

融合蛋白 pIL6-IL2 在 *E. coli* 中的表达及活性鉴定^{*}

严琳 卿柳庭 贝为成 黄红亮 陈焕春^{**}

(华中农业大学动物医学院动物病毒室 武汉 430070)

摘要 白细胞介素 2(interleukin 2, IL-2)与白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)能分别刺激 T 淋巴细胞增殖与 B 淋巴细胞分泌免疫球蛋白,从而促进动物机体的细胞免疫与体液免疫;另外 IL2 与 IL6 在发挥生物学活性时还有相互协同作用。因此,将去除信号肽的猪白细胞介素 6(pIL-6)与猪白细胞介素 2(pIL-2) cDNAs 序列通过一段 Linker 相连,克隆到 *E. coli* 表达载体 pPET-28a 中。该融合蛋白 IL6-IL2 在 *E. coli* 表达菌 BL21(DE3)中获得成功表达,SDS-PAGE 分析分子量约为 40kDa,表达量达到总菌体的 66.26%。用 IL6 依赖的 B9 细胞与 IL2 依赖的 CTLL 细胞增殖试验进行融合蛋白 IL6-IL2 的生物活性检测,其活性可分别达到 0.8×10^3 U/mg 和 6.4×10^3 U/mg。

关键词 猪白细胞介素 6 猪白细胞介素 2 *E. coli* 表达 生物活性

IL-2 和 IL-6 分别由 Morgan (1976) 和 Nordan (1986) 等^[1] 首次报道。经过历年来各国学者对其理化性质及生物学活性的不懈研究,发现 IL-2 与 IL-6 能针对性地刺激 T-淋巴细胞增殖分化及诱导 B-淋巴细胞合成与分化,进而提高动物机体的细胞免疫与体液免疫能力,因而又分别被称为 T 细胞生长因子(TCGF)与 B 细胞分化因子(BCDF-2)^[2]。同时,IL-2 与 IL-6 在免疫体系网络中相辅相成,在分别刺激细胞与体液免疫的同时又能相互诱导而开启另一支路:IL-2 能刺激 LAK 细胞增殖而分泌包括 IL-6 在内的众多细胞因子^[3];IL-6 反过来又能刺激 IL-2R 的表达与 IL-2 的产生^[4]。鉴于此,我们设计在 *E. coli* 中表达有生物学活性的 pIL6-IL2 融合蛋白,为下一步进行兽用疫苗的佐剂效应研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与细胞株

SK⁺-IL6 和 SK⁺-IL2 克隆质粒为解放军农牧大学军事兽医研究所余兴龙博士惠赠;表达载体 pET-28a,受体菌 *E. coli* DH₅ α 及表达菌 *E. coli* BL21(DE3)均为本室保存。IL2 依赖的 CTLL 为小鼠杀

伤性 T 细胞系,购自上海细胞生化所;IL6 依赖的 B9 细胞为小鼠杂交瘤细胞,购自第四军医大学免疫学教研室。

1.2 生化试剂

各种限制性内切酶及 T4DNA 连接酶、PCR 试剂、DNA Marker 均为 TakaRa 产品。扩增引物由上海生工合成。标准 rpIL-2 为 R&D 公司产品(652-P2),标准 rhIL-6 为 PeproTech EC LTD 公司产品。MTS 反应试剂盒为 Promega 公司产品。

1.3 pIL6 与 pIL2 的 PCR 扩增

根据 GENBANK 报道 pIL2(X56750)与 pIL6(M86722)序列设计引物。

Primer A: 5'-gcGAGCTCccgggacgcctggaagaag 3';

Primer B: 5'-cgCAATTGggaacctccacctccattatccgaatggccctca 3'

Primer C: 5'-gcGAATTCgggttctggcgggtgcacctacttcaagct 3';

Primer D: 5'-gcGTCGACcttaattatgaagtcagt 3'

引物 A 与 B 用于扩增成熟 pIL6 cDNA,添加了 *SacI* 和 *MunI* 酶切位点。引物 C 与 D 用于扩增成熟 pIL2 cDNA,添加了 *EcoRI* 和 *Sall* 位点。同时,为使融合蛋白能以天然 IL6 与 IL2 构型折叠而不相互干扰,我们设计用一段低电荷,亲水性氨基酸多肽(GGGGSEFGSGG)来连接 IL6 和 IL2,其 linker 序列分别设计入 Primer B 与 Primer C 中。

以 SK⁺-pIL6 和 SK⁺-pIL2 为模板,用高保真

收稿日期:2004-05-12 修回日期:2004-07-19

^{*} 国际科学基金资助项目(IFS: B/35281)

^{**} 通讯作者,电子信箱:hzauvet@public.wh.hb.cn.

