

文章编号 :1000 - 2340(2006)03 - 0301 - 06

# IL15/ PAP融合蛋白基因克隆及其原核与植物表达载体的构建

陈其新<sup>1,4</sup>, 陈凌娜<sup>3</sup>, 陈正华<sup>2</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物所,青海 西宁 830000;2. 甘肃亚盛集团博士后科研工作站,甘肃兰州 730070;3. 新疆农业大学,新疆 乌鲁木齐 810000;4. 河南农业大学,河南 郑州 450002)

**摘要:**将 IL15 和 PAP 基因通过一甘氨酸接头 (Gy<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 连接在一起,构建原核和植物表达载体,以期表达具有导向杀伤活性的融合蛋白.在引物设计中,通过引物在 IL15 基因下游引入 (Gy<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 的编码序列和 Bam HI 位点,然后采取分步克隆及 PCR、酶切、连接等一系列分子克隆方法,将 IL15 和 PAP 基因融合在一起,构建融合蛋白的原核与植物表达载体.经 PCR 和 Nco I/ Sal I 双酶切鉴定及测序,证实原核表达载体 pET32a-IL15/ PAP 及植物表达载体 pB-IP 中均插入了正确的融合基因序列.

**关键词:**IL15/ PAP 融合蛋白;表达载体;构建

中图分类号:Q 813.2 文献标识码:A

## Gene Cloning and Construction of Prokaryotic and Plant Expression Vectors of IL15/ PAP Fusion Protein

CHEN Qi-xin<sup>1,4</sup>, CHEN Ling-na<sup>3</sup>, CHEN Zheng-hua<sup>2</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, CAS, Xining 830000, China; 2. Postdoctoral Research Station of Yasheng Group Co., Lanzhou 730070, China; 3. Xinjiang Agricultural University, Urumqi 810000, China; 4. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** To link IL15 gene and PAP gene by a mediate sequence (Gy<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> and express a new kind of fusion protein with target killing effects on the tumor cells overexpressing IL15R in *E. coli* and plants, a DNA linker consisting of (Gy<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> coding sequence and Bam HI restriction site was introduced into the downstream of IL15 gene, then the vectors for expressing the fusion protein in *E. coli* and plants were constructed by step-by-step cloning and PCR, enzyme digestion and linkage techniques. The PCR, restriction analysis with Nco I/ Sal I and sequencing claimed that the fusion gene of interest was inserted into the prokaryotic expression vector pET32a-IL15/ PAP and the plant expression vector pB-IP respectively.

**Key words:** IL15/ PAP fusion protein; expression vector; construction

商陆抗病毒蛋白 (pokeweed antiviral protein, 简称 PAP) 是一种具有 N-糖苷酶活性的单链蛋白,可

收稿日期:2005 - 10 - 20

基金项目:甘肃亚盛集团博士后基金资助项目(无编号)

作者简介:陈其新(1965 - ),男,甘肃景泰人,讲师,博士,主要从事基因工程与动物生殖生理学研究;通讯作者:陈正华.

使核糖体失活而抑制蛋白质合成过程,对动物病毒和植物病毒均有广谱的杀灭作用.国内外都已从美洲商陆中克隆出不同结构的 PAP,并对其 cDNA 和氨基酸序列进行了鉴定<sup>[1-2]</sup>.在医学领域内,PAP 与抗体连接后构成免疫毒素,可特异性地杀伤能被相应抗体识别的细胞.此外,PAP 也是构建重组细胞毒性融合蛋白的适宜材料<sup>[3]</sup>.白介素 15 (interleukin 15,简称 IL15)是机体重要的细胞因子之一,具有抗肿瘤活性.成熟的人 IL15 由 114 个氨基酸残基组成,属 4 螺旋细胞因子家族,主要刺激 NK、T、B 细胞增殖分化.研究表明<sup>[4]</sup>,IL15 与其受体 (IL15R) 相结合而发挥生物学作用.IL15/IL15R 系统与多种疾病的发生和发展有密切联系,在一些自身免疫性疾病中,IL15/IL15R 异常表达;成人 T 淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤等恶性肿瘤细胞表面也有 IL15R 的组成型表达.因此,杀伤 IL15R 阳性的病变细胞是治疗 IL15/IL15R 系统相关疾病的重要思路.作者拟通过引物设计和分步克隆的方法,用甘氨酸接头 (Gy4Ser)<sub>3</sub> 将人 IL15 和 PAP 基因连在一起,构建 IL15/PAP 融合蛋白的原核和植物表达载体,以期为进一步表达融合蛋白及其活性研究提供材料.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 pUCmrT-IL15 质粒为甘肃亚盛集团博士后科研工作站北京实验室(简称本实验室)构建,其中含人 IL15 成熟肽编码基因,长度为 345 bp,编码 114 个氨基酸组成的蛋白;该基因侧翼分别有 Bam HI 和 Sal I 识别位点.质粒 pUCmrT-PAP 为本实验室保存,含 942 bp 的 PAP 基因<sup>[2]</sup>,其上、下游克隆位点也分别是 Bam HI 和 Sal I.原核表达载体 pET32a 为本实验室保存,克隆载体 pUCm-T 购自上海生工生物技术公司.植物表达载体 pBPAP12 为本实验室构建,有 35S 启动子、Bam HI 和 Sal I 克隆位点等植物表达框架.DH5 菌株由北京天为时代科技有限公司提供.

