

## 人白细胞介素 23 p19 亚基基因的克隆和序列分析

骆江坤<sup>1,2</sup>, 方强<sup>2,3</sup>, 齐文娟<sup>1,2</sup>, 王雪梅<sup>2,3</sup>

[摘要] 目的: 克隆人白细胞介素-23(IL-23) p19 亚基基因。方法: 分离健康成年人外周血单个核细胞, 常规培养后用脂多糖至终浓度为 100 ng/ml 刺激增殖 12 h, 收集细胞并提取细胞总 RNA, 用 RT-PCR 方法扩增人 IL-23 p19 cDNA 编码基因, 克隆至 pMD18-T 载体, PCR 鉴定后进行序列测定。结果: RT-PCR 产物电泳结果显示所扩增的基因为 734 bp, 基因测序显示其序列与 GenBank 报道的人 IL-23 p19 基因序列完全一致。结论: 成功地克隆了人 IL-23 p19 cDNA 编码基因。

[关键词] 白细胞介素 23, 人; p19; RT-PCR; 基因克隆; 序列测定

[中国图书资料分类号] R 392.114 [文献标识码] A

## Molecular cloning and sequence analysis genes of human interleukin-23 p19 subunit

LUO Jiang-kun<sup>1,2</sup>, FANG Qiang<sup>2,3</sup>, QI Wen-juan<sup>1,2</sup>, WANG Xue-mei<sup>2,3</sup>

(1. Department of Immunology, 2. Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity;

3. Department of Microbiology and Parasitology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] Objective: To clone genes for encoding human interleukin-23 (IL-23) p19 subunit. Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of human were isolated and cultured for 10 hours, and then stimulated with 100 ng/ml LPS for 12 hours. Total RNA from these stimulated PBMCs were extracted, and cDNA of genes for human IL-23 p19 subunit were amplified by RT-PCR assay and inserted into pMD18-T vector. Results: The PCR production of human IL-23 p19 was verified by Electrophoresis proved to be 734 bp, result of sequencing was the same as the gene sequence of GenBank. Conclusions: cDNA encoding human interleukin-23 p19 was successfully cloned into cloning vector pMD18-T.

[Key words] interleukin-23, human; p19; RT-PCR; molecular cloning; sequencing

白细胞介素-23 (interleukin-23, IL-23) 是 2000 年发现的新的异二聚体细胞因子, 在结构上与 IL-12 共用 p40 亚基, 是 p40 亚基和 p19 亚基以二硫键连接而成的异二聚体<sup>[1]</sup>。它与 IL-12、IL-27 和 IL-35 共同组成 IL-12 分子家族<sup>[2]</sup>, 具有十分复杂的生物学功能, 在抗感染免疫、抗肿瘤免疫以及自身免疫病的发病中发挥着重要作用。本实验采用 RT-PCR 技术从健康成年人外周血单个核细胞 (PBMCs) 中获得编码人 IL-23 p19 亚基的 cDNA, 并对其进行克隆、序列测定和分析。

## 1 材料与方法

1.1 质粒和受体菌 pMD18-T 载体为 TaKaRa 产品, 大肠埃希菌 (*E. coli*) 由蚌埠医学院免疫学教研室保存。

1.2 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、DNA Ladder 均为 Fermentas 公司产品, Ficoll 分离液为上海试剂二厂产品, 其余试剂为国产分析纯。

1.3 引物 根据 GenBank 发表 IL-23 p19 序列 (登录号为 p19; NM\_016584) 设计一对引物, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, PAGE 纯化。P19S: GAG AAT CAG GCT CAA AGC AAG TG, P19A: TGG GGT GGT AGA TTT ATC TTG GC。

## 1.4 细胞的分离培养及总 RNA 提取

1.4.1 人 PBMCs 的分离 采健康志愿者静脉血 5 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 °C 1 500 r/min 水平离心 30 min, 小心吸取 PBMCs 界面层, Hank's 液洗涤, 4 °C 1 500 r/min 离心 10 min, 洗涤细胞 2 次。然后用含 10% 小牛血清 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度调至  $1 \times 10^6$ /ml, 放入 24 孔板中培养。

1.4.2 细胞的刺激培养及总 RNA 的提取 向上述分离培养的细胞中分别加入脂多糖至终浓度为 100 ng/ml 刺激增殖 12 h, 收集细胞后按 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, 选取质量好的 RNA 进行反转录。

1.5 总 mRNA 的反转录 按照 Fermentase 公司的

[收稿日期] 2009-12-31

[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, 2. 安徽省感染与免疫重点实验室, 3. 病原生物学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 骆江坤 (1976 -), 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

RevertAid™第一链 cDNA 合成使用说明书操作: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-MuLV 反转录酶进行反转录, 所得 cDNA 直接用于 PCR 或放于 -20 °C 保存待用。

