

IL-10₁₈₋₅₇-PE40 高效表达、纯化及细胞活性之研究

High Level Expression ,Purification and Cytotoxicity of IL-10₁₈₋₅₇-PE40

彭其胜¹ 李月红² 朱 平^{3*}

PENG Qi-Sheng¹ ,LI Yue-Hong² and ZHU Ping^{3*}

1 吉林大学畜牧兽医学院,长春 130062

2 吉林农业大学动物科技学院 长春 130118

3 军事医学科学院军事兽医研究所,长春 130062

1 College of Veterinary ,Jilin University ,Changchun 130062 , China

2 Animal Science and Technology College ,Jilin Agricultural University ,Changchun 130118 , China

3 Institute of Veterinary Science ,Academy of Military Medical Science ,Changchun 130062 , China

摘 要 以 IL-10 的功能短肽(40 肽,即 IL-10 第 18 号至 57 号氨基酸)为导向部分与 PE40(绿脓杆菌外毒素除去受体结合区后的剩余部分)融合分别构建了 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 的胞质和胞周质表达质粒,其中 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 在 RosettaBlue(DE3)中以高效胞质可溶形式表达,在 BL21(DE3)pLysS 中以胞周质分泌形式表达,表达宿主菌 RosettaBlue(DE3)超声波破碎后,依次通过硫酸铵盐析、疏水层析、铜离子亲和层析、阴离子交换层析纯化后,得 96% 重组毒素纯品。细胞活性实验、细胞 ELISA 和荧光标记实验表明,构建的 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 符合免疫毒素的作用机理。因此,该实验为 PE 免疫毒素的规模制备和纯化做了一定的有益的探索。

关键词 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 纯化 细胞毒性

中图分类号 S852.61 ;Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0087-07

Abstract The objective of the experiment is to explore the purification and production of immunotoxin. The chimeric toxin, which is composed of 40 peptides of interleukin 10 (from amino acids 18 to 57) fused to a mutant form of *Pseudomonas* exotoxin (PE) devoid of its native cell recognition domain. Two kinds of prokaryotic expression vector containing the chimeric toxin IL-10₁₈₋₅₇-PE40 were constructed respectively. After induction of IPTG for 3 hours, IL-10₁₈₋₅₇-PE40 was expressed highly in cytoplasmic fraction in RosettaBlue(DE3), and was directed to periplasmic space as soluble form in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Western-blotting showed that the expressed protein could react with the specific rabbit sera against LHRH-PE40. With the application of salting out of (NH₄)₂SO₄, hydrophobic interaction chromatography, Cu-affinity chromatography and anion exchange chromatography, the purity of IL-10₁₈₋₅₇-PE40 was about 96%. The cytotoxicity assay, Cell-ELISA and fluorescent antibody test support the hypothesis that IL-10₁₈₋₅₇ based ligand-mediated cytotoxicity can serve to target cytotoxic agents *in vitro*.

Key words IL-10₁₈₋₅₇-PE40, purification, cytotoxicity

免疫毒素的发展已经经历了两代,所用的导向部分为单抗、单链抗体、激素分子、细胞因子或生长因子,现将进入第三代,即用噬菌体展示技术改良或分离新型的导向部分,改善免疫毒素的活性。但是,免疫毒素的一些基本问题,如:免疫毒素的规模制备、设计、稳定性等仍然是限制其发展的瓶颈^[1],我们以前的实验表明:IL-10₂₃₋₅₇-PE40 免疫毒素能在大肠杆菌中可溶表达,克服了传统免疫毒素包涵体形式表达、复性率不高、稳定性差的难题,且其对靶细胞的致死作用符合免疫毒素的机理,为此,我们提出了细胞因子功能短肽可以替代细胞因子作为免疫毒素导向部分的基本理论^[2]。本次实验尝试进一步改造功能短肽,提高免疫毒素的表达量,为 PE 免疫毒素的规模制备和纯化做一定实验探索。