1.1.2 酶和试剂 限制性内切酶 Bam HI, Sal I, Nco I 及 T<sub>4</sub> DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶等均为大连宝生物工程公司产品. dNTPs, DNA marker 为北京鼎国生物公司产品.质粒提取试剂盒、PCR 纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒等由北京天为时代生

物科技公司提供. DNA 序列分析由上海博亚生物公司完成.

### 1.2 方法

1.2.1 融合基因的设计 选择甘氨酸接头 (Gy<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 为连接序列,将 IL15 基因和 PAP 连接在一起<sup>[5]</sup>.

1.2.2 接头序列的 PCR 法引入 应用 PCR 技术在 IL15 基因下游引入接头序列.设计一对引物,序列如下:

5'-CGC CCAATGG CGATGAAGCTGGGTGAATGTAATAAGTG -3'

Nco I

5'-CCC GGAATCCP CGATCCGCCACCGCCAGGCCACTCCGCCT-

Bam HI

GAACCGCTCCACC AGAAGTGTGATGAACATTG -3'

在上游引物中加入 Nco I 切点;在下游引物中去掉终止密码子,并引入 (Gy<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 的 45 bp 及 Bam HI 酶切位点,斜体部分为接头序列.

以 pUCmrT-IL15 质粒为模板,用上述引物进行 PCR 扩增.反应体系共 50 μL,反应条件为:94 1 min,94 30 s,49 30 s,72 1 min,共 30 个循环,最后 72 延伸 10 min.在 10 g L<sup>-1</sup> 琼脂糖电泳检查后,回收 PCR 产物,将其命名为 IL15/L (即 IL15 加接头序列).

### 1.2.3 IL15/PAP 融合基因原核表达载体的构建

采用分步克隆,即先扩增出 IL15/L 及亚克隆出 pET32a-PAP,再将 IL15/L 插入 pET32a-PAP 中,完成融合.然后按下列步骤进行.第 1 步,用 Bam HI/Sal I 分别双酶切 pUCmrT-PAP 和 pET32a,在凝胶回收后将 PAP 和 pET32a 按 5:1 (体积比) 连接.连接体系为 10 μL,反应条件为 16 h,过夜.然后将连接产物直接转化 CaCl<sub>2</sub> 法制备的 DH5 感受态细胞,经氨苄青霉素抗性筛选及双酶切鉴定等,得到阳性重组子 pET32a-PAP.第 2 步,将纯化的 PCR 产物 IL15/L 和 pET32a-PAP 分别用 Nco I/Bam HI 双酶切,经过与上述类似的步骤得到 pET32a-IL15/PAP 阳性克隆.对所获克隆进行 PCR 鉴定,使用的上、下游引物序列分别为:

5'-CGC CCAATGG CGATGAAGCTGGGTGAATGTAATAAGTG -3'

5'-CCC GTCGAC TCAGAATCTTCAAATAGATCACC -3'

PCR 反应条件为:94 1 min,94 50 s,53 1 min,72 2 min,共 30 个循环,最后 72 延伸 10 min. PCR 检测后,再进行 Nco I/Sal I 双酶切鉴定,最后挑选阳性克隆进行测序.

