论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0828-03

重组免疫毒素 hIL-2-Luffin P1 的构建及表达

王儒鹏,周丽娜,吴 军,贺伟峰,易绍萱,陈希伟,张小容 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建人分泌型 IL-2 与免疫毒素 Luffin P1 的重组基因原核表达载体,并对其产物进行鉴定及纯化。**方法** 采用基因工程原理,将 IL-2-Luffin P1 的重组基因片段克隆入表达载体 pET20b(+)中,经酶切及 DNA 序列测定鉴定正确,转化表达宿主菌 Origami(DE3)pLysS 中,经 IPTG 诱导表达含 His 标签的融合蛋白-重组免疫毒素 hIL-2-Luffin P1。**结果** 成功构建了免疫毒素表达载体 pET20b(+)-hIL-2-Luffin P1,获得纯化的重组免疫毒素,并经 Western blot 鉴定正确。**结论** hIL-2-Luffin P1 的成功构建,为进一步研究它在抗移植排斥中的作用奠定了基础。

关键词: 免疫毒素;Luffin P1;Western blot

中图法分类号: R392.11; R394-33 **文献标识码:** A

Construction and expression of a recombinant immunotoxin hIL-2-Luffin P1

WANG Ru-peng, ZHOU Li-na, WU Jun, HE Wei-feng, YI Shao-xuan, CHEN Xi-wei, ZHANG Xiao-rong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a new recombinant immunotoxin expression vector composed of human IL-2 and immunotoxin Luffin P1 gene, and to examine the inhibition effects of fusion protein hIL-2-Luffin P1 on T cells. **Methods** The hIL-2-Luffin P1 gene fragment was subcloned into fusion protein expression plasmid. The recombinant vector was identified by restriction endonucleases digestion and DNA sequencing. After transformed into Origami (DE3) pLysS and induced by IPTG, the protein was purified by His affinity chromatography. The effects of hIL-2-Luffin P1 on T cells were evaluated by MLR assay. **Results** The new recombinant immunotoxin expression vector pET20b(+)-hIL-2-Luffin P1 was constructed successfully. The fusion protein was identified by Western blot assay. Tests showed that purified IL-2-Luffin P1 had obvious inhibition effects on T cells proliferation. **Conclusion** hIL-2-Luffin P1 has great potentials for further research in the field of transplantation and autoimmune diseases.

Key words: immunotoxin; Luffin P1; Western blot

免疫毒素是免疫学研究的热点之一,被称为"生物导弹",近年来利用基因工程技术构建了不同用途的免疫毒素[1]。Luffin P1 是最近发现的分子量最小的核糖体失活蛋白,毒性作用强,免疫原性低[2,3]。另一方面利用 IL-2 作为导向性的载体分子,构建免疫毒素的方法具有明显的优势,能够定向针对 IL-2 受体,因此在抗移植排斥及自身免疫性疾病中具有很好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

原核表达载体 pET20b(+)及表达宿主菌 Origami(DE3)pLysS 系哈佛医学院高文达博士惠赠。大肠杆菌 DH5α 为本研究室保存。RT-PCR 试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、*Eco*RⅠ、*Sal*Ⅰ、*Xho*Ⅰ、DNA 聚合酶、T4 DNA、连接酶、DNA 标准分子质量 Marker 购自大连宝生物工程公司。氨苄青霉素购自上海生工公司。兔抗人 IL-2 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠 IgG 系博士德公司产品。DNA 凝胶回收试剂盒系 Omiga 公司产品,亲和层析柱、His 标签抗体、Bugbuster 蛋白抽提试剂及 Benzonase 核酸酶系 Novagen 公司产品。其它常规试剂按文献[4]配制。

1.2 方法

1.2.1 hIL-2 的克隆 提取人脾细胞 mRNA,用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV)中的反转录酶将 RNA 合成 cDNA,然后在同一反应管中使用 Hot Start PCR 用 TaKaRa Ex *Taq* HS DNA 聚合酶扩增此 cDNA,设计套式 PCR 引物扩增不含信号肽序列的 hIL-2 的引物,两对引物序列分别为:首先含信号肽的全长序列引物为:5′-CACAACACCTGCCACAA3′;5′-TGAAACCATTTTAGAGCC-3′,不含信号肽的 hIL-2 引物为:5′-TGATCCATGGCACCTACT-3′;5′-GGAAGCACTTAATTATC-3′。扩增的 IL-2 片段最终长度为 426 bp。

1.2.2 hIL-2-Luffin P1 的克隆 Luffin P1 在 Genebank 中的序

作者简介:王儒鹏(1971-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事移植免疫方面的研究。电话:(023)66574342

