

การผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ลูกผสม :

รีคอมบิแนนท์อินเตอร์ลิวคิน 6

Production of Hybridoma Growth Factor:

A Recombinant Interleukin-6

อรฤดี ขันติสิทธิพร*

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

พจนีย์ ศรีมานชญ์ และผ่องศรี ทองทวี

โครงการบัณฑิตศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Onruedee Khantisitthiporn*

Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Potjanee Srimanote and Pongsri Tongtawe

Graduate Program in Biomedical Science, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

สารอินเตอร์ลิวคิน 6 (IL-6) เป็นไซโตไคน์ที่สร้างได้จากเซลล์หลายชนิดและทำหน้าที่ได้หลากหลาย ได้แก่ การช่วยในกระบวนการสร้างเม็ดเลือด การตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน การส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์พลาสมาไซโตมา และเซลล์ลูกผสม การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ IL-6 (rIL-6) ของหนูเพื่อใช้เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตสำหรับเซลล์ลูกผสม โดยการสังเคราะห์ยีน IL-6 จาก cDNA ซึ่งเตรียมจากเซลล์จากม้ามของหนูไม่ช้สายพันธุ์ BALB/c ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide จากนั้นโคลนยีน IL-6 เข้าสู่ pQE32 vector และนำเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ M15 แล้วคัดเลือกโคลน *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (pQE32:IL-6) ไปเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีน rIL-6 ด้วยสาร IPTG หลังจากนั้นทำให้ rIL-6 บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography แล้วนำไปทำ refolding ให้เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ นำ rIL-6 ที่ผลิตได้ไปทดสอบสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์กับเซลล์ลูกผสม C9B6

และเซลล์ myeloma ชนิด P3x-63-Ag8.653 ด้วยวิธี proliferation assay ซึ่งพบว่าโปรตีน rIL-6 ที่ความเข้มข้น 0.125 นาโนกรัมต่อมิลลิตร สามารถทำให้เซลล์ทั้งสองชนิดเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ mock การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารส่งเสริมการเจริญเติบโตซึ่งจำเป็นสำหรับการโคลนและการเพาะเลี้ยงเซลล์ถูกผสมให้มีประสิทธิภาพสามารถผลิตใช้ได้เองในห้องปฏิบัติการทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังสามารถนำไปพัฒนาต่อยอให้ได้ผลผลิตปริมาณมากเพื่อการพาณิชย์และลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง

คำสำคัญ : อินเตอร์ลิวคิน 6, โปรตีนรีคอมบิแนนท์, เซลล์ลูกผสม, สารส่งเสริมการเจริญเติบโต

Abstract

Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine produced from various cell types and possess several biological functions such as in hematopoiesis, immune responses, growth factor for plasmacytoma and hybridoma cells. The purpose of this study was to produce a murine recombinant IL-6 (rIL-6) for use as a growth factor for hybridoma cells. Gene encoding the mouse IL-6 was amplified from the complementary DNA (cDNA) prepared from the spleen cells of a BALB/c mouse stimulated with lipopolysaccharide (LPS). The IL-6 cDNA was cloned into pQE32 vector and subsequently transformed into *Escherichia coli* strain M15. The selected *E. coli* clone carrying recombinant DNA, pQE32:IL-6, was induced to express the rIL-6 protein by IPTG. After rIL-6 was purified by using affinity column chromatography and refolded to be a soluble form, it was tested for promoting growth of two cell types i.e., hybridoma (C9B6) and myeloma (P3x-63-Ag8.653) cells by using the proliferation assay. The concentration of rIL-6 at 0.125 ng/ml could conspicuously enhance growth of both cell types compared with the cells cultured in the identical concentration of mock medium. This study demonstrated that the growth factor which is necessary for efficient cloning and culturing hybridoma could be produced for in-house applications, replacement of using laboratory animals. Moreover, it could be further developed for mass production and commercialization leading to reduction of imported products which are very expensive.

Key words: interleukin 6, recombinant protein, hybridoma cell, growth factor

1. บทนำ

สารอินเตอร์ลิวคิน 6 (interleukin-6, IL-6) เป็นไซโตไคน์ชนิดหนึ่งที่ผลิตได้จากเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์แมโครฟาจ (macrophages) เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibroblasts) เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด

(endothelial cells) และเซลล์ลิมโฟซัยต์ชนิด T-helper (activated T-helper cells) IL-6 เป็นไกลโคโปรตีนที่มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 21-28 กิโลดัลตัน (kDa) ซึ่งขนาดมวลโมเลกุลของ IL-6 ขึ้นอยู่กับกระบวนการตัดแปลงโครงสร้างโปรตีนที่เกิดขึ้นหลังจากกระบวนการ

การถอดรหัสโปรตีน (post-translational modification) IL-6 ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 185 ตัว จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสัตว์หลาย ๆ สปีชีส์พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ IL-6 ในสัตว์แต่ละสปีชีส์มีความเหมือนกัน (identity) ที่ส่วนกลางของโมเลกุล คือ ประมาณกรดอะมิโนลำดับที่ 40-100 และที่ส่วนปลายด้าน C (C-terminus) ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 165-184 [1] และเมื่อเปรียบเทียบ IL-6 ของคนกับหนูพบว่ามีความคล้ายคลึงกัน (homology) ทั้งในระดับ DNA (65 %) และในระดับโปรตีน (42 %) [2]