Taq 酶扩增目的片段。PCR 扩增程序为: 95℃ 5min 后, 95℃ 50 s → 55℃ 60s → 72℃ 35s 进行 40 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min, 终止反应。

1.4 表达载体 28a IL6 IL2 的构建

将扩增产物克隆入 pMD18-T 载体中, 分别命名 T-IL6-L 与 T-L-IL2, 测序鉴定正确后按图 1 的技术路线构建原核表达载体 28a IL6 IL2。用 *SacI* 单酶切 T-IL6-L 产生 583bp 的 IL6-L 序列, 连入原核表达载体 pPET-28a 中。连接产物转化感受态 DH5α 受体菌, 挑

取单菌落提取质粒酶切鉴定。其中阳性克隆子包括外源片段正向插入与反向插入两种。由于外源片段 IL6-L 序列与载体 pPET-28a 均带有 *Bam*HI 酶切位点, 所以用 *Bam*HI 单酶切能够筛选出正向连入的克隆子 28a IL6 L。另再将 T-L-IL2 用 *Eco*RI 和 *Sal*I 消化产生 438bp 的 L-IL2 序列。根据 *Eco*RI 与 *Mun*I 是同尾酶的特性, 外源片段 L-IL2 插入经 *Mun*I 和 *Sal*I 消化的 28a IL6-L 载体上, 即连入 IL6 序列尾部, 构建原核表达质粒 28a IL6 IL2。

