

[文章编号] 1000-2200(2008)06-0644-04

· 校庆约稿 ·

## 猪白细胞介素 12 p35、p40 亚基基因的克隆和序列分析

袁远英<sup>1,2</sup>, 方强<sup>2,3</sup>, 孙新<sup>2,3</sup>, 王雪梅<sup>2,3</sup>, 李柏青<sup>1,2</sup>, 夏惠<sup>2,3</sup>

**[摘要]** 目的: 克隆猪白细胞介素(IL)-12 p35、p40 亚基基因, 为制备猪囊尾蚴的复合基因疫苗奠定基础。方法: 分别分离成年猪的外周血单个核细胞和脾细胞, 培养 10 h 后用 IFN- $\gamma$  (100 ng/ml) 刺激增殖 12 h, 随后加入细菌脂多糖 (1  $\mu$ g/ml) 刺激培养 3 h, 分别收集细胞并提取细胞总 RNA, 用 RT-PCR 方法扩增猪 IL-12 p35、p40 cDNA 编码基因, 克隆至 pMD18-T 载体, 经 PCR 和双酶切鉴定后进行序列测定。结果: 猪 IL-12 p35、p40 cDNA PCR 产物电泳结果证明所克隆的基因分别为 616 bp 和 1 011 bp, 基因测序结果与 GenBank 报道的基因序列各有一个碱基差异, 但编码氨基酸无差异, 证实分别为猪 IL-12 p35、p40 cDNA 编码基因。结论: 成功克隆了猪 IL-12 p35、p40 cDNA 编码基因。

**[关键词]** 囊尾蚴病; 白细胞介素 12; p35; p40; RT-PCR; 基因克隆; 序列测定

**[中国图书资料分类号]** R 532.33; R 392.12 **[文献标识码]** A

### Cloning and sequence analysis genes of porcine interleukin-12 p35 and p40 subunit

YUAN Yuan-ying<sup>1,2</sup>, FANG Qiang<sup>2,3</sup>, SUN Xin<sup>2,3</sup>, WANG Xue-mei<sup>2,3</sup>, LI Bai-qing<sup>1,3</sup>, XIA Hui<sup>2,3</sup>

(1. Department of Immunology, 3. Department of Microbiology and Parasitology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

2. Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity at Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To clone genes of encoding porcine interleukin-12 p35 and p40 subunits, for preparing the compound nucleic acid vaccine against the porcine bladder worm. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells and splenic lymphocytes of porcine were isolated and cultured for 10 hours, and stimulated with 100 ng/ml IFN- $\gamma$  for 12 hours, followed by stimulated with 1  $\mu$ g/ml lipopolysaccharide for 3 hours. Total RNA from these stimulated porcine lymphocytes were extracted, cDNA of genes for porcine IL-12 p35 and p40 subunit were amplified by RT-PCR assay and inserted into pMD18-T vector. The cloned genes were sequenced. **Results:** The PCR products of porcine IL-12 p35 and p40 subunits were 616 bp and 1 011 bp, respectively, verified by electrophoresis, sequence analysis for cloned genes in pMD18-T vector showed one base was different in each but none affecting amino acids coding, confirmed to be genes of porcine IL-12 p35 and p40 subunit. **Conclusions:** cDNA encoding porcine interleukin-12 p35 and p40 subunit have been successfully cloned into cloning vector pMD18-T.

**[Key words]** cysticercosis; interleukin 12; p35; p40; RT-PCR; molecular cloning; sequencing

白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12), 又称细胞毒淋巴细胞成熟因子 (CLMF)<sup>[1]</sup> 和自然杀伤细胞刺激因子 (NKSF)<sup>[2]</sup>, 是一种分子量为 75 kDa 的糖蛋白, 由 40 kDa 和 35 kDa 两个亚基经二硫键结合的异源二聚体, p35 决定 IL-12 的种属特异性, p40 在 IL-12 与受体结合时起关键作用<sup>[3]</sup>。IL-12 是一种由巨噬细胞和其它抗原提呈细胞产生的早期炎症细胞因子, 具有广泛的免疫效应: 促进 NK 和 T 细胞的增殖及杀伤作用, 促使细胞因子的分泌, 诱导抗原特异性辅助性 T 细胞 (helper T cell, TH) 向 TH1 分化。近年来, IL-12 作为疫苗佐剂和免疫调节剂受到广泛关注, 通过基因工程构建的重组 IL-12 载体,