1.6 PCR 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, 上下引物各 20 pmol, Prime STAR™ HS DNA 聚合酶 0.5 μl, 补加灭菌水至总体积反应条件为 50 μl。预加热 94 °C 5 min; 然后 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增结束后取 8 μl PCR 产物, 用 1.5% TBE 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。获得约 750 bp 的特异性目的片段, 切胶回收纯化。

### 1.7 目的片段与载体的连接

1.7.1 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, Taq DNA 聚合酶 5 μl, 加灭菌水至总体积为 10 μl。70 °C 孵育 30 min, 乙醇沉淀加尾产物。

1.7.2 与载体的连接反应 根据 pMD18-T 载体连接反应体系, 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 °C 进行 30 min

连接反应。将连接产物转化 *E. coli* 感受态细胞, 铺含 AMP、X-gal、IPTG 的 LB 平板进行蓝白斑筛选。

1.8 克隆鉴定及序列测定 分别挑取多个白色单菌落, 提取质粒; 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。经鉴定的阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

## 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 人 IL-23 p19 亚基 cDNA PCR 扩增 RT-PCR 从刺激培养人 PBMCs 扩增得到的片段大小约 750 bp, 与预期片段大小一致(见图 2)。

2.3 重组质粒的酶切验证 挑取阳性菌落, 摇菌培养, 提取质粒, 对提取的质粒分别用 *kpn* I 单酶切和 *kpn* I、*Hind* III 双酶切鉴定(见图 3)。

2.4 序列分析 取阳性质粒送上海英骏公司测定序列, 结果显示克隆入 T 载体的片段大小为 734 bp, 序列与 GenBank 发表的人 IL-23 p19 亚基基因序列完全一致, 表明成功克隆了人 IL-23 p19 基因。

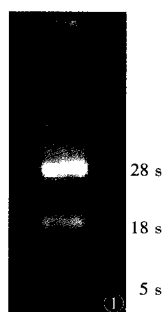


图 1 p19 基因总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

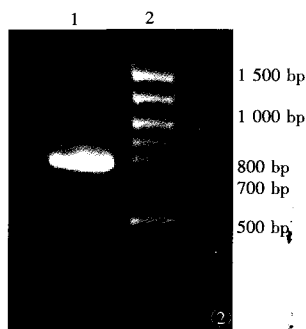


图 2 p19 基因 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

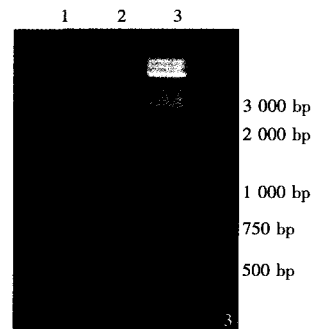


图 3 重组质粒 pMD18-T-p19 酶切鉴定

## 3 讨论

IL-23 是一种由 p40 亚基和 p19 亚基以二硫键连接以异二聚体形式存在的细胞因子, 它在结构上与 IL-12 共用 p40 亚基, 在功能上与 IL-12 既有相似之处, 亦存在不同。IL-23 与 IL-12 均具有调节树突细胞的协同刺激功能<sup>[3]</sup>, IL-12 在体外只选择性作用于 CD8<sup>-</sup> DC, 而 IL-23 可作用于 CD8<sup>-</sup> 和 CD8<sup>+</sup> DC, 从而使 DC 递呈抗原的能力更为强大, 在激活和调节 T 细胞应答中起主要作用<sup>[4]</sup>。IL-12 可同时作用于初始 T 细胞和记忆性 T 细胞, 而 IL-23 则主要用于记忆性 T 细胞, 促进记忆性 T 细胞的形成与增

殖, 这对于维持获得性免疫具有重要意义<sup>[5]</sup>。有研究<sup>[6]</sup>显示, IL-23 参与 Th1 细胞的产生并增强 Th1 免疫反应, 诱导更高水平的 CTL 活性, 同时也参与 Th2 细胞的分化。IL-23 可以刺激记忆性 T 细胞分泌产生 IL-17、IL-17F、IL-6。TH17 细胞是近年来发现的一个新的细胞亚群, 在自身免疫病、抗感染、抗肿瘤免疫等具有重要作用, 而 IL-23 则可以诱导活化的 TH17 细胞分泌 IL-17, 并刺激 TH17 细胞的增殖, 是维持 TH17 细胞增殖的必要细胞因子<sup>[7-10]</sup>, IL-23 和 IL-17 可能是中和或阻止炎症反应的一个有效靶标; IL-6 是一种主要由髓样细胞产生来源广泛的多功能因子, 也是引起炎症的重要因子, IL-6 对多种细胞的