收稿日期:2005-01-15;修回日期:2005-04-12

列号为 AF537345,由于分子量小,核苷酸序列短,仅有 123 bp,因此根据重叠 PCR 的方法,设计寡聚核苷酸作引物直接将其延他片段扩增出来,并用此方法将 Luffin P1 与 IL-2 片段接起来,两个片段之间含表达 3 个甘氨酸的柔性连接子,引物设计时加入与 pET20b 载体相应的酶切位点 *Nco* Ⅰ, *Xho* Ⅰ。获得重组免疫毒素 hIL-2-Luffin P1 基因序列,基因重组策略流程见图 1。

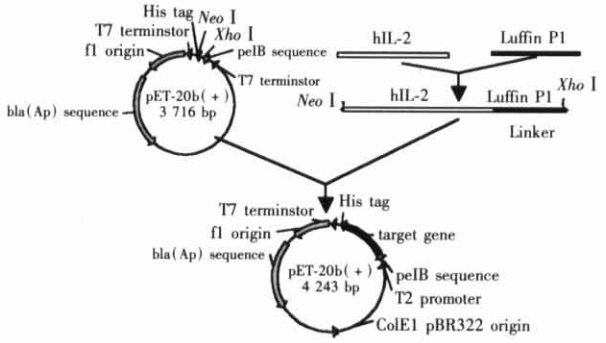


图 1　基因重组策略图

Fig 1　The process of plasmid recombination

1.2.3　重组表达质粒 pET-hIL-2-Luffin P1 的构建　　PCR 扩增、质粒提取、酶切、回收、连接、转化、鉴定和序列测定等均按文献[4]进行。hIL-2-Luffin P1 PCR 产物分别经双酶切后利用胶回收试剂盒回收,然后连接入原核表达载体 pET20b(+),转化大肠杆菌 DH5α,氨苄青霉素抗性筛选阳性菌落,特异 PCR 和质粒酶切电泳鉴定重组质粒。阳性重组质粒送上海博亚公司测序,测序正确后重组质粒转化 Origami(DE3)pLysS,并提质粒、酶切鉴定。

1.2.4　重组表达质粒 pET-hIL-2-Luffin P1 的表达　　通过重组质粒表达的蛋白为含 IL-2 及 Luffin P1 的融合蛋白。从过夜培养的 Origami(DE3)pLysS(pET- hIL-2-Luffin P1)菌液中取 50 μl,加入 5 ml 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液中,250 r/min 振摇,37 ℃振荡培养至对数生长期。加化学诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,继续 250 r/min,于不同时相点取样品,制备样品进行 SDS-PAGE 电泳。Western blot:蛋白样品经 SDS-PAGE 后,凝胶和 PVDF 膜在转移缓冲液(25 mmol/L Tris,192 mmol/L 甘氨酸,20 ml/L 甲醇,0.1 g/L SDS)中浸泡 15 min,于半干式电转印仪 25 V 转印 25 min。PVDF 膜用蒸馏水洗 3 次,PBS 洗 1 次,转入封闭液(TBST + 10 g/L 脱脂奶粉)中封闭 1 h,与小鼠来源的 His 单克隆抗体孵育,4 ℃过夜。洗膜后,与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(1∶1 000)反应 1 h,用化学发光法显色。大量诱导的菌液,4 ℃,4 000 × *g* 离心 20 min 收集细菌,1 × PBS 洗菌 1 次。用 BugBuster 蛋白抽提试剂按每克菌体湿重加入 5 ml 的 BugBuster,另外按每毫升的 BugBster 加入 25 单位的 Benzonase 核酸酶,低速混均,室温孵育 20 min,16 000 × *g* 离心 15 min,收集上清备纯化。0.1 mol/L $NiCl_2$ 0.5 ml 挂镍。Start buffer (20 mmol/L Na_2HPO_4,0.5 mol/L NaCl,10 mmol/L 咪唑)10 ml 平衡过柱。5 ml 上清液过柱,流速控制在 1 ml/min,Start buffer 10 ml 洗柱,Elution buffer (20 mmol/L Na_2HPO_4,0.5mol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑) 5 ml 洗脱,收集洗出物,电泳观察纯化效果。

1.2.5　融合蛋白 hIL-2-Luffin P1 功能的初步分析　　用混合淋巴细胞反应(MLR)检测融合蛋白对 T 细胞转化的作用[5],C57 及 BALB/c 小鼠脾细胞各 1×10^5/孔,进行混合淋巴细胞培养,实验孔中加入不同浓度的融合蛋白,对照加 PBS,5% CO_2、37 ℃培养 7 d, ^3H 胸腺嘧啶掺入,14 h 后收获细胞,β 液闪仪检测。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件行单因素方差分析。