1.2.4 IL15/ PAP 融合基因植物表达载体的构建

1.2.4.1 IL15/ PAP 的 PCR 点突变 为利用植物表达载体 pBPAP12 中的 *Bam* HI 和 *Sal* I 克隆位点, 参照文献 [6] 对 pET32a- IL15/ PAP 中的融合基因进行 PCR 点突变, 去除内含 *Bam* HI 位点. 合成如下 4 条引物:

IPU1: 5' - GGA GGATCC ATGAACTGGGGAATGAAATAAGTG - 3'   
 *Bam* HI

IPL1: 5' - CGC GTCGAC TCAGAATCCTTCAAATAGATC - 3'   
 *Sal* I

IPU2: 5' - GTGCCGGATCGGG C TCCATGAAGTIC - 3'

IPL2: 5' - GACTTCATGGG A GCCCATCCGCCAC - 3'

IPU1 和 IPL1 分别为 IL15-PAP 基因上、下游引物. IPU1 中含 *Bam* HI 位点. IPL1 中包括 *Sal* I 位点与终止密码子 TGA. IPU2 和 IPL 2 分别是引入突变的正向和反向引物, 其中带下划线者为突变碱基.

以 pET32a- IL15/ PAP 为模板, 分别用 IPU1/ IPL 2, IPU 2/ IPL 1 引物对进行第 1 轮 PCR 反应, 再以凝胶回收的第 1 轮 PCR 产物为模板进行第 2 轮 PCR, 用 IPU1/ IPL1 引物对扩增出带突变的 IL15/ PAP 融合基因. PCR 反应体系都为 50  $\mu$ L, 第 1 轮 PCR 条件为: 94 1 min, 94 30 s, 53 30 s, 72 1 min; 第 2 轮 PCR 条件为: 94 2 min, 94 60 s, 53 60 s, 72 3 min; 两轮 PCR 都进行 30 个循环, 最后 72 延伸 10 min.

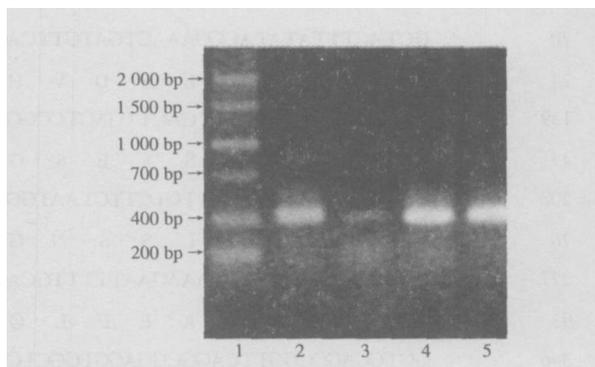
1.2.4.2 IL15/ PAP 融合基因与植物表达载体的连接 用 *Bam* HI 和 *Sal* I 双酶切点突变 PCR 产物, 插入到同样双酶切的 pBPAP12 中, 经 PCR、双酶切鉴定后进行序列测定. 将构建的载体命名为 pB- IP.

2 结果与分析

2.1 原核表达载体 pET32a - IL15/ PAP 的构建

以 IL15 基因为模板, 用加接头的引物进行扩增, 得到 1 条约 410 bp 的的条带, 大小与预期的相符 (图 1). 用 *Nco* I / *Sal* I 双酶切构建的重组质粒 pET32a- IL15/ PAP, 经 10 g L<sup>-1</sup> 琼脂糖电泳, 可见约 1 350 bp 的条带, 大小与预期的一致 (图 2). 对重组质粒进行测序分析, 结果见图 3. 从图 3 可看出, 插入位点、IL15、接头、PAP 各构件完整无缺, 拼接正确. 用 DNAMAN 软件分析, 结果表明, 插入序列与

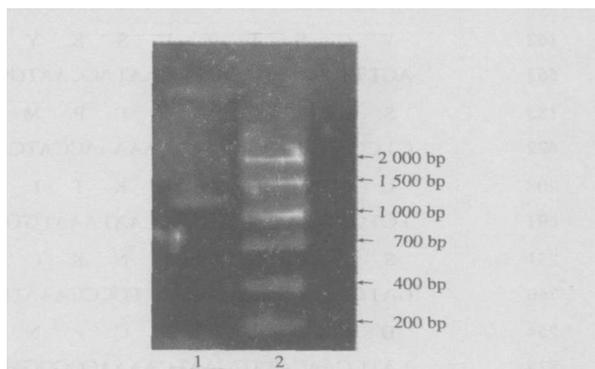
目标序列完全吻合, 无阅读框移位, 说明表达载体 pET32a- IL15/ PAP 构建成功.



