

人 IL-37b 在大肠埃希菌中的表达、纯化及活性鉴定

李梦媛, 韦荣飞, 徐大模, 杨星九, 高 苒*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100121)

【摘要】 目的 表达重组 IL-37b 蛋白并去除内毒素, 鉴定其活性。方法 构建原核表达载体 pET28/IL-37b, 转化大肠杆菌感受态细胞; 经 IPTG 诱导表达的重组蛋白由 Ni²⁺-NTA 凝胶进行变性条件下的亲和层析纯化; 用 SDS-PAGE 分析、考马斯亮蓝染色鉴定重组蛋白是否为目的蛋白; 去除蛋白中原核表达所产生的内毒素; 将蛋白作用于受 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞, 收集培养上清, 通过 ELISA 方法检测 IL-6 的表达水平, 鉴定蛋白的生物学活性。结果 表达了纯度较好的重组 IL-37b 蛋白, 降低了其中原核表达所产生的内毒素, 经鉴定其具备良好的生物学活性。结论 成功表达了具备良好生物学活性的 IL-37b 蛋白。

【关键词】 IL-37b; 表达; 纯化; 生物学活性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 03-0020-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.03.004

Expression, purification and activity assay of human IL-37b in *E. coli*

LI Meng-yuan, WEI Rong-fei, XU Da-mo, YANG Xing-jiu, GAO Ran*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of recombinant IL-37b protein and removal of the endotoxin, and identify its biological activity. **Methods** The prokaryotic expression vector pET28/IL-37b was constructed and to transform *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta. After induction with IPTG, the recombinant protein was purified through Ni²⁺-NTA gel column and identified by SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining. Then, the endotoxin protein was removed and was treated with LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The culture supernatant was collected. The expression of IL-6 was detected by ELISA and the biological activity of the protein was identified. **Results** The recombinant IL-37b with high purity was expressed and the endotoxin produced by prokaryotic expression was reduced, and it was identified to have good biological activity. **Conclusions** In this study a recombinant IL-37b protein with high biological activity is successfully obtained.

【Key words】 IL-37b; Expression; Purification; Biological activity

IL-37 是 IL-1 家族细胞因子, 最初被发现时被命名为 IL-1F7^[1], 目前是 IL-1 家族中唯一一个没有在小鼠体内发现有同类分子的细胞因子^[2]。IL-37 的基因包含 6 个外显子, 其编码产物有 a、b、c、d、e

共 5 种亚型, 其中, 外显子 1~3 编码 IL-37 前体蛋白的 N 末端, 外显子 4~6 编码 C 末端 IL-1 样细胞因子结构^[3]。IL-37b 是五种亚型中序列最长的一个, 共有 218 个氨基酸, 含有外显子 1、2、4、5、6; 其

【基金项目】 中央级公益性科研院所基本科研业务费。

【作者简介】 李梦媛(1988-), 女, 研究方向: 免疫学。E-mail: limengyuan767@126.com

【通讯作者】 高苒(1980-), 女, 研究方向: 肿瘤学、免疫学。E-mail: gaoran26@hotmail.com

序列在 N 端有一段前导序列,其中存在一个 caspase-1 切割位点,IL-37b 前体分子经 caspase-1 切割修饰后成为成熟分子移入细胞核^[4,5]。近年来,大量研究已证实 IL-37b 具有生物学活性,其能够作为炎症抑制因子抑制多种免疫细胞的炎症反应,进而调节固有免疫应答,IL-37b 对外源性刺激诱导的结肠炎、关节炎、胰腺炎等多种炎症性疾病中都能够发挥抗炎作用^[6-11]。

目前,国外已有商品化的 IL-37b 蛋白,但价格比较昂贵,商品包装量较少。本实验通过成本较低廉、操作较便捷的技术手段大量表达 IL-37b 蛋白,并对其生物学活性进行了鉴定,为进一步研究 IL-37b 在相关炎症性疾病中的机制提供了条件。

1 材料和方法

1.1 材料

含有全长 IL-37b 编码区基因的质粒 pGEM-T-IL-37b 以及表达载体由本实验室保存,大肠杆菌 DH5 α 购自天根生物公司,Taq 聚合酶、限制性内切酶、pET28a(+) 质粒等购自 Takara 公司,质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司。 Ni^{2+} -NTA 凝胶购自 Novagen 公司,透析袋购自北京自亮蓝生物公司,尿素、Tris-Cl、 NaH_2PO_4 、考马斯亮蓝等化学试剂购自 Amresco 公司。内毒素去除和检测试剂盒购自金斯瑞生物公司,IL-37 抗体购自 Abcam 公司,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物公司。RAW 264.7 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所,LPS(Lipopolysaccharide) 购自 Sigma 公司,ELISA 试剂盒购自 R&D 公司,96 孔酶标板购自 COSTAR 公司,预染蛋白分子量 marker 与 BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自 Thermo 公司。引物合成服务由英潍捷基(上海)公司提供,DNA 序列测定服务由北京美吉生物提供。

