

# 人白细胞介素-12(hIL-12)基因在杆状病毒 表达载体系统中的表达<sup>\*</sup>

杨 林 张晓馨 陈新华 龙繁新 王珣章 李迎秋

(中山大学生物医药中心、生物防治国家重点实验室 广州 510275)

**摘 要:** 人白细胞介素 12(hIL-12)是细胞介导免疫发生的关键调节因子,也是目前发现的唯一的异源二聚体细胞因子,由 P35 和 P40 两个亚基经二硫键连接而成。利用 DNA 重组技术,分别构建了含 hIL-12 p35 基因和 p40 基因的重组转移载体质粒 pAcAB3-p35 和 pAcAB3-p40。将两个重组转移载体分别与致死缺陷型线性化苜蓿丫纹液蛾核型多角体病毒(AcNPV BaculoGold Linearized Baculovirus)基因 DNA 共转染昆虫细胞,构建出遗传稳定的重组病毒 AcNPV-OCC-hIL-12(p35)与 AcNPV-OCC-hIL-12(p40)。将两种病毒分别感染 Sf9 细胞,取细胞培养物上清和细胞裂解物上清进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测,结果显示 hIL-12 p35 和 p40 两基因均在昆虫细胞中获得表达,且能分泌至胞外。表达产物具有免疫原性。

**关键词:** 人白介素 12 基因,杆状病毒表达系统,表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2001)01-0035-08

人白介素 12(human interleukin-12, hIL-12)是一种对 T 细胞和自然杀伤细胞(Nature Killer Cell, NK)具有多种调节功能的细胞因子,它可以刺激 T 细胞、NK 细胞释放  $\gamma$  干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ),诱导辅助性 T 细胞(Helper T Cell,  $T_H$ )前体细胞向  $T_{H1}$  细胞分化,从而启动细胞介导免疫,在抗肿瘤、抗病毒等方面有着不可估量的临床应用前景<sup>[1]</sup>。hIL-12 是至今发现的细胞因子中唯一由异二聚体组成的糖蛋白分子,由分子量分别为 35kD 和 40kD 的大小两亚基(P35, P40)以二硫键连接而成<sup>[2]</sup>。

杆状病毒表达载体系统是最具有应用前景的真核表达系统之一。它具有对外源基因容量大,操作方便,不污染环境等优点。由于它是真核表达系统,故可使表达产物得到较充分的翻译后修饰。目前,国际上已有数百家实验室和公司从事这一方面的研究<sup>[3]</sup>。

本文构建了含 hIL-12 p35 和 p40 亚基基因的重组转移载体质粒 pAcAB3-p35 和 pAcAB3-p40,并应用杆状病毒表达载体系统表达两亚基基因,同时探讨了表达产物在昆虫细胞中的加工修饰过程,为进一步开发出具有临床应用价值的 hIL-12 打下一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和菌株:含人白介素 12(hIL-12)p35 亚基和 p40 亚基基因的质粒 pED-p35

<sup>\*</sup> 广东省自然科学基金资助项目(960059)

作者简介: 杨 林(1964-),男,云南个旧人,中山大学生物防治国家重点实验室和生物医药中心博士后,主要从事基因工程研究。

收稿日期: 2000-03-27,修回日期: 2000-05-15 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

和 pED-*p40* 由美国 Genetics Institute Inc. S F Wolf 教授惠赠 ;转移载体质粒 pAcAB3 购自 PharMingen 公司 ;质粒 pBluscripts SK( M13- )由本实验室保存 ;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由美国 Scripps Institute 惠赠 ,基因型 :*supE44*  $\Delta$ *lacU169*(  $\phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15 ) ,*hsdR17* ,*recA1* ,*endA1* ,*gyrA96* ,*thi-1* ,*relA1* ;大肠杆菌 JM109 购自 Promega 公司 ,基因型 :*recA1* ,*endA1* ,*gyrA96* ,*thi* ,*hsdR17*(  $r_K^-$  , $m_K^+$  ) ,*relA1* ,*supE44*  $\Delta$ ( *lac-proAB* ) [ F' ,*traD36* ,*proAB* ,*lacI*<sup>q</sup> $\Delta$ M15 ]

