

## 重组人白介素-12在银纹夜蛾中的表达纯化及其生物活性\*

徐进平, 孟小林\*\*, 王健, 鲁伟

(武汉大学病毒研究所, 湖北武汉 430072)

Expression, Purification and Bioactivity Detection of Recombinant Human IL-12 in *Argyrogramma agnata*

XU Jin-ping, MENG Xiao-lin\*\*, WANG Jian, LU Wei

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** Two cDNA fragments encoding human interleukin-12 (hIL-12) P35 and P40 subunits were isolated by RT-PCR from KB cells stimulated with PDBu, and then cloned into pCR<sup>®</sup>2.1 respectively and down the double promoters of pAcUW51. The recombinant baculovirus Ac-hIL2 was obtained by cotransfecting with pAcUW51-IL12 and baculoGold<sup>TM</sup> Linearized baculovirus DNA. *Argyrogramma agnata* larvae were infected with recombinant baculovirus Ac-hIL12 by hemocoel injection. The rhIL-12 was purified from the supernatant with affinity chromatography. The blood lymph supernatant harvested and rhIL-12 purified were subjected to SDS-PAGE (silver stain) and Western blot. The level of rhIL-12 was detected by ELISA. Bioactivity of purified rhIL-12 samples were detected by MTT method. It is indicated that Ac-hIL12 can replicate in fat body and midgut cells of *Argyrogramma Agnata* larvae. The Mw of rhIL-12 expressed was 75kD. The expression levels of rhIL-12 were 17.8  $\mu\text{g}/10^6$  cells and 200 - 300mg/L in Sf9 cells and *Argyrogramma agnata* Staudinger larvae blood lymph respectively. The purified rhIL-12 has significant activities which enhanced NK cytotoxicity and increased the proliferation of human PBMC PHA-P activated significantly.

**Key words:** Human interleukin-12; Expression; Purification; Bioactivity; *Argyrogramma agnata* Staudinger

**摘要:** KB细胞经PDBu刺激,采用异硫氰酸胍一步法提取细胞总RNA,RT-PCR法获得重组人白介素-12(rhIL-12) P35和P40 cDNA。将hIL-12 P35 cDNA和P40 cDNA分别克隆到pAcUW51载体的Polyhedrin和P10启动子下游,构建pAcUW51-IL12转移载体。pAcUW51-IL12与坏死缺陷型线性苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒基因DNA共转染Sf9细胞,获得重组杆状病毒Ac-hIL12。该病毒经血腔感染银纹夜蛾幼虫,采用亲和层析法纯化rhIL-12; SDS-PAGE(银染法)、Western blot鉴定表达和纯化的产物;ELISA检测rhIL-12含量;MTT法检测rhIL-12样品生物活性。rhIL-12分子量为75kD。rhIL-12在Sf9细胞培养中表达水平为17.8 $\mu\text{g}/10^6$ 细胞;在银纹夜蛾幼虫中表达水平为200-300mg/L血淋巴。纯化的重组rhIL-12样品对经PHA-P激活的PBMC有明显的增殖活性,且具有明显的促NK细胞杀伤活性的生物活性。

**关键词:** 人白介素-12;表达;纯化;生物活性;银纹夜蛾

中图分类号:Q78 文章标识码:A 文章编号:1003-5125(2002)04-0340-04

人白介素-12(human interleukin-12, hIL-12)主要是由抗原提呈细胞产生的一种异二聚体细胞因

收稿日期:2001-04-24,修回日期:2002-05-24

\* 基金项目:湖北省重点资助项目(2001AA304B05)。

作者简介:徐进平(1964-),女,湖南常德籍,副教授,从事病毒分子生物学研究。

\*\* 通讯作者:孟小林(1956-),男,山东肥城籍,教授,从事病毒分子生物学研究。Correspondence author.

