

人 IL35-IgG4(Fc)融合蛋白在 CHO/DG44 细胞中的稳定表达

唐静¹, 高闻达², 张青¹, 张大为¹, 陈洋¹, 何波¹, 刘全胜¹

1 四川大学生命科学学院 医学细胞生物学教研室, 成都 610041

2 哈佛大学医学院, 波士顿 02115, 美国

摘要: 本研究利用基因重组技术构建人 IL35-IgG4(Fc)融合基因真核表达载体, 稳定转染 CHO/DG44 细胞并检测重组蛋白的表达。主要采用聚合酶链式反应(PCR)从脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)诱导的人髓性白血病细胞株 KG-I cDNA 文库中克隆 EB13 和 IL-12p35 cDNA, 重叠 PCR 法连接 2 个片段, 并克隆到 IgG4(Fc)- pOptiVEC™-TOPO®载体上, 对新构建的 IL-35-IgG4 (Fc) pOptiVEC™-TOPO®真核表达载体并进行酶切、测序、PCR 鉴定; 脂质体法转染 CHO/DG44 细胞; RT-PCR 检测转染结果, 采用 α -MEM 培养基筛选实验组细胞, 对筛选的阳性克隆细胞再进行氨甲喋呤 (Methotrexate, MTX)的加压筛选, ProteinG-Agarose 纯化阳性克隆培养上清, 免疫印迹检测目的蛋白表达。结果显示 IL-35-IgG4 (Fc) pOptiVEC™-TOPO®表达载体稳定转染 CHO/DG44 细胞并获得阳性克隆; SDS-PAGE 电泳得到一条与预期相对分子质量大小相符的蛋白条带; 该蛋白能与羊抗人 IgG4 抗体特异结合。本实验获得了能够稳定表达具有稳定结构的 IL35-IgG4(Fc)融合蛋白的 CHO/DG44 细胞株。

关键词: IL-35-IgG4(Fc)融合蛋白, 重叠 PCR, 稳定转染, CHO/DG44 细胞, MTX 诱导的基因扩增

Expression of humane IL-35-IgG4 (Fc) fusion protein in CHO/DG44 cells

Jing Tang, Wenda Gao, Qing Zhang, Dawei Zhang, Yang Chen, Bo He, and Quansheng Liu

1 College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610041, China

2 Harvard Medical School, Boston 02115, USA

Abstract: We constructed the eukaryotic expression vector of human IL-35-IgG4 (Fc)-pOptiVEC™-TOPO® by gene recombination technique and expressed the fusion protein human IL-35-IgG4 (Fc) in CHO/DG44 cells. The two components of the newly discovered cytokine human IL-35, EB13 and IL-12p35, were amplified by PCR from the cDNA library derived from the KG-I cells after LPS induction. The two PCR-amplified cDNA fragments of human IL-35 were linked by over-lapping PCR and then cloned into the IgG4 (Fc)-pOptiVEC™-TOPO® vector. The constructed plasmid with the recombinant cDNA IL-35-IgG4 (Fc) was verified by restriction enzyme digestion analysis, PCR and DNA sequencing. The verified plasmid with the recombinant cDNA was transfected into CHO/DG44 cells using Lipofectamine™ 2000. The success of the transfection was examined and confirmed by RT-PCR. After selection in α -MEM (-) medium, the IL-35-Ig G4 (Fc) positive CHO/DG44 clones were chosen and the media from

Received: July 30, 2008; **Accepted:** November 7, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30371307).

Corresponding author: Quansheng Liu. E-mail: qliu@shmu.edu.cn

Wenda Gao. E-mail: wgao@bidmc.harvard.edu

国家自然科学基金项目(No. 30371307)资助。

these positive clones were collected to be used to purify the fusion protein. The positive CHO/DG44 clones were further cultured in increasing concentrations of MTX and the expression levels of the fusion protein IL-35-Ig G4 (Fc) were repetitively induced by MTX-induced gene amplification. The IL-35-Ig G4 (Fc) fusion protein was purified from the media collected from the positive CHO/DG44 clones by protein G affinity chromatography and then identified by SDS-PAGE and Western blotting. The results showed that one protein band was found to match well with the predicted relative molecular mass of human IL-35-IgG4 (Fc) and this protein could specifically bind to anti-human IgG4 (Fc) monoclonal antibody. In conclusion, our study successfully established an IL-35-IgG4 (Fc) positive DG44 cell line which could stably express IL-35-IgG4 (Fc) fusion protein.

