

## 研究报告

## 人重组白细胞介素 12 在 CHO 细胞中的表达

戴燕 陈慰峰<sup>1)</sup>

(北京医科大学免疫学系, 北京 100083)

**摘要** 将人白细胞介素 12 (interleukin 12, IL-12) 两条链 p35 及 p40 全长 cDNA 分别亚克隆至真核表达载体 pcDNA3 中, 构建了 pcDNA3/p35a, pcDNA3/p40a, pcDNA3/p35b, pcDNA3/p40b 四种真核细胞重组表达质粒, 利用磷酸钙共沉淀法转染中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞. 通过对阳性克隆的筛选鉴定, 获得了稳定表达人 IL-12 的 CHO 细胞株, 活性最高的一株表达量为 105 U/ml. 此细胞株经半年的传代培养, 能够稳定地分泌 IL-12. 结果显示: IL-12 在 CHO 细胞中的稳定表达受到重组质粒结构、DNA 整合、mRNA 转录、蛋白质翻译等多因素的影响, IL-12 两个亚基在 CHO 细胞中的共同表达是产生有生物活性 IL-12 的基础.

**关键词** 白细胞介素 12, 表达, 中国仓鼠卵巢细胞, 质粒

**学科分类号** R392.11

白介素 12 (IL-12) 是近年发现的一种由巨噬细胞, B 淋巴细胞以及抗原呈递细胞产生的糖蛋白分子. 它能够促使活化的 T 细胞及 NK 细胞的增殖; 增加 T 细胞及 NK 细胞的细胞毒活性; 是促使 Th1 细胞分化, 启动细胞介导的免疫反应的一个关键的细胞因子; 在抗肿瘤、抗感染中具有很好的应用前景<sup>[1~3]</sup>.

IL-12 由 p35 和 p40 两个亚基经多对链间和链内二硫键连接而成. 在所有已被克隆的细胞因子中, IL-12 是迄今为止所发现的唯一的异源双链细胞因子. 由于 IL-12 结构的复杂性, 使其无法在 *E. coli* 中获得表达<sup>[4~6]</sup>. IL-12 的真核表达, 就成为体外获得 IL-12 从而对 IL-12 进行深入理论和临床研究的唯一途径. 本文构建了 4 种 IL-12 的真核细胞重组表达质粒, 经转染 CHO 细胞, 获得了稳定分泌 IL-12 的 CHO 细胞株.

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒, 菌株和细胞株

含有 IL-12 p40 亚基及 p35 亚基 cDNA 全

序列的质粒 PBC12B1/p40 及 PBC12B1/p35 由美国 Moore 博士惠赠. pcDNA3 质粒载体由加拿大肖波博士惠赠. DH5 $\alpha$ , JM109 菌株及中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 为本室保存.

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶, Taq 酶, 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段及 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, Boehringer Mannheim 公司及 New England Biolabs 公司. DMEM 细胞培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清, 小牛血清, G418, HEPES 购自 Sigma 公司. <sup>3</sup>H-脱氧胸腺嘧啶核苷 (<sup>3</sup>H-TdR) 购自上海原子核研究所. Dig DNA 标记与测定 Kit 购自 Boehringer Mannheim 公司. 其他进口及国产试剂均为分析纯及优级纯.

### 1.3 PCR 扩增 IL-12 cDNA 片段

根据人 IL-12 的 cDNA 序列, 合成了 p40 及 p35 3' 与 5' 端的两对 PCR 引物, 在 p40 引物增加了 Kpn I 和 Bcl I 位点, 在 p35 引物增

<sup>1)</sup>通讯联系人.

收稿日期: 1997-03-29, 修回日期: 1997-07-02

加了 Kpn I 和 Xho I 位点. 以 PBC12B1/p40 及 PBC12B1/p35 为模板进行扩增. p40 扩增条件为: 变性 94℃, 30 s; 退火 54℃, 30 s; 延伸 72℃, 1 min. p35 扩增条件为: 变性 97℃, 20 s; 退火 54℃, 30 s; 延伸 72℃ 1 min.

