

BIỂU HIỆN PROTEIN INTERLEUKIN-7 TÁI TỔ HỢP TRONG DÒNG TẾ BÀO THUỐC LÁ BY-2

Nguyễn Huy Hoàng^{1,2}, Phạm Bích Ngọc¹, Chu Hoàng Hà¹,[✉], Lê Văn Sơn¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: chuhoangha@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 09.01.2017

Ngày nhận đăng: 29.8.2017

TÓM TẮT

Interleukin là một nhóm các cytokine được tìm thấy đầu tiên trong các tế bào bạch cầu, đóng vai trò điều hòa đáp ứng miễn dịch. Trong đó, interleukin 7 (IL7) là một cytokine có vai trò chính trong sự tăng trưởng của các dòng tế bào B và T, đây là những dòng tế bào có chức năng quan trọng trong hệ miễn dịch của con người. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tổng hợp nhân tạo gen *IL7* với mã di truyền được tối ưu hóa biểu hiện trong dòng tế bào thuốc lá BY-2. Chúng tôi sử dụng vector pK7WG2D.1/cal để tạo cấu trúc pK7WG2D.1/cal/*IL7*. Cấu trúc này được sử dụng để chuyển gen *IL7* vào các dòng tế bào thuốc lá BY-2. Gen đích trong các dòng tế bào BY-2 được đánh giá bằng kỹ thuật PCR và protein tái tổ hợp được xác định bằng lai miễn dịch Western blot. Kết quả cho thấy, đã tạo được các dòng tế bào BY-2 sinh trưởng ổn định trong môi trường lỏng sau 5 lần cấy chuyển với khoảng cách mỗi lần cấy chuyển là 2 tuần. Các dòng BY-2 chuyển gen sinh trưởng ổn định và biểu hiện protein tái tổ hợp IL7 có kích thước khoảng 23 kDa. Đây là kết quả mới ở Việt Nam và trên thế giới, *IL7* được biểu hiện trong dòng tế bào thuốc lá BY-2. Kết quả này mang lại tiềm năng lớn cho nghiên cứu và sản xuất protein *IL7* tái tổ hợp phục vụ trong y học.

Từ khóa: BY-2, cytokine, interleukin-7, protein tái tổ hợp, tế bào thuốc lá.

MỞ ĐẦU

Interleukin-7 gồm một chuỗi glycoprotein xoắn 4 α , là một cytokine có vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng của các dòng tế bào B và T, là những dòng tế bào có vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch của người. Ở người, gene *IL7* có kích thước 33kb, gồm 6 exon và 5 intron nằm trên nhiễm sắc thể số 8, ở vị trí 8q21.13, chủ yếu được sản xuất bởi tuyến ức, tế bào tủy, tế bào nguyên bào sợi lưới. Chức năng chủ yếu của *IL7* là hỗ trợ cho sự tăng trưởng và chống lại các yếu tố phá hủy tế bào lympho B và lympho T, đồng thời tăng cường hệ thống các tế bào T độc tế bào, kích thích sự hoạt động của bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi. Trong y học, *IL7* được ứng dụng nhiều trong điều trị bệnh như bệnh bạch cầu lympho cấp tính, bệnh cúm A, một số bệnh tự miễn, ung thư đại trực tràng (CRC), viêm gan B v.v... Chính vì vậy, hiện nay nhu cầu sử dụng *IL7* trong y học rất lớn nhưng nguồn cung còn hạn chế, hiện mới chỉ có nguồn sản xuất *IL7* tái tổ hợp từ vi khuẩn *E.Coli*, nhưng còn nhiều hạn chế như hàm lượng protein tái tổ hợp thu nhận chưa cao, quá trình thu

nhận và tinh sạch khó thực hiện. Một trong những hướng nghiên cứu mới phục vụ sản xuất protein tái tổ hợp hiện nay là nghiên cứu chuyển gen mã hóa protein vào tế bào thực vật, do tế bào thực vật có ưu điểm nuôi cấy dễ dàng, môi trường nuôi cấy đơn giản, rẻ tiền, dễ dàng sản xuất một lượng sinh khối lớn trong khoảng thời gian ngắn và quan trọng hơn cả là tế bào thực vật nuôi cấy *in vitro* không mang các mầm bệnh cho người.

