

## 白细胞介素 2-绿脓杆菌外毒素 融合基因的克隆及高效表达

高基民 黄洪莲 王小宁

(第一军医大学免疫教研室 广州 510515)

徐舫飞 郑仲承 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

**摘 要** 利用聚合酶链式反应和寡核苷酸介导的定向诱变技术构建了白细胞介素 2-绿脓杆菌外毒素 IL2-PE40、IL2-PE40KDEL、IL2-PE66<sup>Glu</sup>和 IL2-PE66<sup>Glu</sup>KDEL 融合基因的原核表达重组质粒,并实现了高效表达,表达产物占菌体总可溶蛋白的 20%~30%。此外,由于这一表达质粒在 IL-2cDNA 与 PE 基因连接处引入了唯一的 Sma I 位点,其 5'、3'端分别含有唯一的 EcoR I、Pst I 位点,因此可方便地用其它基因替换 IL-2 或 PE 基因而获得相应融合蛋白的表达质粒。

**关键词** 白细胞介素-2, 绿脓杆菌外毒素, 融合蛋白, 原核表达, 细胞毒作用

异体移植排斥反应和某些自身免疫性疾病的病因是被相应抗原激活的 T 淋巴细胞集聚于病灶,并释放细胞活性因子的结果。激活的 T 淋巴细胞的一个重要特征是其表面含有高亲和力 IL-2 受体 (IL-2R);此外 HIV-1 在机体内只有进入激活态的 T 淋巴细胞后才能复制繁殖<sup>(1)</sup>;某些血源性肿瘤细胞的表面也含高亲和力 IL-2R。因此,研制 IL-2-毒素融合蛋白,借助 IL-2 与高亲和力 IL-2R 的特异性结合和毒素介导的细胞毒效应以选择性地杀死表面含高亲和力 IL-2R 的靶细胞,可望防治上述各种疾病。

绿脓杆菌外毒素 (PE) 是 613 肽的单链蛋白,分子量 66kDa,它有三个主要结构功能区:细胞结合区 (Ia) 识别 PE 专一的细胞受体,并与之结合;膜转位区 (I) 是毒素跨越细胞膜进入胞浆所必需;ADP-核糖基化活性区 (II),它裂解胞浆内 NAD<sup>+</sup> 释放出 ADP-核糖,后者使延长因子-2 (eEF-2) 失活,从而抑制细胞的蛋白质合成,导致靶细胞死亡。PE40 (缺失 Ia) 和 PE66<sup>Glu</sup> (Lys<sup>57</sup>His<sup>246</sup>Arg<sup>247</sup> 和 His<sup>249</sup> 均突变为 Glu) 均为 PE 的突变型,因为突变都发生在细胞结合区,就使毒素与其专一受体的结合能力丧失,但仍保留有完整的膜转位区和 ADP-核糖基化区;一旦它们通过其它蛋白质 (如 IL-2) 介导进入靶细胞内,仍可发挥其细胞毒效应。因此,IL2-PE40 和 IL2-PE66<sup>Glu</sup> 融合蛋白可选择地将表面含高亲和力 IL-2R 的靶细胞杀死。此外,若将 PE 的 C 末端 REDLK 突变成 KDEL,该突变子的细胞毒效应将增强<sup>(2)</sup>。

我们通过体外寡核苷酸定向诱变和聚合酶链式反应等技术构建了含 IL2-PE40、IL2-PE40KDEL、IL2-PE66<sup>Glu</sup>、IL2-PE66<sup>Glu</sup>KDEL 等融合基因的原核表达质粒,并实现了高

效表达, 为 IL2-PE 融合蛋白的应用基础研究和开发研究奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株与质粒

质粒 pMS151 (含全长 PE 基因, 由 Barbara Iglewski 博士惠赠<sup>[2]</sup>), IL2-pLY4 (人 IL-2 表达质粒) 和 pLY-5 (原核表达载体) 由中国科学院上海生物化学研究所构建。

### 1.2 主要生化试剂及材料

[U-<sup>14</sup>C] NAD (Amersham), 辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠或羊抗兔 IgG、3, 3'-二氨基联苯胺 (华美生物工程公司), 鼠抗 YIL-2 单克隆抗体 5C9 (本室制备) 及兔抗 PE 血清 (第三军医大学胡福泉博士惠赠)。

### 1.3 PCR 反应中所用的一些引物

P1: 5' TCTCCCGGGAGTCAGTGTGAGATGAT 3'

用来在 IL-2 cDNA 3'端引入 Sma I 位点。

P2: 5' TCTCCCGGGCCGAGGAAGCCTTCGAC 3'

用来在 PE5'端引入 Sma I 位点。

P3: 5'CTTAGAGCTCGTCTTTCCGGCGTTTCCCGGGCTGGC 3'