#### 1.4 细胞培养, DNA 转染及阳性克隆的筛选

CHO 细胞培养在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中. DNA 转染采用磷酸钙共沉淀法, 在培养瓶内接种入  $2 \times 10^5$  细胞, 待细胞长至 70%~80% 后, 进行转染. 先将 10  $\mu$ g 质粒 DNA 与 31.2  $\mu$ l 2 mol/L  $\text{CaCl}_2$  及水 (补足 250  $\mu$ l) 在一锥形管中混匀, 然后取 250  $\mu$ l  $2 \times$  HEPES 缓冲液轻轻放入管中, 柔和地混匀, 室温静置 30 min 后, 加入到待转染的培养瓶中, 37℃ 培养 16 h 倒掉转化液, 换含 10% 小牛血清的 DMEM, 培养 48 h, 胰酶消化细胞, 以 1:10 传入 G418 浓度为 600 mg/L 的选择培养基中, 第 4 天换液, 直至 2 周左右长出细胞克隆. 挑选单克隆细胞, 依次在 96 孔板、24 孔板及培养瓶中扩增细胞.

#### 1.5 探针的制备及地高辛标记

用 BamHI 从 PBC12B1/p40 上切下 0.9 kb 的片段用于 IL-12 p40 的探针. 用 BamHI 从 PBC12B1/p35 上切下 0.5 kb 的片段用于 IL-12 p35 的探针. 详见 Boehringer Mannheim 地高辛标记试剂盒说明书.

#### 1.6 细胞 DNA 提取、PCR 及 DNA 印迹检测

染色体 DNA 提取采用高盐法. 对细胞转染后的 cDNA 整合检测, 采用双重 PCR 方法. 即在一个试管中同时加入 p35 和 p40 两对引物, 同时扩增检测 p35 和 p40 两个 cDNA 的整合. 细胞 DNA 经 BamHI 消化以后进行 DNA 印迹实验<sup>[7]</sup>.

#### 1.7 RNA 的提取及 RT-PCR 分析

采用异硫氰酸胍一步法提取阳性 CHO 克隆总 RNA, 电泳鉴定并定量后, 取 10  $\mu$ g 总 RNA 于 42℃ 进行 1 h 的逆转录反应, 取逆转录产物 5  $\mu$ l 进行 PCR 反应. 以转染了 pcDNA 空白载体的 CHO 抗性克隆为对照.

#### 1.8 IL-12 活性测定

采用 T 细胞增殖法<sup>[8]</sup>. 取人的新鲜外周

血, 分离外周血单核细胞 (PBMC). 经 PHA 活化 4 d 后收集细胞计数, 制备浓度为  $2 \times 10^5$ /ml 的 PBMC 悬浮液. 向 96 孔板的每孔中加入不同稀释度的待测 CHO 细胞培养液 100  $\mu$ l 及 PBMC 的悬浮液 100  $\mu$ l, 37℃ 培养 48 h, 掺  $^3\text{H}$ -TdR 继续培养 18 h 后, 收集细胞, 测  $^3\text{H}$  掺入值. 以转染了 pcDNA3 载体的 CHO 细胞上清液为阴性对照, IL-12 标准品为阳性对照.

## 2 结 果

### 2.1 人 IL-12 真核细胞重组表达质粒的构建

**2.1.1 pcDNA3/p40a 及 pcDNA3/p35a 重组表达质粒的构建:** 经 PCR 扩增得到 1.0 kb 及 0.68 kb 长完整的人 IL-12 p40 及 p35 cDNA (图 1).

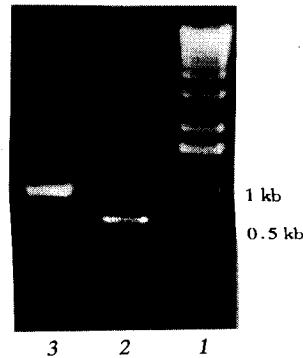


图 1 PCR 扩增 IL-12 cDNA 电泳图

1: 1 kb DNA ladder; 2: p35 cDNA; 3: p40 cDNA.

采用 pcDNA3 为载体, 该质粒载体含有 hCMV 启动子及 neo 基因. 将 PCR 扩增得到的 1.0 kb 长的人 IL-12 p40 cDNA 及 0.68 kb 的人 IL-12p35 cDNA 分别插入 pcDNA3 载体, 经转化、筛选及酶切鉴定后, 得到 pcDNA3/p40a 及 pcDNA3/p35a 重组表达质粒 (图 2).

### 2.2 稳定表达 IL-12 的 CHO 细胞株的建立

**2.2.1 重组质粒转染 CHO 细胞:** 转染分以下 6 组进行. 1 组: pcDNA3/p35a 与 pcDNA3/p40a 共转染 (Da 组); 2~5 组: 分别为 pcDNA3/p35a, pcDNA3/p40a, pcDNA3/p35b 及 pcDNA3/

p40b 单转染; 6 组: pcDNA3 转染对照组. 经抗

性筛选得到 161 株 G418 抗性克隆.