Keywords: IL-35-IgG4 (Fc) fusion protein, over-lapping PCR, stable transfection, CHO/DG44 cell lines, MTX-induced gene amplification

白介素 35(Interleukin 35, IL-35)是 2007 年最新命名的新型细胞因子,是由 EB13(Epstein-Barr virus-induced gene 3)和 IL-12p35 两个亚基共价结合形成的异源二聚体^[1]。EB13(Epstein-Barr virus-induced gene 3)是 IL-12p40 和睫状节神经细胞营养因子的同源物,最初是在感染了 EBV 病毒的 B 淋巴细胞中被发现的^[2],主要由髓样细胞系所分泌^[3]。EB13 编码分子量为 34 kD 的糖蛋白,与 IL-12p40 有 27%的氨基酸同源性;IL-12p35 编码分子量为 35 kD 的糖蛋白,与 IL-6、粒细胞集落刺激因子有同源性^[4]。

2007 年 Lauren W 等^[5]报道,在小鼠体内, Foxp3⁺的 Treg 细胞能高表达 EB13 和 IL-12p35,并且 EB13-IL-12p35 组成型表达后被分泌到胞外,而 CD4⁺ T (Teff)和初始性 T 细胞并无此功能;当 Treg 细胞和 Teff 细胞共培养的时候, Treg 细胞内 EB13 和 IL-12p35 的 mRNA 水平显著提高^[5]。Wanda N 等^[1]的研究发现在体外 IL-35 可以抑制 Th17 细胞的分化;在小鼠体内, IL-35 可以减轻由 II 型胶原所诱导的关节炎的症状^[1]。因此, IL-35 是一种新型抗炎细胞因子,在小鼠体内主要通过诱导调节性 T 细胞增殖以及抑制 Th17 细胞来达到抑制炎症的作用。并且认为 IL-35 在炎症疾病以及免疫相关疾病的治疗中发挥重要的作用,鉴于目前人类 IL-35 的研究较少且及其重要性,本实验通过体外构建人 IL-35 真核表达载体并转染 CHO/DG44 细胞来研究 IL-35 抗体融合蛋白的表达,旨在为进一步研究其在人体内的调控、生理功能和临床上的应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞株和菌株

人髓性白血病细胞株 KG-I cDNA 文库和

pOptiVECTMTNFR-TOPO[®]-IgG4(Fc 段)载体(*dhfr*⁺)、中华仓鼠卵巢细胞(*dhfr* gene deficient CHO/DG44 cells)细胞株,均由哈佛大学医学院 Wenda Gao 博士惠赠,感受态菌 DH5 α 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

RNA 提取试剂(Invitrogen), AMV 逆转录酶(Promega);限制性内切酶 *Nhe* I、*Xho* I 和 *Nsb* I T4 DNA 连接酶,蛋白 Marker(MBI 公司);DNA 纯化回收试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司);制粒提取试剂盒(上海博泰生物公司);*px* DNA 合成酶、LipofectamineTM 2000 脂质体(Invitrogen);山羊抗人 IgG(H+I)(中山金桥);亲和层析柱 Protein G-Agarose 购自 Roche 公司;其他试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基

a-MEM(+), a-MEM(-)培养基购自 GIBICO;无血清培养基 CD OptiCHOTM Medium 购自 Invitrogen 公司;透析胎牛血清购自 Hyclone 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增人 EB13 和 IL-12p35 基因

利用 Primer 5 软件,根据 EB13 和 IL-12p35 在 GenBank 中的序列设计引物。在 EB13 上游引物(UP primer)的 5'端加上 4 个保护碱基并引入 *Nhe* I 酶切位点和 Kozak 序列(核糖体进入位点,防止核糖体在翻译过程中的滑行脱落,增加基因的表达水平)。在 EB13 下游引物(Antisense primer)的 5'端引入 linker; UP primer: 5'**GTTA**GCTAGCCGCCACCATGAC CCCGCAGCTTCTCCTGGCCC 3' (42); Antisense primer: 5' ACC TCC ACC TGA ACC TCC ACC ACCCGAACCACCTCCACCCTTGCCCAGGCTCATT GTGGC 3'(60)。扩增产物包括了 EB13 整个编码区 687 bp。PCR 反应参数: 95°C 4 min; 94°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 7 min。1%琼脂糖