IL-6 จัดเป็น multifunctional cytokine เนื่องจากมีหน้าที่หลายอย่าง ได้แก่ การควบคุมการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน acute phase reactions และกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือด เป็นต้น IL-6 มีบทบาทต่อการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน (Ig) ของ B-cell โดย IL-6 จะเหนี่ยวนำให้ B-cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) [3] หรือ pokeweed mitogen (PWM) [4] ให้มีการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน (Ig) ชนิด IgM, IgG และ IgA นอกจากนี้ IL-6 ยังสามารถทำให้มีการแสดงออกของตัวรับ (receptor) ของ IL-6 บน T-cell และธัยโมซัยต์ [5,6] ทำให้มีการเจริญและการแบ่งตัวของ T-cell เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PHA ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและแสดงหน้าที่ของ cytotoxic T-cell (CTL) [7] อีกทั้ง IL-6 ยังสามารถทำงานส่งเสริมกันกับ IL-3 ในการกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดให้มีการแบ่งตัวในหลอดทดลอง [8] ได้อีกด้วย นอกจากนี้ IL-6 มีหน้าที่ในการกระตุ้นเซลล์ PC12 ให้เจริญเป็นเซลล์ประสาท [9-11] ช่วยยืดยาวเซลล์ประสาทชนิด cholinergic ในระหว่างการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ [12] อีกทั้งยังพบว่า IL-6 ยังทำหน้าที่เป็น growth factor ของ

เซลล์มะเร็งชนิด plasma cell ในหนู (murine plasmacytoma cells) [2,13] และเซลล์มะเร็งในคน (myeloma cell) [14]

ในขั้นตอนการทำ limiting dilution เพื่อแยกเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวของกระบวนการผลิตเซลล์ลูกผสม (hybridoma cells) เพื่อสร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดีนั้น มีความจำเป็นอย่างยั้งที่ต้องเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ feeder cells เพื่อช่วยให้เซลล์ลูกผสมเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจาก feeder cells มีการหลั่ง growth factor ซึ่งต่อมาพบว่าคือสาร IL-6 [15] และเนื่องจาก IL-6 เป็นปัจจัยที่สำคัญในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์มะเร็งทั้งในคนและในสัตว์ทดลอง (หนู) การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสมซึ่งมีสมบัติการเป็นเซลล์มะเร็งชนิดหนึ่งในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยการเติม IL-6 ซึ่งใช้เป็น growth factor ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์จะช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น มีการผลิตแอนติบอดีได้ดีขึ้น [16] และช่วยยับยั้งการเกิดเซลล์ตายแบบ apoptosis ได้ [17] จึงได้มีการนำ IL-6 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้มีปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นเพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก ดังนั้นการศึกษาวัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโปรตีนชนิดรีคอมบิแนนท์อินเตอร์ลิวคิน 6 ของหนู (recombinant IL-6, rIL-6) ชนิดละลายน้ำได้เพื่อนำมาใช้เป็น growth factor สำหรับนำไปใช้เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ลูกผสม

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัดแยก total RNA และการสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA)

กระตุ้นเซลล์จากม้ามของหนูไมซ์ ชนิด BALB/c จำนวน 1×10^6 เซลล์ (ได้รับอนุเคราะห์จาก

ผศ.ดร.พจน์ ศรีมาโนชญ์) ด้วยสาร lipopolysaccharide (5 µg/ml) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5 % CO₂ อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นสกัดแยก total RNA จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแล้วด้วย TRIzol® (Invitrogen, USA) และสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จาก RNA ด้วยวิธี reverse transcription โดยใช้ชุดทดสอบ Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas life sciences, USA)

2.2 Polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มจำนวน DNA ของยีน *IL-6* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะซึ่งประกอบด้วย forward primer: 5'-CGG ATC CCA GAA ACC GCT ATG AAG TT-3' และ reverse primer: 5'-TGC TAA GCT TAG GCA TAA CGC ACT AGG T-3' ในหนึ่งปฏิกิริยาปริมมาตร 25 µl มีส่วนผสม ได้แก่ 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 µM *IL-6* primers, 0.04 unit *Taq* DNA polymerase (Fermentas life sciences, USA), 1x *Taq* buffer และ cDNA template 1 µl นำส่วนผสมไปทำปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ (1) primary denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที (2) PCR cycle ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที ตามลำดับ จำนวน 30 รอบ และ (3) final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis