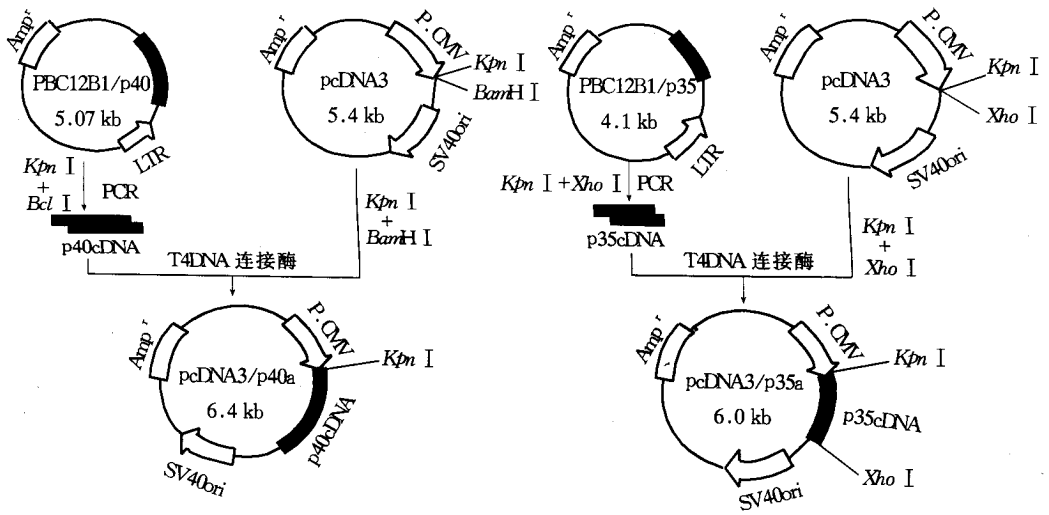


图 2 pcDNA3/p40a 及 pcDNA3/p35a 构建图

2.2.2 阳性克隆的鉴定: a.PCR 扩增检测: 对得到的 64 株 G418 抗性克隆, 首先应用 PCR 扩增检测 IL-12cDNA 的整合. 结果在检测的 Da 共转染组 64 株克隆中, 具有 p35 与 p40 双整合的有 8 株, p35 单整合的 27 株, p40 单整合的 25 株, 无整合的 2 株. 在检测的各组单转染中, 具有 IL-12 单亚基整合的占 80%~90%, 有 10%~20% 的没有整合. Da 组部分细胞株的双重 PCR 结果见图 3.

b.PCR-DNA 及 DNA 杂交鉴定: 为了进一步鉴定重组阳性克隆, 在 PCR 检测的基础上, 进一步进行 PCR-DNA 及 DNA 杂交鉴定. 杂交结果表明 PCR 的检测结果是可靠的, 凡是 PCR 鉴定为阳性的细胞株, PCR-DNA 及 DNA 鉴定也为阳性. CHO 细胞抗性克隆中 IL-12 P35 cDNA 的整合 DNA 杂交分析见图 4.

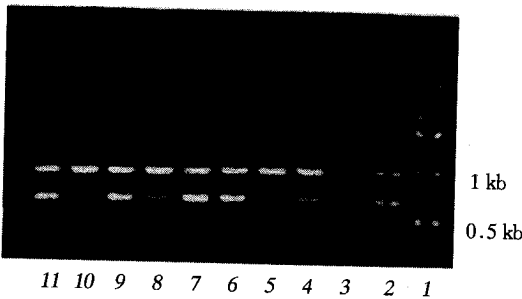


图 3 双重 PCR 分析 Da 共转染组 p35 及 p40 cDNA 在 CHO 染色体上的双整合

1: 1 kb DNA ladder; 2: PBC12B1/p35 及 PBC12B1/p40 质粒扩增阳性对照; 3: pcDNA3 转染 CHO 扩增; 对照 4~11. 为 Da 共转染组的 CHO 阳性克隆双重 PCR 扩增.