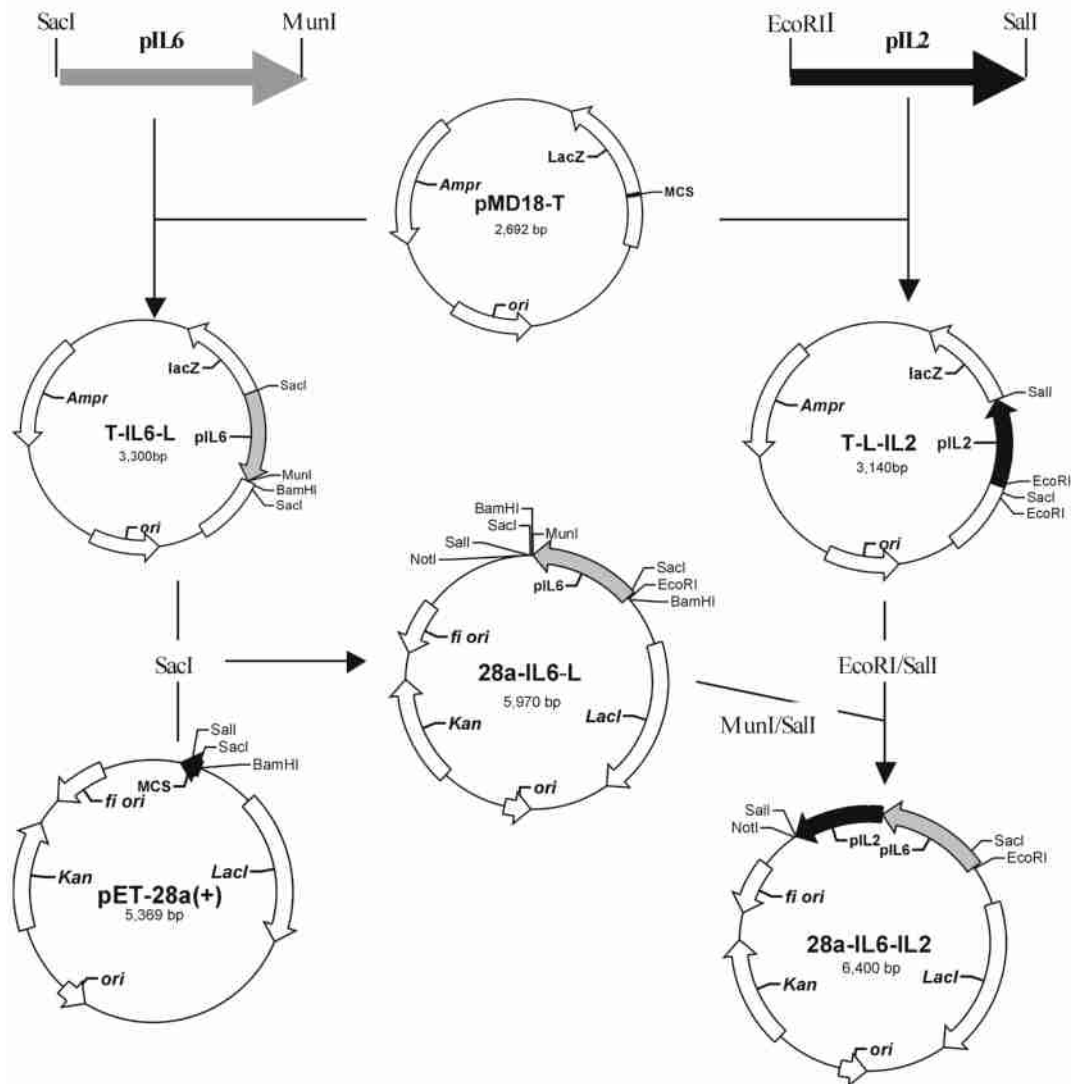


图 1 表达载体 pPET IL6 IL2 的构建

Fig. 1 Construction of expression plasmid pET IL6 IL2

1.5 融合蛋白 IL6 IL2 的表达

将原核表达质粒 pPET-IL6 IL2 转化入 *E. coli* 表达菌 BL21 (DE3) 中。按《分子克隆实验指南》^[9] 上的方法挑取单菌落接种于 3ml LB 培养基中,

37℃ 摇床培养, 4℃ 静置过夜。第二天取 50μl 进行 100 倍扩大培养, 3h 后加 IPTG (终浓度为 1.0mmol/L) 诱导, 再培养 3h 后离心收集菌体。样品经煮沸处理后进行浓度为 12% 的 SDS-PAGE 电泳, 考马斯

亮兰(R250) 染色。

1.6 重组蛋白包涵体的提取

大量诱导表达菌(100ml), 3h 后离心收集菌体。用 10mmol/L TE(pH8.0) 洗菌体一次, 除去残留培养基成分, 再用 10mmol/L TE(pH8.0, 内含 200μg/ml 溶菌酶) 重悬菌体, 置 37℃温浴 1h 后, 加 DTT 与 Triton X-100 至终浓度分别达 5mmol/L 与 1%。然后进行高频短时超声波处理数次。再 4℃, 10×10^3 r/min, 离心 15min 后, 分别收集上清与沉淀, 取样进行 SDS PAGE 电泳, 鉴定重组蛋白是以可溶形式还是以包涵体形式存在。

1.7 包涵体的变性及复性

依据 SDS-PAGE 结果, 将重组蛋白所在的包涵体溶解于含 0.3% SKL(十二烷基肌氨酸钠) 的 PBS (pH7.2) 中, 室温静置过夜。用紫外分光光度计测出溶解的蛋白质浓度, 用 PBS 稀释至 1mg/ml, 装入透析袋, 内加 1mmol/L 氧化型: 还原型谷胱甘肽(比例为 1: 4) 帮助变性的肽键依天然构象复性。用 20 倍体积的 PBS 进行 4℃搅拌透析复性, 每 2h 换液一次。经 6 次换液后收集蛋白液, 过滤除菌后置 - 20℃冻存。

1.8 融合蛋白 IL6-IL2 的生物学活性分析

参照文献[2] 的方法, 用 IL6 依赖的 B9 细胞与 IL2 依赖的 CTLL 细胞增殖试验来检测融合蛋白 IL6-IL2 的生物活性。将提纯的融合蛋白 IL6-IL2 以 50μg/ml 作为初始浓度, 在 96 孔板中进行 2^{10} 次倍比稀释。把已用 1640 洗涤 2 次的 B9(或 CTLL-2) 以每孔 100μl(500 细胞数) 加入, 在 37℃, CO₂ 培养箱中培养 72h(CTLL 培养 24h)。在培养结束前 4h 加入 20μMTS。37℃作用 4h 后, 将 96 孔板取出, 用酶标检测仪(OD492nm) 检测各孔 OD 值, 制备样品曲线。用标准品 rhIL-6 与 rpIL-2(起始浓度为 10U/ml) 制备标准曲线, 同时设细胞对照与空白对照, 每份样品设置 3 个重复。所得数据用 SPSS10.0 统计软件分析作图。将样品曲线与标准曲线比较, 确定表达产物的生物活性单位。