子,能显著增强 NK/LAK 细胞的杀伤活性,促进特异性 CTL 细胞的应答能力,诱导 T 细胞和 NK 细胞大量分泌 IFN- $\gamma$ ,启动  $T_H0$  细胞向  $T_H1$  细胞的发育<sup>[1]</sup>。hIL-12 是目前所发现的细胞因子中对体内免疫活性细胞诱导调节作用最强且范围最广的一种细胞因子,它参与机体的抗肿瘤、抗过敏、抗感染过程。hIL-12 是由不具基因相关性的两个蛋白质亚基 P35 和 P40 通过二硫键相连构成的糖蛋白异二聚体。P35 亚基含 197 个氨基酸残基,分子量约为 35kD;P40 亚基含 306 个氨基酸残基,分子量约为 40kD。P35 亚基是传递信息的功能亚单位<sup>[2]</sup>,而 P40 亚基是 hIL-12 与细胞受体结合的功能蛋白质<sup>[3]</sup>。本研究旨在探讨重组昆虫病毒在靶昆虫活体中表达有生物活性重组人白介素-12(rhIL-12)方法。我们构建了含 hIL-12 P35 和 P40 亚基 cDNA 的重组昆虫病毒,在银纹夜蛾幼虫中高效表达 rhIL-12,采用亲和层析法纯化了 rhIL-12,并对纯化的 rhIL-12 进行了生物活性测定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

银纹夜蛾 (*Argyrogramma agnata* Staudinger) 由本室提供,均为人工饲料传代饲养。草地贪夜蛾细胞 Sf9、KB 和 K562 细胞为本室保存。*E. coli* DH 5 $\alpha$  为本室保存。pCR<sup>®</sup>2.1 购自 Invitrogen 公司。pAcUW51 和坏死缺陷型线性苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒基因 DNA 购自 PharMingen 公司。

### 1.2 试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、MMLV 逆转录酶、Lipofectin 购自 Gibco 公司。DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow)、Sepharose CL-4B 购自 Pharmacia 公司。rhIL-12 (carrier free) 标准品、human IL-12 mAb、抗 hIL-12 mAb ELISA 试剂盒购自 R&D 公司。植物血凝素 PHA-P 购自 DIFCO 公司。

### 1.3 hIL-12 的克隆

收集经 PDBu (100nmol/L, Sigma) 刺激培养 20h KB 细胞。采用异硫氰酸胍一步法抽提总 RNA。分别采用 P35 和 P40 引物 PCR 扩增 P35 和 P40 cDNA 片段。P35 引物:

P1 TTGATCAATGTGTCCAGCGCGCAGCC  
T;

P2 AGTGACGAGCTATCTGAATGCTTCCT  
AA。

P40 引物:P3 AGATCTATGTGTACCAGCAG  
TTGGT;

P4 TGGATCCCTAACTGCAGGGCACAGAT  
G。

### 1.4 重组质粒 pAcUW51-IL12 的构建

将 P35 和 P40 cDNA 片段分别克隆入 pCR<sup>®</sup>2.1 载体中,构建重组质粒 pCR35 和 pCR40。pCR40 经 *Bgl* II 和 *Bam* H I 酶切,回收的 P40 cDNA 片段插入 pAcUW51 *Bgl* II 位点,构建重组质粒 pAcUW51-P40。pCR35 经 *Eag* I 酶切,回收的 P35 cDNA 片段插入 pAcUW51-P40 *Bam* H I 位点,构建重组质粒 pAcUW51-IL12 (图 1)。hIL-12 P35 和 P40 cDNA 序列测定由美国 ABI PE 公司完成。

### 1.5 表达 rhIL-12 重组杆状病毒的构建

按 PharMingen 使用说明书,将 pAcUW51-IL12 DNA 与 BaculoGold<sup>™</sup> Linearized Baculovirus DNA 共转染 Sf9 细胞,获得重组病毒 Ac-hIL12。