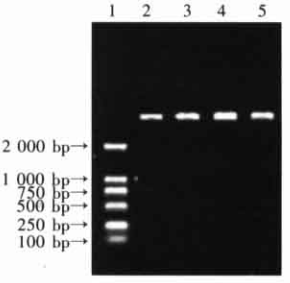
2　结果

2.1　重组表达质粒 pET- hIL-2-Luffin P1 的构建及鉴定

2.1.1　hIL-2、Luffin P1 片段的合成　　用人脾细胞提取的 mRNA 为模板,反转录获得 cDNA,通过两次 PCR 扩增不含信号肽的 hIL-2 基因片段 426 bp。以及通过计寡聚核苷酸作引物直接扩增 Luffin P1 片段。

所得的 hIL-2、Luffin P1 片段分别与 T 载体相连,经转化、铺板和小量提取质粒后,分别进行双酶切鉴定,大小片段与目的基因片段大小相符。双酶切鉴定正确的阳性克隆,由上海博亚生物技术有限公司采用全自动 DNA 序列分析仪进行分析。两个基因片段序列完全正确。

2.1.2　hIL-2-Luffin P1 的克隆　　获得的 hIL-2 及 Luffin P1 用设计的引物通过重叠 PCR 的方法连接起来,获得全长的 hIL-2-Luffin P1,含与 pET20b(+)相应的酶切位点 *Nco* Ⅰ, *Xho* Ⅰ。hIL-2-Luffin P1 和载体 pET20b(+)分别用 *Nco* Ⅰ、*Xho* Ⅰ酶双切,目的片段和载体回收后用 T4 DNA 酶连接。并转化大肠杆菌 DH5α,经 PCR 及酶切鉴定片段大小相符(图 2),送博亚生物技术公司测序,结果完全正确。并转化表达菌 Origami(DE3)pLysS,经鉴定正确后用于重组蛋白的表达。



1: DNA Marker; 2 and 3: pET20b(+)plasmid; 4 and 5: pET20b(+)-hIL-2-Luffin P1 digested with *Nco* Ⅰ, *Xho* Ⅰ

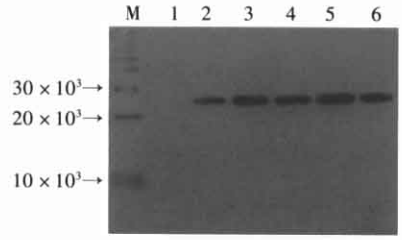
图 2　重组质粒 pET20b(+)-hIL-2-Luffin P1 酶切琼脂糖电泳图谱

Fig 2　Agarose electrophoresis of recombinant plasmid pET20b(+)-hIL-2-Luffin P1 digested with *Nco* Ⅰ, *Xho* Ⅰ

2.2　重组表达质粒 pET-hIL-2-Luffin P1 的表达和鉴定

重组表达质粒转化表达菌 Origami(DE3)pLysS 后,用 IPTG 诱导重组基因的表达,表达产物用 SDS-PAGE 检测,结果显示,与未诱导菌以及单纯 pET20b(+)相比,诱导的重组菌表达一条相对分子量约为 23×10^3 的深染带,与预期的目的蛋白大小一致。经凝胶成像仪扫描分析显示蛋白表达量占菌体总蛋白量的 15%左右,并且不同时相的表达量不同,在 4 h 蛋白的表达最高。

用 His 单克隆抗体行 Western blot 检测(图 3),有很强的阳性条带,并且在同样蛋白上样量条件下,4 h 表达量最高,与 SDS-PAGE 相符。用抗人 IL-2 抗体检测,也出现阳性条带。



M: Marker; 1: Non-induced pET20b(+)-hIL-2-Luffin P1 as control; 2 - 6: hIL-2-Luffin P1 fusion proteins at 1,2,3,4,5 h respectively detected with anti-His tag antibody