2.3 การโคลนยีน *IL-6*

สกัดแยก *IL-6* ออกจาก agarose gel โดยใช้ชุดทดสอบ GENECLEAN® II Kit (Biomedical,

LLC, USA) แล้วนำไปเชื่อมต่อ (ligate) เข้ากับ cloning vector (pGEM®-T Easy Vector, Promega, USA) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas life sciences, USA) incubate ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำ recombinant plasmid (pGEM-T:*IL-6*) เข้าสู่ competent *E. coli* สายพันธุ์ JM109 คัดเลือกโคโลนี *E. coli* ที่มี inserted *IL-6* ด้วยวิธี PCR หลังจากคัดเลือกโคโลนีได้แล้ว นำไปสกัดแยก recombinant plasmid และนำไปตรวจสอบลำดับเบส (nucleotide sequence) ของยีน *IL-6* ด้วยวิธี sequencing (Macrogen, Korea)

2.4 การเคลื่อนย้ายยีน *IL-6* เข้าสู่ expression vector

นำ recombinant plasmid (pGEM-T:*IL-6*) และ expression vector (pQE-32) ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วยการ run บน 1 % agarose gel electrophoresis จากนั้นสกัดแยก *IL-6* และ pQE-32 ออกจาก agarose gel แล้วทำการเชื่อมต่อยีน *IL-6* เข้ากับ pQE-32 ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ที่อุณหภูมิ 4 °C (16-22 ชั่วโมง) นำ recombinant plasmid (pQE-32:*IL-6*) เข้าสู่ competent *E. coli* สายพันธุ์ M15 (expression host) และเพาะเลี้ยง transformed *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มีส่วนผสมของ 100 µg/ml ampicillin และ 25 µg/ml kanamycin (LB-AK) จากนั้นสุ่มโคโลนีไปทำ PCR เพื่อคัดเลือกโคลนที่มียีน *IL-6*

2.5 การเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีน recombinant *IL-6* (rIL-6)

เหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีน rIL-6 จากโคลน transformed *E. coli* ที่คัดเลือกไว้แล้ว โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของแต่ละโคลนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิด LB-AK broth ปริมาตร 1 ml นำไปบ่มพร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm อุณหภูมิ 37 °C (16-18 ชั่วโมง) เพื่อเตรียมเป็น *E. coli* starter จากนั้นนำ *E. coli* starter ปริมาตร 100 µl เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB-AK broth ปริมาตร 10 ml และนำไปบ่มพร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งเซลล์อยู่ในระยะ log phase ($OD_{600nm} = 0.5$) แล้วเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 3,500 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แล้วนำ cell homogenate ไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่ 4 °C และแยกส่วนที่เป็น soluble และส่วนที่เป็น insoluble หรือตะกอน นำส่วนที่เป็นตะกอนไปปั่นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วละลายตะกอนด้วย buffer C (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris, 8 M Urea, pH 6.3) หลังจากนั้นนำโปรตีนที่เตรียมไว้ทั้ง 2 ส่วน คือ soluble และ insoluble ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [18] และ Western blot analysis [19] โดยใช้ mouse anti-His (dilution 1 : 3,000) เป็นแอนติบอดีสำหรับตรวจตามตำแหน่งของโปรตีน rIL-6

2.6 การแยกโปรตีน rIL-6 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography

เพาะเลี้ยง *E. coli* starter ปริมาตร 2.5 ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-AK broth ปริมาตร 250 ml นำไปบ่มพร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนกระทั่งเซลล์อยู่ในระยะ log phase ($OD_{600nm} = 0.5$) จากนั้นเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ

37 °C ต่ออีก 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และปั่นล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง เติม buffer B (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris, 8 M Urea, pH 8) ปริมาตร 12 ml ลงในตะกอนเซลล์ ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เก็บแยกส่วน supernatant นำไปผสมกับ Ni-NTA resin ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ Ni-NTA resin ที่เตรียมไว้ใส่ลงใน column หลังจากล้าง column ด้วย buffer C 5 ml จำนวน 3 ครั้งแล้ว ชะล้างโปรตีน rIL-6 ที่ยึดติดกับ resin ด้วย buffer D (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris, 8 M Urea, pH 5.9) ปริมาตร 10 ml เก็บโปรตีนที่ชะล้างจาก column อย่างต่อเนื่องใส่ลงในแต่ละหลอดทดลองหลอดละ 1 ml จากนั้นทำการชะล้าง column ต่อด้วย buffer E (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris, 8 M Urea, pH 4.5) ปริมาตร 10 ml และเก็บโปรตีนที่ชะล้างจาก column หลอดละ 1 ml เช่นเดียวกัน นำโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกได้จาก column ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis

2.7 Protein refolding

นำ purified rIL-6 ไปทำการ refolding โดยการเติม refolding buffer (100 mM Tris-Cl, 100 mM L-arginine, 2 mM NaEDTA, 0.5 mM oxidized-glutathione, 5 mM reduced-glutathione, 1 mM PMSF) ปริมาตร 25 เท่า ของปริมาณโปรตีนที่บริสุทธิ์ โดยการหยด refolding buffer ที่ละลายพร้อมกับการผสมให้เข้ากันด้วยการปั่นเบา ๆ บน magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อเติมบัพเฟอร์ครบปริมาตรแล้ว incubate ต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วย

amicon tube ให้มีปริมาตรเหลือเพียง 5 ml นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แบ่งส่วน supernatant ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis นำส่วนที่เหลือไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน membrane ที่มีขนาดรู (pore size) 0.22 micron และคำนวณหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford's [20]