Trong đó, dòng tế bào thuốc lá BY-2 hiện nay đang được sử dụng để sản xuất một số loại protein tái tổ hợp như: erythropoietin của người (Matsumoto *et al.*, 1993; 1995), đoạn kháng thể bisFcFv (Fischer *et al.*, 1999), kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (Yano *et al.*, 2004), hGM-CSF (James *et al.*, 2000) v.v... do có rất nhiều ưu điểm như độ đồng đều cao, có tốc độ sinh trưởng nhanh, lên đến 80-100 lần sau một tuần nuôi cấy, có hàm lượng rất thấp nicotine so với cây thuốc lá hoang dại (Nagata *et al.*, 1992).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu chuyển gen *interleukin-7* tái tổ hợp biểu

hiện trong dòng tế bào thuốc lá BY-2, đánh giá các dòng tế bào BY-2 chuyển gen bằng kỹ thuật PCR và lai miễn dịch Western blot.

tra chọn dòng sau biến nạp được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của cặp mồi IL7_F và IL7_R.

Ký hiệu cặp mồi	Trình tự nucleotide chiều 5' -> 3'
IL7_F	TCGAGCTCGATTGTGATATT
IL7_R	AGGAAACACAAGTCATTCAG

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

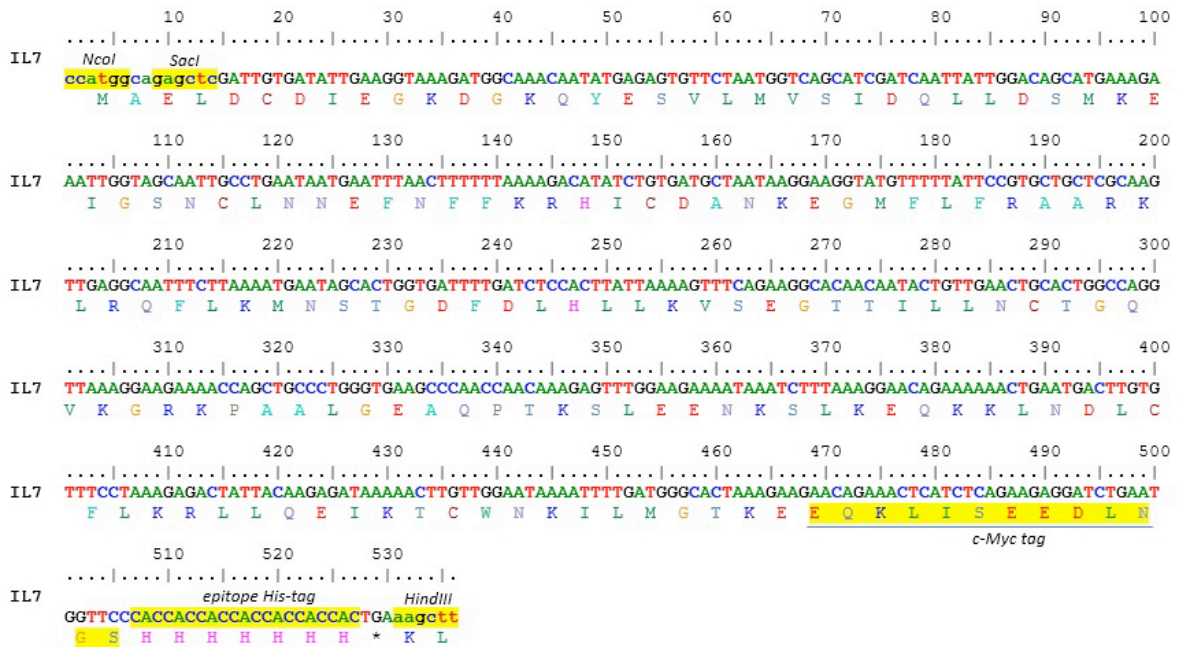
Gen *IL7* tái tổ hợp có mã di truyền được tối ưu để biểu hiện ở thực vật: thông tin trình tự nucleotide của gen được khai thác trên Ngân hàng gen quốc tế (mã số: AH006906.2). Chúng tôi đã sử dụng phần mềm Codon Usage Database và Codon Optimization 2.0 của Invitrogen để tối ưu mã di truyền biểu hiện ở thực vật. Đồng thời, đoạn trình tự nucleotide mã hóa cho c-myc tag và epitope His-tag được gắn vào đầu 3', hai vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *SacI* và *HindIII* cũng được thêm vào đầu 5' và 3' của gene *IL7* theo thứ tự tương ứng; gen *interleukin-7* sau khi được tối ưu có kích thước 536 bp. Gen *IL7* được tổng hợp tại hãng Epoch Life Science (Hoa Kỳ) và được nhân dòng trong vector pBSK-IL7.