图 3 Western blot 鉴定免疫毒素 hIL-2-Luffin P1 的表达

Fig 3 Western blot identification of immunotoxin hIL-2-Luffin P1 expression

3 讨论

研究表明植物种子中含有多种蛋白质和多肽,其中有一类是具有抑制蛋白质生物合成活性的核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating protein, RIP),是一类重要的免疫毒素[6,7],具有很强的毒性作用,它包括天花粉蛋白、Luffin 家族等。通常根据肽链的组成和性质,植物核糖体失活蛋白分为 3 类,Ⅰ型由单链构成,Ⅱ型为双链,两条链通过二硫键连接,Ⅲ型 RIP 也由两条链组成,它们由同一个前体蛋白加工而成,通过非共价的相互作用结合在一起,共同参与形成 N-糖苷酶的活性中心。单链毒素和完整毒素的 A 链一样,是一类特异的 RNA N-糖苷酶,能水解真核细胞核糖体 RNA 的 4 324位上的腺嘌呤,使真核细胞核糖体 60S 亚基失活从而抑制其蛋白质生物合成。完整毒素的 B 链可以结合真核细胞表面的半乳糖残基从而协助 A 链进入细胞,抑制细胞内的蛋白质合成而导致细胞死亡。单链毒素对无细胞体系中的蛋白质合成具有强烈的抑制效应,但单链毒素没有 B 链所以很难进入细胞,因此对完整细胞毒性很低。所以,把单链毒素和单克隆抗体、细胞因子等载体结合在一起形成融合分子,能特异性地杀伤靶细胞,在导向治疗中有广泛的应用价值。如在抗肿瘤作用的研究中,把单链毒素与特定的癌细胞衍生的单克隆抗体连接而制备的导向药物(免疫毒素)能高效率地杀伤癌细胞,能够获得很好的疗效。

Luffin P1 是最近发现的分子量最小的 Luffin 家族成员[3],分子量大小为5 226.1,毒性作用强,免疫原性低,因而更具有应用价值。但 Luffin P1 是也是属于Ⅰ型 RIP,也是由单链构成,本身不具有进入细胞的功能,需要通过一定方式介导才能进入细胞发挥作用。另一方面,在 T 细胞瘤、一些自身免疫性疾病以及器官移植排斥反应中,T 细胞的过度活化起着主导地位[8,9]。同时,静止 T 细胞只表达 IL-β 链,与 IL-2 配体结合力差,当 T 细胞活化后同时高表达 IL-2Rα 链和 β 链,组成高亲和力受体,与 IL-2 有很强的结合力,因而能使过度活化的 T 细胞成为靶细胞,同时用人源性的 IL-2 避免了因应用异源载体引起的副作用,因而人 IL-2 可以作为理想的定向载体。利用人 IL-2 构建融合免疫毒素的方法具有明显的优势,具有很好的应用前景,有的已进入临床试验,在治疗 T 细胞肿瘤和自身免疫性疾病的试验中取得了较好的效果[10,11]。因而本实验利用 Luffin P1 与人 IL-2 的特点,用基因重组的方法构建了免疫毒素表达载体 pET20b(+) hIL-2-Luffin P1,以 Origami(DE3)pLysS 为表达宿主菌,成功表达了融合蛋白 IL-2-Luffin P1,为进一步研究它在抗移植排斥及自身免疫性疾病中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] Kreitman R J. Recombinant immunotoxins for the treatment of haematological malignancies[J]. Expert Opin Biol Ther, 2004, 4(7): 1115 - 1128.

[2] Wang H X, Ng T B, Cheng C H, *et al*. Contamination of ribosome inactivating proteins with ribonucleases, separated by affinity chromatography on red sepharose[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2003, 33(2): 101 - 111.

[3] Li F, Yang X X, Xia H C, *et al*. Purification and characterization of Luffin P1, a ribosome-inactivating peptide from the seeds of Luffa cylindrical [J]. Peptides, 2003, 24(6): 799 - 805.

[4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2003. 1565 - 1594.

[5] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 第 2 版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002. 396 - 399.

[6] Bagga S, Seth D, Batra J K. The cytotoxic activity of ribosome-inactivating protein saporin-6 is attributed to its rRNA N-glycosidase and internucleosomal DNA fragmentation activities[J]. J Biol Chem, 2003, 278(7): 4813 - 4820.

[7] Kreitman R J. Immunotoxins[J]. Expert Opin Pharmacother, 2000, 1(6): 1117 - 1129.

[8] Szabolcs P, Park K D, Marti L, *et al*. Superior depletion of alloreactive T cells from peripheral blood stem cell and umbilical cord blood grafts by the combined use of trimetrexate and interleukin-2 immunotoxin[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2004, 10(11): 772 - 783.

[9] Tsai H F, Lai J J, Chou A H. Induction of costimulation of human CD4 T cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: possible role in T cell activation in systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(2): 629 - 639.

[10] Foss F M. Interleukin-2 fusion toxin: targeted therapy for cutaneous T cell lymphoma[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 941: 166 - 176.

[11] Foss F M, Waldmann T A. Interleukin-2 receptor-directed therapies for cutaneous lymphomas[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2004, 17(6): 1449 - 1458.

(编辑 薛国文)