2 结 果

2.1 重组表达质粒 pPET-IL6-IL2 的构建

按图 1 技术路线将 PCR 扩增产物 pIL6 与 pIL2 先后连入原核表达载体 pET-28a 中, 得到 pET-IL6-IL2。重组质粒 pET-IL6-IL2 经 *EcoRI* 与 *Sall* 酶切后

产生一约 1000bp 的外源片段及 5400bp 的载体片段(图 2), 确证原核表达质粒 pET-IL6-IL2 构建正确。

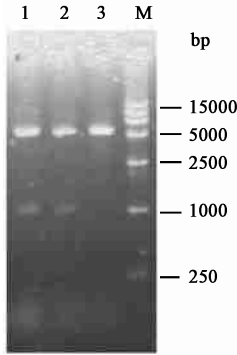


图 2 pET IL6 IL2 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of expression plasmid pET IL6 IL2

1, 2: pET IL6 IL2 digested by *EcoRI* 与 *Sall*; 3: pET 28a digested by *EcoRI* 与 *Sall*; M: DNA marker

2.2 融合蛋白 IL6-IL2 的表达及包涵体的提取

重组菌 BL21/ pET-IL6-IL2 经 IPTG 诱导后, 高效表达出一 40kDa 大小的特异性蛋白(图 3a)。我们进一步进行包涵体的提纯, SDS-PAGE 分析, 可知目的蛋白 IL6-IL2 完全以包涵体的形式表达(图 3b)。GelExpert 软件分析, 目的蛋白占总菌体 66.26%, 经包涵体提取后提高至 85.66%(图 3b)。

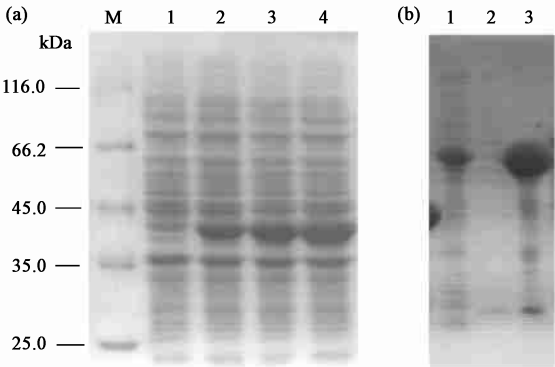


图 3 SDS PAGE 分析融合蛋白 IL6 IL2 的表达情况

Fig. 3 Expression analysis of fusion protein IL6 IL2 by SDS PAGE

(a) M: Protein Marker; 1: sample of BL21/ pET 28a induced by IPTG; 2~ 4: samples of BL21/ pET IL6 IL2 induced by IPTG
(b) 1: sample of BL21/ pET IL6 IL2 induced by IPTG; 2: supernatant of purified BL21/ pET IL6 IL2; 3: purified inclusion body of BL21/ pET IL6 IL2

2.3 融合蛋白 IL6-IL2 的生物活性分析

用 IL6 依赖的 B9 细胞增殖试验来检测 IL6-IL2 中的 IL6 活性; IL2 依赖的 CTLL 细胞增殖试验来检

测 IL6-IL2 中的 IL2 活性。将样品曲线同标准品曲线比较, 换算出融合蛋白 IL6-IL2 的 IL6 与 IL2 的生物活性分别为 0.8×10^3 U/mg 和 6.4×10^3 U/mg(图 4)。