通过分析 IL-10 与其受体结合的晶体结构及 IL-10 功能短肽研究进展,发现 IL-10 与受体结合主要集中在 1-57 位氨基酸,通过分析 IL-10 前 57 位氨基酸的特点^[3,7],我们设计了另一种免疫毒素 IL-10₁₈₋₅₇-PE40。利用 Overlap PCR 技术扩增了 IL-10₁₈₋₅₇ 基因,与 PE40 融合分别构建了 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 的胞质内表达质粒和胞周表达质粒:pet-28a(+)-IL-10₁₈₋₅₇-PE40, pet-26b(+)-IL-10₁₈₋₅₇-PE40。IL-10₁₈₋₅₇-PE40 能在 RosettaBlue(DE3)胞质中高效可溶表达,在 BL21(DE3)pLysS 胞周质亦能分泌表达。用 DNASTAR 蛋白质软件分析 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 的特点,设计了如下纯化程序:硫酸铵盐析、疏水层析、亲和层析、阴离子交换层析,获得了纯化的免疫毒素,其纯度达到国家生物制品要求。同时,对该免疫毒素进行了细胞毒性实验、细胞 ELISA 和免疫荧光标记检测,证明靶细胞的死亡确系免疫毒素所致。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞:质粒 pet-28a(+), pet-26b(+), RosettaBlue(DE3)、BL21(DE3)pLysS 购于 Novagen 公司;PE40 基因为本室保存;克隆菌 *E. coli* TOP 由孟锐奇研究员(University of Texas)惠赠,RAW264.7 单核-巨噬瘤细胞购自中科院上海细胞研究所,Sp2/0 骨髓瘤细胞和 Hella 细胞为本室保存。

1.1.2 工具酶及试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、PCR 产物回收试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司。Phenol Sepharose 疏水层析、Butel Sephrose 疏水层析、Cu affinity 亲和层析、Q Sephrose

阴离子交换层析所需试剂及层析柱均购自瑞典 Pharmacia Biotech 公司。诱导剂 IPTG 购自 Merck 公司,蛋白质相对分子量标准购自上海生物化学研究所。兔抗 LHRH-PE40 为本室保存,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 为 Sigma 产品,荧光标记羊抗兔 IgG 为 Sigma 产品;PCR 引物、寡核苷酸片段的合成及 DNA 测序由大连 TaKaRa 公司承担;RPMI-1640 培养基为 GIBCO/BRL 公司产品;XTT 细胞毒性试剂盒为 Roche 公司产品。

1.1.3 PCR 引物及寡核苷酸片段的设计:根据 IL-10₁₈₋₅₇ 氨基酸序列设计引物。p1: 5' catgccatgggtaacc 3'; p2: 5' gctgccgccctett 3'; p3: 5' catg cca tgg gta acc tgc cga aca tgc tgc gtg atc tgc gt3', 含有 Nco I 酶切位点; p4: 5' gaa gaa agt ttt tac acg aga gaa agc atc acg cag atc acg 3'; p5: ttt tga aag aag gtc tac ttt cta gtc gac cta ttg gac gac gac ttt ett aga gac gac 5'; p6: 5' ctg ctg aaa gaa tet ctg ctg gaa gat ttc aaa cat atg gcc gaa gag ggc ggc agc3', 含有 Nde I 酶切位点,酶切位点后面的为与 PE40 互补的 18bp。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增与纯化:PCR 反应 1: P3 与 P4 互为模板,94℃ 预变性 45s,68℃ 延伸 60s,10 个循环,得产物 A;PCR 反应 2: P5 与 P6 互为模板,94℃ 预变性 45s,68℃ 延伸 60s,10 个循环,得产物 B;PCR 反应 3: A 与 B 互为模板,94℃ 预变性 45s,68℃ 延伸 60s,10 个循环,得产物 C;PCR 反应 4: 以 C 为模板, P1 和 P2 为引物,94℃ 预变性 45s,50.4℃ 退火 45s,72℃ 延伸 60s,30 个循环,所得产物为 IL-10₁₈₋₅₇ 的基因,经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收。

1.2.2 表达载体的构建与鉴定:PCR 产物用 Nco I 和 Nde I 双酶切,与经同样双酶切的含有 PE40 的 pet-28a(+)的载体连接,得到融合蛋白表达载体 pet-28a-IL-10₁₈₋₅₇-PE40,筛选阳性克隆后测序鉴定,对 pet-28a-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 进行 Nco I 和 EcoR I 双酶切,与经同样双酶切的载体 pet-26b(+)连接,得融合蛋白表达载体 pet-26b-IL-10₁₈₋₅₇-PE40,筛选阳性克隆后测序鉴定。

1.2.3 表达蛋白及 SDS-PAGE 分析:分别将 pet-28a-IL-10₁₈₋₅₇-PE40、pet-26b-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 转化 RosettaBlue(DE3)和 BL21(DE3)pLysS,用终浓度为 1mmol/L 的 IPTG,37℃ 3h 诱导表达。收集表达宿主菌,用 10 倍体积的蔗糖溶液(20% 蔗糖,20mmol/L Tris-Cl,2mmol/L EDTA,pH7.5)悬浮菌体,4℃ 放置,10

min,离心收集菌体,用4℃重蒸水悬浮菌体,4℃放置10 min,离心,取上清液 SDS-PAGE 分析蛋白表达形式,然后收集表达宿主菌的原生质体,超声波裂解后 SDS-PAGE 分析蛋白表达形式。