Dòng tế bào thuốc lá BY-2 được nuôi cấy và giữ dòng trong điều kiện *in vitro*, chủng vi khuẩn chuyển gen *Agrobacterium tumefaciens CV58*, chủng vi khuẩn *E. coli DH5a* mang vector biểu hiện do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Vector biểu hiện pK7WG2D.1/cal mang signal peptide calreticulin có tác dụng tăng cường khả năng tiết protein tái tổ hợp ra môi trường để tăng hiệu quả thu nhận protein.

Trình tự nucleotide của cặp mồi đặc hiệu dùng để khuếch đại gen *IL7* từ vector pBSK-IL7 và kiểm

Kháng thể anti-mouse IgG cộng hợp HRP của hãng Promega (USA) do Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.



Hình 1. Trình tự nucleotide interleukin 7 tối ưu mã.

Phương pháp

Phương pháp thiết kế vector pK7WG2D.1/cal/IL7

Chúng tôi sử dụng vector pENTR221/cal làm vector trung gian vì trên vector này có hai vị trí tái tổ hợp attL1 và attL2, được sử dụng để trao đổi với attR1 và attR2 trên vector pK7WG2D.1 khi thiết kế vector pK7WG2D.1/cal/IL7 bằng kỹ thuật Gateway cloning.

Tiến hành cắt đồng thời gen *IL7* và vector pENTR221/cal bằng cặp enzyme giới hạn *SacI* và *HindIII*. Sau đó, ghép nối gene *IL7* vào vector tiếp nhận pENTR221/cal với sự xúc tác của enzyme T4 ligase, tạo vector pENTR221/cal/IL7 tái tổ hợp.

Thực hiện phản ứng LR giữa vector tiếp nhận pENTR221/cal/IL7 và vector đích pK7WG2D.1 của kỹ thuật Gateway cloning, tạo vector pK7WG2D.1/cal/IL7 tái tổ hợp.

Phương pháp biến nạp vector pK7WG2D.1/cal/IL7 vào vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58

Sau khi thiết kế thành công vector tái tổ hợp pK7WG2D.1/cal/IL7, chúng tôi tiến hành biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58 bằng phương pháp xung điện và chọn dòng khuẩn mang vector pK7WG2D.1/cal/IL7 bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu hoặc phản ứng cắt bởi enzyme giới hạn *SacI* và *HindIII*.

Phương pháp chuyển gen vào tế bào BY-2 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

Chúng tôi sử dụng phương pháp của Nocarova và Fischer (2009) để chuyển gen vào dòng tế bào thuốc lá BY-2 thông qua *Agrobacterium tumefaciens* CV58 và chọn lọc dòng BY-2 mang gen *IL7*.