1.2 方法

1.2.1 IL-37b 基因的克隆与表达载体的构建

IL-37b 基因模板来自本实验室制备的含 IL-37b 全长编码区基因的质粒 pGEM-T-IL-37b。以质粒 pGEM-T-IL-37b 为模板,通过 PCR 技术对 IL-37b 编码区基因进行扩增。上游引物 F1:5'-GGAATCCA TATGTCCTTTGTGGGGAGAAC-3' (下划线为 *Nde I* 酶切位点);下游引物 F2:5'-CGGAATTCCTA ATCGCTGACCTCACTGGGGCTC-3' (下划线为 *EcoR I* 酶切位点)。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$

30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;扩增 30 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,并进行胶回收,收集扩增的目的基因片段,用于连接构建表达载体。用限制性内切酶 *EcoR I* 和 *Nde I* 分别对目的基因的 PCR 产物与表达载体 pET28a(+) 进行双酶切,再次进行琼脂糖凝胶电泳,通过胶回收纯化收集酶切产物,于室温过夜连接,构建表达载体。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,取 100 μL 转化液均匀涂布于具有卡那霉素抗性的 LB 平板,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中倒置培养。次日,挑选菌落进行 PCR,通过琼脂糖凝胶电泳鉴定结果后,将阳性克隆进行 DNA 测序鉴定,检测 IL-37b 基因片段是否正确插入,阳性克隆质粒命名为 pET28/IL37b。

1.2.2 重组蛋白的表达与纯化

转化重组质粒 pET28/IL-37b 进入大肠杆菌感受态细胞后,将其均匀涂布于具有卡那霉素抗性的 LB 平板上,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中倒置培养过夜。次日,挑取单个菌落接种至 3~4 mL LB 液体培养基中,进行少量培养。将培养的菌液按 1:500 的体积比接种到更多 LB 液体培养基中,进行 37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 振荡培养,每隔一段时间检测菌液 OD₆₀₀ 值。培养至菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.5~0.6 时,加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 诱导菌体表达蛋白,继续 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养。培养 16~18 h 后,以 4 $^{\circ}\text{C}$,4000 r/min 条件离心 30 min,收集菌体沉淀。用 PBS 重悬沉淀,经超声破碎,12000 r/min 再次离心 20 min,分别取细菌裂解产物的上清与沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,分析目的蛋白的表达形式^[12]。电泳结果显示细菌裂解产物的上清和沉淀中都有外源性重组蛋白表达的条带,表明重组 IL-37b 具有可溶性和包涵体两种表达形式。由于沉淀中的目的重组蛋白较多,故再次实验时诱导表达 1 L 菌液,离心并超声破碎菌体后,收集其沉淀进行纯化。重组 IL-37b 蛋白带有 6 个 His 标签,采用 Ni^{2+} -NTA 凝胶进行变性条件下的亲和层析纯化,变性结合缓冲液为 8 mol/L 尿素,0.1 mol/L NaH_2PO_4 ,0.01 mol/L Tris-Cl,pH 8.0;变性漂洗缓冲液为 8 mol/L 尿素,0.1 mol/L NaH_2PO_4 ,0.01 mol/L Tris-Cl,pH 6.3;变性洗脱缓冲液为 8 mol/L 尿素,0.1 mol/L NaH_2PO_4 ,0.01 mol/L Tris-Cl,pH 4.5;具体步骤按 Merck 的 His Tag 蛋白纯化操作手册进行。纯化完成后,通过 PBS 对重组蛋白进行透析复性,除去其中的尿素,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境透析 24 h,每 2~3 h 更换一次透析液。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳与 Western blot

配制 12 ~ 15% 的分离胶,将纯化蛋白过程中收集的各组溶液进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后,用考马斯亮蓝对电泳胶染色,至能明显观察到 marker 与蛋白条带后,用乙酸脱色液洗涤至条带清晰,于紫外显影仪下观察蛋白条带。另外对一块胶进行转膜,将蛋白条带电转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭,按 1:1000 的比例用 IL-37 抗体 4 °C 孵育过夜。次日,用 0.1% 的 PBST 洗膜去除非特异性结合,加入 1:5000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG,洗膜后加显影液,观测蛋白条带。