1. DNA 标准 DNA marker; 2~5. PCR 产物 PCR products

图 1 IL15/L PCR 产物电泳

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of IL15/L



1. 重组质粒 *Nco* + *Sal* ; 双酶切 pET32a- IL15/ PAP/ *Nco* + *Sal* ; 2. DNA 标准 DNA marker

图 2 pET32a- IL15/ PAP 的酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme analysis of pET32a- IL15/ PAP

2.2 植物表达载体的构建

对 pET32a - IL15/ PAP 质粒中的融合基因进行 PCR 点突变. 在第 1 轮 PCR 反应中, 分别扩增出了 404 bp 和 965 bp 的 2 个片段, 再以回收的这 2 个片段为模板进行第 2 轮 PCR, 扩增出了带目的突变的 IL15/ PAP 融合基因. 将第 2 轮 PCR 终产物插入 pBPAP12 的表达框架. 重组子经双酶切鉴定 (图 4), 结果表明, 切下了约 1 350 bp 的片段, 与预期相符. 按照目标序列设计引物测定插入片的序列, 与预期序列完全一致, 并且原接头下游与 PAP 基因之间的 *Bam* HI 位点按设计被改变 (图 5). 构建的植物表达载体结构见图 6.

```

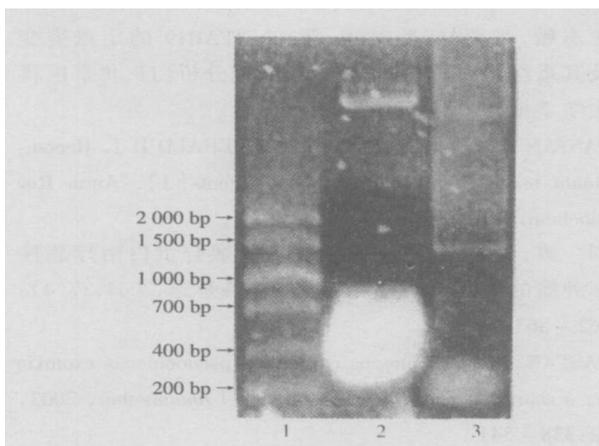
1      ATGAACTGGGTGAATGT AATAAGT GATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGAT
I      M N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D
70     GCTACTTTATATACGGAAGT GATGTTACCCCGAGTTGCAAGGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTG
24     A T L Y T E S D V H P S C K V T A M K C F L L
139    GAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATC
47     E L Q V I S L E S G D A S I H D T V E N L I I
208    CTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTG
70     L A N N S L S S N G N V T E S G C K E C E E L
277    GAGGAAAAAATATTAAGAATTTTTCAGAGTTTGTACATATTGTCCAATGTTCATCAACACTTCT
93     E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S
346    GGTGGAGCGGTT CAGGCGGAGTGGCTCTGCCGGTGGCGGATCGGGATCCATGAAGTCGATGCTTGTG
116    G G G G S G G G S G G G S G S M K S M L V
415    GTGACAATATCAATATGGCTCATTCTTGACCAACTTCAACTTGGGCTGTGAATACAATCATCTACAAT
139    V T I S I W L I L A P T S T W A V N T I I Y N
484    GTTGGAAGTACCACCATTAGCAAATACGCCACTTTTCTGAATGATCTTCGTAATGAAGCGAAAGATCCA
162    V G S T T I S K Y A T F L N D L R N E A K D P
553    AGTTTAAATGCTATGGAATACCAATGCTGCCAATACAATACAATCCAAAGTACGTGTTGGTTGAG
185    S L K C Y G I P M L P N T N T N P K Y V L V E
622    CTCCAAGGTTCAAATAAAAAACCATCACACTAATGCTGAGACGAAACAATTTGTATGTGATGGGTTAT
208    L Q G S N K K T I T L M L R R N N L Y V M G Y
691    TCTGATCCCTTTGAAACCAATAAATGTCGTTACCATATCTTTAATGATATCTCAGGTAAGCCCAA
231    S D P F E T N K C R Y H I F N D I S G T E R Q
760    GATGTAGAGACTACTCTTTGCCCAAATGCCAATCTCGTGTTAGTAAAAACATAAACTTTGATAGTCGA
254    D V E T T L C P N A N S R V S K N I N F D S R
829    TATCCAACATTTGGAATCAAAGCGGGAGTAAAATCAAGAAGTCAAGTCCAAGTGGGAATTCAAATACTC
277    Y P T L E S K A G V K S R S Q V Q L G I Q I L
898    GACAGTAATATTGAAAGATTTCTGGAGTGATGTCATTCACTGAGAAAACCGAAGCCGAATTCTATTG
300    D S N I G K I S G V M S F T E K T E A E F L L
967    GTAGCCATACAAATGGTATCAGAGGCAGCAAGATTCAAGTACATAGAGAATCAGGTGAAAATAATTTT
323    V A I Q M V S E A A R F K Y I E N Q V K T N F
1036   AACAGAGCATTCAACCCTAATCCCAAAGTACTTAATTTGCAAGAGACATGGGTAAGATTCAACAGCA
346    N R A F N P N P K V L N L Q E T W G K I S T A
1105   ATTCAATGATGCCAAGAATGGAGTTTACCCAAACCTCTCGAGCTAGTGGATGCCAGTGGTCCAAGTGG
369    I H D A K N G V L P K P L E L V D A S G A K W
1174   ATAGTGTGAGAGTGGATGAAATCAAGCCTGATGTAGCACTCTTAAACTACGTGGTGGGAGCTGTCAG
392    I V L R V D E I K P D V A L L N Y V G G S C Q
1243   ACAACTTATAACCAAAATGCCATGTTTCTCAACTTATAATGTCTACTTATTATAATTACATGGTTAAT
415    T T Y N Q N A M F P Q L I M S T Y Y N Y M V N
1312   CTTGGTGATCTATTTGAAGGATTCTGA
437    L G D L F E M F *