已被直接应用于肿瘤基因治疗或作为 DNA 疫苗的基因佐剂因子, 而在猪的基因疫苗中, 国内外均有以 IL-12 作为 DNA 疫苗佐剂的报道<sup>[4,5]</sup>。本研究从猪体不同来源的细胞分别克隆猪 IL-12 的 p35、p40 亚基, 与已发表的序列比较, p35 基因和 p40 基因均只有一个碱基差异且为同源突变, 其编码的氨基酸均相同, 成功获得了编码猪 IL-12 p35、p40 亚基的 cDNA 克隆, 为制备猪囊尾蚴的基因联合疫苗奠定基础。

### 1 材料与方法

1.1 实验动物 成年肉猪, 由蚌埠宏业肉类联合加工有限责任公司提供。

1.2 质粒和受体菌 pMD18-T 载体为 TaKaRa 产品, 大肠埃希菌 *E. coli* 由本室保存。

1.3 工具酶及试剂 Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品, cDNA 合成试剂盒为 Fermentas 公司产品 (#K1621), PrimeSTAR<sup>TM</sup> HS DNA 聚合酶为 TaKaRa 产品, Tap DNA 聚合酶、100 bp plus DNA Ladder 和 1 kb

[收稿日期] 2008-09-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30600518/C030112)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 免疫学教研室, 3. 病原生物学教研室, 安徽蚌埠 233030; 2. 安徽省感染与免疫重点实验室 (蚌埠医学院), 安徽蚌埠 233030

[作者简介] 袁远英 (1982-), 女, 硕士, 研究生。

[通讯作者] 方强, 博士, 研究生导师, 副教授, E-mail: fq333@sohu.com

DNA Ladder 均为 Fermentas 公司产品, *Bam*H I、*Hind* III 和 *Kpn* I 均为 TaKaRa 产品, Ficoll 分离液为上海试剂二厂产品, 其余试剂为国产分析纯。

1.4 引物 根据 Genbank 发表的序列(登录号为 p35:L35765;p40:U08317)共设计两对引物, 其中在 p35 基因的上下游引物中, 划线部分为插入的保护碱基和酶切位点, 引物由上海生工合成, PAGE 纯化。猪 p40S(49-69): AGAGCAAGATGCACCTTCAG; 猪 p40A(1059-1040): CTCCATGGTTTTCTCCCAAG; 猪 p35S(285-302): CCCAGCTCAGGAGCCTCCCTGCAACC; 猪 p35A(878-858): CCCAGCTCTAGATTAGGAAGAATTCAGATAGCT

#### 1.5 细胞的分离培养及总 RNA 提取

1.5.1 猪脾细胞的分离 取新鲜猪脾, 无菌采取脾脏, 立即放入含庆大霉素 100 u/ml 的 Hank's 液中, 冲洗后去其表面被膜、脂肪及结缔组织, 剪成 1 cm × 1 cm × 1 cm 大碎块, 200 目钢网中磨碎过滤。4 ℃ 1 500 r/min 离心 15 min, 去上清; 加入 50 倍量体积的红细胞溶解液(2 × 氯化铵), 充分震荡 1 min 后迅速用 Hank's 液稀释, 4 ℃ 1 200 r/min 离心 5 min, 洗涤细胞 2 次。然后用含 10% 小牛血清 RPMI1640 完全培养液调细胞浓度为 (2~5) × 10<sup>6</sup>/ml, 放入 24 孔板中培养 10 h。

1.5.2 猪外周单核细胞(PBMC)的分离 从猪胸腔静脉采取血 20 ml 肝素抗凝, 加入等量的 Hank's 液稀释后, 加入等量的 Ficoll 分离液, 20 ℃ 水平离心 1 500 r/min 30 min, 小心吸取单个核细胞界面层, Hank's 液洗涤 4 ℃ 1 500 r/min 10 min, 洗涤细胞 2 次。最后用含 10% 小牛血清 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 (2~5) × 10<sup>6</sup>/ml, 放入 24 孔板中培养 10 h。

1.5.3 细胞的刺激培养及总 RNA 的提取 向上述培养 10 h 的细胞中分别加入 IFN-γ(100 ng/ml) 刺激增殖 12 h, 随后加入 LPS(1 μg/ml) 刺激培养 3 h, 分别收集细胞按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 分别用紫外分光光度法测定总 RNA 的纯度和浓度, 1.2% TBE 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量, 选取高质量的 RNA 进行逆转录。