1.2.4 去除重组蛋白内毒素并鉴定内毒素残留量

使用金斯瑞生物的内毒素去除试剂盒与内毒素检测试剂盒,通过凝胶吸附法除去重组蛋白溶液中的内毒素,并检测去除内毒素后蛋白中内毒素残留量。

去除内毒素前调节蛋白溶液 pH 至 6.0 ~ 9.0 之间,以达到更好的去除效果。首先使用 3 ~ 4 倍柱体积的再生缓冲液活化柱中的内毒素吸附树脂,控制流速在 0.25 mL/min,确保体系内无热原;随后用 3 ~ 4 倍柱体积的平衡缓冲液平衡树脂,流速控制在 0.5 mL/min;开始去除内毒素,加入样品,流速控制在 0.25 mL/min,用无热原接收管收集流出液;柱子经再生后可重复使用或 4 °C 保存。

用试剂盒中的无热源水溶解鲎变形细胞溶解物 (limulus amoebocyte lysate, LAL) 检测蛋白溶液中的内毒素含量。按 1:50 ~ 1:3200 梯度稀释重组蛋白样品;分别将 0.1 mL 的 LAL 溶液与同体积的蛋白样品混匀,37 °C 孵育 1 h,观察 LAL 与蛋白样品是否凝固成胶状物质。按样品的稀释倍数计算内毒素含量,若其含量达不到预期要求,可对柱中树脂进行再生,再次去除内毒素。

1.2.5 重组蛋白生物学活性的鉴定

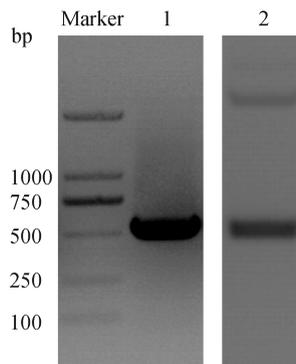
采用 0.05 ~ 200 ng/mL 不同浓度梯度的重组蛋白与终浓度 1 μg/mL LPS 共同作用于 RAW 264.7 细胞,37 °C 培养细胞 24 h 后,收集培养上清,通过 ELISA 方法检测上清中 IL-6 的表达量。步骤如下,提前 1 d 在 96 孔板上包被捕获抗体,室温过夜。次日弃去旧液,用 0.05% 的 PBST 洗涤 3 次,用 1% BSA 室温封闭 1 h。弃去旧液,洗涤后加入收集的细胞培养上清样品与稀释好的标准品,室温封闭 2 h。弃去旧液,洗涤后加入检测抗体,室温封闭 2 h。弃去旧液,洗涤后加入 HRP,避光室温孵育 20 min。弃去旧液,洗涤 3 次,加入按体积比 1:1 混合的显色

液 A 液与 B 液,避光孵育 10 ~ 20 min,随后加入终止液终止显色反应。通过酶标仪检测 450 nm 波长处的 OD 值,按照 OD 值绘制标准曲线,并通过其方程计算样品中 IL-6 表达量。

2 结果

2.1 表达载体的构建与鉴定

PCR 扩增产物在 500 bp 左右有一条符合预期结果的目的基因条带,如图 1 所示;质粒经 *EcoR* I、*Nde* I 双酶切后,在 500 bp 左右处也有一条与目的基因大小相符的条带。DNA 测序结果与 BLAST 分析显示 PCR 扩增出的片段无碱基突变;构建的表达质粒 pET28/IL-37b,通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆,扩增出的基因片段同样在 500 bp 处,也与预期结果相符。对阳性克隆进行 DNA 测序,结果显示 IL-37b 基因片段正确插入表达载体 pET28a(+) 质粒中,碱基无突变,可进一步用于目的蛋白的诱导表达。



注:1:IL-37b 基因的 PCR 产物;2:pET28a/IL-37b 质粒经 *Nde* I/*EcoR* I 双酶切的结果。

图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 与酶切产物

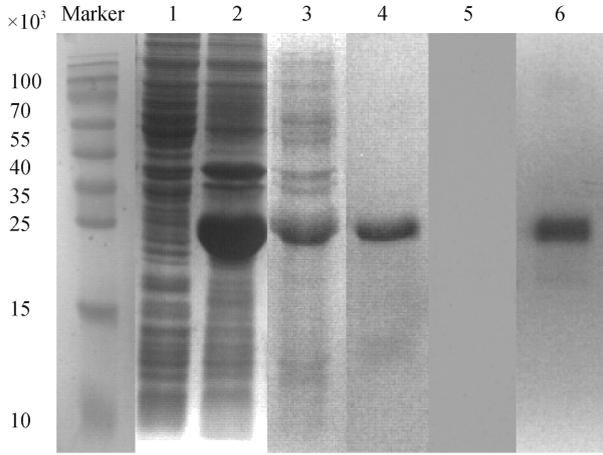
Note. 1: PCR Results of IL-37b gene;

2: Result of pET28/IL-37b by *Nde* I/*EcoR* I digestion.