นอกจากนี้โปรตีนจากโคลน *E. coli* ที่มี empty pQE32 ได้ถูกเตรียมคู่ขนานพร้อมไปกับการเตรียม rIL-6 ที่ละลายน้ำด้วย เพื่อนำไปใช้เป็นโปรตีนควบคุม (mock) สำหรับการทดสอบ cell proliferation assay

2.8 Cell proliferation assay

การทดสอบหน้าที่ของ rIL-6 ในการเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด myeloma (P3x-63-Ag8.653) และเซลล์ลูกผสม (hybridoma, C9B6) โดยการเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยการทำ proliferation assay มีขั้นตอนดังนี้ (1) เพาะเลี้ยงเซลล์ myeloma และเซลล์ลูกผสม ใน RPMI 1640 medium ที่มี 10 % heat inactivated fetal bovine serum (FBS) เพาะบ่มใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่งได้เซลล์ประมาณ 80-90 % confluent เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น RPMI 1640 ที่มี 2 % FBS และบ่มใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (2) ทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ myeloma และเซลล์ลูกผสม (cell proliferation) ที่ได้รับการกระตุ้นจากโปรตีน rIL-6 และ mock ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยนำเซลล์ที่ได้จากข้อ (1) ดูดเซลล์ให้หลุด centrifuge ขนาด 15 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 100 x g เป็นเวลา 8 นาที เทส่วน supernatant ออกแล้วเติม RPMI 1640

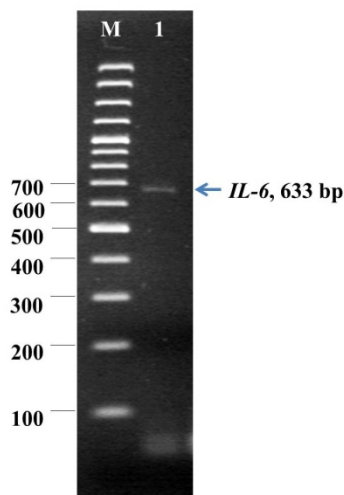
medium ปริมาตร 1 ml นับจำนวนเซลล์และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีความเข้มข้น 2×10^4 cells/ml และแบ่งเซลล์ใส่ลงใน microtitre plate แบบ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 μ l (2000 cells/well) จากนั้นเติมโปรตีน rIL-6/mock หลุมละ 100 μ l ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.125, 0.5, 2, 8 และ 32 ng/ml ตามลำดับ ทำซ้ำ 3 หลุม ในแต่ละความเข้มข้น (triplicate) และทำการทดสอบอย่างน้อยสามครั้ง ในแต่ละครั้งของการทดสอบมีการทำ triplicate ของหลุมที่เป็นเซลล์ควบคุม (baseline) ที่ไม่ได้เติมโปรตีน rIL-6/mock และหลุมที่เป็น medium control (blank) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เพียงอย่างเดียว (200 μ l) ทำการเพาะบ่มใน 5 % CO₂ incubator เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบเวลาเติมสี resazurin (Molecular probes, USA) ความเข้มข้น 500 μ g/ml ใส่หลุมละ 10 μ l นำไปเพาะบ่มต่อใน 5 % CO₂ incubator เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (3) อ่านผลการ proliferate ของเซลล์ myeloma/เซลล์ลูกผสม ในสภาวะที่มี rIL-6 และ mock ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยดูการเปลี่ยนสีของสี resazurin จากสีฟ้าเป็นสีชมพู วัดค่า fluorescence ของสีที่เปลี่ยนไปโดยใช้ excitation และ emission wavelength ที่ 560 และ 590 nm ตามลำดับ (4) Plot กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีนและค่า fluorescence เปรียบเทียบแนวโน้มการเจริญเติบโตของเซลล์ myeloma/hybridoma ระหว่างเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย rIL-6 และ mock

3. ผลการทดลอง

3.1 Polymerase chain reaction (PCR)

จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน *IL-6* โดยใช้ cDNA เป็น template และใช้ specific primer ที่ออกแบบขึ้นเพื่อให้มีความจำเพาะสำหรับยีน *IL-6*

ของหนู และการวิเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis พบว่า *IL-6* มีขนาด 633 base pairs ดังแสดงในรูปที่ 1



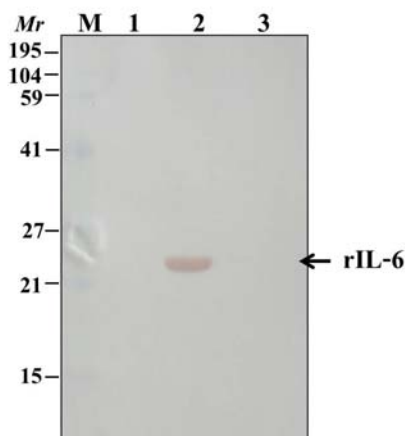
รูปที่ 1 PCR product ของยีน *IL-6* (lane M: 100 bp DNA ladder, lane 1: ยีน *IL-6*)

