

· 论 著 ·

# 人单链白细胞介素 12 的原核表达和生物学活性鉴定\*

周鹤峰<sup>1</sup>, 邵敏<sup>1</sup>, 姬可平<sup>1</sup>, 葛正龙<sup>2△</sup>

(1. 遵义医学院珠海校区生物工程系, 广东珠海 519041; 2. 遵义医学院生物化学教研室, 贵州遵义 563003)

**摘要:**目的 构建含人单链白细胞介素 12(hscIL-12)基因的原核表达载体,在大肠杆菌中表达具有活性的 hscIL-12。方法 PCR 法从质粒 pCA13-hscIL-12 中扩增 hscIL-12 基因,经酶切、连接构建原核表达载体 pET28a(+)-hscIL-12,转入到大肠杆菌 BL21(DE3)中,用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,收集菌液进行蛋白质印迹分析,经镍柱亲和层析(Ni<sup>2+</sup>-NTA)纯化,体外增殖实验检测其生物学活性。结果 PCR 扩增、双酶切及 DNA 序列测定证实 pET28a(+)载体上成功插入了 hscIL-12 基因片段。表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析,证明其相对分子质量为 70×10<sup>3</sup>;蛋白质印记表明重组蛋白具有 hscIL-12 抗原活性;表达产物纯化、复性后进行体外生物学活性实验表明,该重组蛋白能刺激外周血单核细胞(PBMC)产生 IFN-γ。结论 pET28a(+)-hscIL-12 原核表达载体的构建和重组 hscIL-12 蛋白的制备为进一步研究 hscIL-12 生物学功能和临床应用奠定了基础。

**关键词:**人单链白细胞介素 12;大肠杆菌;生物学活性;表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.31.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)31-3124-03

## Prokaryotic expression and bioactivity identification of single chain human interleukin-12\*

Zhou Hefeng<sup>1</sup>, Shao Min<sup>1</sup>, Ji Keping<sup>1</sup>, Ge Zhenglong<sup>2△</sup>

(1. Department of Bioengineering, Zhuhai Campus, Zunyi Medical College, Zhuhai, Guangdong 519041, China;

2. Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**Abstract: Objective** To construct the expression vector of human single chain interleukin-12(hscIL-12) gene. It can express hscIL-12 with bioactivity in escherichia coli. **Methods** hscIL-12 gene was amplified from recombinant pCA13-hscIL-12. With restricted enzyme digestion, gene of interest was cloned into the prokaryotic vector pET28a(+) to construct expressing plasmid of pET28a(+)-hscIL-12. After pET28a(+)-hscIL-12 was transformed into escherichia coli BL21(DE3), the bacteria were induced by IPTG. The expression of hscIL-12 was detected by Western blotting. The hscIL-12 protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. The bioactivity of hscIL-12 was detected by PHA-activated peripheral blood mononuclear cell(PBMC) proliferation assay. **Results** PCR and restriction enzyme digestion and DNA sequencing indicated that hIL-12 gene was inserted into the prokaryotic expression vector pET28a(+), SDS-PAGE analysis showed that molecular weight of the expressed protein was 70×10<sup>3</sup>; Western blotting analysis showed that recombinant protein had the antigenicity of hscIL-12. The purified hscIL-12 protein had the bioactivities in stimulating the IFN-γ production of human PBMC. **Conclusion** The construction of the recombinant plasmid and the preparation of the active protein of hscIL-12 have laid a foundation for further studying the function and clinical applications of hscIL-12.

**Key words:** interleukin-12; escherichia coli; bioactivity; expression

白细胞介素 12(interleukin 12, IL-12)又名自然杀伤细胞刺激因子(NKSF),或称为细胞毒淋巴细胞成熟因子(CLMF),它是由抗原呈递细胞,如巨噬细胞、B 淋巴细胞等在免疫应答过程中产生的具有多种生物学活性细胞因子。它能促进 T 细胞和自然杀伤细胞的增殖,诱导干扰素(IFN)-γ 等多种细胞因子的产生,调节 Th0 细胞向 Th1 细胞分化发育,具有较强的抗肿瘤、抗病毒、抗感染的作用<sup>[1]</sup>。IL-12 是由 P40 和 P35 两个亚基通过二硫键构成的异二聚体细胞因子<sup>[2]</sup>,只有当这两个亚基形成异源二聚体时,IL-12 分子才具有生物活性<sup>[3]</sup>,单个 P40 或 P35 亚基的过量表达还会产生活性抑制作用<sup>[4]</sup>。本实验使用的人单链 IL-12(human single chain IL-12, hscIL-12)全长基因由编码 P40 和 P35 的 2 个基因经一段接头序列连接而成,用其构建原核表达载体,经大肠杆菌 BL21 进行诱导表达并获得了有活性的重组 hscIL-12,为进一步研究 hscIL-12 生物学功能和临床应用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒与菌株** 质粒 pCA13-hscIL-12、原核表达载体 pET28a(+),大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)由本室保存。