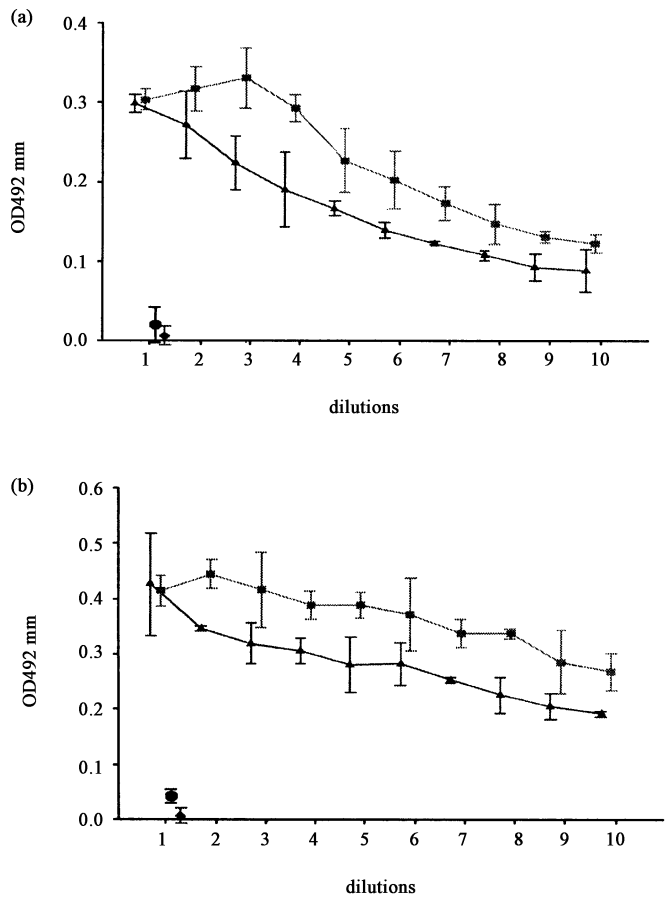


图 4 融合蛋白 IL6-IL2 的生物活性分析

Fig. 4 Bio assay of IL6-IL2 by cell proliferation assays of B9 (a) and (CTLL-2(b)).

(●) Standard IL6 and standard IL2 at started concentration of 10 IU/ml; (▲) sample of control strain BL2/pET-28a; (■) purified fusion protein IL6-IL2 with starting concentration of 50 μg/ml; (◆) cell control and (▼) negative control; Samples were diploid diluted from 2^1 to 2^{10} . According to the standard curve by standard rhIL6 and pIL2, the specific IL6 and IL2 activity of the recombinant protein was calculated as 0.8×10^3 U/mg and 6.4×10^3 U/mg. Each point represents the mean \pm SD of triplicate assay

3 讨论

细胞因子在调节动物机体免疫反应时具有多向性、网络性的特点, 它们不仅可以单独发挥生物学活性, 而且不同的细胞因子之间还有相互协调和相互制约的作用。利用细胞因子的这一特点, 一些实验室设计并构建出了新型双分子重组细胞因子融合蛋白, 即利用基因工程技术和蛋白质工程技术, 将功能类似或功能互补的两种细胞因子合二为一, 使之成为具有多功能的嵌合蛋白质新品种。目前有报道的有 hIFN- γ -IL2, hTNF-IFN α , mSCF-IL3,

hIL6-IL6, hGM-CSF-IL2 等^[6, 7]。本实验构建表达 pIL6-IL2, 旨在获得具有双重活性的融合蛋白, 为今后在疾病诊断及疫苗佐剂应用方面奠定基础。

但众多实验表明, 并非所有融合蛋白都发挥出其预想的协同效应。这是由于相连的两种分子在肽链折叠过程中相互干扰, 不能形成天然空间构型, 从而影响了其生物学活性。针对这一问题, 许多学者采用亲水性、低电荷效应的氨基酸 linker 来分开两种组分, 使其能互不干扰地伸展成各自的天然构型。被用作 linker 的氨基酸有 Gly、Ser、Pro、Ala、Thr 等, 其中以 Gly 与 Ser 使用最为广泛^[7-10]。

因此, 为保证其生物活性, 在本实验中我们在 IL6 与 IL2 之间加入了一段由 11 个氨基酸组成的 linker (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Glu-Phe-Gly-Ser-Gly-Gly), 而 IL2 N 端前 6 个氨基酸由 Pro、Ser、Thr 等亲水性氨基酸组成, 本身也可作为 linker 的有效成分。用 SWISS 2DPAGE soft www.ExPASy.com 软件分析其串联序列的二级结构, 可知两分子折叠并未发生相互干扰现象。本实验的生物学活性分析也证实了这一点, 该融合蛋白同时具有 IL6 与 IL2 活性。