用来在 PE3'端引入 KDEL。

P4: 5' ATGGCCAGCTCGAGCGCGTCG 3'

P5: 5' GCCCTCGGAAACTCCAGCTCTTCACTGATGACCGT 3'

它们分别是介导 PELys<sup>57</sup>→Glu<sup>57</sup> 和 His<sup>244</sup>Arg<sup>247</sup> His<sup>249</sup>→Glu<sup>244,247,249</sup>的突变引物。

### 1.4 聚合酶链式反应

参照 kit 方法进行。

### 1.5 寡核苷酸的定点诱变

参照 Kunkel 的 U DNA 法<sup>[4]</sup>进行。

### 1.6 IL2-PE 融合基因在大肠杆菌中的表达

用含 IL2-PE 融合基因表达质粒转化的细菌在 30℃培养过夜, 次日以 1:20 稀释到 LB 培养基中, 30℃摇床扩增至 A<sub>600</sub>=0.4~0.6, 迅速转至 42℃进行热诱导, 继续培养 3h 后收集细菌。留取少量菌体悬于适量 1X 样品缓冲液中, 以用作蛋白质电泳时的对照; 其余的菌体则悬浮于 1/20 体积的 PBS, 在冰浴中超声破碎菌体, 10 000r/min 离心 10min, 收集沉淀和上清, 进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.7 ADP-核糖基化活性的测定

参照文献[5], 取 [U-<sup>14</sup>C]NAD0.1μCi, 网织红细胞裂解液 10μl 和样品于总体积 500μl 的反应液 (40mmol/LDTT、1mmol/LEDTA、50mmol/L Tris-HCl, pH8.0) 中, 37℃作用 30min, 随后加入 0.5ml 12%三氯乙酸, 冰浴 15min, 3000g 离心 10min, 再加入 1ml 6%三氯乙酸漂洗一次, 测定 cpm。

## 2 实验结果

### 2.1 人 IL-2 cDNA 和 PE 基因的末端改造及全长核苷酸序列的测定

为了获得 IL2-PE 融合基因, 我们对 IL-2 和 PE 基因进行了亚克隆和末端改造, 并对

它们的全长编码序列进行了核苷酸顺序测定。

2.1.1 人 IL-2 cDNA 的 3' 末端改造: 用 PCR 反应, 将克隆在 pLY4 中的 IL-2 基因 3' 末端的终止密码子去除, 并加上一个 Sma I 位点 (图版 I-A)

2.1.2 PE 基因的 5' 末端改造: 将 pMS151 中的 PE 基因亚克隆在 pUC18 中, 然后用 PCR 反应在 5' 末端加上一个 Sma I 位点 (图版 I-B)

## 2.2 IL2-PE-pLY5 重组质粒的构建

用 EcoR I 和 Sma I 从 pLY4-IL2 中切出改造后的 IL-2 基因; 用 Sma I 和 Pst I 从 pUC18-PE 中切出改造后的 PE40 基因; 然后, 将这两个基因组装入用 EcoR I 和 Pst I 切开的 pLY5 中, 就构成含有 IL2-PE40 融合基因的表达载体。IL2-PE66<sup>Glu</sup>-pLY5 重组质粒的构建以及 IL2-PE40KDEL-pLY5 与 IL2-PE66<sup>Glu</sup>KDEL-pLY5 重组质粒的构建同此办理。

## 2.3 IL2-PE 融合蛋白在大肠杆菌中的高效表达

将上述各种分别含 IL2-PE40、IL2-PE40KDEL、IL2-PE66<sup>Glu</sup>、IL2-PE66<sup>Glu</sup>KDEL 融合基因的表达载体在大肠杆菌中表达。产生的融合蛋白都占细菌总可溶蛋白的 20%~30% (图版 I-C), 说明它们的表达效率都是很高的。这些融合蛋白在细菌内主要以包含体的形式存在 (图版 I-C)。

用鼠抗  $\gamma$ IL-2 单克隆抗体 5C9 或兔抗 PE 血清作为第一抗体, 对上述 IL2-PE 融合蛋白进行 Western 免疫印迹 (分别以  $\gamma$ IL-2、PE 为阳性对照), 结果也表明: 相应分子量的位置有特异性条带出现 (图未列出)。

## 2.4 IL2-PE 融合蛋白 ADP-核糖基化活性测定

IL2-PE 融合蛋白的核糖基化活性 (即实行  $[U-^{14}C] NAD^+ + eEF-2 \rightarrow [U-^{14}C] ADP-ribose-eEF-2 + nicotinamide + H^+$  反应的能力) 可在细胞外测定, 其中的 eEF-2 可由网织红细胞裂解液提供。通过测定沉淀的  $[U-^{14}C] ADP-ribose-eEF2$  的 cpm 值就可以知道 IL2-PE 融合蛋白的核糖基化活性的大小。我们测定了含 PE Domain III 的各融合蛋白的核糖基化活性 (表 1), 并比较了同等摩尔浓度下各融合蛋白与野生型 PE 的核糖基化活性, 发现它们之间都没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1 IL2-PE 融合蛋白的 ADP-核糖基化活性的测定