1.1.2 昆虫细胞株和杆状病毒 草地贪夜蛾细胞( *Spodoptera frugiperda* 9 ,*Sf9* )引自英国自然环境研究会病毒研究所( NERC ,Institute of Virology ,Oxford ,England ) ;粉纹夜蛾细胞( *Trichoplusia ni* ,*Tn-5B1-4* )由武汉病毒所惠赠 ;含合成启动子和  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的无包涵体粉纹夜蛾重组株( *TnNPV-SVI-G* )由本实验室构建<sup>[4]</sup> ;致死缺陷型线性苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒基因 DNA 购自 PharMingen 公司。

1.1.3 试剂 :昆虫细胞裂解缓冲液( 1 $\times$  ) :10mmol/L Tris pH7.5 ,130mmol/L NaCl ,1% Triton X-100 ,10mmol/L NaF ,10mmol/L NaPi ,10mmol/L NaPPi ;蛋白酶抑制剂混合物( Protease Inhibitor Cocktail X 50 $\times$  ) :800 $\mu$ g/mL Benzamidine HCl ,500 $\mu$ g/mL Phenanthroline ,500 $\mu$ g/mL Aprotinin ,500 $\mu$ g/mL Leupeptin ,500 $\mu$ g/mL Pepstatin A ,50mmol PMSF。

1.1.4 抗体 抗人 IL-12p40/p70 以及抗人 IL-12 p35 单克隆抗体购自 PharMingen 公司 ;HRP 标记兔抗鼠 IgG 购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建 :参照萨姆布鲁克等的方法略作修改进行<sup>[5]</sup>。

1.2.2 重组病毒的构建和扩增 :参照杨林等的方法进行<sup>[6]</sup>。采用磷酸钙沉淀法将经聚乙二醇纯化的含 *p35* 和 *p40* 基因的重组转移载体质粒与 AcMNPV-OCC<sup>-</sup> DNA 共转染 *Sf9* 细胞。致死缺陷型线性化病毒基因组 DNA( AcMNPV-OCC<sup>-</sup> DNA )由于其必需基因的部分缺失 ,只有通过重组转移载体质粒 DNA 同源重组 ,才能修复致死性缺失 ,复制出具有感染力的病毒粒子 ,重组率高达 99% 以上 ,故一般无需进行空斑纯化 ,构建得到重组病毒 AcMNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL12( *p35* )和 AcMNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL12( *p40* )。

1.2.3 人白介素12 *p35* 和 *p40* 基因的表达与鉴定 :AcMNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL12( *p35* ) ,AcMNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL12( *p40* )及 *TnNPV-SVI-G* 感染对数生长期的 *Sf9* 细胞 ,27 $^{\circ}$ C 培养 72~96h ,收获细胞进行总蛋白的 SDS-PAGE、Western-blot 检测以及薄层色谱扫描测定外源蛋白表达量。

2 结果

2.1 重组转移载体质粒 pAcAB3-*p35* 与 pAcAB3-*p40* 的构建与酶切鉴定

将 pED-*p35* 用 *Pst* I 酶切 ,收集 1138bp 的 *p35* 基因片段 ;转移载体质粒 pAcAB3 用 *Sma* I 酶切 ,由于 *Pst* I 位点与 *Sma* I 位点无法互补配对 ,故引入中间载体 pBluscript。将 pED-*p35* 用 *Pst* I 酶切后的基因片段插入 pBluscript 用 *Pst* I 切出的窗口中 ,筛选正向的重组子 ,再用 *Sma* I 和 *Dra* I 酶切 ,收集小片段 ,这样 ,就得到了含两个钝端的 *p35* 片段 ,即可插入 pAcAB3 用 *Sma* I 酶切的窗口中 ,再次筛选正向的重组子 ,得到重组转移载体质粒 pAcAB3-*p35*。构建过程如图 1 所示。酶切鉴定结果显示 ,经 *Bam* HI 酶切的

pAcAB3-*p35* 比 pAcAB3 载体多出了一个 606bp 的小片段 ,用 *EcoR* I 酶切的 pAcAB3-*p35* 也比 pAcAB3 载体多出了一个 1127bp 的小片段 ,均与预期大小一致(图 2)。