**1.1.2 试剂** 限制性核酸内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品;高保真即用 PCR 扩增试剂盒、UNTQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒为上海生工生物工程公司产品;镍离子亲和层析柱(Ni<sup>2+</sup>-NTA)购自 Qiagen 公司;ECL 化学发光试剂盒试剂盒购自武汉博士德公司;鼠抗人 IL-12 单克隆抗体购自 R&D 公司;羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)购自武汉博士德公司;IL-12 国际标准品、人 IFN-γ 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自 R&D 公司;其余化学试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 寡核苷酸引物设计与合成** 根据 GenBank 中 hsdll-12 的 cDNA 序列设计引物,由上海生工生物工程公司完成。上游引物:5'-CTA GCT AGC ATG GGT CAC CAG CAG T-3'(划线

\* 基金项目:贵州省科委重大攻关项目(2004NGZ002);贵州省教育厅重点项目(2004118)。△ 通讯作者, Tel:(0852)8608572; E-mail: zbnge@hotmail.com。

部分为 *Nhe* I 酶切位点), 下游引物: 5'-ACCG GAG CTC TTA GGA AGC ATT CAG-3'(划线部分为 *Sac* I 酶切位点)。

1.2 方法

1.2.1 hscIL-12 的 PCR 扩增 以质粒 pCA13-hscIL-12 为模板, 在 50  $\mu$ L 反应体系中, 加入上、下游引物各 3  $\mu$ L, 模板 pCA13-hscIL-12 1  $\mu$ L, 2  $\times$  PCR Master 25  $\mu$ L, 扩增条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 62  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2.2 重组原核表达质粒的构建和鉴定<sup>[5]</sup> PCR 产物与表达载体 pET28a(+) 分别用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Sac* I 双酶切后, 用回收试剂盒回收, 连接回收的目的基因与原核表达载体片段, 并转化感受态 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性菌落进行扩增并少量提取质粒进行酶切鉴定。鉴定阳性的菌株送上海生工进行生物工程公司测序。

1.2.3 hIL-12 蛋白的诱导表达及纯化 将测序正确的质粒转化 BL21(DE3) 感受态细胞, 筛选阳性克隆。将阳性克隆接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD(600) 为 0.5, 经异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 终浓度为 1 mmol/L, 进行诱导表达 4 h<sup>[6]</sup>, 菌液离心弃上清, 超声裂解菌体, 收集上清及裂解物沉淀行 SDS-PAGE 电泳。彻底溶解裂解物沉淀, 用镍柱亲和层析法 Ni<sup>2+</sup>-NTA 纯化目的蛋白, 按照 Qiagen 公司 Ni<sup>2+</sup>-NTA 使用说明书进行, 纯化蛋白经过透析复性, SDS-PAGE 电泳和薄层扫描分析蛋白纯度, 对蛋白进行冻干保存准备用于活性检测。

1.2.4 蛋白质印迹分析 将上述诱导后的裂解菌液进行 SDS-PAGE 电泳后, 参考文献[7] 进行, 电转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤; 与一抗室温反应 2 h, PBS 洗涤; 与 HRP 标记的二抗室温反应 2 h, 洗涤; 用 ECL 试剂室温孵育 1 min, 进行曝光、显影和定影。以未经诱导的细菌裂解液和用空载体转化的细菌诱导物作对照。

1.2.5 重组蛋白生物学活性测定 分离人外周血单个核细胞 (PBMC), 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基调整活细胞浓度为 1  $\times$  10<sup>6</sup> 个/mL, 向 96 孔板中每孔加入细胞悬液 100  $\mu$ L。将标准品用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基稀释成 2 ng/mL, 原核表达的不同浓度的重组 hscIL-12 蛋白, 分别按每孔 100  $\mu$ L 加入含有细胞悬液的 96 孔板中, 每组设 3 个复孔, 置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h 后, 收集上清液用 ELISA 试剂盒测定 IFN- $\gamma$  的含量, 操作步骤按试剂盒说明书完成。

1.3 统计学处理 所有数据用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

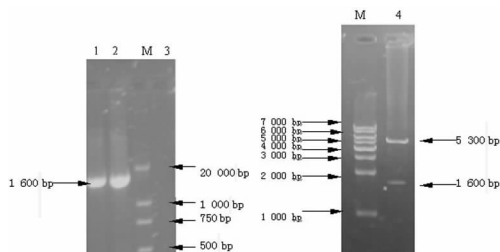
2 结 果

2.1 原核表达载体 pET28a(+)-hscIL-12 的鉴定 以质粒 pCA13-hscIL-12 为模板, PCR 扩增 hscIL-12 cDNA。将 hscIL-12 克隆入 pET28a(+) 中, 构建重组原核表达载体 pET28a(+)-hscIL-12, 重组质粒经 PCR 扩增和 *Nhe* I、*Sac* I 双酶切鉴定, 可见大小约 1 600 bp 的条带, 经测序证实结果正确, 表明原核表达载体构建成功, 见图 1。