1.2.4 Western 印迹分析:表达产物经 SDS-PAGE 后,电转移至硝酸纤维素膜上,进行 Western 印迹分析,一抗为兔抗 LHRH-PE40 血清(使用前,用适量的 RosettaBlue(DE3)空菌超声破碎离心上清液吸附血清,然后超滤得一抗血清),二抗为 HRP-羊抗兔 IgG,显色剂为 DAB。

1.2.5 IL-1018-57-PE40 的纯化:

1)用35%饱和硫酸铵盐析 RosettaBlue(DE3)超声波破碎成份;Phenol Sepharose 疏水层析:用含0.5mmol/L 硫酸铵的缓冲液(20mmol/L Tris-Cl, 2mmol/L EDTA, pH8.0)平衡层析柱10个柱床,直至流出液与缓冲液性质相同为止,用缓冲液溶解经35%硫酸铵沉淀法制备的粗纯化样品,以3mL/min的流速上样,再用起始缓冲液将流穿峰洗下直至基线平稳,再行 A(20mmol/L Tris-Cl, 2mmol/L EDTA, 0.5mol/L 硫酸铵, pH8.0)→B(20mmol/L Tris-Cl, 2mmol/L EDTA, pH8.0)梯度洗脱,梯度洗脱条件为5mL/min,时间60min,再以100% B 保持20min,然后超纯水洗脱5个柱床,收集各组分峰进行 SDS-PAGE 和细胞活性分析。

2)Butel Sepharose 疏水层析:用含0.5mmol/L 硫酸铵的缓冲液(20mmol/L Tris-Cl, 2mmol/L EDTA, pH8.0)平衡层析柱10个柱床,直至流出液与缓冲液性质相同为止,样品进行补盐调整浓度至上样缓冲液,其它程序同 Phenol Sepharose 疏水层析。

3)Cu²⁺离子亲和层析:样品进行平衡处理(Sephadex G-25, 20mmol/L Tris-Cl, NaCl 0.3mmol/L, pH7.8),用起始缓冲液 A(20mmol/L Tris-Cl, NaCl 0.3mmol/L, pH7.8)平衡亲和层析柱10~15个柱床,上样:以 A(20mmol/L Tris-Cl, NaCl 0.3mmol/L, pH7.8)→B(20mmol/L Tris-Cl, 咪唑 0.2mmol/L, NaCl 0.3mol/L, pH7.8)行梯度洗脱,梯度洗脱条件为2mL/min,时间60min,收集各组分峰进行 SDS-PAGE 和细胞活性分析。

4)Q Sepharose 阴离子交换层析:用起始缓冲液 A(20mmol/L Tris-Cl, 2mmol/L EDTA, pH7.5)平衡层析柱10~15个柱床,样品进行脱盐处理后(Sephadex G-25, 20mmol/L Tris-Cl, 2mmol/L EDTA, pH7.5)上样,起始缓冲液 A 洗脱流穿峰至基线平稳,以 A(20mmol/L Tris-Cl, 2mmol/L EDTA, pH7.5)→B

(20mmol/L Tris-Cl, 2mmol/L EDTA, 1mmol/L NaCl, pH7.5)行梯度洗脱,梯度洗脱条件为5mL/min,时间60min,收集各组分峰进行 SDS-PAGE 和细胞活性分析,用 Lowry 法试剂盒测定蛋白质浓度。

1.2.6 细胞培养:RAW264.7 癌细胞、Hella 细胞和 SP2/0 骨髓细胞分别用 RPMI-1640 完全培养基在5% CO₂、37℃条件下单层贴壁培养。取对数生长期细胞,吹打分散成单细胞悬液,将细胞数调至2×10⁴个/mL,每孔50μL 加入到96孔培养板中,再根据要加入样品的体积添加40~49μL 的完全培养基,CO₂培养箱中过夜使之贴壁。

1.2.7 细胞毒性试验:纯化的免疫毒素经过滤除菌,和以 RosettaBlue(DE3)超声波破碎的过滤除菌液为对照组,调整两者的蛋白浓度一致,按等倍稀释法将不同量的样品加入各细胞孔中,使之总体积为100μL,5% CO₂、37℃条件下培养12h,取出在倒置显微镜下观察结果,并利用 XTT 法计算 IC₅₀ 的剂量,96孔培养板各孔中分别加入100μL XTT 染色试剂,5% CO₂、37℃条件下继续培养4h,于490nm 波长下 ELISA 检测仪测定吸光值,计算免疫毒素对各种肿瘤细胞的50%蛋白质合成抑制的浓度。