凝胶电泳, 凝胶成像系统观察并照相回收目的片段。在 IL-12p35 上游引物(Sense primer)的 5'端引入 linker, 下游引物(DN primer)的 5'端加上 4 个保护碱基, 并引入 *Xho* I 酶切位点。

Sense primer: 5'-GTG GTT CGG GTG GTG GAG GTT CAG GTG GAG GTG GTT CT AGAAACCTCCCCGTGGCCACTC-3 (60)

DN primer: 5'-GTAACTCGAGGGAAGCATTC AGATAGCTCATCACTC-3 (36)。扩增产物 IL-12p35 去掉了信号肽序列和起始密码子、终止密码子后, 共有 591 bp。PCR 反应参数: 95°C, 4 min; 94°C 1 min; 54°C 1 min; 72°C 1 min; 30 个循环; 72°C 7 min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外线透射仪下观察并照相, 胶回收目的片段(引物中带下划线分别为 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切位点, 带框的部分为保护碱基, 阴影部分为 Kozak 序列, 斜体部分为 linker)。

1.2.2 重叠 PCR 扩增 IL-35

以 PCR 扩增得到的 EB13 和 IL-12p35 为模板, EB13 的上游引物(UP primer)和 IL-12p35 的下游引物(DN primer)作为一对引物, 扩增得到 EB13-IL-12p35(IL-35), 即重叠 PCR 法将 2 个片段连接起来。PCR 反应参数: 95°C 4 min; 94°C 1 min, 52°C 2 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 7 min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外线透射仪下观察并照相。胶回收目的片段。

1.2.3 IL-35-IgG4(Fc)pOptiVEC™-TOPO® 重组质粒的构建

挑取 TNFR-IgG4(Fc)-pOptiVEC™-TOPO® 菌株单克隆于 10 mL LB 培养基中, 37°C 恒温培养过夜, 碱裂解法抽提质粒, *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切质粒, 胶回收含有 IgG4(Fc)的 pOptiVEC™-TOPO® 载体片段。*Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切 IL-35 的重叠 PCR 产物, 乙醇沉淀法纯化浓缩。用 T4 连接酶将酶切的 IL-35 和同样酶切的含有 IgG4(Fc)的 pOptiVEC™-TOPO® 载体片段进行粘性末端的连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆 37°C 恒温摇动培养, 提取制粒 DNA, 利用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切, *Xho* I 单酶切以及 PCR 鉴定后测序。

1.2.4 细胞培养

CHO/DG44 细胞培养于 a-MEM+含 10%新生小牛血清的培养基中, 于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.5 脂质体法转染 CHO/DG44 细胞及阳性克隆的筛选

采用 Invitrogen 公司的脂质体转染技术(参考试

剂说明书)。*Nsb* I 酶切 IL-35-IgG4(Fc) pOptiVEC™-TOPO® 质粒使其线性化, 乙醇沉淀后纯化回收, 双蒸水溶解, 最终质粒浓度为 0.5 μ g/ μ L。按照转染试剂 Lipofectamine™ 2000 说明书将线性化的重组质粒转染 CHO/DG44 细胞。同时设置空载体组和未转染组细胞。转染 24 h 之后加入 a-MEM 培养基进行筛选。12 d 后表达质粒组和空载体组可见有阳性克隆形成, 阴性细胞组全部死亡, 用克隆环套取单克隆, 胰酶消化, 挑出 20 个生长旺盛的单克隆扩大培养, 在扩大培养的基础上重复挑取 20 个单克隆扩大培养、冻存和检测。

1.2.6 RT-PCR 检测表达的的目的基因

RT-PCR 检测 CHO-DG/44 细胞中 IL-35mRNA 的表达, 分别取制粒表达组、空载体组、未转染对照组各 1×10^7 细胞用 RT-PCR 检测 IL-35mRNA 的表达(方法参照 Promega 说明书)。

1.2.7 IL-35 目的基因的扩增、诱导表达与纯化

在每个单克隆扩大培养稳定生长达到 70%~80%时, 分别用浓度 50 nmol/L、100 nmol/L、250 nmol/L、500 nmol/L 和 1 μ mol/L 的 MTX 进行加压筛选, 然后加入 a-MEM 筛选培养基使细胞生长达到 70%~80%后, 离心除去杂质, 超滤法浓缩细胞上清, 将浓缩以后的细胞上清用 ProteinG-Agarose 纯化, 最后分别收集在 pH 9.0 的预冷的 2 mol/L 的 Neutralization Buffer 中。