Sử dụng kỹ thuật PCR kiểm tra sự có mặt của gen interleukin-7 trong dòng tế bào thuốc lá BY-2

Sau khi chuyển gen thành công, chúng tôi sử dụng phương pháp của Gowel và cộng sự (1991) để tách chiết DNA bằng CTAB (Cetyl Threemethyl Amomnium Bromide) từ các dòng tế bào thuốc lá BY-2 để làm khuôn cho phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *IL7* bằng cặp mồi đặc hiệu IL7_F và IL7_R theo chu trình nhiệt: 94°C/5 phút, 94°C/30 giây, 50°C/30 giây, 72°C/1 phút, 72°C/10 phút, 15°C/2 giờ, lặp lại 30 chu kỳ.

Sử dụng kỹ thuật lai miễn dịch Western blot kiểm tra sự biểu hiện của protein interleukin-7 trong dòng tế bào BY-2

Tiến hành cho tế bào BY2 vào các ống Eppendorf 2ml có đục lỗ, ly tâm loại nước để thu sinh khối tế bào. Tế bào BY-2 được nghiền trong nitor lỏng thành bột mịn, bổ sung đệm PBS 1X. Thu dịch vào ống Eppendorf 2 ml, ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút, thu dịch nổi ở pha trên. Protein tổng số được định lượng bằng phương pháp so màu của Bradford (1976). Biểu hiện protein IL7 được kiểm tra bằng kỹ thuật lai miễn dịch Western blot của Burnette (1981). Protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE 12% theo phương pháp của Laemmli (1970), sau đó chuyển lên màng lai nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter của hãng Scientific Pierce ở 25V, cường độ 1.3 A trong 20 phút. Sau khi phủ màng bằng sữa tách béo 5% pha trong PBST trong 5 giờ, màng lai được ủ với kháng thể 1 anti-c-Myc pha loãng 100 lần bằng PBS chứa 5% sữa tách béo qua đêm trước khi ủ với kháng thể 2 anti-mouse IgG cộng hợp HRP pha loãng 2.500 lần bằng PBS chứa 5% sữa tách béo trong 2 giờ. Sự có mặt của protein IL7 trong mẫu được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất TMB.

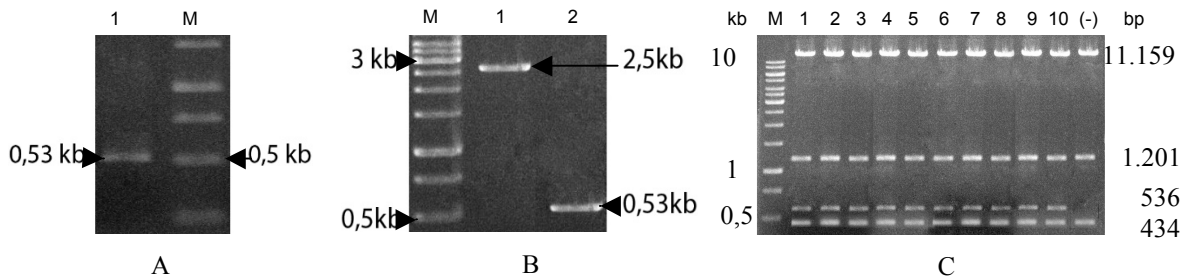
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thiết kế vector pK7WG2D.1/cal/IL7

Gen *IL-7* được khuếch đại từ vector pBSK-IL7 bằng cặp mồi đặc hiệu và cắt bằng *SacI* và *HindIII*, sau đó tiến hành tinh sạch để chuẩn bị cho phản ứng lai ghép. Tiến hành cắt mở vòng vector pENTR221/cal bằng *SacI* và *HindIII*. Sau đó, thực hiện phản ứng lai ghép gene *IL-7* với vector pENTR221/cal với sự xúc tác của enzyme T4 ở 22°C/1 giờ 30 phút, thu được vector pENTR221/cal/IL7 tái tổ hợp.