1.2.8 细胞 ELISA:各取正常生长的 Sp2/0 2mL 吹打分散成细胞悬液,置于三支试管,其中一支加入纯化的免疫毒素,第二支不加任何样品作为对照1,第三支试管加入对照 RosettaBlue(DE3)超声波破碎成份的过滤除菌液,调整其蛋白浓度与纯化样品一致,为对照2,均放入5% CO₂、37℃ CO₂ 培养箱作用30min,500r/min 离心5min,以 A 液 PB 50mmol/L, NaCl 0.15mol/L, pH7.8 洗涤3次,其后的程序同常规 ELISA。

1.2.9 荧光标记检测:5% CO₂、37℃细胞培养箱4h, Sp2/0 细胞充分贴壁后,每孔加入20μg/mL 浓度的 IL-1023-57-PE40 20μL,对照组加同样浓度的 PBS 20μL。放入细胞培养箱2h后取出,吸出营养液,加入 PBS 200μL,然后吸出,重复洗3遍。然后加入含1:50 兔抗 LHRH-PE40IgG 的 PBS 100μL,放37℃温箱2h,轻轻吸出所有液体,每孔加入 PBS 200μL,然后吸出,重复3遍,加入1:20 稀释的荧光标记的二抗 PBS(含3% BSA),放入37℃温箱2h,吸出所有液体,用 PBS 洗3遍,使用荧光显微镜观察,照相。

2 结果

2.1 目的基因 IL-10₁₈₋₅₇ 片段的 PCR 扩增

利用 overlap-PCR 技术通过4次扩增合成 IL-

10₁₈₋₅₇ 片段基因 经 2% 琼脂糖凝胶电泳观察 在 150bp 处扩增出一条与预期值相符的特异片段(图 1)。

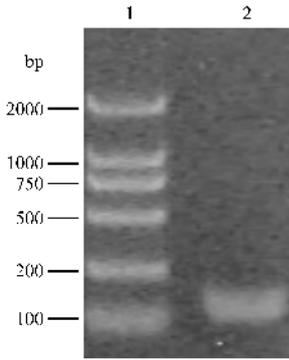


图 1 IL-1018-57 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of IL-10₁₈₋₅₇ DNA
1 :DL2000 DNA mark 2 :PCR products.

2.2 免疫毒素 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 的两种表达载体构建及鉴定

pet-28a(+)和 pet-26b(+)同为 Novagen 的 pet 表达载体系列,后者带有 pelB leader 信号肽,将 PCR 扩增产物连接于含有 PE40 的载体 pet-28a(+)后,得 pet-28a-IL-1018-57-PE40 经 *Nco* I 和 *Eco* R I 双酶切后,插入相同酶切的空白 pet-26b(+)即可得到 pet-26b-IL-1018-57-PE40 表达载体(图 2)。DNA 测序证实两种表达载体插入的目的基因无碱基突变和读码框转移。

2.3 免疫毒素 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 的表达与分析

两种表达载体 pet-28a-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 和 pet-26b-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 分别转化 RosettaBlue(DE3) 和 BL21

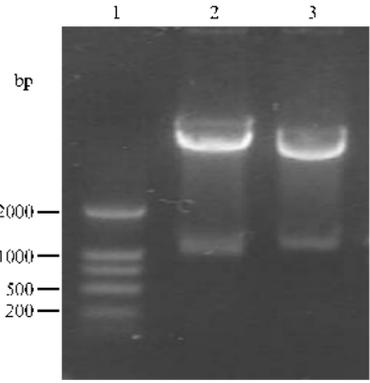


图 2 重组质粒酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme-digestion profile of recombinant plasmid

1 :DL2000 2 :identification of pet-28a-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 with *Nco* I and *Eco* R I digestion ;3 : Identification of pet-26b- IL-10₁₈₋₅₇-PE40 with *Nco* I and *Eco* R I digestion.