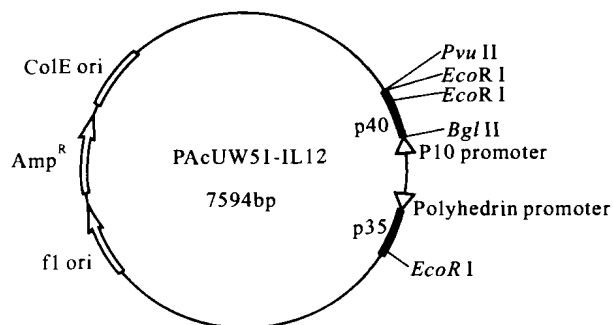


图 1 重组质粒 pAcUW51-IL12 结构示意图

Fig. 1 Present of organization recombinant plasmid pAcUW51-IL12

### 1.6 rhIL-12 在银纹夜蛾中的表达

按  $2\mu\text{l } 7 \times 10^7$  pfu/mL Ac-hIL12 注射 1 头银纹夜蛾的剂量,血腔注射 4 龄银纹夜蛾幼虫,96h 后收集血淋巴。采用 10% SDS-PAGE (银染法) 和 Western blot 鉴定。

### 1.7 rhIL-12 的纯化

分别收集 Ac-hIL12 感染 Sf9 细胞和银纹夜蛾 96h 后的上清或血淋巴。根据 March 等方法<sup>[4]</sup>改进,采用 hIL-12 mAb Sepharose CL-4B 柱免疫亲和层析纯化 rhIL-12。

### 1.8 rhIL-12 ELISA 检测

根据 R&D 公司操作手册进行。

### 1.9 rhIL-12 生物活性测定

根据 Mosmann 方法<sup>[5]</sup>进行。按常规方法分离

人外周血单个核细胞(PBMC)。检测 rhIL-12 对 PBMC 的刺激增殖生物活性,并测定 rhIL-12 诱生 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性,用 MTT 法测定。

## 2 结果

### 2.1 hIL-12 P35 和 P40 cDNA 片段扩增

从经 PDBu 刺激培养的 KB 细胞提取总 RNA,分别采用 P1、P2 和 P3、P4 引物,通过 RT-PCR 扩增,得到单一的 667bp P35 cDNA 片段和 1000bp P40 cDNA 片段。

### 2.2 重组质粒的鉴定

pCR35 经 *Eag* I 单酶切,得到 732bp 和 3.8kb 二条 DNA 片段;经 *Not* I 单酶切,得到 4.5kb 一条 DNA 片段;用 P1、P2 为引物,以 pCR35 DNA 为模板,PCR 扩增,得到 667bp 一条 DNA 片段。pCR40 经 *Bgl* II 和 *Bam* H I 双酶切,得到 1.0kb 和 3.9kb 二条 DNA 片段;经 *Not* I 单酶切,得到 4.9kb 一条 DNA 片段;用 P3、P4 为引物,以 pCR40 DNA 为模板,PCR 扩增,得到 1000bp 一条 DNA 片段。pAcUW51-P40 经 *Bgl* II 或 *Bam* H I 单酶切,得到 6862bp 一条 DNA 片段,经 *Eco*R I 单酶切,正向连接出现 256bp 和 6606bp 二条 DNA 片段,反向连接出现 6107bp 和 755bp 二条 DNA 片段;用 P3、P4 为引物,以 pAcUW51-P40 DNA 为模板,PCR 扩增,得到 1000bp 一条 DNA 片段。pAcUW51-IL12 经 *Eco*R I 单酶切,正向连接出现 0.26kb、1.77kb 和 5.57kb 三条 DNA 片段;反向连接出现 0.26kb、1.18kb 和 6.16kb 三条 DNA 片段。另外,用 P1、P2 为引物,以 pAcUW51-IL12 DNA 为模板,PCR 扩增,获得 667bp P35 cDNA 片段;P3、P4 为引物,以 pAcUW51-IL12 DNA 为模板,PCR 扩增,获得 1000bp P40 cDNA 片段。

### 2.3 hIL-12 P35 和 P40 序列测定

pCR35 和 pCR40 经全自动测序分析,测序结果与报道一致<sup>[4]</sup>。

### 2.4 重组病毒 Ac-hIL12 的鉴定

以重组杆状病毒 Ac-hIL12 DNA 为模板,分别采用 P1、P2 和 P3、P4 二对引物,PCR 扩增分别得到 0.67kb 和 1.0kb DNA 片段。