3.2 การโคลนยีน *IL-6* และการเคลื่อนย้าย recombinant DNA เข้าสู่ expression vector

เมื่อโคลนยีน *IL-6* เข้าสู่ cloning vector (pGEM-T) และนำ recombinant plasmid (pGEM-T:*IL-6*) เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 เป็นลำดับ แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่มี inserted gene นำไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่ายีน *IL-6* มีลำดับเบสและ deduced amino acid เหมือนกับ *IL-6* ที่ใช้เป็นต้นแบบ (*Mus musculus* *IL-6*, GenBank Accession Number NM_031168.1) ที่ 100 % และหลังจากการเคลื่อนย้าย *IL-6* จาก pGEM-T:*IL-6* เชื่อมต่อกับ expression vector (pQE-32) และนำ pQE-32:*IL-6* เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15 แล้วทำการสุ่มเลือกโคโลนีจำนวน 8 โคโลนี ไปตรวจสอบการมียีน *IL-6* ด้วยวิธี PCR พบว่าทุกโคลนที่สุ่มเลือกไปทดสอบมียีน *IL-6*

3.3 การเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีน recombinant *IL-6* (rIL-6)

เมื่อนำ *E. coli* ทั้ง 8 โคลน (โคลนที่ได้จากผลการทดลองที่ 3.2) ไปเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีน rIL-6 และตรวจสอบคุณลักษณะของโปรตีนด้วยการทำ SDS-PAGE และ Western blot analysis พบว่าทุกโคลนมีการแสดงออกของโปรตีน rIL-6 ที่มีขนาดประมาณ 22.6 kDa และโปรตีนนี้เป็น inclusion bodies อยู่ในส่วนที่เป็นตะกอนหรือ insoluble portion ดังแสดงในรูปที่ 2

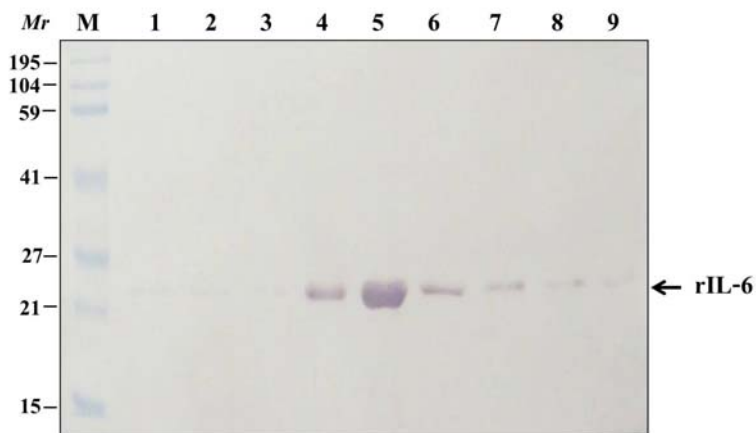


รูปที่ 2 Western blot analysis ที่ probe ด้วย mouse anti-His ของโปรตีน rIL-6 ที่แสดงออกในเซลล์ *E. coli* หลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร IPTG [lane M: standard protein markers, lane 1: โปรตีนจากส่วน supernatant (soluble portion), lane 2: โปรตีนจากส่วนตะกอน (insoluble portion), lane 3: โปรตีนจาก whole cell homogenate ก่อนการเหนี่ยวนำด้วยสาร IPTG]

3.4 การแยกโปรตีน rIL-6 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography

การสกัดโปรตีน rIL-6 จากเซลล์ *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography พบว่าเมื่อชะล้าง column ด้วย elution buffer (buffer E) สามารถตรวจพบ rIL-6 ที่ถูก elute ออก

จาก column ได้ใน fraction ที่หนึ่ง (E1) และพบมีปริมาณสูงสุดใน fraction E2 จากนั้นปริมาณลดลงเป็นลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 Western blot analysis ที่ probe ด้วย mouse anti-His ที่แสดงผลการ purify โปรตีน rIL-6 ด้วย affinity column chromatography [lane M: standard protein markers, lanes 1-3: purified rIL-6 ที่ elute ด้วย buffer D (แสดงเฉพาะ fractions D5-D7), lanes 4-9, purified rIL-6 ที่ elute ด้วย buffer E (fractions E1-E6)]

3.5 Protein refolding

เนื่องจาก rIL-6 ที่ผลิตได้เป็น insoluble protein ไม่สามารถนำไปใช้ทดสอบหน้าที่ได้ จึงต้องทำการ refolding เพื่อเปลี่ยนให้เป็น soluble form ก่อน หลังจากการทำ refolding แล้วตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis อีกครั้ง พบว่าโปรตีน rIL-6 อยู่ในส่วนน้ำ (supernatant) ดังแสดงในรูปที่ 4 และจากการหาปริมาณโปรตีน rIL-6 ที่เตรียมได้ พบว่าได้ปริมาณโปรตีนทั้งสิ้นประมาณ 100 μ g (ความเข้มข้นเท่ากับ 20 μ g/ml)