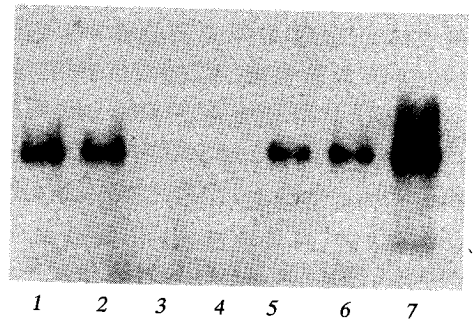


图 4 DNA 杂交分析 CHO 细胞抗性克隆中 IL-12 P35 cDNA 的整合

1: Da-1; 2: Da-10; 3, 4: pcDNA3 转染 CHO 对照; 5: pcDNA3/P35a 转染 CHO; 6: pcDNA3/P35b 转染 CHO; 7: P35cDNA 阳性对照.

**2.2.3 IL-12mRNA 转录分析:** 对经 PCR 鉴定具有 IL-12cDNA 整合的细胞提取 RNA 后, 进行 RT-PCR 分析. 在分析的具有 IL-12 两个亚基双整合的 8 株细胞中, 有 6 株既有 p35mRNA 也有 p40mRNA 的转录, 有 1 株细胞只有 p40mRNA 的转录, 另外 1 株细胞只有 p35mRNA 的转录. 分析单转染单整合的 12 株细胞中, 有 11 株有 IL-12 单亚基 mRNA 的转录, 一株没有 mRNA 转录. Da 组两株细胞的 RT-PCR 结果见图 5 和图 6.

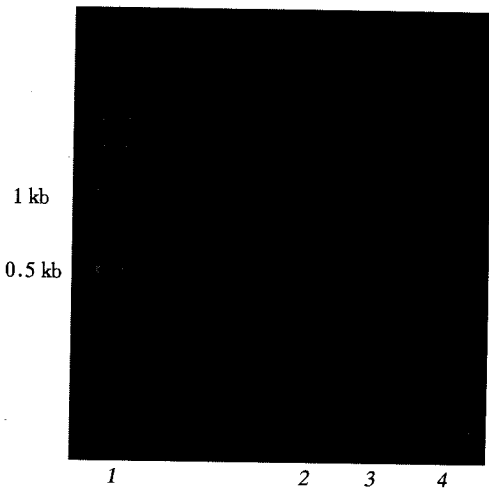


图 5 RT-PCR 分析共转染双整合 CHO 细胞 p35 mRNA 的转录

1: 1 kb DNA ladder; 2: pcDNA3 转染 CHO 对照; 3, 4: 为 Da 组两株 CHO 克隆.

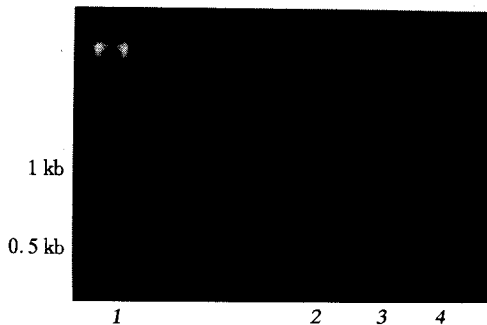


图 6 RT-PCR 分析共转染双整合的 CHO 细胞 p40 mRNA 的转录

1: 1 kb DNA ladder; 2: pcDNA3 转染 CHO; 3, 4: Da 组两株 CHO 克隆.

**2.2.4 IL-12 活性测定:** 采用 T 细胞增殖法, 对鉴定的 6 株具有 p35 及 p40 双亚基整合及双亚基转录的细胞株进行活性测定. 有 5 株细胞能够分泌 IL-12, 其中以 Da-1 活性最高. 活性测定结果见表 3.

表 3 IL-12 在 CHO 细胞中的表达活性

产生 IL-12 的细胞株	IL-12 活性 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-12 活性 / $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$
Da-1	21	105
Da-10	11	55
Da-17	15	75
Da-35	12	60
Da-40	18	90

**2.2.5 转染了 IL-12 cDNA 的 CHO 细胞株分泌 IL-12 的动态观察及稳定性分析:** 我们以 Da-1 为测定细胞株, 对其 IL-12 分泌的动态进行了观察. 此细胞株在克隆传代 5 个月后, 仍能稳定地分泌 IL-12. 上清液在  $-70^{\circ}\text{C}$  冻存 6 个月后, 活性分析没有发现活性下降, 表明经筛选得到的能分泌 IL-12 的 CHO 细胞株及分泌的重组 IL-12 是比较稳定的.