(DE3)pLysS 后,经诱导表达后,表达产物行 SDS-PAGE 分析,在 M_r43 000 有一条明显的条带,与预期值相符(图 2A、2B),表达宿主菌经过糖-水渗透溶胀后,收集 RosettaBlue(DE3)菌体原生质体,超声波破碎裂解,分别取其上清和沉淀进行 SDS-PAGE,实验表明免疫毒素 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 以可溶性形式表达,表达蛋白经 Kodak 1D 电泳分析软件,其表达量为菌体总蛋白的 20%(图 3B),收集 BL21(DE3)pLysS 菌体,进行糖-水渗透溶胀,进行 SDS-PAGE 分析,表明免疫毒素 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 以分泌细菌周质形式表达(图 3A),其表达量为 5%。

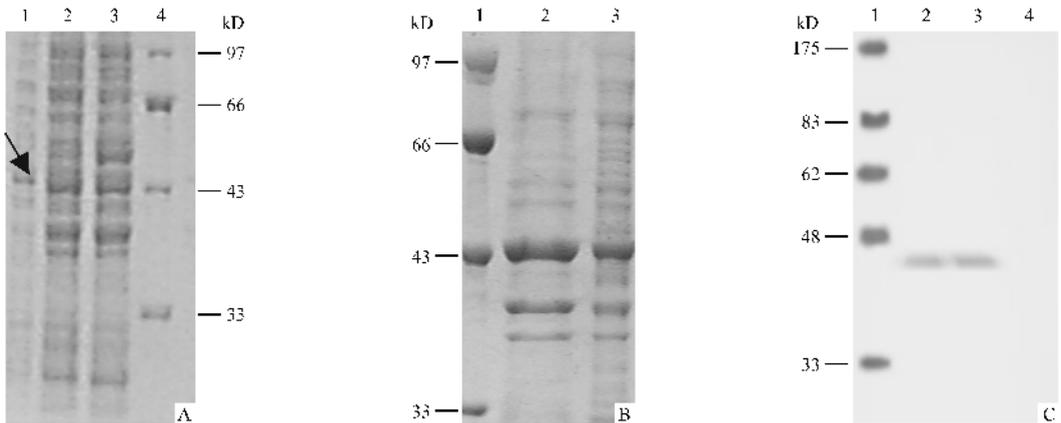


图 3 免疫毒素的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

Fig. 3 The expression products analysed by SDS-PAGE(A、B) and Western-blotting(C)

(A) 1 :periplasmic fraction of BL21(DE3)pLysS with pet-26b-IL-1018-57-PE40 ; 2 :BL21(DE3)pLysS with pet-20b-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 ; 3 : BL21(DE3)pLysS ; 4 :protein marker(from up to down 97.4 66.2 43.31 2014kD) (B) : protein marker ; 2 :soluble cytoplasmic fraction of RosettaBlue(DE3) with pet-28a-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 ; 3 :RosettaBlue(DE3) with pet-28a-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 ; (C) 1 : protein marker , 2 : soluble cytoplasmic fraction of RosettaBlue(DE3) with pet-28a-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 3 :RosettaBlue(DE3) with pet-28a-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 4 : contro(RosettaBlue(DE3)).

2.4 Western 印迹分析

pet-28b-IL-10₁₈₋₅₇-PE40 在 Rossetablue (DE3) 中的表达产物经 Western 印迹分析检测,在对应于 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 处有明显的蛋白杂交带,说明产物为特异性蛋白(图 3C)。

2.5 免疫毒素 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 的纯化

35% 饱和硫酸铵盐析 Rossetablue (DE3) 表达菌超声波破碎成份后,依次经 Phenol Sepharose 疏水层析、Butel Sepharose 疏水层析、Cu affinity 亲和层析、Q Sepharose 阴离子交换层析纯化后,用 SDS-PAGE 分析,纯化后的蛋白达到 96% 纯度(图 4)。经蛋白质浓度测定可知,蛋白质产率约为 15mg/L。

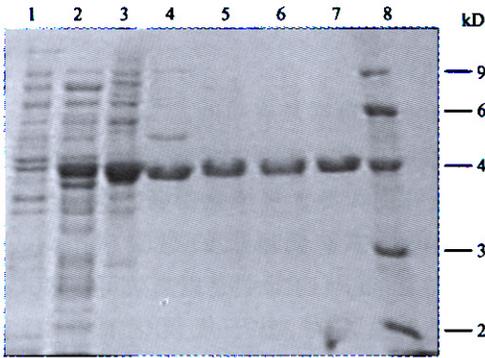


图 4 IL-1018-57-PE40 的纯化

Fig. 4 SDS-PAGE of purified IL-10₁₈₋₅₇-PE40

1: control (RosstaBL21 DE3); 2: expression of IL-10₁₈₋₅₇-PE40; 3: salting out (35% Ammonium sulphate); 4: Phenol Sepharose; 5: Butel Sepharose; 6: Cu affinity; 7: Q Sephrose; 8: marker.