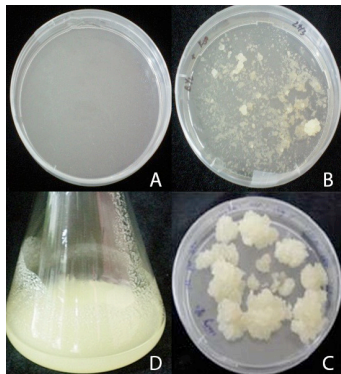
Thực hiện phản ứng LR của kỹ thuật Gateway giữa vector tiếp nhận pENTR221/cal/IL7 và vector đích pK7WG2D.1 tạo vector pK7WG2D.1/cal/IL7 tái tổ hợp. Sử dụng phương pháp sốc nhiệt để biến nạp vector pK7WG2D.1/cal/IL7 vào *E.coli* để chọn dòng.

Sau khi chọn dòng, plasmid mang vector pK7WG2D.1/cal/IL7 được biến nạp vào vi khuẩn *A.tumefaciens* CV58 bằng phương pháp xung điện để chuẩn bị cho thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Thiết kế vector pK7WG2D.1/cal/IL7. (A). Nhân gene IL-7 từ vector pBSK-IL7 bằng cặp mồi đặc hiệu; (B). Cắt mở vòng pENTR221/cal bằng *SacI* và *HindIII* (giếng 1) và kết quả tinh sạch đoạn gen *IL-7* sau phản ứng cắt bằng *SacI* và *HindIII* (giếng 2); (C). Điện di sản phẩm cắt kiểm tra plasmid mang vector pK7WG2D.1/cal/IL7 trong các dòng A. *tumefaciens* CV58 bằng *SacI* và *HindIII* (giếng 1-10); (-). đối chứng âm (vector pK7WG2D.1)

Kết quả tạo dòng tế bào thuốc lá BY-2 chuyển gen *IL7*



Hình 3. Quá trình chuyển gen *IL7* vào dòng tế bào thuốc lá BY-2. A. Đồng nuôi cấy vi khuẩn *A. tumefaciens* mang gen *IL-7* với tế bào BY-2 đại; B. Callus BY-2 tái sinh trên môi trường chọn lọc sau 2 tuần nuôi cấy; C. Callus trên môi trường chọn lọc sau 4 tuần nuôi cấy; D. Tế bào huyền phù mô sẹo BY-2 mang gen *IL-7* trong môi trường lỏng chứa kháng sinh chọn lọc.

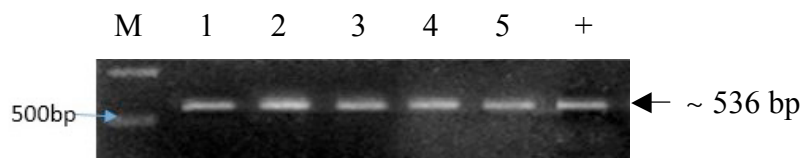
Chúng tôi tiến hành lây nhiễm và đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector biểu hiện, sau đó tế bào huyền phù thuốc lá BY-2 được cấy trải trên môi trường chọn lọc có bổ sung kanamycin 100 mg/l. Trong quá trình lây nhiễm, ngoài cấu trúc gen *IL7*, gen *nptII* trên vector chuyển gen mã hóa cho enzyme phân giải kanamycin cũng được tích hợp vào genome tế bào chủ nên chỉ những tế bào được chuyển gen mới có khả

năng sống sót trên môi trường có kháng sinh kanamycin, các cụm mô sẹo được hình thành trên môi trường chọn lọc sẽ được tiếp tục nuôi cấy trên môi trường lỏng (lắc 130 vòng/phút), dưới áp lực chọn lọc của *kanamycin*, sau 5 lần cấy chuyển với khoảng cách giữa các lần là 2 tuần, chúng tôi thu được những dòng BY-2 sinh trưởng ổn định, thể hiện ở hình 3.