IL2 依赖的 CTLL-2 是小鼠杀伤性 T 细胞系, 对不同来源的 IL2 呈种属上行性。IL6 依赖的 B9 细胞是小鼠杂交瘤细胞, 他们对不同种属的细胞因子都有反应。在国内外许多文章报道均以这两种细胞来检测猪 IL2 与 IL6 生物学活性^[11~13]。在本实验中, 我们分别采用该两种细胞来检测融合蛋白 IL6-IL2 的生物学活性, 其活性可分别达到 0.8×10^3 U/mg(IL6 活性) 和 6.4×10^3 U/mg(IL2 活性)。

在本实验的基础上, 我们将开展融合蛋白在动物体内的生物活性研究, 探讨 IL6-IL2 对疫苗的佐剂效应。

参考文献

- [1] Richard P N, Janet G P, Stuart R. Purification and NH₂ terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1. J Immunol, 1987, 139: 813~ 817
- [2] 孙为民, 王惠琴. 细胞因子研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 387~ 405; 443~ 458
- [3] Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, et al. Two types of murine

- helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol, 1986, 136(7): 2348
- [4] Anne C L F, Edward J P. The absence of IL-6 does not affect Th2 cell development *in vivo*, but does lead to impaired proliferation, IL-2 receptor expression, and B cell responses. J Immunol, 1999, 162: 5829
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [6] 刘颢, 马大龙. 新型双分子细胞因子融合蛋白研究进展. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(3): 194~ 196
- [7] 刘冬梅, 张卓远, 王妍. 分泌型 rhGM-CSF/IL-2 融合蛋白表达载体的构建. 中国生物制品学杂志, 2002, 15(4): 197~ 200
- [8] 贺平, 汤钊, 刘彬彬, 等. 人 IL-2/IFN γ 融合基因在肝癌细胞中靶向表达. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(4): 637~ 641
- [9] 马越云, 马文熠, 于文彬, 等. IgG Fab BPI 融合蛋白真核表达载体的构建及其在 CHO 细胞中的表达. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(5): 470~ 473
- [10] 张梅, 司履生, 王一理. 应用重组 PCR 技术构建人单链白蛋白介素 12 融合基因. 免疫学杂志, 2001, 17(1): 22~ 26
- [11] Verfaillie T, Cox E, To L T, et al. Comparative analysis of porcine cytokine production by mRNA and protein detection. Vet Immunol Immunop, 2001, 81: 97~ 112
- [12] Hiroyuki I, Tatsuo U, Kyoko T, et al. Swine interleukin 2 activity produced by mesenteric lymph node cells. J Vet Med Sci, 1993, 55(5): 729~ 734
- [13] Magnusson M, Johansson E, Berg M, et al. The plasmid pcDNA 3 differentially induces production of interferon α and interleukin 6 in cultures of porcine leukocytes. Vet Immunol Immunop, 2001, 78: 45~ 56

Expression of Fusion Protein pIL6-IL2 in *E. coli* and Bio-activity Assay

YAN Lin QING Liuting BEI Weicheng HUANG Hong-liang CHEN Huan-chun

(Laboratory of Animal Virology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University Wuhan 430070, China)

Abstract Interleukin 2 and Interleukin 6 can stimulate T-lymphocytes proliferation and B lymphocytes secreting immunoglobulins respectively, further enhance animal's cellular and humoral immune responses. Moreover, IL2 and IL6 can co-adjust biological activities between them. Hence, two cDNAs of the mature porcine IL6 (pIL6) and that of pIL2 were linked by a sequence with translating GGGGSEFGSGG and cloned into *E. coli* expression plasmid pET-28a. The fusion protein pIL6-IL2 was expressed in BL21 (DE3) with 40kDa of molecular weight by SDS-PAGE. The expression level reached to 66.26% and enhanced to 85.66% by purification. Analysis by cell proliferations of IL6-dependent cell B9 and IL2-dependent cell CTLL, the bio-activity units of the fusion protein IL6-IL2 can reach 0.8×10^3 U/mg and 6.4×10^3 U/mg respectively.

Key words Porcine Interleukin 6 Porcine interleukin 2 *E. coli* expression Bio-activity