2.6 细胞 ELISA 分析

以未加任何样品组为空白对照(设为对照 1),经 ELISA 反应后,测得加入纯化样品组的 OD 平均值为 0.85,加入 Rossetablue(DE3)超声波破碎成份的过滤除菌液后其 OD 平均值为 0.09(设为对照 2),结果表明,免疫毒素 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 结合到了的 SP2/0 骨髓瘤细胞表面(表 1)。

表 1 细胞 ELISA 分析

Table 1 Assay of immunotoxin by cell-ELISA

Control1	Control2	IL-10 ₁₈₋₅₇ -PE40
0	0.09	0.85

2.7 细胞毒活性的荧光标记检测

从显微镜下观察,PBS 对照组没有发现荧光。而加入 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 的细胞孔每孔能看到细胞在显微镜光源的激发下发出的荧光,说明 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 可以通过 IL-10₁₈₋₅₇ 与 Sp2/0 细胞细胞上的 IL-10R 结合。

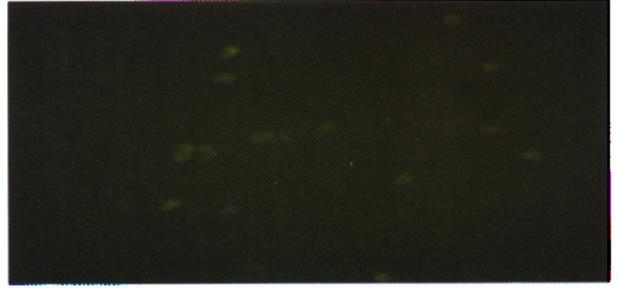


图 5 Sp2/0 细胞的荧光标记

Fig. 5 Immunofluorescence of Sp2/0 cell

2.8 细胞毒性试验和 IC50 的测定

我们检测了免疫毒素对 RAW264.7 单核-巨噬瘤细胞、Hella 细胞和 Sp2/0 骨髓瘤细胞的杀伤作用,结果表明,免疫毒素 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 对 RAW264.7 单核-巨噬瘤细胞和 SP2/0 细胞具有杀灭作用,而且 Rossetablue(DE3)超声波破碎成份的过滤除菌液对 RAW264.7 和 SP2/0 细胞无影响(图 6,图 7),XTT 法染色后通过酶标仪测定免疫毒素对 Sp2/0 的 IC50 剂量大约为 100pmol/L(图 8)。

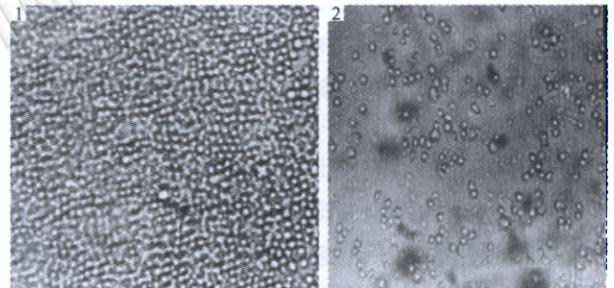


图 6 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 对 Sp2/0 的细胞毒性

Fig. 6 specific cytotoxic activity of IL-10₁₈₋₅₇-PE40 to Sp2/0 (dose: 100pmol/L, time: 24h)

1: control group; 2: experiment group.

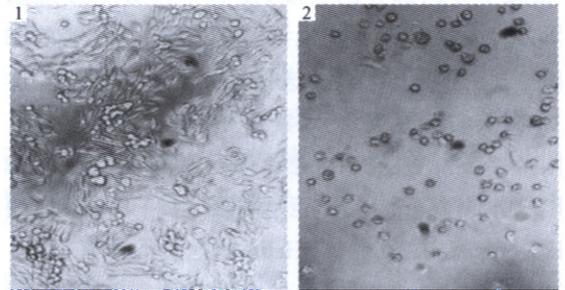


图 7 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 对 RAW264.7 的细胞毒性

Fig.7 specific cytotoxic activity of IL-10₁₈₋₅₇-PE40 to RAW264.7 (dose: 100pmol/L, time: 24h)

1: control group; 2: experiment group.