1.2.8 SDS-PAGE 电泳以及 Western blotting 检测

分别收集质粒表达组、空载体组及未转染对照组 CHO-DG44 细胞培养上清。ProteinG-Agarose 纯化后, 用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳(制两块胶, 点相同的样)。电泳完毕后, 一块胶用考马斯亮蓝 G250 染色 1 h, 脱色后观察。另一块电转印至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂牛奶封闭, TBST 洗膜后孵育二抗, 山羊抗人 IgG, 稀释倍数为 1:2 500~50 000 显色, 曝光。

2 结果

2.1 EB13、IL-12p35 和 IL-35 基因 PCR 扩增结果以及载体的获得

PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳显示约为 687、591、1278 bp 的特异性扩增条带, 同预期结果相符(图 1)。

载体的获取: *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切 TNFR-IgG4-pOptiVEC™-TOPO®质粒, 胶回收法获取含有 IgG4(Fc)段的 pOptiVEC™-TOPO®载体片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示有 1 条分子量为 5089 bp 的片段, 与预期的结果相符合(图 1)。

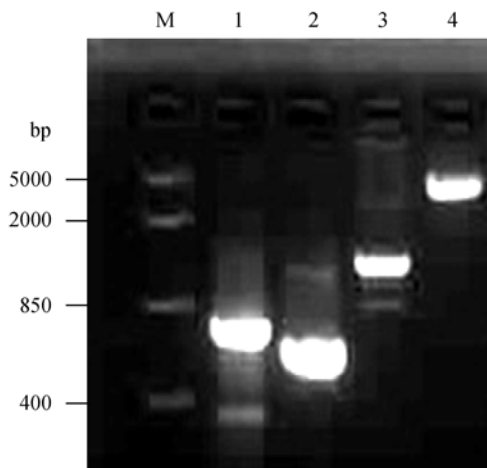


图 1 PCR 产物和载体的琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 1 Analysis of IL-35-IgG4(Fc)-pOptiVEC™-TOPO® vector by enzymatic digestion and the vector. M: marker; 1: EBI3 687 bp; 2: IL-12p35 591 bp; 3: IL-35 1278 bp; 4: IgG4(Fc)-pOptiVEC™-TOPO® vector 5089 bp.

2.2 重组 IL-35-IgG4(Fc)-pOptiVEC™-TOPO® 真核表达载体的鉴定

将重组获得的 IL-35-IgG4(Fc)-pOptiVEC™-TOPO® 真核表达载体双酶切, 单酶切和 PCR 鉴定, 将酶切后的结果经 1% 的琼脂糖凝胶电泳显示(图 2), 用 pOptiVEC™-TOPO® 载体的通用测序引物进行双向测序(Invitrogen 公司), 测序结果与 GenBank 上的序列 (EBI3 NM-005725, IL-12p35 NM-000882) 完全一致。

2.3 重组质粒转染 CHO/DG44

重组质粒 IL-35-IgG4(Fc)-pOptiVEC™-TOPO®, pOptiVEC™-TOPO® 采用脂质体转染试剂盒转染 CHO/DG44 细胞, 加入 a-MEM(含 5% 透析胎牛血清) 筛选培养基筛选, 12 d 后出现分散的阳性克隆, 未转染对照组细胞全部死亡(图 3)。

2.4 IL-35 基因表达产物的鉴定

2.4.1 IL-35 基因表达产物的 RT-PCR 分析结果

提取实验组细胞 RNA, RT-PCR 法和利用重叠 PCR 的引物扩增 IL-35mRNA, 结果显示质粒表达组扩增出大小为 1278 bp 的 DNA 带, 而未转染对照组和质粒组未扩增出 DNA 带(图 4)。