2.2 重组蛋白的表达与纯化 将重组基因工程菌经 IPTG 诱导, 超声裂解后, 对全菌裂解液进行 SDS-PAGE 分析, 相对分子量为 70  $\times$  10<sup>3</sup> 的外源蛋白表达水平大大提高, 该蛋白质的相

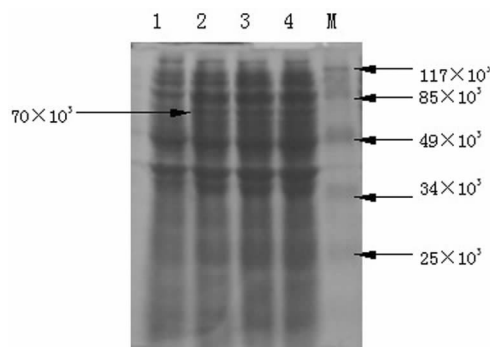
对分子质量与 hscIL-12 融合蛋白理论相对分子质量一致, 见图 2, 镍柱亲和层析后获得了纯度在 95% 以上的 hscIL-12 蛋白。

2.3 重组蛋白质印迹鉴定 蛋白质印迹分析表明, 经 IPTG 诱导后的菌体裂解液能与抗体发生特异反应, 经 ECL 显色, 曝光, 胶片上在相对分子质量为 70  $\times$  10<sup>3</sup> 处出现特异性反应条带, 见图 3, 与目的蛋白带一致, 而空载体未见显色反应。



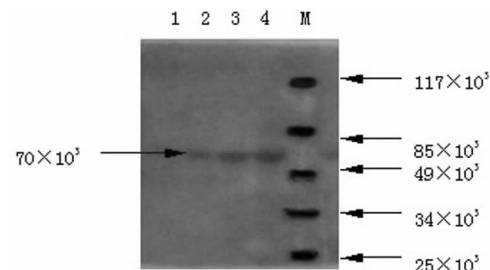
M: DNA 标准; 1, 2: PCR 扩增产物; 3: 空载体; 4: pET28a(+)-hIL-12 质粒经 *Nhe* I、*Sac* I 双酶切后的产物

图 1 pET28a(+)-hscIL-12 的 PCR 和酶切鉴定



M: 蛋白质分子量标准; 1: 未诱导的 BL21(DE3); 2~4: IPTG 诱导后的 BL21(DE3)

图 2 pET28a(+)-hscIL-12 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达的 SDS-PAGE 分析



M: 蛋白质分子量标准; 1: 阴性对照; 2~4: 诱导表达后的菌体蛋白

图 3 诱导表达菌体的蛋白质印迹分析

2.4 hscIL-12 生物活性测定 以浓度为 5 ng/mL 的蛋白标准品和浓度分别为 2、4 和 6 ng/mL 的重组 hscIL-12 蛋白作用于人 PBMC, 同时以 PBS 作为对照, 检测 IFN- $\gamma$  表达量分别为 (712.5  $\pm$  37.5) pg/mL、(243.8  $\pm$  11.9) pg/mL、(467.6  $\pm$  32.1) pg/mL、(746.2  $\pm$  39.5) pg/mL, PBS 对照组表达量为 (21.5  $\pm$  8.6) pg/mL。经统计学处理, 标准品和不同浓度梯度原核表达的 hscIL-12 分别与 PBS 空白对照组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 表明原核表达的 hscIL-12 能够促进 PBMC 产生 IFN- $\gamma$ , 证明重组原核表达载体能够表达有生物活性的 hscIL-12。

3 讨 论

IL-12 是一种重要的细胞因子, 由 P40 和 P35 2 个亚基经

二硫键共价结合而成的异源二聚体<sup>[8]</sup>。一级结构 P40 有 306 个氨基酸,含 4 个理论糖基化位点和 10 个半胱氨酸;P35 有 197 个氨基酸,含 3 个理论糖基化位点和 7 个半胱氨酸<sup>[9]</sup>。hs IL-12 是一个多功能的免疫调节因子,具有较强的抗肿瘤和抗转移的作用<sup>[10]</sup>,而且不良反应小。