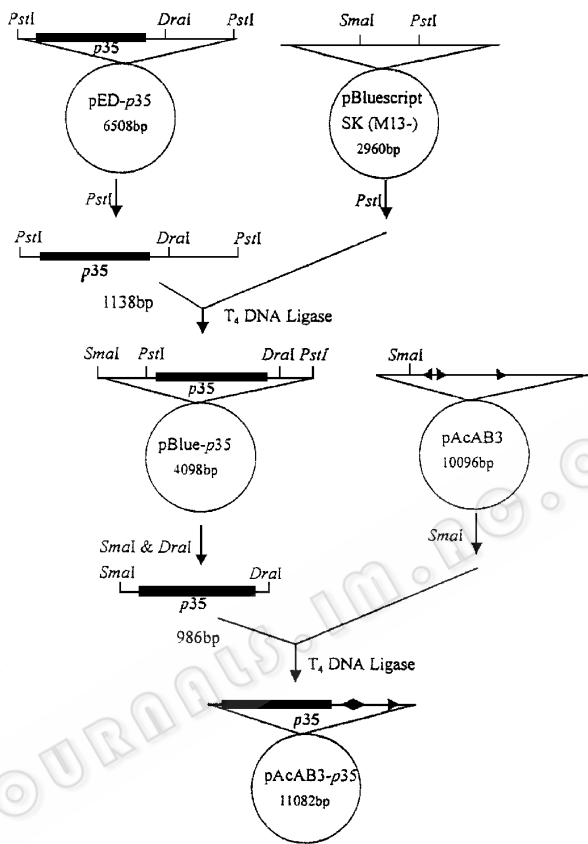


图 1 重组质粒 pAcAB3-*p35* 构建路线图

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid of pAcAB3-*p35*

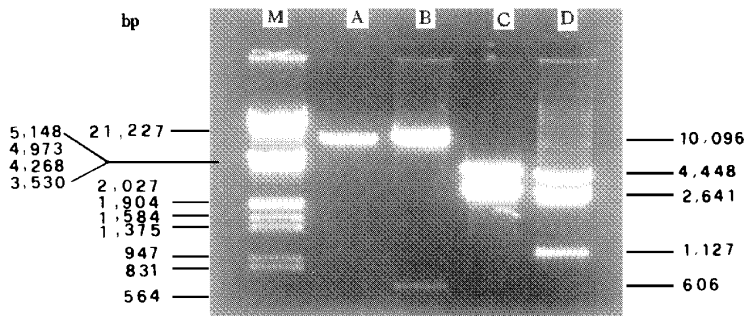


图 2 重组质粒 pAcAB3-*p35* 的酶切鉴定

Fig. 2 Digestion pattern of the plasmid pAcAB3-*p35*

M  $\lambda$ DNA/*EcoR* I + *Hind* III ; A pAcAB3/*Bam* H I ;

B pAcAB3-*p35*/*Bam* H I ; C pAcAB3/*EcoR* I ; D pAcAB3-*p35*/*EcoR* I .