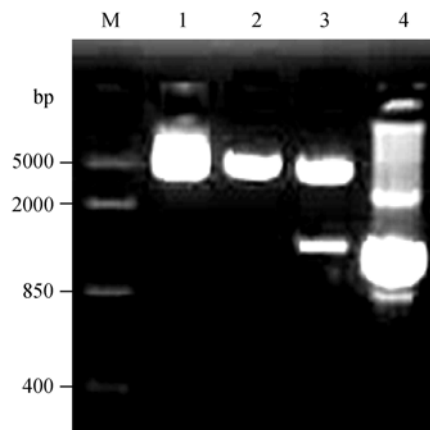


图 2 重组质粒的酶切鉴定
Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid by enzyme digestion. M: marker; 1: recombinant plasmid IL-35-IgG4(Fc)-pOptiVEC™-TOPO®; 2: IL-35 IgG4(Fc)-pOptiVEC™-TOPO® is digested by *xho* I; 3: the vector IL-35-IgG4(Fc)-pOptiVEC™-TOPO® is digested by *Nhe* I and *Xho* I; 4: IL-35 PCR.

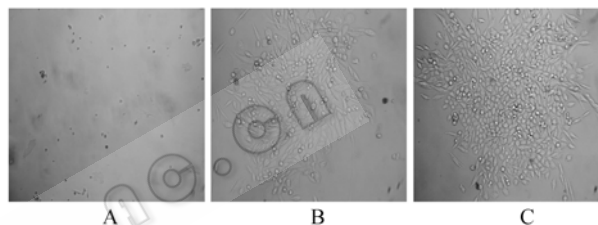


图 3 细胞克隆
Fig. 3 The clone of the cells. A: untransfected control; B: cells transfected with pOptiVEC™-TOPO® vector; C: cells transfected with IL-35-IgG4(Fc)-pOptiVEC™-TOPO®.

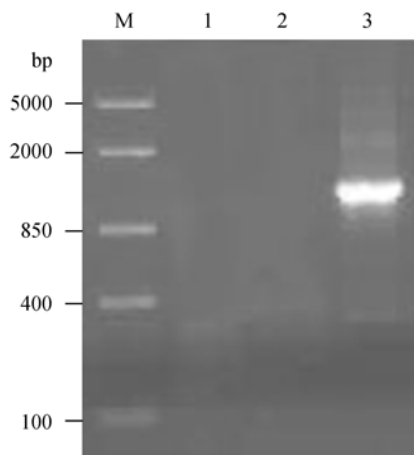


图 4 RT-PCR 检测未转染组、空载体组和质粒表达组细胞中 IL-35 mRNA 的表达
Fig. 4 Analysis of PCR product in untransfected group, blank vector group and plasmid-expressed group. M: marker; 1: untransfected group; 2: blank vector transfected group; 3: plasmid-transfected group.

2.4.2 IL-35 基因表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果

ProteinG-Agarose 纯化的 IL-35-IgG4 (Fc) 融合蛋

白, 在变性条件下进行 SDS-PAGE 电泳, 考马氏亮兰染色, 发现在 78 kD 处见 1 条蛋白带(图 5)和预期的 IL-35-IgG4 (Fc)融合蛋白相对分子质量相符。

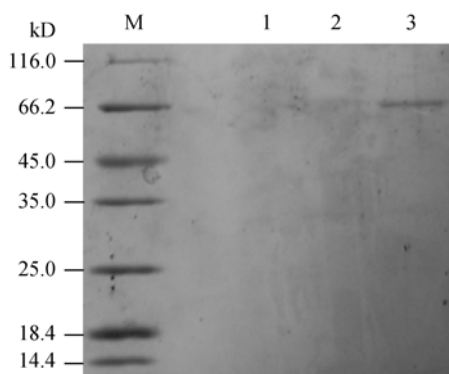


图 5 IL-35-IgG4(Fc)融合蛋白 SDS-PAGE 分析图

Fig. 5 Analysis of IL-35-IgG4 (Fc) fusion protein by SDS-PAGE. M: marker; 1: blank vector transfected group; 2: untransfected group; 3: IL-35-IgG4(Fc) fusion protein.