Table 1 Determination of ADP-ribosylation activity of IL2-PE fusion proteins

Sample ( $\mu$ g)	cpm	cpm*
IL-2	160	160
PE	1 600	1 600
IL2 ( $\Delta$ 59-133) -PE40	2 240	1 580
IL2-PE40	1 980	1 650
IL2-PE40KDEL	2 000	1 670
IL2-PE66 <sup>Glu</sup>	1 250	1 530
IL2-PE66 <sup>Glu</sup> KDEL	1 300	1 600

Each cpm value was determined at  $1\mu$ g protein assessed by SDS-PAGE, and each cpm\* value was the respective cpm modified at the same molar number as  $1\mu$ g *Pseudomonas* exotoxin.

## 3 讨 论

IL-2 与毒素 (如 PE、白喉毒素) 结合而形成的融合蛋白因研制的方法不同可分为两大类:

一类是通过化学交联以二硫键直接将化学修饰过的毒素蛋白连接于 IL-2 上获得；另一类是通过基因工程的方法将 IL-2 cDNA 与突变的毒素基因拼接为融合基因后，在原核细胞内表达而获得 IL-2-毒素融合蛋白。后一方法制备的融合毒素蛋白具有以下优点：产物均一而且体外化学稳定性好（IL-2 与毒素蛋白以肽键相连）；易工业化生产而且成本较低；便于在基因水平设计出特异性好、杀伤力更强的改进型 IL-2-毒素融合蛋白。

研究表明，PE 的细胞毒效应还与其羧基末端最后 5 个氨基酸残基（Arg-Glu-Asp-Leu-Lys 或 REDLK）密切相关，若用 KDEL 替换 REDLK，PE 突变子的细胞毒效应会有所增强。据认为，KDEL 为内质网的滞留序列<sup>(6)</sup>，它的存在有利于 PE 的产生和分泌。我们的实验结果也表明了这一点（表 1）。

体外研究表明，IL-2-PE40 融合蛋白对靶细胞有高度的选择性（例如对高亲和力 IL-2R 阳性和阴性的蛋白质合成的半数抑制剂量即 ID<sub>50</sub> 之间相差达 2~3 个数量级）和强大的细胞毒效应（例如 IL-2-PE40 对表面含高亲和力 IL-2R 的 CTLL-2 细胞的 ID<sub>50</sub> 值仅为 0.4 ng/ml，而单用 PE40 即使浓度高达 2 000 ng/ml 也无明显细胞毒效应<sup>(7)</sup>）。

动物实验表明，IL-2-PE40 融合蛋白能选择性地杀伤表面含高亲和力 IL-2R 的激活态 T 淋巴细胞，从而能明显地延长异体移植体（如移植的心脏<sup>(8)</sup>）的存活期，抑制佐剂诱导性关节炎、实验性自身免疫性视网膜葡萄膜炎和实验性变态反应性脑脊髓炎<sup>(9-11)</sup>，并能引起 IL-2R 阳性的淋巴瘤消退<sup>(12)</sup>。

而 IL-2-PE66<sup>Glu</sup> 融合蛋白，除上述功能外，对一些 IL-2-PE40 抗性细胞有杀伤效应，尤其对体外周血中 PHA 或混合淋巴细胞反应激活的淋巴母细胞有强大的细胞毒效应（IL-2-PE66<sup>Glu</sup> 是 IL-2-PE40 的数十倍），显示它有可能成为可应用于临床的特异性强免疫抑制剂，将为某些疾病（如移植排斥反应、自身免疫性疾病、某些淋巴瘤/白血病和 AIDS）的防治提供新的途径<sup>(13)</sup>。

我们构建了 IL-2-PE40、IL-2-PE40KDEL、IL-2-PE66<sup>Glu</sup> 和 IL-2-PE66<sup>Glu</sup>KDEL 等融合蛋白的原核表达重组质粒，并实现了高效表达。与国外同类研究相比<sup>(7,13)</sup>，我们的工作具有一定的特色和创新（表 2），其中 IL-2-PE40KDEL、IL-2-PE66<sup>Glu</sup>KDEL 融合蛋白的表达尚未见文献报道。

表 2 与 Pastan 小组获得的 IL-2-PE 融合蛋白的比较

Table 2 Comparison of IL-2-PE fusion proteins made by our group with those by pastan group

	Pastan group <sup>(7,13)</sup>	Our group
N terminal	Met-Ala-Asp	Met
Linker coding	Ile-Pro-Glu-Gly	Pro-Gly
Amino acids		
IL-2	aa2-131	aa1-133
PE66 <sup>Glu</sup>	aa3-613	aa1-613
Promoter used	T7	P <sub>R</sub> P <sub>L</sub>
Expression rate*	5%	20%~30%
Inducing method	Chemical (IPTG)	Thermal (42°C)

\*: It was expressed as the percent of the total amount bacterial protein.