生长和分化都有调节作用。某些急性炎症、自身免疫性疾病、淋巴细胞恶性肿瘤(如多发性骨髓瘤)等与患者体内 IL-6 水平异常增高有关,在很多慢性炎症性疾病的发病机制中有很重要的作用<sup>[11]</sup>。鉴于 IL-23 复杂的生物学功能,其在抗感染免疫、抗肿瘤免疫以及自身免疫病的发病中发挥着重要作用,因此,成功克隆表达 IL-23 基因,获取高生物学活性的重组 IL-23,对于进一步研究 IL-23 的生物学功能,探讨其在抗感染免疫、抗肿瘤免疫以及自身免疫病中的作用有重要的意义。

目前,小鼠 IL-23 的克隆表达及转基因细胞的构建已有较多报道,而对于人 IL-23 的克隆表达则研究较少,目前国内尚未见相关报道。鉴于 IL-23 拥有与 IL-12 相同的 p40 亚基,而 IL-12 的 p40 亚基基因已克隆表达,因此成功克隆表达 IL-23 的关键在于 p19 亚基基因的成功克隆。IL-23 主要来源于活化的单核/巨噬细胞和 B 细胞,IL-23 p19 的 mRNA 主要在内皮细胞和造血细胞表达,包括 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞。同时研究<sup>[1]</sup>也证明脂多糖可以刺激人和小鼠的树突状细胞产生 IL-23,所以在本实验中采用脂多糖刺激人 PBMC 12 h,通过 RT-PCR 扩增 IL-23 p19 基因,克隆至 T 载体,经测序表明序列与 GenBank 报道序列完全一致,表明我们成功地克隆了人 IL-23 p19 基因,为进一步表达人 IL-23,并深入研究其功能和作用奠定了基础。

#### [参 考 文 献]

[1] Oppmann B, Lesley R, Blom B, *et al.* Novel p19 protein engages

IL-12 p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12 [J]. *Immunity*, 2000, 13 (5): 715 - 725.

- [2] Goriely S, Neurath MF, Goldman M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(1): 81 - 86.
- [3] Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 683 - 747.
- [4] Belladonna ML, Renauld JC, Bianchi R, *et al.* IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2002, 168(11): 5448 - 5454.
- [5] Lankford CS, Frucht DM. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73(1): 49 - 56.
- [6] Ha SJ, Kim DJ, Baek KH, *et al.* IL-23 induces stronger sustained CTL and Th1 immune responses than IL-12 in hepatitis C virus envelope protein 2 DNA immunization [J]. *J Immunol*, 2004, 172 (1): 525 - 531.
- [7] Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(5): 489 - 498.
- [8] Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells [J]. *Cell Res*, 2009, 19(4): 399 - 411.
- [9] Boniface K, Blom B, Liu YJ, *et al.* From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited [J]. *Immunol Rev*, 2008, 226(1): 132 - 146.
- [10] Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, *et al.* IL-23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease [J]. *Gut*, 2008, 57(12): 1682 - 1689.
- [11] Ito H. Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease [J]. *J Gastroenterol*, 2002, 37(Suppl 14): 56 - 61.

(上接第 544 页)

- [2] Babior BM. The respiratory burst of phagocytes [J]. *J Clin Invest*, 1984, 73(3): 599 - 601.
- [3] Meischl C, Roos D. The molecular basis of chronic granulomatous disease [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 1998, 19(4): 417 - 434.
- [4] Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, *et al.* Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide [J]. *Am J Pathol*, 1985, 119(1): 101 - 110.
- [5] 吕金星, 汪健, 张锡庆, 等. Percoll 非连续密度梯度沉降法分离人外周血中性粒细胞 [J]. *上海免疫学杂志*, 2000, 20(2): 122.
- [6] Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, *et al.* Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(5): 617 - 653.
- [7] Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, *et al.* Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 178(1): 89 - 97.
- [8] Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2', 7'-dichlorofluorescein [J]. *J Leukoc Biol*, 1990, 47(5): 440 - 448.
- [9] Bonini MG, Rota C, Tomasi A, *et al.* The oxidation of 2', 7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(6): 968 - 975.
- [10] Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress [J]. *Chem Res Toxicol*, 1992, 5(2): 227 - 231.
- [11] Van Pelt LJ, Van Zwielen R, Weening RS, *et al.* Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst [J]. *J Immunol Methods*, 1996, 191(2): 187 - 196.
- [12] Smith JA, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 162(2): 261 - 268.
- [13] Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, *et al.* A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test [J]. *J Immunol Methods*, 1998, 219(1/2): 187 - 193.
- [14] Vuorte J, Jansson SE, Repo H. Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay [J]. *Cytometry*, 2001, 43(4): 290 - 296.