2.4.3 IL-35 基因表达产物的 Western blotting 检测结果

各实验组细胞培养上清经 SDS-PAGE 电泳分离和 Western blotting 分析, 发现质粒转染组有一分子质量约为 78 kD 大小的特异性条带与山羊抗人 IgG 特异结合, 而未转染组和空载体组(不含 IgG4 (Fc)段)细胞培养上清中, 未见相应条带(图 6)。

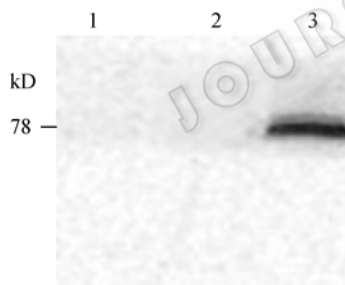


图 6 免疫印迹检测 IL-35-IgG4(Fc)融合蛋白的表达

Fig. 6 The expression of fusion protein IL-35-IgG4 (Fc) by Western blotting. 1: culture supernatant of untransfected control; 2: culture Supernatant of cells with empty vector; 3: IL-35-IgG4(Fc) fusion protein.

2.4.4 蛋白浓度测定结果

通过紫外分光光度计测定 5 种 MTX 浓度条件下的纯化蛋白浓度, 根据波长 595 nm 的光吸收值鉴定含有免疫球蛋白的洗脱组分溶液($A_{595} \approx 0.8 \text{ mg/mL}$), 在 MTX 浓度分别为 0 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、250 nmol/L、500 nmol/L 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 下, 蛋白表达产量依次为: 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、1.8 $\mu\text{g/mL}$ 、

3.2 $\mu\text{g/mL}$ 、4.6 $\mu\text{g/mL}$ 、7.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 11.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

用浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 BSA (牛血清白蛋白) 滴定 MTX 五种浓度条件下加压的无血清培养上清。

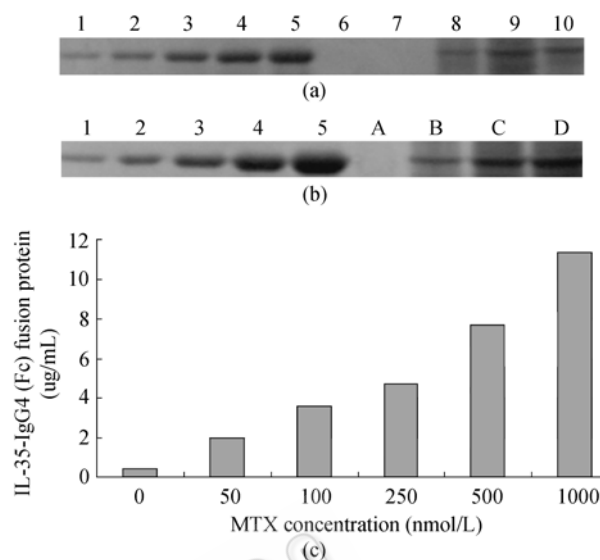


图 7 BSA 半定量滴定结果

Fig. 7 Result of BSA semiquantitative titration. 1-5: amount of BSA is 1 μg , 2 μg , 4 μg , 8 μg , 16 μg separately; 6: the medium without serum; 7: culture supernatant of untransfected group in serum-free medium; 8-10: culture supernatants of cells cultivated in serum-free medium and selected by 0 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L of MTX separately; A: culture supernatant of cells transfected with empty vector in serum-free medium; B-D: culture supernatants of cells cultivated in serum-free medium and selected by 250 nmol/L, 500 nmol/L, and 1000 nmol/L, MTX separately.

3 讨论

IL-35 是由 EBI3 和 IL-12p35 两个亚基构成的异源二聚体, 属于 IL-12 家族^[1]。调节性 T 细胞(Treg)可组成性的分泌 EBI3 和 IL-12p35, 但在静息状态下和效应 T 细胞(Teff)中不表达^[5]。IL-35 在功能上主要涉及抑制 IL-17、IL-22 等细胞因子的表达, 抑制机体免疫反应^[1]。

IL-12p35 组成性的表达于多种组织内^[6,7], 而 EBI3 则主要在造血细胞中表达^[2]。在人体内, EBI3 主要在淋巴组织内表达^[2]。Devergne O 等人的研究发现在人的扁桃体, 肾脏细胞尤其是在足月的胎盘滋养层细胞中 EBI3 有很高的表达水平, 在患有溃疡性结肠炎病人的粘膜内 EBI3 也有表达^[8]。EBV 感染后, Th1 样细胞因子的表达水平是升高的, 目的在于