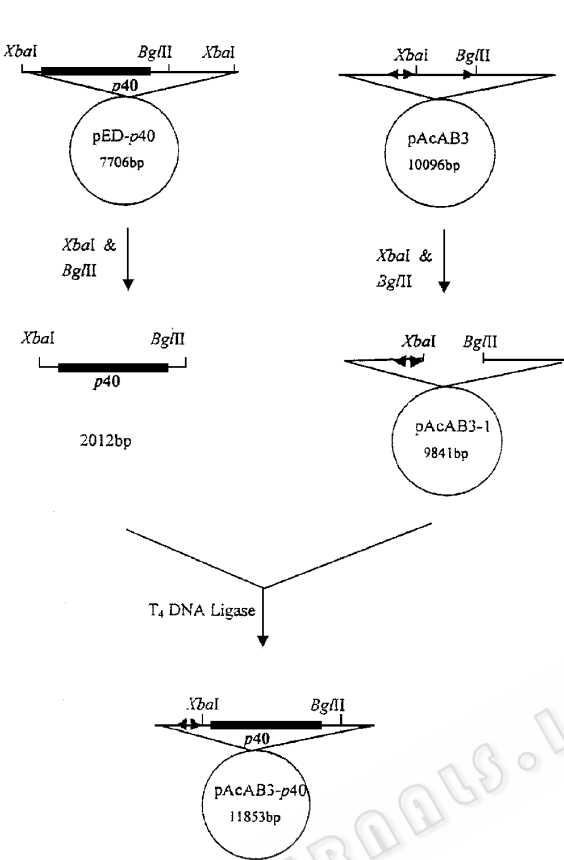


图 3 重组质粒 pAcAB3-*p40* 构建路线图

Fig.3 Construction of the recombinant plasmid of pAcAB3-*p40*

将 pED-*p40* 用 *Xba* I 和 *Bgl* II 酶切,收集 2012bp 的 *p40* 基因片段;质粒 pAcAB3 也用 *Xba* I 和 *Bgl* II 酶切,切除一个多余的 p10 启动子,收集大片段.将两个片段用 T4 Ligase 连接,从而将 *p40* 基因插入 pAcAB3 用 *Xba* I 和 *Bgl* II 切出的窗口中,构建成重组转移载体质粒 pAcAB3-*p40*.构建过程如图 3 所示.酶切鉴定结果显示,经 *Xba* I 和 *Bgl* II 酶切的 pAcAB3-*p40* 比 pAcAB3 载体多出了 2012bp 的基因片段,用 *Eco*R I 酶切的 pAcAB3-*p40* 可得到 4448bp、3501bp、2641bp 和 1263bp 的四个片段,均与预期大小一致(图 4).

2.2 重组病毒 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12 (*p35* 与 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12 *p40*) 的构建

重组转移载体质粒 pAcAB3-*p35* 和 pAcAB3-*p40* 采用改进的聚乙二醇沉淀法进行纯化.纯化后的质粒 DNA  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  值分别为 1.98 和 1.92,表明重组转移载体质粒 DNA 纯度较理想.将高纯度的 pAcAB3-*p35* 重组转移载体质粒 DNA 与 BaculoGold

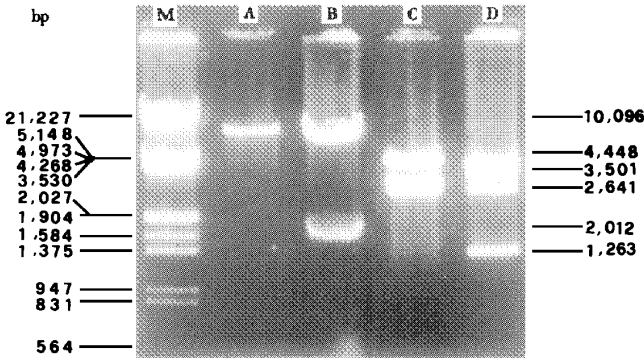


图 4 重组质粒 pAcAB3-*p40* 的酶切鉴定

Fig.4 Digestion pattern of the plasmid pAcAB3-*p40*

M  $\lambda$ DNA/*Eco*R I + *Hind*III ;A pAcAB3/*Bgl* II + *Xba* I ;

B pAcAB3-*p40*/*Bgl* II + *Xba* I ;C pAcAB3/*Eco*R I ;D pAcAB3-*p40*/*Eco*R I

Linearized Baculovirus DNA 共转染 *Sf9* 细胞 ,经过同源重组得到了遗传稳定的重组病毒 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p35* )。共转染 4d 后观察到 *Sf9* 细胞有病毒空斑出现。收集病毒液。

将高纯度的 pAcAB3-*p40* 重组转移载体质粒 DNA 与 BaculoGold Linearized Baculovirus DNA 共转染 *Sf9* 细胞 ,经过同源重组得到了遗传稳定的重组病毒 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p40* )。共转染 4d 后观察到 *Sf9* 细胞有病毒空斑出现。收集病毒液。

将 MOI 约为 3~10 $\mu$ g 的重组病毒 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p35* )原液感染处于生长对数期的 *Sf9* 细胞 ,27 $^{\circ}$ C 培养 72h 后 ,收集培养物上清 ,用适量的细胞裂解液裂解贴壁的细胞单层 ,取适量的细胞裂解液和培养物上清进行 SDS-PAGE 分析 ,可观察到感染 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p35* )的细胞裂解液蛋白质样品比感染了 TnNPV-OCC<sup>-</sup> 的样品多了一条约 31kD 的蛋白带 (图 5 )。该蛋白带与预期的表达产物大小一致 ,表明 hIL-12*p35* 基因得到了表达。

将 MOI 约为 3~10 的重组病毒 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p40* )原液感染处于生长对数期的 *Sf9* 细胞 ,27 $^{\circ}$ C 培养 72h 后 ,收集培养物上清 ,用适量的细胞裂解液裂解贴壁的细胞单层 ,取适量的细胞裂解液和培养物上清进行 SDS-PAGE 分析 ,可观察到感染 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p40* )的细胞裂解液蛋白质样品比感染了 TnNPV-OCC<sup>-</sup> 的样品多了一条约 40kD 的蛋白带 (图 6 )。该蛋白带与预期的表达产物大小一致 ,表明 hIL-12*p40* 基因得到了表达。