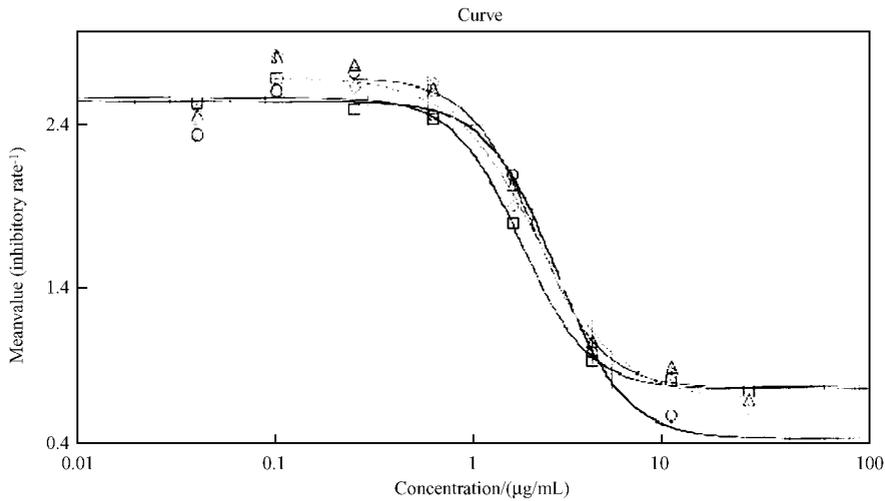


图8 IL-10₁₈₋₅₇-PE40对Sp2/0的半致死浓度(IC₅₀)

Fig. 8 IC₅₀ assay of IL-10₁₈₋₅₇-PE40 to Sp2/0

3 讨论

免疫毒素是一种新型靶向性基因工程药物,它采用基因工程技术,将人为设计的导向部分和毒素部分进行基因融合,置于原核系统表达,它具有靶向性强、生物活性高的特点,不失为一种良好的抗癌药物。目前,对免疫毒素的研究主要集中在寻找合适的导向部分,使其特异性强,对正常细胞毒性小,对靶细胞毒性强,而且便于原核表达纯化,所用的导向部分包括:单克隆抗体及其功能片段、生长/细胞因子和可溶性受体。这些导向部分虽然已经人源化或部分人源化,减少了免疫毒素的免疫原性,但是,其与毒素基因融合并在原核系统中表达时大多以包涵体表达,复性难度大,回收率低^[1]。为了克服这个难题,我们尝试用与细胞因子受体有特异结合能力的功能短肽替代细胞因子作为免疫毒素的导向部分,尽量减少导向部分的长度,使其不过分干扰细菌毒素的阅读框架,让免疫毒素可溶表达,本次实验和以前的实验证明了我们的这种思路的正确性^[2]。

我们实验了免疫毒素对 RAW264.7 单核-巨噬瘤细胞、Hella 细胞和 Sp2/0 骨髓瘤细胞的杀伤作用(其中 RAW264.7 单核-巨噬瘤细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞上含有 IL-10 受体, Hella 细胞上不含有 IL-10 受体)在 24h 内免疫毒素对 RAW264.7 单核-巨噬瘤细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞有明显的杀伤作用,对 Hella 细胞没有致死作用。细胞 ELISA 和免疫荧光标记表明,对细胞的杀伤是通过免疫毒素与细胞的结合所致。从这个方面证明免疫毒素和绿脓杆菌外毒素的作用机理是一致的,从而说明我们构建的 IL-

10₁₈₋₅₇-PE40 免疫毒素是成功的。

由于免疫毒素是静脉注射给药,且所需用量较大,因此其纯度和易于规模化制备是我们实验中首先应考虑的因素。同以前的实验相比,IL-10₁₈₋₅₇-PE40 在 RosettaBlue(DE3)中是以高效可溶形式表达,表达量在 20% 左右,易于规模化制备,且较 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 明显提高,这是由于 IL-10₂₃₋₅₇ 的前 5 个氨基酸中含有 2 个精氨酸,有文献表明,重组蛋白前几位若是精氨酸,其去质子化所需能量为 6 ~ 8 kcal/mol,在所有氨基酸中最高,它限制表达,将精氨酸后移,一般能提高蛋白质的表达^[4,5]。尽管 IL-10₁₈₋₅₇-PE40 在 BL21(DE3)pLysS 中也能胞周质分泌表达,但是由于 BL21(DE3)pLysS 染色体中整合有溶菌酶的基因,该菌在常温和 4℃ 之间来回载换操作时极易细胞裂解,导致核酸溢出,给纯化带来麻烦,导致纯度不够^[2],因此本次实验我们尝试纯化 RosettaBlue(DE3)中的表达蛋白,通过 DNASTar 软件分析免疫毒素的特性,发现其等电点为 4.8、疏水性较强和有 4 个组氨酸分布比较集中的特点,因此我们设计了疏水层析、阴离子交换层析和铜离子亲和层析作为免疫毒素的纯化方法,为了做到尽量减少免疫毒素的损失,实验中我们引进了两种疏水层析方法,先用 Phenol Sepharose 疏水层析将细菌中有一定疏水性的蛋白浓缩,然后用 Butel Sepharose 疏水层析将疏水性较强的免疫毒素进一步浓缩出来^[6],然后经过 Cu affinity 层析和 Q Sepharose 阴离子交换层析后免疫毒素的纯度达到 96%,符合国家生物制品的纯度要求,本实验中之所以引入 Q 阴离子交换层析,是因为它不仅具有层析专一性,而且还有很强的浓