### 2.5 rhIL-12 的表达

10% SDS-PAGE(银染法)和 Western Blot 结果表明,Ac-hIL12 感染的 Sf9 细胞浓缩上清和感染的

银纹夜蛾幼虫血淋巴,有特异性 35kD 和 40kD 二种蛋白的表达(图 2)。

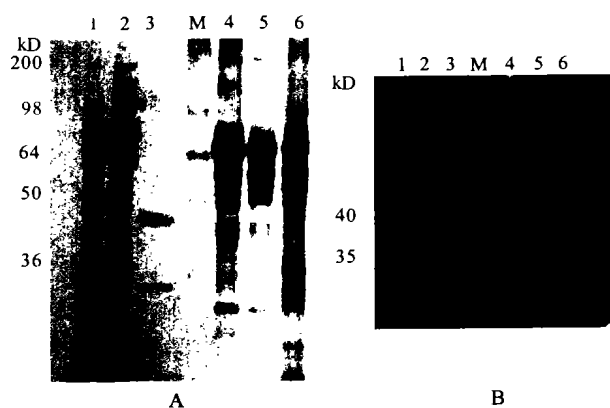


图 2 rhIL-12 表达和纯化的鉴定

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of recombinant hIL-12 protein expression and purification

M, protein marker; 1, Haemolymph from *Argyrogramma Agnata* larve infected with Ac-hIL12; 2, Haemolymph from *Argyrogramma Agnata* larve infected with AcNPV; 3, Purified rhIL-12; 4, Concentrated supernatant of Sf9 cells infected with Ac-hIL12; 5, Concentrated supernatant of Sf9 cells; 6, Concentrated supernatant of Sf9 cells infected with AcNPV.

### 2.6 rhIL-12 的纯化和纯度测定

Ac-hIL12 经血腔注射感染银纹夜蛾 4 龄幼虫。采用亲和层析法,从感染幼虫血淋巴中纯化获得 rhIL-12。纯化的 rhIL-12 样品经 10% SDS-PAGE,银染法和 Western blot 检测,有二条特异带 35kD 和 40kD(图 2)。

### 2.7 rhIL-12 ELISA 检测

重组杆状病毒 Ac-hIL12 经血腔感染银纹夜蛾 4 龄幼虫 96h 后收获血淋巴。Ac-hIL12 感染 Sf9 细胞,96h 后收获细胞上清。采用 ELISA 法,用 hIL-12 mAb ELISA 检测试剂盒检测。结果表明,细胞培养中 rhIL-12 的含量为  $17.8\mu\text{g}/10^6$  细胞,银纹夜蛾幼虫血淋巴中 rhIL-12 的含量为 200~300mg/L。

### 2.8 rhIL-12 生物活性测定

纯化的 rhIL-12 样品与 rhIL-12 标准品,对经 PHA-P 激活的 PBMC 具有明显的增殖活性。当 rhIL-12 浓度为 10、100、1000、10000pg/mL 时, PBMC 增殖效率随 rhIL-12 浓度升高而增高;当 rhIL-12 浓度为 100000pg/mL 时, PBMC 增殖效率略有降低(图 3)。

纯化的 rhIL-12 样品与 rhIL-12 标准品诱生 NK 细胞,该诱生细胞对 K562 细胞具有明显的杀伤

活性,当效靶比为 50:1、25:1、12.5:1、6.25:1、3.125:1时,杀伤活性随效靶比降低而下降(图4)。

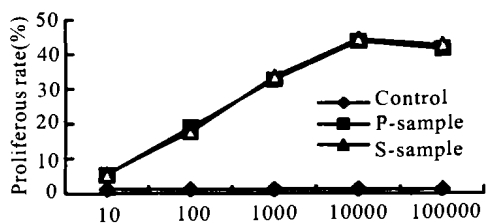


图3 rhIL-12对PBMC的增殖效应

Fig.3 Proliferation of PBMC activated by rhIL-12

P-sample: rhIL-12 purified from haemolymph of *argyrogramma agnata* larvae infected with Ac-hIL12; S-sample: rhIL-12 (carrier free) from R&D Co.