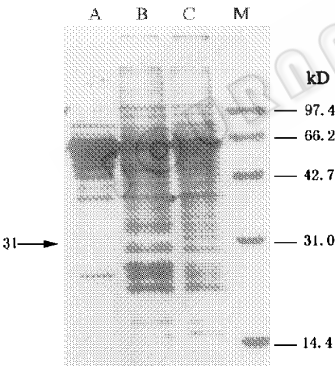


图 5 感染了重组病毒 AcNPV-OCC—hIL-12 ( *p35* )的 *Sf9* 细胞裂解物及培养物上清的 SDS-PAGE 分析图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the *Sf9* cell lysate and culture supernatant infected with recombinant virus AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p35* )

M :Mid-range protein molecular weihgt marker ;A :*Sf9* cell culture supernatant infected with recombinant virus AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p35* ) ;B :*Sf9* cell lysate infected with TnNPV-OCC<sup>-</sup> ;C :*Sf9* cell lysate infected with recombinant virus AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p35* ) .

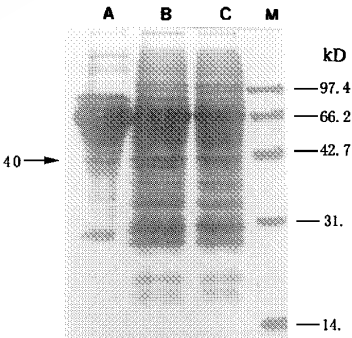


图 6 感染了重组毒株 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p40* )的 *Sf9* 细胞裂解物及培养物上清的 SDS-PAGE 分析图

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the *Sf9* cell lysate and culture supernatant infected with recombinant virus AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-1 $\alpha$ ( *p40* )

M :Mid-range protein molecular weihgt marker ; A :*Sf9* cell culture supernatant infected with recombinant virus AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12( *p40* ) ; B :*Sf9* cell lysate infected with recombinant virus AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12( *p40* ) ;C :*Sf9* cell lysate infected with TnNPV-OCC<sup>-</sup> .

2.3 *p35* 与 *p40* 基因在 *Sf9* 和 *Tn-5B1-4* 细胞中表达产物的分析与鉴定

为了证实上述二基因获得了表达,采用抗人 IL-12 *p40/p70* 与 *p35* 的单克隆抗体抗体进行表达的鉴定。对 AnNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p35*)和 TnNPV-OCC<sup>-</sup> 毒株分别感染的 *Sf9* 细胞裂解物和培养物上清的 SDS-PAGE 进行转膜,Western blot 结果显示,重组毒株感染的细胞培养物上清中有一条分子量为 28kD 的特异性反应带,细胞裂解物上清中除分子量为 28kD 的特异性反应带外,还有一条约 31kD 的条带,可能是信号肽切割不完全形成的。而作为对照的 TnNPV-OCC<sup>-</sup> 毒株感染的细胞裂解物上清结果为阴性,证明该基因得到了正确表达且能分泌至胞外。用 *Tn-5B1-4* 细胞重复实验,也得到相同的结果(图 7)。

对 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p40*)进行 Western blot 分析,可见重组毒株感染的细胞培养物上清中有一条分子量为 36kD 的特异性反应带,细胞裂解物上清中除分子量为 36kD 的特异性反应带外,还有一条约 40kD 的条带,可能是信号肽切割不完全形成的。证明该基因也得到了正确的表达和分泌(图 8)。

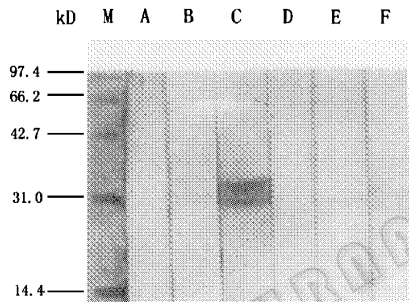


图 7 感染了 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p35*)的 *Sf9* 细胞和 *Tn-5B1-4* 细胞裂解物及培养物上清的 Western blot 分析

Fig. 7 Western blot analysis of the *Sf9* cell and *Tn-5B1-4* cell lysate and culture supernatant infected with recombinant virus AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p35*)

M:Mid-range protein molecular weight marker ;A :*Sf9* cell lysate infected with TnNPV-OCC<sup>-</sup> ;B :*Sf9* cell culture supernatant infected with AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p35*) ;C :*Sf9* cell lysate infected with AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p35*) ;D :*Tn-5B1-4* cell lysate infected with TnNPV-OCC<sup>-</sup> ;E :*Tn-5B1-4* cell culture supernatant infected with AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p35*) ;F :*Tn-5B1-4* cell lysate infected with AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p35*) .