1.6 总 mRNA 的逆转录 按照 Fermentase 公司的 RevertAid™ 第一链 cDNA 合成使用说明操作: 其中在 20 μl 反应体系中, 细胞总 RNA 量为 3~4 μg, oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物, M-MuL V 逆转录酶进行逆转录, 所得 cDNA 立即进行 PCR 或 -20 ℃ 保存待用。

1.7 PCR 猪 IL-12 p35 扩增体系为以反转录后的产物 2 μl 作为扩增的模板, 扩增反应液总体积为 50 μl, 其中 5 × Prime STAR™ 缓冲液 10 μl, dNTP

2 mmol/L, 上下引物各 20 pmol/L, Prime STAR™ HS DNA 聚合酶 0.5 μl, 补加灭菌水至总体积为 50 μl。预加热 94 ℃ 3 min; 然后 94 ℃ 1 min, 58.7 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。猪 IL-12 p40 扩增体系及反应条件与猪 IL-12 p35 相似, 不同之处是退火温度为 58 ℃。扩增结束后取 8 μl PCR 产物, 用 1.2% TBE 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 分别获得 616 bp 和 1 011 bp 两条特异性目的片段, 给予切胶回收纯化。

#### 1.8 目的片段与载体的连接

1.8.1 目的片段的加 A 尾反应 加 A 尾反应体系为: PCR 纯化后产物 1~7 μl, 10 × Taq 缓冲液 1 μl, dATP 0.2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 5 u, 加灭菌水至总体积为 10 μl。70 ℃ 孵育 30 min, 乙醇沉淀加尾产物。

1.8.2 与载体的连接反应 根据 pMD18-T 载体使用说明建立连接反应体系, 取已纯化加了 A 尾端的目的 DNA 0.1~0.3 pmol, pMD18-T 载体 1 μl, Solution I 5 μl, 加灭菌水至总体积为 10 μl, 16 ℃ 30 min 进行连接反应。将连接产物转化 *E. coli* 感受态细胞, 平铺入含 Amp、Xgal、IPTG 的 LB 琼脂平板进行蓝白斑筛选。

1.9 克隆鉴定及序列测定 分别挑取多个白色单菌落, 放入 2 ml 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 ℃ >200 r/min 8 h, 提取质粒 DNA。以提取的质粒 DNA 为模板, 分别以上述引物进行 PCR 扩增鉴定阳性克隆; 根据 T 载体和目的 DNA 所含的酶切位点, 分别对提取的质粒 DNA 进行单双酶切鉴定。将经鉴定的阳性克隆菌送上海生工进行序列测定。

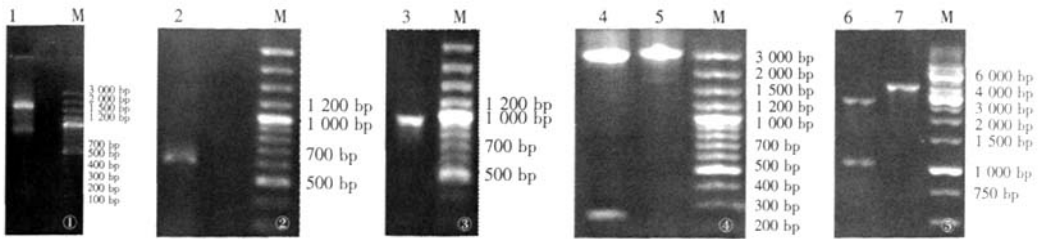
## 2 结果

2.1 RNA 的质量鉴定 分别用紫外分光光度法测定总 RNA 的纯度和浓度, 1.2% TBE 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量。提取的 RNA A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 为 1.8~2.0, 浓度 300~500 μg/ml, 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 条带清晰锐利, 无降解弥散, 28S:18S 的灰度值比约为 2:1, 质量较好(见图 1)。

2.2 猪 IL-12 p40、p35 亚基 cDNA PCR 扩增及阳性克隆的 PCR 鉴定 分别 RT-PCR 从刺激培养的猪 PBMCs 扩增得到猪 IL-12 p35 基因和猪脾淋巴细胞扩增得到猪 IL-12 p40 基因(见图 2、3)。筛选阳性克隆菌时, 通过上述相同的两对引物分别对质粒 DNA 进行 PCR 鉴定, 得到与目的基因大小相近的特异性片段。对猪 IL-12 p35 质粒 DNA, 根据 T 载体和插入片段(660 bp)中各含有一个 *Bam*H I 位点, 用 *Bam*H I 进行双酶切鉴定和用 *Kpn* I 进行单酶