提高蛋白表达量的首要因素,是选择适合的载体与宿主菌<sup>[11]</sup>。本研究选用了 T7 表达系统中的 pET28a 表达载体。pET 系列载体以 T7 为启动子,可使目的基因得到高效转录与翻译。由于该表达系统在目的表达产物的 N 端融合了一段 6 个组氨酸标签序列,有利于天然条件下用金属螯合层析进行融合蛋白的纯化,本实验使用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 纯化目的蛋白,Ni<sup>2+</sup> 与组氨酸结合,在纯化过程中分辨率高、选择性好、操作方便,可获得的重组蛋白纯度高。而组氨酸标签相对分子质量小,无生物活性,一般对重组蛋白的功能无影响。与其他表达系统相比,大肠杆菌表达系统蛋白表达量高,容易纯化,且具有遗传背景清楚、成本低、培养周期短、抗污染能力强等特点<sup>[12]</sup>。

本实验成功将 hscIL-12 克隆入原核表达载体 pET28a (+) 中,在大肠杆菌 BL21 (DE3) 获得高效表达。表达产物以包涵体的形式存在,包涵体的形成,可使在胞内表达的外源蛋白不易被细菌的蛋白酶所降解,同时也有利于重组蛋白的分离纯化。包涵体经过洗涤、溶解、Ni<sup>2+</sup>-NTA 纯化以及蛋白质的复性等步骤后,获得了纯度约为 95% 的重组 hscIL-12 蛋白,蛋白质印迹表明重组蛋白具有 hscIL-12 抗原活性。经纯化、复性后的表达产物进行体外实验表明,表达 hscIL-12 能刺激 PBMC 产生 IFN- $\gamma$ ,提示该重组蛋白具有生物学活性。本研究成功实现 hscIL-12 蛋白在原核系统中的表达,为其进一步的理论研究和临床应用奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Cao XF, Leonard K, Lynne I, et al. Interleukin 12 stimulates IFN-mediated inhibition of tumor-induced regulatory T-cell proliferation and enhances tumor clearance [J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 8700-8709.
- [2] Zhang C, Zhang J, Niu J, et al. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D [J]. *Hum Immunol*, 2008, 69(8): 490-500.
- [3] Nascimento DS, do Vale A, Tomas AM, et al. Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-12 p40 and p35 subunits [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(9): 2277-2291.
- [4] 陈坚,薛绪潮,方国恩,等.米非司酮调控的单链鼠白介素 12 真核表达载体的构建及鉴定 [J]. *生物学杂志*, 2008, 25(6): 17-21.
- [5] 徐林,张凤,周涯,等.小鼠 CD25 分子胞外段的原核表达载体的构建及表达鉴定 [J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(3): 278-281.
- [6] 钟刚强,杨斯皓,贾钰铭,等. pGEX-4T-2-TK 原核表达质粒的构建及其表达 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(9): 1036-1038.
- [7] 王彦,吴奎,毕玉田,等. FasL 和 Der p2 双基因共表达真核表达载体的构建及其在树突状细胞中的表达 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(20): 2697-2699.
- [8] Lesinski GB, Badgwell B, Zimmerer J, et al. IL-12 pretreatments enhance IFN-alpha-induced Janus kinase-STAT signaling and potentiate the antitumor effects of IFN-alpha in a murine model of malignant melanoma [J]. *J Immunol*, 2004, 172(12): 7368-7376.
- [9] Sinclair G, Choy FYM. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2002, 26(1): 96-105.
- [10] Takeda K, Suzuki T, Shimada SI, et al. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 146(1): 109-115.
- [11] Knutson KL, Disis ML. IL-12 enhances the generation of tumour antigen-specific Th1 CD4 T cells during ex vivo expansion [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 135(2): 322-329.
- [12] Nemeckova S, Sroller V, Hainz P, et al. Experimental therapy of HPV16 induced tumors with IL12 expressed by recombinant vaccinia virus in mice [J]. *Int J Mol Med*, 2003, 12(5): 789-796.

(收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-07-14)

(上接第 3123 页)

3414-3421.

- [12] Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(10): 764-776.
- [13] Okamoto M, Van Stry M, Chung L, et al. Mina, an Il4 repressor, controls T helper type 2 bias [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(8): 872-879.
- [14] Melen E, Umerkajeff S, Nyberg F, et al. Interaction between variants in the interleukin-4 receptor alpha and interleukin-9 receptor genes in childhood wheezing: evi-

dence from a birth cohort study [J]. *Clin Exp Allergy*, 2006, 36(11): 1391-1398.

- [15] Chan IH, Leung TF, Tang NL, et al. Gene-gene interactions for asthma and plasma total IgE concentration in Chinese children [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(1): 127-133.
- [16] Vercelli D. Gene-environment interactions in asthma and allergy: the end of the beginning [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2010, 10(2): 145-148.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-05-12)