缩功能。因此本实验为 PE 免疫毒素规模制备和纯化做出了有益的探索。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Gerald R thrush , Laura R Lark , Birgitta C *et al.* Immunotoxins :An update. *Ann rev Immunol* ,1996 ,14 :49 - 71
- [2] Peng QS(彭其胜) ,Zhang GI(张国利) ,Wu GM(吴广谋) *et al.* Soluble expression , purification and cytotoxicity of IL-10_{23,57}-PE40. *Chinese Journal of Biochemistry & Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报) 2005 ,21(4) 504 - 509
- [3] Moore KW , de Waal Malefyt R , Coffman RL *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* ,2001 ,19 :683

- 765

- [4] Engelman DM , Steitz TA. The spontaneous insertion of protein into and across membranes :the helical hairpin hydrophesis. *Cell* ,1981 ,23(2) : 411 - 422
- [5] Davis NG , Model P. An artificial anchor domain :hydrophobicity suffices to stop transfer. *Cell* ,1985 ,81 :607 - 614
- [6] Amersham Pharmacia Biotech Press. Hydrophobic interaction chromatography principle and methods. Edition AB ,2000 ,18-1020-90
- [7] Reineke U , Sabat R , Volk HD *et al.* Mapping of the Interleukin10/ Interleukin10 receptor combining site. *Protein Science* ,1998 ,7 :951 - 960

“活体生物反应器”研究新进展

本刊曾介绍了生物反应器研究的新进展(2005, 21(5): 808) 这里再作几点补充。

1. 克隆猪及克隆羊表达有关人体有益基因:日本农业生物资源研究所与名古屋大学合作,用克隆技术和基因操作技术成功克隆出含有人体基因的猪和羊,再用这种含人体基因的猪器官移植到人体内,不会发生排异反应。这充分表明此“工程器官”的外源基因与受体宿主细胞基因已融为一体,这样的整合对临床医学有着重要的价值。“工程克隆猪”是如此,对“工程克隆羊”也是如此。如带有编码人体血液微量蛋白质的羊,其乳汁中含有对人体有用的蛋白质(如 IFN、MT、tPA 等),饮用这种含有一种有用蛋白质或复合的“工程羊奶”,会起到医疗保健作用。但煮沸之后各蛋白质的效力如何,还有待进一步实验研究。日本研究者计划将含有人体基因的克隆猪的器官移植到猴子体内,如能成功,则对人类更加有利。3~4 年后用含有人体基因的克隆羊进行药物开发实验,将能够更多地服务于人类。

2. 建构转基因奶牛有益于抗炎症,更好地自我保护:美国研究者建构的转基因奶牛能有效抵抗由金葡萄菌(*Staphylococcus aureus*)感染引发的奶牛乳腺炎(注:此疾病在美国造成奶制品业经济损失达每年 20 亿美元,在英国,每年损失达 2 亿美元左右),这种“工程奶牛”能生产一种溶菌酶,它具有溶解金葡萄菌的能力。实验证明,此“工程奶牛”(含有溶菌酶蛋白)没有被金葡萄菌感染的迹象,表明外源酶基因表达产物可以起重要作用,而对照奶牛乳腺感染的面积平均达 70%。这说明外来金葡萄菌感染而引发的乳腺炎依然如故,甚至大有蔓延之势。因此,建构抗病(乳腺炎)转基因奶牛对提高奶的产量和质量、确保饮用奶产品的安全有重要价值。

3. 转基因克隆奶牛的奶可用来治疗胃病:这是我国研究人员取得的一项成果(中国农业大学和中国农业科学院畜牧研究所共同努力合作的结果),他们从一头高产奶牛的耳中取出活体组织细胞,通过转基因技术植入岩藻糖转移酶(对人的胃病有一定疗效)基因,再培养成奶牛胚胎,而后通过胚胎移植技术将克隆胚胎移植到受体母牛子宫内繁育,8 个多月降生(雌性),成长至 19 个月,经人工授精怀孕,可继续繁殖后代。由于遗传的因素,她具有高产奶的特性,出乳第 1 天就产奶 10 多公斤,比一般的奶牛高出 1 倍,到产奶高峰期,每年可产奶 1 万公斤,显示出巨大的开发潜能。

总之,转基因技术、克隆技术或将它们有机地结合起来,对于开发“活体生物反应器”生产人类必需的高品质医用或保健产品具有明显的优势,有望实现产业化。对“活体生物反应器”的开发将产生可观的经济和社会效益。

(柯 为)