```

上行:DNA 序列,下行:氨基酸序列;划线部分为接头序列,划线前部分为 IL15,划线后部分为 PAP。The underlined letters indicated linker (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> and Bam HI restriction site, before the underlined is the sequence of IL15, after the underlined is the sequence of PAP.

图3 原核表达载体 pET32a-IL15/PAP 中融合基因的完整序列及相应的氨基酸序列

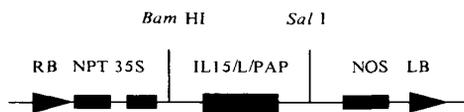
Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of cloned IL15/PAP fusion gene



1. DNA 标准 DNA Marker; 2. pB-IP/ Bam HI 单酶切对照 pB-IP/ Bam HI control; 3. pB-IP Bam HI/ Sal I 双酶切 pB-IP/ Bam HI + Sal I

图 4 pB-IP 的酶切鉴定

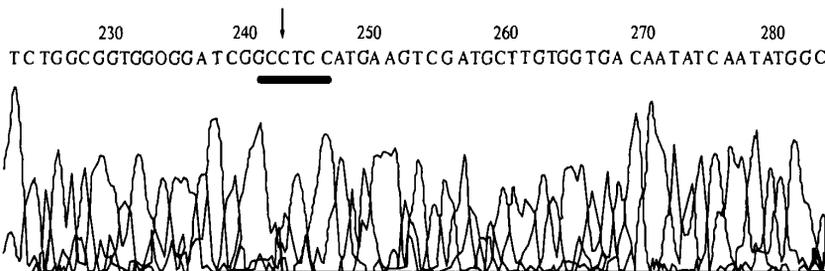
Fig. 4 Enzyme analysis of pB-IP



RB:右边界 Right border;NPT:植物选择标记 Neomycin phosphotransferase;35S:35S 启动子 35S CaMV promoter;NOS:终止子 Terminator;LB:左边界 Left border.

图 6 植物表达载体 pB-IP 结构

Fig. 6 Structure of plant expression vector pB-IP



箭头所示为突变碱基 The arrow indicated the mutated base

图 5 植物表达载体 pB-IP 插入片段部分序列测定结果

Fig. 5 Partial result of sequencing of foreign fragment in pB-IP

### 3 讨论

构建细胞因子融合毒素旨在利用细胞因子与其受体的特异性结合来达到特异性杀伤高表达相应细胞因子受体的肿瘤细胞的目的. 由于 IL2R 比较特异的分布于被激活而增殖的 T 淋巴细胞表面, 因此 IL2 被广泛用作构建多种导向药物的载体<sup>[7,8]</sup>, IL15 也被用来构建融合毒素<sup>[4]</sup>. 在多数以细胞因子作为载体的导向药物中, 弹头都采用绿脓杆菌外毒素 (PE) 和白喉毒素 (DT) 变异体等<sup>[9,10]</sup>. 作者以 IL15 为载体, PAP 为弹头, 设计了一种新型的、可消除 IL15R 高表达细胞的导向药物基因. IL15 与 IL2 生物学活性、受体结构等有很多相似之处, 但 IL15 的副作用小 (特别是血管渗出综合征低)、与相应受体亲和力高及协同性分布等都是 IL2 所不具备的特点. 因此, IL15 导向药物的临床应用有剂量小、特异性强及毒副作用低等优势<sup>[4,11,12]</sup>. 与细菌毒素 (PE, DT 等) 相比, 植物性毒素 PAP 细