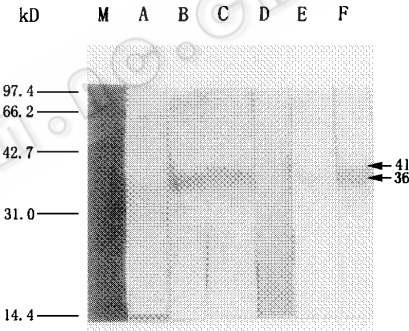


图 8 感染了 AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p40*)的 *Sf9* 细胞和 *Tn-5B1-4* 细胞裂解物及培养物上清的 Western blot 分析

Fig. 8 Western blot analysis of the *Sf9* cell and *Tn-5B1-4* cell lysate and culture supernatant infected with recombinant virus AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p40*)

M:Mid-range protein molecular weight marker ;A :*Sf9* cell lysate infected with TnNPV-OCC<sup>-</sup> ;B :*Sf9* cell culture supernatant infected with AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p40*) ;C :*Sf9* cell lysate infected with AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p40*) ;D :*Tn-5B1-4* cell lysate infected with TnNPV-OCC<sup>-</sup> ;E :*Tn-5B1-4* cell culture supernatant infected with AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p40*) ;F :*Tn-5B1-4* cell lysate infected with AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12(*p40*) .

2.4 外源基因表达量的测定

在薄层扫描仪上对 SDD-PAGE 的结果进行了扫描 ,测定了 590nm 波长下的吸收波 ,结果表明 ,P35 蛋白和 P40 蛋白分别占 Sf9 细胞总蛋白的 1.11%和 7.57%。

3 讨论

3.1 hIL-12p35 和 p40 在昆虫细胞中的表达和分泌

从 Western blot 的结果分析 ,在 Sf9 和 Tn-5B1-4 细胞培养物上清和细胞裂解液上清中 ,都可检测到 hIL-12p35 和 p40 亚基基因的表达产物 ,证明二亚基在两种昆虫细胞中都得到了表达 ,且能分泌至胞外。可见 ,昆虫细胞能识别 hIL-12p35 和 p40 信号肽并进行切割。

3.2 外源基因表达水平的探讨

为了提高外源基因表达水平 ,本论文在转移载体质粒的选择和外源基因自身条件的优化两方面 ,做了以下一些探讨 :带有滞晚期强启动子 *polh* promoter 和 *p10* promoter 的转移载体质粒比晚期或早期启动子能更高效地表达外源基因 ,不过后者具有对外源重组蛋白更强的加工修饰能力 ,选用带有 *polh* promoter 和 *p10* promoter 的转移载体质粒 ,以提高外源基因的表达水平。此外 ,虽然基因组 DNA 可在杆状病毒系统中得到剪接并获得低水平表达<sup>[7,8]</sup> ,但至今仍无高水平表达的报道 ,采用 hIL-12p35 和 p40 的 cDNA 作为外源基因的来源 ,以提高表达水平。值得一提的是有报道表明 mRNA 3'端非编码区 AU 富含序列控制着 mRNA 的不稳定性<sup>[9]</sup>。因此 ,删除了 hIL-12p35 cDNA 3'端 252bp 的部分 poly( A)序列 ,也删除了 hIL-12 p40 cDNA 3'端 324bp 的部分 poly( A)序列 ,以尽量减少外源 mRNA 的 AU 富含序列 ,提高表达水平。虽然本文就上述因素进行了改进 ,但表达水平依然不够理想 ,这很可能与 Sf9 细胞的密码子偏好有较大关系。

通过比较发现 :同样编码甘氨酸( Gly )的四个密码子 GGU ,GGC ,GGA 和 GGG 在 Sf9 细胞中的使用的频率并不相同 ,其频率分别为 GGU :20.0‰ ;GGC :20.0‰ ;GGA :21.4‰ ;GGG 5.5‰ ,GGG 的使用频率比其它三个明显的低。