Kiểm tra sự có mặt của gen *IL7* trong dòng tế bào thuốc lá BY-2 bằng phương pháp PCR

Chúng tôi tiến hành chọn ngẫu nhiên 5 dòng từ các dòng BY-2 ổn định sau 5 lần cấy chuyển trong môi trường lỏng có bổ sung kháng sinh *kanamycin* 100mg/l để đánh giá sự có mặt của gen *IL7* tái tổ hợp trong các dòng thuốc lá BY-2. Sau đó, tiến hành tách chiết DNA và thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen *IL7*. Kết quả điện di sản phẩm PCR thể hiện ở hình 4.

Phân tích kết quả thể hiện ở hình 4 cho thấy các giếng điện di đều xuất hiện một băng đặc hiệu có kích thước khoảng 536 bp, tương ứng với kích thước gen *IL7* được chúng tôi thiết kế. Kết quả này cho thấy, chúng tôi đã chuyển thành công cấu trúc gen *IL7* đã tối ưu mã di truyền vào tế bào thuốc lá BY-2, các dòng tế bào BY-2 này sẽ được chúng tôi sử dụng làm nguyên liệu để đánh giá sự biểu hiện của protein *interleukin-7* tái tổ hợp bằng kỹ thuật lai miễn dịch Western blot.



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen *IL7* từ DNA các dòng BY-2 chuyển gen trên gel agarose 0,8% (w/v). M. Thang DNA chuẩn 1kb (Fermentas); 1-5. Các dòng BY-2 chuyển gen interleukin-7; (+). đối chứng dương.

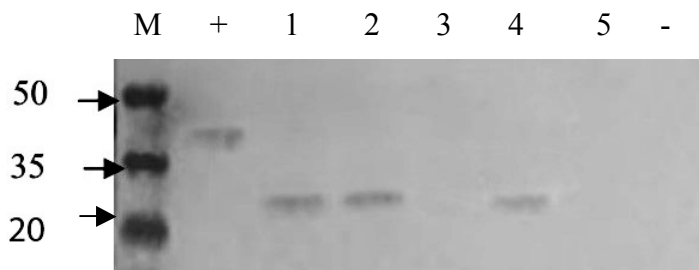
Kiểm tra sự biểu hiện của protein interleukin-7 tái tổ hợp trong dòng tế bào BY-2 bằng kỹ thuật Western blot

Chúng tôi thực hiện phản ứng lai miễn dịch Western blot để kiểm tra và đánh giá sự biểu hiện của protein IL7 trong dòng tế bào thuốc lá BY-2 với 5 dòng tế bào BY-2 chuyển gen và một dòng tế bào BY-2 không chuyển gen dùng làm đối chứng âm. Như kết quả ở phần trên, chúng tôi đã thiết kế và gắn đuôi c-Myc vào gen *interleukin-7* để phát hiện sự có mặt của protein *interleukin-7* bằng sử dụng kháng thể anti-c-Myc. Độ nhạy của phản ứng Western blot được đánh giá bằng đối chứng dương là protein tái tổ hợp scFv

có gắn đuôi c-Myc. Kết quả thể hiện ở hình 5.

Kết quả cho thấy các dòng BY-2 chuyển gen *IL7* số 1, 2, 4 xuất hiện một băng khoảng 23 kDa, tương ứng với kích thước của IL-7 theo tính toán lý thuyết. Trong khi đó, dòng số 3, 5 không thấy xuất hiện băng protein IL-7 mặc dù kết quả kiểm tra bằng PCR cho thấy 2 dòng này đều mang gen đích *IL7*, điều này có thể được giải thích do hiện tượng gen chuyển không hoạt động (Sun *et al.*, 2006).