清除感染的细胞^[9]; EB13 在霍奇金淋巴瘤中也有很高的表达水平^[10]。已有研究发现在胎盘滋养层细胞内, EB13 和 IL-12p35 的表达水平同时都有很大水平的提高^[11], 同时在足月的人的正常胎盘的滋养层细胞中可以分离得到 EB13 和 IL-12p35^[12], 滋养层在母体免疫耐受中扮演着重要的角色, 其中部分作用是通过分泌细胞因子来实现的^[13-16]。由此可以推测出 IL-35 在炎症反应的控制中起着非常重要的作用。在急性感染(如 EBV 感染), IL-35 可以明显地诱导 Th1 细胞的增殖, 目的在于清除掉感染的细胞^[1], IL-35 也可以抑制 Th17 细胞的分化来阻止重度自身免疫疾病的发生^[5]; 同时在急性感染下, IL-35 也可以诱导调节性 T 细胞的增殖; 在慢性感染中, 调节性 T 细胞(Treg)通过抑制效应性细胞的作用来阻止感染中的并行破坏作用^[1], 更为重要的是: IL-35 在胎盘的滋养层细胞中出现, 可能用来抑制潜在的效应细胞的破坏, 其在母体免疫耐受中起到重要作用^[1]。

将抗体分子片段与其他蛋白融合, 可以得到具有抗体活性和其他生物活性或功能的抗体融合蛋白^[17,18]。抗体融合蛋白能改善免疫分析、免疫治疗和抗体纯化等^[19]。利用抗体的 Fc 片段的特有生物效应功能, 将抗体的 Fc 片段与另一活性蛋白相融合, 可构建 Fc 抗体融合蛋白。这些融合蛋白除了保持功能蛋白的活性外, 也获得了 Fc 片段的活性, 这可以增加该蛋白在血液中的半衰期, 并发挥 Fc 片段的生物学效应, 如激活机体的免疫功能或是提高药物的动力学活性, 同时也有利于目的蛋白的分离纯化。Fc 和酶标如碱性磷酸酶等融合, 用于细胞活性的分析和研究^[21], 同时也会引起抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和补体激活作用给机体造成伤害^[22]。本实验构建的抗体融合蛋白 IL-35-IgG4(Fc)表达质粒使用的是 IgG4 的 Fc 段, 在其基因中引入了一个突变(Mutation), 使其中一个亮氨酸密码子(tta)变成了一个谷氨酸密码子(gaa), 完全敲除了 ADCC 和补体激活作用, 这将避免抗体融合蛋白药物所带来的副作用。

在本实验所构建的 IL-35-IgG4(Fc)- pOptiVECTM-TOPO®表达载体中, EB13 和 IL-12p35 是通过 linker 连接的, 其中所设计的 linker peptide 是 GGGSGGG-GSGGG。为防止连接的过程中 2 条 linker 互补配对形成二聚体, 在 linker 的设计中本实验对部分甘氨酸

的密码子作了同义突变, 将 linker 分别加在扩增 EB13 的下游引物的 3'端, IL-12p35 上游引物的 5'端, 然后以 PCR 扩增的 EB13 和 IL-12p35 为模板, EB13 的上游引物, IL-12p35 的下游引物作为一对引物通过重叠 PCR 扩增, 就可以通过 linker 来连接 2 个片段, 扩增得到 EB13-IL-12p35 即(IL35)。

在表达系统方面, 本研究采用了 CHO 真核表达系统。CHO 细胞属于成纤维细胞, 很少分泌自身内源性蛋白, 且能保持重组蛋白的生物活性, 这些都保障了重组蛋白的分离纯化, 对工业化生产提供了可行性^[22]。本实验结果显示, 通过基因工程手段所构建的 IL35-IgG4(Fc)融合基因的真核表达载体 IL-35-IgG4(Fc)-pOptiVECTM-TOPO®稳定转染 CHO/DG44 细胞, 已成功表达了 IL-35-IgG4(Fc)抗体融合蛋白。Western blotting 证实转染 CHO/DG44 细胞上清液中 IL-35-IgG4(Fc)融合蛋白有表达, 且这种融合蛋白具有免疫学活性。BSA 半定量滴定实验显示, 每毫升的无血清培养上清中 IL-35-IgG4(Fc)融合蛋白的表达量随着 MTX 浓度的增加, 呈现递增的趋势; 而利用紫外分光光度计测定 5 种 MTX 浓度加压条件下的纯化蛋白浓度的结果也显示了这种趋势。通过这种方法可以筛选出高效表达 IL-35-IgG4(Fc)融合蛋白的细胞株。