再比较这四个密码子在 hIL-12p35 和 p40 中的使用情况 ,结果如表 1 所示。

表 1 Sf9 细胞与外源基因密码子使用频率的比较

Table 1 Comparison of codon usage frequency between Sf9 cells and foreign genes Unit :‰ ( Quantity of codon )			
Codon	Sf9	hIL-12p35	hIL-12p40
GGU	20.0( 130 )	3.9( 1 )	3.0( 1 )
GGC	20.0( 130 )	0( 0 )	18.3( 6 )
GGA	21.4( 139 )	3.9( 1 )	18.3( 6 )
GGG	5.5( 36 )	7.9( 2 )	6.1( 2 )

在 hIL-12p35 和 p40 中 ,GGG 的出现率却都比 GGU 高。因此这很可能是限制 p35 和 p40 基因在 Sf9 细胞中获得高效表达的瓶颈。在将来的工作中 ,可望通过同义突变 ,将 GGG 突变成 GGU ,以提高表达水平。

3.3 信号肽的识别与切割

Western blot 结果显示 ,细胞裂解物泳道除预期大小的印迹外 ,还有一条比预期印迹大的印迹 ,估计是由于信号肽切割不完全而形成的。可见 ,杆状病毒表达载体系统对 hIL-12 *p*35 和 *p*40 蛋白信号肽的识别和切割仍很有限 ,改进的方法是采用杆状病毒自身的信号肽 (如 GP67 的信号肽序列 )代替外源基因的信号肽 ,以获得最好的表达分泌效果。

参 考 文 献

[ 1 ] Baukd R E , Patel P M , Selby P J. *British Journal of Cancer* ,1995 ,71 655~659.  
[ 2 ] Wolf S F , Temple P A , Kobayashi M. *Journal of Immunology* ,1991 ,157 3047~3081.  
[ 3 ] O'Reilly D R. *Baculovirus Expression Vectors ; A Laboratory Manual*. New York ; WH Freeman ,1992 ,567~650.  
[ 4 ] 王珣章 ,龙繁新 ,谢伟东. *病毒学报* ,1991 ,7 253~261.  
[ 5 ] 萨姆布鲁克 J ,弗里奇 E F ,曼尼阿蒂斯 T. *分子克隆(第二版)*. 北京 :科学出版社 ,1996. 247~259.  
[ 6 ] 杨 林 朱 维 王珣章 等. *生物化学与生物物理学学报* ,1998 ,30( 3 ) 293~298.  
[ 7 ] Jeang K T. *J Virol* ,1987 ,61 :1761~1764.  
[ 8 ] Iatrou K. *PNAS USA* ,1989 ,86 9129~9133.  
[ 9 ] Yost H. *Trends in Genetics* ,1990 ,6 223~227.

EXPRESSION OF HUMAN INTERLEUKIN-12 IN BACULOVIRUS  
EXPRESSION SYSTEM\*

Yang Lin Zhang Xiaoxin Long Xuxin Chen Xinhua Wang Xunzhang Li Yinqiu  
( *Biopharmaceutical Center , State Key Lab for Biocontrol , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China* )

**Abstract :** Human Interleukin-12 ( hIL-12 ) is a key immunoregulatory cytokine and the only heterodimeric cytokine found by far. It is a disulfide-linked heterodimer composed of a 35kD light chain ( P35 ) and a 40kD heavy chain ( P40 ). Two recombinant transfer vector plasmids pAcAB3-*p*35 ( including hIL-12 *p*35 gene ) and pAcAB3-*p*40 ( including hIL-12 *p*40 gene ) were constructed and co-transfected the insect cells *Sf*9 with AcNPV BaculoGold Linearized Baculovirus DNA. The obtained recombinant viruses , AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12 ( *p*35 ) and AcNPV-OCC<sup>-</sup>-hIL-12 ( *p*40 ) , were used to infect the *Sf*9 cells separately , and the supernatants of culture and cell lysate were examined by using SDS-PAGE and Western blot. Results showed that both hIL-12 *p*35 and *p*40 gene were successfully expressed in insect cells and secreted. The expression productions had immunogenicity.

**Key words :** Human interleukin-12 ( hIL-12 ) , Baculovirus expression system , Expression

\* Supported by Guangdong Provincial Natural Science Foundation ( 960059 ) 中国科学微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>