### 3 讨 论

由于 IL-12 在免疫调节、特别是在细胞介导的免疫应答中所起的重要作用以及在抗感染和抗肿瘤中的应用前景, 对于 IL-12 的研究越来越引起人们极大的重视. IL-12 在真核细胞中的稳定表达, 对于进行 IL-12 的进一步理论研究和临床应用具有重要意义. 自然界只能产生极微量的 IL-12, IL-12 产生细胞系 RPMI-8866 和 NC-37 在使用佛波酯处理以后可产生 5 U/ml 的 IL-12 异源二聚体<sup>[9]</sup>. Martinotti<sup>[10]</sup> 及 Tahara<sup>[11]</sup> 在基因治疗的研究中, 分别在 C-26 鼠的结肠癌细胞和 NIH3T3 细胞中表达了 IL-12, 表达量分别为 30~80 ng/L 和 48 h 内  $10^6$  个细胞内表达活性为 100~240 U. 本实验通过构建 IL-12 真核重组表达质粒, 转染 CHO 细胞, 获得了 5 株能够稳定分泌 IL-12

的 CHO 细胞株, 其中表达活性最高的一株为 105 U/ml.

在共转染所得到的 64 株抗 G418 克隆中, 有 8 株细胞有 p35 cDNA 及 p40 cDNA 的同时整合, 在这 8 株中有 6 株能够进行 p35 及 p40 的 mRNA 转录, 最后检测出 IL-12 活性的只有 5 株. 这反映出 IL-12 在 CHO 细胞中的稳定表达受到 DNA 整合、mRNA 转录、蛋白质翻译等多个水平的调控. 6 株有 p35 亚基和 p40 亚基 mRNA 转录的克隆中, 有 5 株具有活性 IL-12 的表达, 这表明 IL-12 在真核细胞中获得有活性蛋白的表达, 不仅要使基因整合到细胞的染色体中, 进行 mRNA 转录, 还需要在翻译水平, 翻译后加工水平上进行蛋白质的翻译和正确的组装. 有转录但没有 IL-12 活性的细胞株培养上清中是否有 p35 及 p40 蛋白的存在, 这有待于我们进行进一步的分析和研究.

### 参 考 文 献

- 1 Trichieri G. Interleukin 12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995, **13**: 251~ 276
- 2 Chehimi J, Trinchieri G. Interleukin 12: a bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency. *J Clin Immunol*, 1994, **14** (3): 149~ 161
- 3 Brunda M J, Gately M K. Antitumor activity of Interleukin-12. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994, **71** (3): 253~ 255
- 4 Gubler U, Chua A O, Schoenhaut D S *et al.* Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (10): 4143~ 4147
- 5 Wolf S F, Temple P A, Kobayashi M *et al.* Cloning of cDNA for natural kill cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biological effects on a T and natural killer cells. *J Immunol*, 1991, **146** (9): 3074~ 3081
- 6 Schoenhaut D S, Chua A O, Wolitzky A G *et al.* Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol*, 1992, **148** (11): 3433~ 3440
- 7 Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975, **98** (3): 503~ 517
- 8 Coligan J E, Kruisbeek A D, Margulies D H *et al.* Current protocols in immunology. John Wiley & Sons, Inc. 1992. 16.1~ 16.8
- 9 D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante N M *et al.* Production of natural kill cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med*, 1992, **176** (5): 1387~ 1398
- 10 Martinotti A, Stoppacciaro A, Wysocka M *et al.* CD4 T cells inhibit *in vivo* the CD8-mediated immune response against murine colon carcinoma cells transduced with interleukin 12 genes. *Eur J Immunol*, 1995, **25** (1): 137~ 246
- 11 Tahara H, Storkus W J, Pappo I *et al.* Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma *in vivo*. *Cancer Res*, 1994, **54** (1): 182~ 189

**Expression of Recombinant Human Interleukin 12 in CHO Cell.** DAI Yan, CHEN Wei-Feng (*Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

**Abstract** Four kinds of human IL-12 expression plasmids pcDNA3/p35a, pcDNA3/p35b, pcDNA3/p40a, pcDNA3/p40b were constructed. These recombinant plasmids were co-transfected into Chinese hamster ovary cells and acquired CHO cell lines that could stably secrete IL-12. The highest expressed amount of IL-12 in CHO cell is 105 U/ml. The results showed that the expression of human IL-12 in CHO cell was affected at several levels such as recombinant plasmid structure, DNA integration, mRNA transcription and protein transpation etc.

**Key words** interleukin 12, expression, CHO cell, plasmid