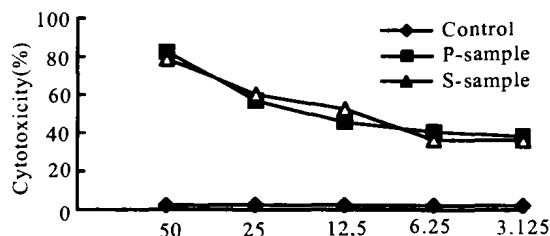


图4 rhIL-12活化的NK细胞对K562细胞杀伤效应

Fig.4 Cytotoxicity of NK activated by rhIL-12 against K562 cells

P-sample: rhIL-12 purified from haemolymph of *Argyrogramma agnata* larvae infected with Ac-hIL12; S-sample: rhIL-12 (carrier free) from R&D Co.

### 3 讨论

表达蛋白质的系统有原核表达系统、酵母表达系统、昆虫细胞表达系统和哺乳动物细胞表达系统等。Gubler<sup>[6]</sup>和 Wolf<sup>[7]</sup>在哺乳动物细胞中共表达 P35 和 P40 亚基,产生了具有生物活性的 hIL-12。本研究中,利用昆虫杆状病毒 AcNPV 作为外源基因的表达载体,使 P35 亚基位于 Polyhedrin 启动子下游,P40 位于 P10 启动子下游。这种构建有利于在昆虫细胞中同时表达 P35 和 P40 亚基,并通过二硫键形成 rhIL12 异源二聚体。

目前,以昆虫虫体作生物反应器的基因工程技术日益受到重视。已有利用家蚕作为生物反应器,表达 IFN- $\gamma$ 、TNF 等的报道。银纹夜蛾属鳞翅目夜蛾科、金翅夜蛾亚科,是危害蔬菜的主要害虫。本研

究采用昆虫活体——银纹夜蛾幼虫表达系统,通过感染银纹夜蛾幼虫,高效表达了重组人白细胞介素-12。

人白细胞介素-12 在细胞介导的免疫应答中是一种重要的调节因素,能促进 T 细胞的增殖和 CTL 分化诱导。本研究中,纯化的 rhIL-12 样品能刺激经 PHA-P 激活的 PBMC 的增殖,说明昆虫活体——银纹夜蛾表达的 rhIL-12 具有诱导经 PHA-P 激活的 T 细胞增殖的活性。但是,当 rhIL-12 浓度为 100000pg/mL,其 PBMC 的增殖效率略有降低,反映出 rhIL-12 超过一定量浓度时,其增殖活性降低。

人白细胞介素-12 也是 NK 细胞强有力的刺激生长因子,能促进 NK 细胞增殖。hIL-12 通过 NK 细胞诱导 IFN- $\gamma$  的复制,并与 hIL-2 有较强的协同作用。hIL-12 也能增强 NK 细胞的溶细胞活性。本研究中,纯化的 rhIL-12 样品能诱导 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性。说明银纹夜蛾表达的 rhIL-12 具有诱导 NK 细胞的杀伤活性的功能。

### 参考文献

- [1] Lamont A G, Adorini L. IL12: a key cytokine in immune regulation [J]. *Immunol Today*, 1996, 17: 214 - 217.
- [2] Zou J J, Schoenhaut D S, Catvajal D M, et al. Structure - function analysis of the p35 subunit of mouse interleukin 12 [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 11 - 17.
- [3] Gillessen S, Carvajal D, Ling P, et al. Mouse interleukin - 12 P40 homodimer: a potent IL - 12 antagonist [J]. *Eur J Immunol*, 1995, 25:1 - 7.
- [4] March S C, Parikh I, Cuatrecasas P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1974, 60: 149 - 152.
- [5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55 - 61.
- [6] Gubler U, Chua A O, Schoenhaut D, et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 4143 - 4147.
- [7] Wolf S F, Temple P A, Kobayashi M, et al. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells [J]. *J Immunol*, 1991, 146: 3074 - 3081.