除此以外，考虑到 IL-2 羧基末端参与了 IL-2 与 IL-2R 的结合，并对结合力有重要影响<sup>(14)</sup>，因此在 IL-2-PE 融合蛋白中我们保留了 IL-2 分子 C 端的完整性；而因为 PE 的 N 端约 10 肽是游离在毒素蛋白分子表面的线性结构<sup>(15)</sup>，我们就在 IL-2-PE66<sup>Glu</sup>/IL-2-

PE66<sup>Gln</sup>KDEL 融合蛋白中也保留了 PE 蛋白氨基末端的完整性, 这样更增加 IL-2C 端的柔韧性, 减少它与 IL-2R 结合时的空间限制。同时为了避免 IL2-PE 融合蛋白将来药用时引起的不必要的免疫原性, 我们将与这个融合蛋白无关的氨基酸残基数减少到了最低限度。我们采用的 P<sub>L</sub> 启动子, 可进行热诱导, 便于工业化生产; IL2-PE 融合蛋白表达效率为 20%~30%, 达到国际先进水平; 产生的蛋白质存在于包含体中, 易于分离和制备, 这些都使我们的研究结果具有进一步开发应用的可能。

**致谢:** 该工作得到虞建良、彭一兵、林来新妹、孙兰英、范佩芳、汪美先、马文煜等同志的支持和帮助, 在此表示感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Finberg R W and Wahl S W. *Science*, 1991, **252**: 1703~1705.
- [2] Pastan I, Chaudhary V, Fitz Gerald D J *et al.* *Annu Rev Biochem*, 1992, **16**: 331~354.
- [3] Hamood A N, Oslon J C, Vincent T S *et al.* *J Bacteriol*, 1989, **171**: 1817~1824.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd edition, 1989.
- [5] Hwang J, Fitz Gerald D J, Adhyaseta J *et al.* *Cell*, 1987, **48**: 129~136.
- [6] Moro S and Pelham H R. *Cell*, 1987, **48**: 899~907.
- [7] Lorberboum-Galski H, Fitz Gerald D J, Chaudhary V *et al.* *Proc Natl. Acad Sci USA*, 1988, **85**: 1922~1926.
- [8] Lorberboum-Galski H, Barrett LV, Kirkman R L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 1008~1012.
- [9] Case JP, Lorberboum Galski H, Lafyatis R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 287~291.
- [10] Lorberboum-Galski H, Lafyatis R, Case J P *et al.* *Int J Immunopharmacology*, 1991, **13**: 305~315.
- [11] Rose J W, Lorberboum-Galski H, Fitz Gerald D J *et al.* *J Neuro Immunol*, 1991, **32**: 209~217.
- [12] Kozak RW, Lorberboum-Galski H, Jones L *et al.* *J Immunol*, 1990, **145**: 2766~2771.
- [13] Lorberboum-Galski H, Garsia R J, Gately M *et al.* *J Biol Chem*, 1990, **265**: 16311~16317.
- [14] Voss S D, Leary T P, Sondel P M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 2428~2432.
- [15] Allured V S, Collier R J, Carroll S F *et al.* *Proc Natl Acad Sci*, 1984, **83**: 1320~1324.

## Cloning and High Level Expression of Interleukin 2-pseudomonas Exotoxin Fusion Gene in *Escherichia coli*

Gao Jimin Huang Honglian Wang Xiaoning

(The 1st Military Medical University, Guangzhou 510515)

Xu Lingfei Zheng Zhongcheng Liu Xinyuan

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

**Abstract** Using PCR and oligonucleotide-directed mutagenesis, recombinant plasmids which express IL2-PE fusion genes, such as IL2-PE40, IL2-PE40KDEL, IL2-PE66<sup>Gln</sup> and IL2-PE66<sup>Gln</sup>KDEL, were constructed and expressed in *E. coli* at high level; 20-30 percent of total soluble bacterial proteins are the fusion protein. They exist as inclusion bodies in *E. coli*. In addition, there are unique EcoR I, Pst I and Sma I sites, respectively, in these expression vectors, so it will be conveniently changed to another expression vectors which contain other cytokines or toxins.

**Key words** Interleukin 2, pseudomonas exotoxin, fusion protein, gene expression, cytotoxicity