切鉴定,酶切后的小片断与预期的碱基大小相同(249 bp)(见图4)。对猪 IL-12 p40 质粒 DNA,根据 T 载体插入位点两端分别含有 BamH I 和 Hind III

位点而在插入片段中没有,用 Hind III 和 BamH I、Hind III 进行单双酶切鉴定,酶切后的小片断与预期的碱基大小相同(1 045 bp)(见图5)。



M:DNA Marker;1:RNA上样量;2:p35 cDNA PCR产物;3:p40 cDNA PCR产物;4:质粒DNA BamH I 双酶切产物;5:质粒DNA Kpn I 单酶切产物;6:质粒DNA BamH I、Hind III 双酶切产物;7:质粒DNA Hind III 单酶切产物

图1 总RNA琼脂糖凝胶电泳结果 图2 p35 cDNA PCR琼脂糖凝胶电泳结果 图3 p40 cDNA PCR琼脂糖凝胶电泳结果 图4 p35+T载体质粒DNA单、双酶切琼脂糖凝胶电泳结果 图5 p40+T载体质粒DNA单、双酶切琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 序列分析 取阳性质粒送上海生工进行序列测定,结果分别与 GenBank 发表的猪 IL-12 p35 和 p40 亚基基因序列相对比, p35 亚基和 p40 亚基分别在 806 位(G→A)和 114 位(T→C)各有一个碱基差异,但其所编码的氨基酸完全相同,证实为猪 IL-12 p35 和 p40 亚基基因序列。BLAST 比对结果见表 1,其中下划线部分为相应的编码密码子,加阴影部分为与 GenBank 发表的序列上不同的碱基。其中猪 IL-12 p35 的编码基因(285-878)为 594 bp,编码 198 个氨基酸;猪 IL-12 p40 的编码基因(57 - 1 031)为 975 bp,编码 325 个氨基酸。猪 IL-12 亚基的基因克隆序列与 GenBank 的序列比对结果:

p35 亚基

	56	110	649
样品	...TTA GGA.....TAT CA.....GCT CCT		
L35765	...TTA GGA.....TAT CA.....GCT CCT		
	878	806	285

p40 亚基

	41	92	1 014
样品	...ATG CAC.....AT C GTG.....AAT TAG		
U08317	...ATG CAC.....AT T GTG.....AAT TAG		
	57	114	1 031

3 讨论

猪囊尾蚴病在我国被列为五大人畜共患寄生虫病之一,我国的东北、华北、西北和西南的部分地区该病流行较为严重,为了防治猪囊尾蚴病,国内外已研制出各种不同的疫苗。而 IL-12 在抗感染中的作用和在众多已有的联合免疫中表现出良好的分子佐剂效应,使得制备猪 IL-12 和猪囊尾蚴联合疫苗成为可能。既往的研究显示,IL-12 p35 和 p40 两个亚

基由不同基因编码,转录和翻译是独立进行的,然后通过二硫键连接形成有活性的 IL-12。天然 IL-12 p40 单体和(p40)<sub>2</sub> 同二聚体没有生物学活性,而且(p40)<sub>2</sub> 拮抗天然 IL-12 的作用,只有在 p35 和 p40 以 1:1 形式形成异二聚体时才具有活性<sup>[6]</sup>。为了体外获得具有生物学活性的重组猪 IL-12,首先需分别得到猪 IL-12 p35 和 p40 的编码基因。

IL-12 在正常体内少量表达,不足以进行 IL-12 的 p35、p40 亚基的克隆,为获取较多的 PCR 模板,需对细胞来源进行选择和对细胞进行必要的刺激。Hayes 等<sup>[7]</sup>用 IFN-γ 和 LPS 成功刺激人单核细胞表达 IL-12 p35、p40 mRNA,我们借鉴其方法,通过调整不同的刺激时间,最终用 IFN-γ 刺激增殖 12 h,随后加入细菌脂多糖 LPS 刺激培养 3 h 方法得到了目的基因,该刺激方法与其他文献报道不同<sup>[8,9]</sup>。此外,Choi 等<sup>[10]</sup>提出猪 IL-12 p35、p40 mRNA 表达量在猪的不同来源细胞中有所不同,其中 p40 mRNA 的表达量由大到小为脾细胞 > 肺泡巨噬细胞 > PBMC,而 p35 mRNA 则为肺泡巨噬细胞 > PBMC > 脾细胞。本研究通过对猪 PBMCs 和猪脾淋巴细胞来源的 cDNA 均进行 p35 和 p40 亚基因的扩增,在相同的刺激条件下的猪 PBMCs 中只扩增出 p35 亚基因,而从猪脾淋巴细胞中只扩增出 p40 亚基因,在一定程度上支持了该观点。