Fig. 1 Identification of PCR and dual-enzyme digestion products by agarose gel electrophoresis

2.2 重组蛋白的表达与鉴定

SDS-PAGE 电泳结果如图 2 所示,经 IPTG 诱导后,菌液在 25 kDa 左右处有一条与预期相符合的高表达外源性蛋白条带,与预期蛋白的相对分子量相符合;纯化后的蛋白中除一条目的条带外未见其他条带;Western Blot 结果显示诱导表达的重组 IL-37b 能够与相应的 IL-37 抗体产生特异性结合,其条位置正确,大小相符^[6,13],而未经 IPTG 诱导的菌液裂解产物的 Western Blot 结果则没有相应的条带。经检测从 1 L 大肠杆菌培养液的菌体沉淀中共纯化得到约 40 mg 左右的重组 IL-37b 蛋白。



注:1:未经 IPTG 诱导的菌体裂解液;2:经 IPTG 诱导的菌体裂解液;3:经 IPTG 诱导的菌体裂解液沉淀;4:纯化后的 IL-37b;5:未经 IPTG 诱导的菌体蛋白的 Western blot 结果;6:重组 IL-37b 的 Western blot 结果。

图 2 IL-37b 纯化的 SDS-PAGE 分析以及 Western blot 鉴定
 Note. 1: Total cell lysates before IPTG induction; 2: Total cell lysates after IPTG induction; 3: IPTG-induced cell lysate precipitation; 4: Purified IL-37b protein; 5: Western blot analysis of bacterial proteins before IPTG induction; 6: Western blot for recombinant IL-37b protein.

Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of the purified IL-37b

2.3 去除重组蛋白内毒素并鉴定内毒素残留量 内毒素检测试剂

盒中 LAL 的灵敏度为 0.25 EU/mL, 计算公式: 内毒素含量 = 0.25 × 样品稀释倍数/样品浓度。经公式计算去除内毒素后重组 IL-37b 的内毒素残留量范围大约在 0.04 ~ 0.07 EU/μg 范围内。(见表 1)

表 1 重组 IL-37b 中的内毒素残留量

Tab. 1 The amount of endotoxin remaining in the recombinant IL-37b

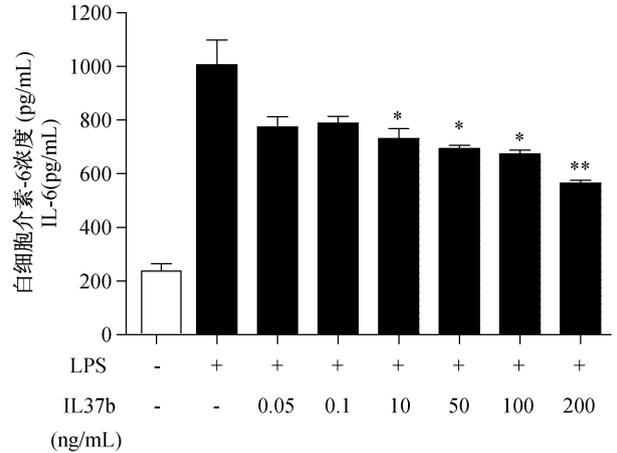
重组 IL-37b 样品的稀释倍数	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
Dilution ratio of recombinant IL-37b samples	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
样品状态 Sample state	+	+	+	-	-	-
内毒素含量 (EU/mL) Content of bacterial endotoxin	12.5	25	50	100	200	400

注:“+”:样品凝固;“-”:样品未凝固。
 Note. “+”:The sample solidified;“-”:The sample was not solidified.

2.4 重组蛋白生物学活性的鉴定

用 RAW 264.7 细胞检测重组 IL-37b 对 LPS 刺

激的抑制作用。如图 3 所示,重组 IL-37b 在 0.05 ~ 200 ng/mL 时均能够抑制 LPS 刺激引起的 IL-6 的表达;且蛋白浓度在 10 ~ 200 ng/mL 时与 LPS 对照组相比差异显著,表明以此种方式诱导表达的 IL-37b 具有良好的生物学活性。



注:与 LPS 对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

图 3 IL-37b 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 IL-6 表达量的影响

Note. Compared with the LPS control group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Fig. 3 Effect of IL-37b on IL-6 production on LPS stimulated RAW 264.7 cells