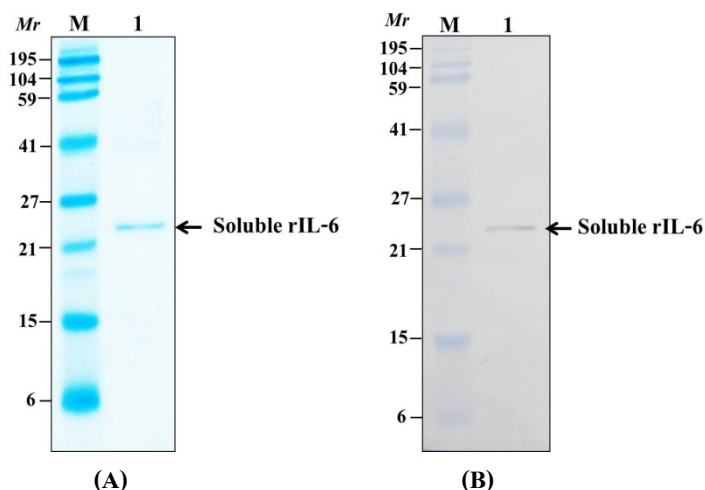
3.6 Cell proliferation assay

การทดสอบสมบัติของโปรตีน rIL-6 ในการเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ลูกผสม

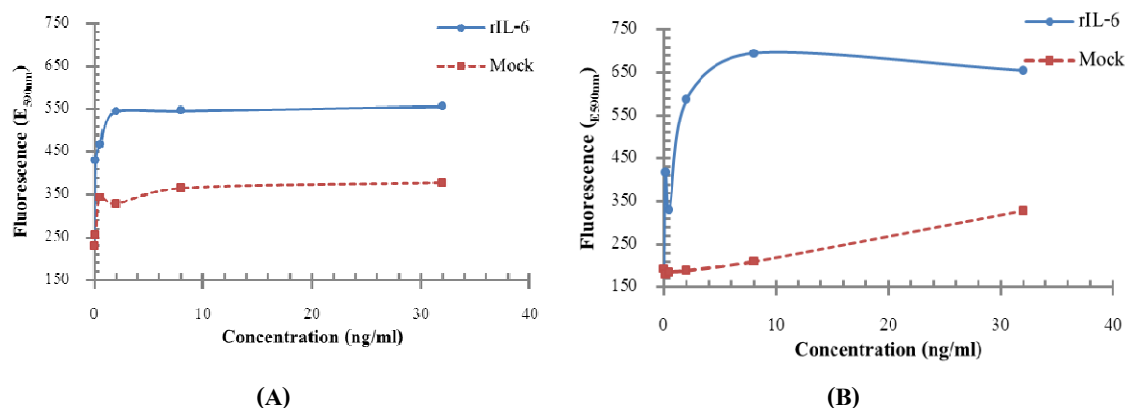
และเซลล์มะเร็ง myeloma โดยการทำ cell proliferation assay พบว่าการเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่มี rIL-6 มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นตั้งแต่ใช้ความเข้มข้นของ rIL-6 เพียง 0.125 ng/ml (รูปที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ปราศจาก rIL-6 (0 ng/ml) และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าการใช้ mock นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนของเซลล์สัมพันธ์โดยตรงกับการเพิ่มความเข้มข้นของ rIL-6 ในช่วงความเข้มข้น 0.125-8 ng/ml

4. วิจารณ์และสรุป

IL-6 เป็นสารไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่ได้หลากหลาย โดยเฉพาะสมบัติในการเป็นสารที่ช่วยในการเจริญเติบโต (growth factor) ของเซลล์หลายชนิด



รูปที่ 4 Soluble rIL-6 หลังจากการทำ refolding วิเคราะห์ด้วย 12 % SDS-PAGE ที่ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 (A) และ Western blot analysis ที่ probe ด้วย mouse anti-His (B) [lane M: standard protein markers, lane 1: โปรตีน rIL-6 ที่ละลายน้ำ]



รูปที่ 5 กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลูกผสม C9B6 (A) และเซลล์มะเร็ง myeloma (B) สัมพันธ์กับความเข้มข้นของโปรตีน rIL-6 และ mock

สมบัตินี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ในกระบวนการสร้างเซลล์ลูกผสมโดยใช้เทคนิคไฮบริโดมา [13,15] ในระยะเริ่มแรก growth factor ที่ใช้ในกระบวนการสร้างเซลล์ลูกผสมนั้นได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ feeder ที่เตรียมจากเซลล์จากม้ามของหนูทดลอง ซึ่งอาจจะเลี้ยงรวม

กับเซลล์ลูกผสมหรือใช้เพียงน้ำเลี้ยงเซลล์ feeder (feeder cell supernatant หรือ conditioned medium) ผสมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งในการเตรียมเซลล์ feeder นั้นมีความยุ่งยากเนื่องจากต้องใช้สัตว์ทดลองเป็นจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง มีภาระในการจัดซื้อ/จัดหา การเลี้ยง และดูแลสัตว์ทดลอง นอกจากนี้มีการ