已有的研究表明 IL-35 在 Treg 细胞存在表达特异性, EB13 是转录因子 Foxp3 的靶作用物^[5], 研究同时还发现 EB13-/- Treg 或 IL-12p35-/- Treg 调控作用显著降低^[5]。从这些研究中, 可以推测 Treg 细胞在维持自身免疫耐受、抑制自身免疫、限制慢性炎症和调节淋巴细胞稳态等作用过程中, IL-35 发挥了关键作用。目前国内外对于 IL-35 的研究相对不足, 本实验建立的重组 IL-35 表达可为以后 IL-35 受体发现、设计的信号通路及其作用机制提供一定的理论参考。

REFERENCES

- [1] Niedbala W, Wei XQ, Cai BL, *et al.* IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol*, 2007, **37**: 3021-3029.
- [2] Devergne O, Hummel M, Koeppen H, *et al.* A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent

- Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol*, 1996, **70**(4): 1143–1153.
- [3] Pflanz S, Timans JC, Cheung J, *et al.* IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD41 T cells. *Immunity*, 2002, **16**: 779–790.
- [4] Merberg DM, Wolf SF, Clark SC. Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. *Immunol Today*, 1995, **13**: 77.
- [5] Lauren WC, Creg JW, Timothy TK, *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007, **22**(450): 566–569.
- [6] Stern FJ, Podlaski JD, Hulmes YE, *et al.* Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(87): 6808–6812.
- [7] Wolf SF, Temple PA, 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 Immunol*, 1991, **9**(146): 3074–3081.
- [8] Christ AD, Stevens, AC, Koeppen H, *et al.* An interleukin 12-related cytokine is up-regulated in ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1998, **115**: 307–313.
- [9] Ohga S, Nomura A, Takada H, *et al.* Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002, **44**: 203–215.
- [10] Niedobitek G, Pazolt D, Teichmann M, *et al.* Frequent expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene, EBI3, an IL-12 p40-related cytokine, in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Pathol*, 2002, **198**: 310–316.
- [11] Devergne O, Coulomb-L'Hermine A, Capel F, *et al.* Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: Involvement of syncytio trophoblasts and extravillous trophoblasts. *Am J Pa*, 2001, **159**: 1763–1776.
- [12] Devergne O, Birkenbach M, Kieff E. Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **22**(94): 12041–12046.
- [13] Jokhi PP, King A, Loke YW. Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface. *Cytokine*, 1997, **9**: 126–137.
- [14] Le BP, Solier C, Proll J, *et al.* Placental HLA-G protein expression *in vivo*: Where and what for? *Hum Reprod Update*, 1999, **5**: 223–533.
- [15] Roth I, Corry DB, Locksley RM, *et al.* Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med*, 1996, **184**: 539–548.
- [16] Dealtry GB, Clark DE, Sharkey A, *et al.* Expression and localization of the Th2-type cytokine interleukin-13 and its receptor in the placenta during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 1998, **40**: 283–290.
- [17] Oppmann B., Lesley R, Blom B, *et al.* Novel p19 protein engages IL-12 p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 2000, **13**: 715–725.
- [18] Pflanz S, Timans JC, Cheung J, *et al.* IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD⁴⁺ T cells. *Immunity*, 2002, **16**: 779–790.
- [19] Zhang XH, Zhang WJ. Construction of genetically engineered antibody fusion Proteins. *Prog Biotechnol*, 2001, **21**(4): 63–65.
张雪洪, 张惟杰. 基因工程抗体融合蛋白的构建. *生物工程进展*, 2001, **21**(4): 63–65.
- [20] Wang CL, Huang M, Wesson CA. A single Fc binding domain-alkaline phosphatase gene fusion expresses a protein with both IgG binding ability and alkaline phosphatase enzymatic activity. *Protein Eng*, 1994, **5**(7): 715–722.
- [21] Junghans RP. IgG Biosynthesis: No “Immunoregulatory Feedback” . *Trends Biotechnol*, 1997, **15**: 155.
- [22] Shen YH, Geng XD. The recent progress in the upstream studies on the culture with CHO cell. *Prog Biotechnol*, 2000, **20**(4): 23–25.
申烨华, 耿信笃. CHO 细胞表达系统研究进展. *生物工程进展*, 2000, **20**(4): 23–25.