3 讨论

本实验通过原核表达的方式大量生产包涵体形式的 IL-37b 蛋白,随后复性使其恢复生物学活性。SDS-PAGE 电泳结果显示经变性纯化的 IL-37b 中基本无其他杂蛋白条带;Western blot 结果显示重组 IL-37b 能够与相应的 IL-37 抗体产生特异性结合,其条带清晰,大小正确,与文献报导相符^[6,13]。证明通过本实验的纯化方式能够快捷、大量地得到纯度较好的 IL-37b。

LPS 系革兰阴性菌细胞壁外表层的内毒素脂多糖,在细菌死亡细胞受到破坏后释放。LPS 性质稳定,耐高温,能够引起发热、微循环障碍、内毒素休克等症^[14]。实验中,通过凝胶吸附法去除了重组 IL-37b 样品中的大部分内毒素,降低了 IL-37b 在发挥治疗与免疫功能的过程中对细胞、机体产生的毒副作用,也减小了将其应用于其他实验研究时产生的误差。

细菌、病毒感染以及 IL-1、TNF-α 等细胞因子均可诱导正常细胞产生 IL-6,IL-6 能够刺激参与免疫反应的细胞增殖、分化并提高其功能,如诱导 Th17 细胞分化、B 细胞抗体表达等,是机体炎症反应的标

志性细胞因子之一^[15]。本实验中,通过 ELISA 方法检测 RAW 264.7 细胞中 IL-6 的表达量,以此检测重组蛋白对促炎性细胞因子的抑制作用。RAW 264.7 细胞系小鼠来源的单核巨噬细胞,自身不表达 IL-37,避免了对实验的背景干扰^[2];重组 IL-37b 在 0.05 ~ 200 ng/mL 时均能在不同程度上抑制 LPS 刺激引起的 IL-6 的表达;且蛋白浓度低至 10 ng/mL 时,其 IL-6 的表达量与 LPS 对照组相比仍存在显著差异,证明表达的 IL-37b 经纯化后具备良好的生物学活性。

目前,商品化 IL-37 蛋白包装量较少,价格昂贵,有些不具备生物学活性,只能在某些实验中作为对照品使用。本实验成功制备了纯度较好、内毒素含量低并具备良好生物学活性的 IL-37b,为今后进一步研究 IL-37b 在人类各种疾病中发挥的机制提供条件。

参考文献:

- [1] Dinarello C, Arend W, Sims J, et al. IL-1 family nomenclature [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 973.
- [2] Diana B, Davide L, Stefan H, et al. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2011, 22: 127 - 147.
- [3] Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, et al. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(14): 10308 - 10314.
- [4] Sharma S, Kulk N, Nold MF, et al. The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines [J]. *J Immunol*, 2008, 180(8): 5477 - 5482.
- [5] Bulau AM, Nold MF, Li SZ, et al. Role of caspase - 1 in nuclear translocation of IL - 37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses [J]. *PNAS*, 2014,

111(7): 2650 - 2655.

- [6] Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 1014 - 1022.
- [7] McNamee EN, Masterson JC, Jedlicka P, et al. Interleukin 37 expression protects mice from colitis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(40): 16711 - 16716.
- [8] Zhao PW, Jiang WG, Wang L, et al. Plasma levels of IL - 37 and correlation with TNF-a, IL - 17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e95346.
- [9] 姚洪锋, 郭瑜佳, 骆方军, 等. 重症急性胰腺炎小鼠 IL - 37 的动态变化及其意义研究 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2014, 38(6): 764 - 769.
- [10] Bulau AM, Fink M, Maucksch C, et al. In vivo expression of interleukin - 37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis [J]. *Sci World J*, 2011, 11: 2480 - 2490.
- [11] Lunding L, Webering S, Vock C, et al. IL - 37 requires IL - 18Ra and SIGIRR/IL - 1R8 to diminish allergic airway inflammation in mice [J]. *Allergy*, 2015, 70(4): 366 - 373.
- [12] Gu JJ, Gao XM, Pan XH, et al. High-level expression and one-step purification of a soluble recombinant human interleukin - 37b in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2015, 4(108): 18 - 22.
- [13] Smith DE, Renshaw BR, Ketchem RR, et al. Four new members expand the interleukin - 1 superfamily [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(2): 1169 - 1175.
- [14] 郭萌, 李冠民, 黄清泉. 细菌内毒素研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(5): 397 - 401.
- [15] 林丽艳, 张慧云, 何韶衡. IL-6 及其受体与炎症性疾病关系的新进展 [J]. *中国热带医学*, 2008, 8(4): 680 - 682.

[修回日期] 2016 - 08 - 26