ใช้ conditioned medium ซึ่งได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์มะเร็ง เช่น เซลล์มะเร็งแมกโครฟาจ (macrophage cell line) ชนิด J774A.1 [21] ซึ่งยังมีข้อด้อยอีกหลายประการ ได้แก่ ปริมาณหรือความเข้มข้นของ growth factor ใน conditioned medium น้อย ต้องใช้ในปริมาณมากต่อครั้งทำให้มีโปรตีนอื่นเจือปนในอาหารเลี้ยงเซลล์สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนจากซีรัมที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และใน conditioned medium ยังมีของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ปนเปื้อนอยู่ด้วย ถ้ามีปริมาณมากอาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฮบริโดมาได้ นอกจากนี้ยังไม่มีความคงทน (stable) เสียสภาพได้ง่าย ไม่สามารถเก็บไว้ใช้ในระยะเวลาได้นานได้ และอีกประการหนึ่งคือการทำให้มีมาตรฐาน (standardize) ทำได้ยากเนื่องจากการเตรียม conditioned medium ในแต่ละครั้งไม่สามารถกำหนดความเข้มข้นของ growth factor หรือซัยโตไคน์ให้มีปริมาณที่แน่นอนและเท่ากันทุกครั้งที่เราเตรียมได้

การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์จากแบคทีเรีย (prokaryotic system) มักพบปัญหาการเกิดเป็น inclusion bodies ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ในการทดสอบทางชีวภาพได้ ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องจากการมีโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นเป็นจำนวนมากสะสมอยู่ในเซลล์ ทำให้มีผลกระทบต่อภาวะสมดุลภายในเซลล์ หรือเกิดจากการใช้สภาวะการหมักย่นระยะเวลาการสร้างโปรตีนที่ไม่เหมาะสม เช่น การเลือกใช้ expression vector และ expression host ที่ไม่เหมาะสม รวมถึงปริมาณของสารเหนี่ยวนำ อุณหภูมิ และระยะเวลาการเหนี่ยวนำ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีน rIL-6 ที่ละลายน้ำได้ โดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสาร IPTG อุณหภูมิที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ อาหารที่ใช้เลี้ยงโคลน *E. coli* รวมทั้งการ

เปลี่ยนชนิดของพลาสมิด ได้แก่ pGEX4T-1 และ pET20b+ (ไม่ได้แสดงผลการวิจัย) พบว่าการปรับเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน rIL-6 ออกมาในรูปของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ซึ่งปัญหาการเกิด inclusion bodies นี้ยังพบได้จากงานหลายวิจัย อาทิเช่น การผลิต rIL-6 ของหนูจากโคลนแบคทีเรีย *E. coli* JM 101 ที่มีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ pUC 9/IL-6 [22] การผลิต rIL-6 ของมนุษย์จากโคลนแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3) Lys E ที่มีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ pT7.7/IL-6 [23] และการผลิต rIL-6 ของมนุษย์จากโคลนแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ pET28/IL-6 [24] ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้วิธี refolding ในการปรับเปลี่ยน rIL-6 ให้สามารถละลายน้ำได้ อย่างไรก็ตาม มีการรายงานว่า การผลิต rIL-6 โดยใช้ eukaryotic system เช่น การใช้ *Pichia pastoris* สามารถผลิตโปรตีนออกมาในรูปแบบที่สามารถละลายในน้ำได้ [25] แต่จะมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ซึ่งจะใช้เวลาเป็นสัปดาห์ในการเพาะเลี้ยง

จากการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีน rIL-6 ในการเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง myeloma ชนิด P3x-63-Ag8.653 และเซลล์ลูกผสม C9B6 พบว่าโปรตีน rIL-6 สามารถทำให้เซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมที่ไม่มีการใช้โปรตีน rIL-6 เพิ่มเติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ และพบว่าเซลล์จะเจริญเติบโตเป็น plateau ที่ rIL-6 ความเข้มข้น 2 ng/ml นอกจากนี้ยังได้มีการนำโปรตีน rIL-6 ที่ผลิตได้ไปใช้เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ลูกผสมในการทำโคลนนิ่งด้วยวิธี limiting dilution พบว่าโปรตีน rIL-6 ที่ผลิตได้จากการศึกษาเมื่อนำไปผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้น

10 ng/ml ในการทำ limiting dilution พบว่าสามารถส่งเสริมให้มีการเจริญของโคลนในหลุมที่มีปริมาณเซลล์น้อย (ประมาณ 1 เซลล์ต่อหลุม) โดยไม่ต้องใช้ feeder cells หรือ growth factor อื่น ๆ (ไม่ได้แสดงผลการวิจัย) จากการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าความก้าวหน้าทางอนุชีววิทยาทำให้สามารถผลิต growth factor ใช้ได้เองในห้องปฏิบัติการ ทดแทนการใช้ feeder cells ที่เตรียมจากหนูทดลองและสามารถลดต้นทุนในการสังเคราะห์ growth factor ได้ ในปัจจุบันมีหลายบริษัทที่มีการผลิต growth factor ออกมาขายในท้องตลาดซึ่งมีราคาแพงและมีอายุการใช้งานสั้น ทำให้ต้นทุนงานวิจัยสูงเนื่องจากต้องใช้เป็นจำนวนมากและใช้อย่างต่อเนื่องในกระบวนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี และหากมีการนำโคลนที่ผลิตได้ไปพัฒนาต่ออาจทำให้เกิดมูลค่าทางการพาณิชย์ได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2553 และทุนมหาวิทยาลัยแห่งชาติจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Simpson, R.J., Hammacher, A., Smith, D.K., Matthews, J.M. and Ward, L.D., 1997, Interleukin-6: Structure-function relationships, *Prot. Sci.* 6: 929-955.
- [2] van Snick, J., Cayphas, S., Szikora, J.P., Renaud, J.C., van Roost, E., Boon, T. and Simpson, R.J., 1988, cDNA cloning of murine