我们根据今后的实验需要,分别扩增得到编码成熟肽的猪 IL-12 p35 亚基因、编码信号肽和成熟肽的猪 IL-12 p40 亚基因,通过与 GenBank 发表的序列比对均只有一个碱基差异,而编码的氨基酸没有改变,与国内相关报道<sup>[11]</sup>略有不同。初步完成猪 IL-12 双亚基的构建,为体外获得重组猪 IL-12 和将来

猪囊尾蚴联合疫苗的制备奠定基础。

【参 考 文 献】

- [1] Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, et al. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effect of T and natural killer cells [J]. *J Immunol*, 1991, 146(9): 3 074 - 3 081.
- [2] Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(17): 6 808 - 6 812.
- [3] Podlaski FJ, Nanduri VB, Hulmes JD, et al. Molecular characterization of interleukin 12 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 294(1): 230 - 237.
- [4] Zhu Y, Si J, Harn DA, et al. Schistosoma japonicum triose-phosphate isomerase plasmid DNA vaccine protects pigs against challenge infection [J]. *Parasitology*, 2006, 132(1): 67 - 71.
- [5] Charentantanakul W, Platt R, Johnson W, et al. Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 109(1 - 2): 99 - 115.
- [6] Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 251 - 276.
- [7] Hayes MP, Wang J, Norcross MA, et al. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes [J]. *Blood*, 1995, 86(2): 646 - 650.
- [8] Foss DL, Murtaugh MP. Molecular cloning and mRNA expression of porcine interleukin-12 [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1997, 57(1-2): 121 - 134.
- [9] Domeika K, Berg M, Eloranta ML, et al. Porcine interleukin-12 fusion protein and interleukin-18 in combination induce interferongamma production in porcine natural killer and T cells [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2002, 86(1-2): 11 - 21.
- [10] Choi IS, Collison EW, Maheswaran SK, et al. Evaluation of cytokine gene expression in porcine spleen cells, peripheral blood mononuclear cells, and alveolar macrophages by competitive RT-PCR [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2002, 34(2): 119 - 126.
- [11] 兰文升, 童光志, 仇华吉, 等. 猪白细胞介素-12 的分子克隆与序列测定 [J]. *动物医学进展*, 2002, 23(1): 38 - 41.

## 作者署名意义及要求

我国著作权法公布以来,已得到社会各界的广泛重视,作为医学科技期刊必须不折不扣地执行著作权法。为此将本刊对作者署名的有关要求重申如下:

### 1 署名的意义

(1) 标明论文的责任人,文责自负。(2) 医学论文是医学科技成果的总结和记录,是作者辛勤劳动的成果和创造智慧的结晶,也是作者对医学事业做出的贡献,并以此获得社会的尊重和承认的客观指标,是应得的荣誉,也是论文版权归作者的一个声明。(3) 作者署名便于编辑、读者与作者联系,沟通信息,互相探讨,共同提高。作者姓名在文题下按序排列,排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再做更改;作者单位名称及邮政编码脚注于首页左下方。

### 2 作者署名应具备下列条件

(1) 参与选题和设计,或参与资料的分析和解释者。(2) 起草或修改论文中关键性理论或其它主要内容者。(3) 能对编辑部的修改意见进行核修,在学术界进行答辩,并最终同意该文发表者。以上 3 条均需具备。仅参与获得资金或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。其他对该研究有贡献者应列入致谢部分。对文章中的各主要结论,均必须至少有 1 位作者负责。在每篇文章的作者中需要确定 1 位能对该论文全面负责的通讯作者。通讯作者应在投稿时确定,如在来稿中未特殊标明,则视第一作者为通讯作者。第一作者与通讯作者不是同一人时,在论文首页脚注通讯作者姓名、单位及邮政编码。如有外籍作者,应附本人亲笔签名同意在本刊发表的函件。集体署名的论文于文题下列署名单位,于文末列整理者姓名,并于论文首页脚注通讯作者姓名、单位和邮政编码。集体署名的文章应在文末用圆括号列出执笔人姓名或将对该文负责的关键人物列为通讯作者。通讯作者只列 1 位,由投稿者决定。