胞毒性更强; 其次, PAP 与细菌毒素无免疫交叉反应, 病人体内也不含天然的抗 PAP 抗体, 尤其当病人对 PE 或 DT 类毒素蛋白产生抗性时, 以 PAP 为主体的毒素蛋白就显得更为重要, 相互之间可起到互补, 甚或可联合应用. 因此, IL15-PAP 融合蛋白可能成为一种特别应用价值的导向性药物.

蛋白质的功能取决于其空间结构. 在进行蛋白融合表达时, 一般都要使用接头序列将两多肽连接起来, 这样可使两基因在空间上各自分离, 折叠形成各自的三维结构, 以发挥其生物学功能. 作者选用了 Huston 设计的、具刚性结构的甘氨酸接头<sup>[5]</sup>, 期望 IL15 与 PAP 互不干扰而形成各自的天然构象, 从而同时获得具有 2 种蛋白功能的重组蛋白, 达到预期的目的. 在接头序列的引入途径上, 没有采取分步克隆策略中通常单独克隆接头序列的方法, 而是通过 PCR 引物引入接头序列, 这样就减少了工作量及加快了工作进展.

植物作为生产药用蛋白的生物反应器, 为人类

提供了一个更加安全和廉价的生产体系. 与其他生产系统相比,它具有许多潜在的优势<sup>[13]</sup>. 如对真核生物蛋白进行准确的翻译后加工和蛋白糖基化;成本较低,周期较短等. 本研究构建了植物表达载体,为研究利用植物生产该融合蛋白提供了试验材料.

#### 参考文献:

- [1] HUR Y, HWANG D J, ZOUBENKO O, et al. Isolation and characterization of pokeweed antiviral protein mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of residues important for toxicity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(18): 8448 - 8452.
- [2] 张海燕, 刘桂珍, 陈正华. 商陆抗病毒蛋白 CDNA 的克隆、测序及植物表达载体的构建[J]. 植物学报, 1999, 41(2): 226 - 228.
- [3] DORE J M, GRAS E, WIDENES J. Expression and activity a recombinant chimeric protein composed of pokeweed antiviral protein and of human interleukin-2 [J]. FEBS Letters, 1997, 402: 50 - 53.
- [4] 牛云飞, 毛晓华. 一种新型融合毒素 IL15-PE 293 的构建与体外活性测定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(12): 991 - 995.
- [5] LIESCHKE G J, RAO P K, GATELY M K, et al. Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo[J]. Nature Biotechnology, 1997, 15: 35 - 40.
- [6] 曹志敏, 张颖妹, 陈英玉, 等. 人 TFAR19 的定点突变及其重组蛋白的表达、纯化和功能分析[J]. 北京医科大学学报, 2000, 32(4): 306 - 310.
- [7] PASTAN I, CHAUSHARY V, FITZGERALD D J. Recombinant toxins as novel therapeutic agents[J]. Annu Rev Biochem, 1992, 61: 331 - 354.
- [8] 刘爽, 田增民. 细胞因子-毒素融合蛋白治疗恶性脑肿瘤的研究动向[J]. 中华神经科杂志, 2004, 37(4): 362 - 363.
- [9] PASTAN I. Immunotoxins containing pseudomonas exotoxin A: a short history[J]. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52: 338 - 341.
- [10] COHEN K A, LIU T, BISSONNETTE R, et al. DAB389EGF fusion protein therapy of refractory glioblastoma multiforme [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2003, 4: 39 - 49.
- [11] KATSANIS E, XU Z, PANPSKALTSIS-MORTARI A, et al. IL15 administration following syngenic bone marrow transplantation prolongs survival of lymphoma bearing mice [J]. Transplantation, 1996, 62: 872 - 875.
- [12] KABAYASHI H, GARRAQUILLO J A, PAIK C H, et al. Differences of biodistribution, pharmacokinetics, and tumour targeting between interleukin 2 and 15 [J]. Cancer Res, 2000, 60: 3577 - 3583.
- [13] 刘德虎. 利用转基因植物生产药用蛋白的发展趋势和方向[J]. 生物技术通报, 1999(4): 1 - 5.