interleukin-HP1: Homology with human interleukin 6, *Eur. J. Immunol.* 18: 193-197.

- [3] Hirano, T., Teranishi, T., Lin, B.H. and Onoue, K., 1984, Human helper T cell factor(s) IV: Demonstration of a human late-acting B cell differentiation factor acting on *Staphylococcus aureus* Cowan I-stimulated B cells, *J. Immunol.* 133: 798-802.
- [4] Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. and Kishimoto, T., 1988, The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells, *J. Exp. Med.* 67: 332-344.
- [5] Noma, T., Mizuta, T., Rosen, A., Hirano, T., Kishimoto, T. and Honja, T., 1987, Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines, *Immunol. Lett.* 15: 249-253.
- [6] Le, J., Fredrickson, G., Rois, L.F.L., Diamanstein, T., Hirano, T., Kishimoto, T. and Vilcek, J., 1988, Interleukin 2-dependent and interleukin2-independent pathways of regulation of thymocyte function by interleukin 6, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8643-8647.
- [7] Liu, C.C., Joag, S.V., Kwon, B.S. and Young, J.D., 1990, Induction of perforin and serine esterases in a murine cytotoxic T lymphocyte clone, *J. Immunol.* 144: 1196-1201.
- [8] Ikebuchi, K., Wong, G.G., Clark, S.C., Ihle, J.N., Hirai, Y. and Ogawa, M., 1987, Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential

- hemopoietic progenitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 9035-9039.
- [9] Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirana, T., Kishimoto, T. and Kaziro, Y., 1988, Introduction of neural differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6, *Mol. Cell. Biol.* 8: 3546-3549.
- [10] Ihara, S., Iwamatsu, A., Fujiyoshi, T., Komi, A., Yamori, T. and Fukui, Y., 1996, Identification of interleukin-6 as a factor that induces neurite outgrowth by PC12 cells primed with NGF, *J. Biol. Chem.* 120: 865-868.
- [11] Wu, Y.Y. and Bradshaw, R.A., 1996, Induction of neurite outgrowth by interleukin-6 is accompanied by activation of Stat3 signaling pathway in a variant PC12 cell (E2) line, *J. Biol. Chem.* 271: 13023-13032.
- [12] Hama, T., Myamoto, M., Tsukui, H., Nishio, C. and Hatanaka, H., 1989, Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats, *Neurosci. Lett.* 104: 340-344.
- [13] Aarden, L., Lansdrop, P. and de Groot, E., 1985, A growth factor for B cell hybridomas produced by human monocytes, *Lymphokines* 10: 175-185.
- [14] Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., Kuramoto, A. and Kishimoto, T., 1988, Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas, *Nature* 332: 83-85.
- [15] Goding, J.W., 1993, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 3rd Ed., Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- [16] Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. and Kishimoto, T., 1988, The essential role of B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells, *J. Exp. Med.* 167: 332-344.
- [17] Liu, Y., Li, P.K., Li, C. and Lin, J., 2010, Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-apoptotic activity of IL-6 in human liver cancer cells, *J. Biol. Chem.* 285: 27429-27439.
- [18] Laemmli, U., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680-685.
- [19] Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., 1973, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- [20] Bradford, M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- [21] Sugasawara, R.J., Cahoon, B.E. and Karu, A.E., 1985, The influence of murine macrophage-conditioned medium on cloning efficiency, antibody synthesis, and growth rate

- of hybridomas, J. Immunol. Methods. 79: 263-275.
- [22] Zhang, J., Moritz, R., Reid G.E., Ward, L.D. and Simpson, R.J., 1992, Purification and characterization of a recombinant murine interleukin-6: Isolation of N- and C-terminal truncated forms, Eur. J. Biochem. 207: 903-913.
- [23] Arcone, R., Pucci, P., Zappacosta, F., Fontaine, V., Malorni, A., Marino, G. and Ciliberto, G., 1991, Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in *Escherichia coli* from a T7 RNA polymerase expression vector, Eur. J. Biochem. 198: 541-547.
- [24] Nausch, H., Huckauf, J., Koslowski, R., Meyer, U., Broer, I. and Mikschofsky, H., 2013, Recombinant production of human interleukin 6 in *Escherichia coli*, Plos one. 8: 1-10.
- [25] Li, H., Wang, Y., Xu, A., Li, S., Jin, S. and Wu, D., 2010, Large-scale production, purification and bioactivity assay of recombinant human interleukin-6 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS, Yeast Res. 11: 160-167.