL-22 活性蛋白,检测了虹鳟 IL-22 的生物活性。结果显示,虹鳟 IL-22 能够上调 β -defensin 等多种抗菌肽表达。上述研究提示低等脊椎动物的 IL-22 可能与哺乳动物 IL-22 具有相似的功能,在炎症反应、免疫系统调控中发挥着重要的功能。

笔者在已有梭鱼 IL-22 cDNA 序列的基础上,通过设计特异性引物扩增并克隆到 462 bp 的梭鱼 IL-22 序列,构建了重组质粒 IL-22/pQE30,并转化 M15 表达菌株,经 IPTG 诱导,梭鱼 IL-22 重组蛋白在 M15 菌株中成功表达。进一步通过对细菌破碎后的沉淀和上清中重组蛋白进行分析,发现重组 IL-22 主要存在于上清中,分子质量约为 17 ku,表明 IL-22 重组蛋白并不是以包涵体形式存在,而是以可溶蛋白的形式存在。采用 Ni-NTA 树脂亲和层

析纯化该重组蛋白,得到了质量浓度为0.12 mg/mL的重组蛋白。为了保证获得蛋白的活性,本研究并未使用尿素对重组蛋白进行纯化,而是采用了较为温和的咪唑来进行重组蛋白的洗脱,这样就保证了重组蛋白的生物学活性^[11]。该研究为深入研究梭鱼 IL-22 基因的功能奠定了基础,同时也为获得鱼类乃至真核生物其他免疫基因的活性蛋白提供了重要的借鉴。

参 考 文 献

- [1] DUMOUTIER L, LOUAHED J, RENAULD J C. Cloning and characterization of IL-10-related T cell derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9 [J]. *J Immunol*, 2000, 164(4): 1814-1819.
- [2] GURNEY A L. IL-22, a Th1 cytokine that targets the pancreas and select other peripheral tissues [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(5): 669-677.
- [3] WOLK K, KUNZ S, WITTE E, et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues [J]. *Immunity*, 2004, 21(2): 241-254.
- [4] ZHENG Y, VALDEZ P A, DANILENKO D M, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens [J]. *Nat Med*, 2008, 14(3): 282-289.
- [5] ZIESCHÉE, SCHEIERMANN P, BACHMANN M, et al. Dexamethasone suppresses interleukin-22 associated with bacterial infection *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157(3): 370-376.
- [6] OUYANG W, VALDEZ P. IL-22 in mucosal immunity [J]. *Mucosal Immunol*, 2008(1): 335-338.
- [7] IGAWA D, SAKAI M, SAVAN R. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost; IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals [J]. *Mol Immunol*, 2006, 43(7): 999-1009.
- [8] QI Z T, NIE P. Comparative study and expression analysis of the interferon gamma gene locus cytokines in *Xenopus tropicalis* [J]. *Immunogenetics*, 2008, 60(11): 699-710.
- [9] 李国峰, 周辑成, 顾军, 等. 滩涂梭鱼和油菜品种 CH12 轮作的高效技术研究 [J]. *江苏农业科学*, 2009(6): 317-318.
- [10] MONTE M M, ZOU J, WANG T H, et al. Cloning, expression analysis and bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-22 [J]. *Cytokine*, 2011, 55(1): 62-73.
- [11] QI Z T, NIE P, SECOMBES C J, et al. Intron-containing type I and type III IFN coexist in amphibians: refuting the concept that a retroposition event gave rise to type I IFNs [J]. *J Immunol*, 2010, 184(9): 5038-5046.

Prokaryotic expression and preparation of *Liza haematocheila* interleukin-22 protein with biological activity

WANG Zi-sheng^{1,2} QI Zhi-tao^{1,2} HUANG Bei³
 ZHANG Qi-huan^{1,2} QIU Ming^{1,2} SHAO Rong²

1. Key Laboratory of Aquaculture and Ecology of Coastal Pool of Jiangsu Province / Department of Ocean Technology, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China;
2. Chemical and Biological Engineering College, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China;
3. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology / Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Abstract To construct a prokaryotic expression system of *Liza haematocheila* interleukin (IL)-22, the partial IL-22 gene was cloned from spleen using the specific primers by PCR and inserted into pUC57 vector. Then, the plasmid and pQE-30 vector were digested with *Bam*H I and *Kpn* I, ligated and subcloned into M15. The IL-22 protein was expressed by IPTG induction, purified by Ni-NTA and confirmed by SDS-PAGE. The SDS-PAGE result showed that after induced by IPTG, the IL-22 was expressed successfully in M15, and mainly expressed in supernatant. The results indicated that the IL-22 prokaryotic expression vector was constructed successfully and the recombinant protein possessed biological activity.

Key words *Liza haematocheila*; interleukin-22; prokaryotic expression; protein purification

(责任编辑:边书京)