Kết quả lai miễn dịch Western blot, một lần nữa khẳng định chúng tôi đã chuyển thành công gen *IL7* và đã biểu hiện thành công protein IL7 tái tổ hợp trong dòng tế bào thuốc lá BY-2.



Hình 5. Lai miễn dịch western blot kiểm tra sự biểu hiện protein IL7 tái tổ hợp trong các dòng tế bào BY-2. (+). đối chứng dương; 1-5. các dòng tế bào BY-2 chuyển gen; (-). đối chứng âm. Phản ứng lai sử dụng kháng thể anti-c-Myc.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tạo thành công các dòng tế bào BY-2 ổn định, biểu hiện protein IL7 tái tổ hợp, góp phần tạo tiền đề cho hướng nghiên cứu sản xuất lượng lớn protein IL7 phục vụ trong y học.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng một phần kinh phí đề tài cán bộ hướng dẫn và kinh phí đào tạo của Bộ GD&ĐT dành cho nghiên cứu sinh. Quá trình thực nghiệm được thực hiện tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Burnette WN (1981) Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal Biochem* 112: 195-203.

Fischer R, Schumann D, Zimmermann S, Drossard J, Sack M, Schillberg S (1999) Expression and characterization of

bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *Eur J Biochem* 262: 810-816.

<http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>.

James EA, Wang C, Wang Z, Reeves R, Shin JH, Magnuson NS, Lee JM (2000) Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expr Purif* 19: 131-138.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

Lee KT, Chen SC, Chiang BL, Yamakawa T (2007) Heat-inducible production of beta-glucuronidase in tobacco hairy root cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 1047-1053.

Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol* 27: 1163-1172.

Matsumoto S, Ishii A, Ikura K, Ueda M, Sasaki R (1993) Expression of human erythropoietin in cultured tobacco cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1249-1252.

Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S (1992) Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* 132: 1-30.

Nocarova E, Fischer L (2009) Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biol* 9:44. doi:10.1186/1471-2229-9-44

Sun HJ, Cui ML, Ma B, Ezura H (2006) Functional expression of the tastemodifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS Lett* 580: 620-626.

Yano A, Maeda F, Takekoshi M (2004) Transgenic tobacco cells producing the human monoclonal antibody to hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 73: 208-215.

TRANSIENT EXPRESSION OF INTERLEUKIN-7 IN BY-2 TOBACCO CELL LINE

Nguyen Huy Hoang^{1,2}, Pham Bich Ngoc¹, Chu Hoang Ha¹, Le Van Son¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy*

SUMMARY

Interleukin is a group of cytokines firstly found in the white blood cells. The function of the human immune system depends mainly on interleukins. Inside information, Interleukin 7 is a cytokine playing the main role in the growth of B and T cells. This cell types are important cells in the human immune system. In the human body, interleukin-7 gene has proportion 33kb, which is consist of 6 exons and 5 introns on chromosome 8 human, is located at 8q21.13. In this study, we synthesized the artificial interleukin 7 gene optimized genetic code which is expressed in the BY-2 cigarette cell line. We used the vector pK7WG2D. 1 / cal to form structure of recombinant pK7WG2D. 1 / cal / IL7. This structure is used to transfer genes interleukin 7 into the cell lines of tobacco BY-2. After that, the presence and expression of interleukin 7 gene in BY-2 tobacco cell lines were appreciated by PCR method and the recombinant protein was determined by Western blot immune method. It was demonstrated that transgenic BY-2 tobacco cell lines grew stably in liquid environment after 5 times of transplant. The expression of interleukin 7 gene in transgenic BY-2 tobacco cell lines resulted in the accumulation of interleukin-7 recombinant protein with molecular mass of approximately 23 kDa. This is the first time in Viet Nam and in the world, interleukin 7 recombinant protein has been expressed in BY-2 tobacco cells. This result is providing a great potential for research and production of interleukin 7 protein to assist for the medical field.

Keywords: *BY-2, cytokine, interleukin-7, nicotiana, taste-modifying protein.*