

抗结肠癌相关抗原单链抗体基因的构建和表达

宋林霞 俞炜源

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 通过 PCR 扩增和酶切分别得到抗结肠癌相关抗原抗体的重链可变区序列、轻链可变区序列及连接肽序列,将它们构建成为 V_H -linker- V_L 形式的单链抗体基因片段,并在大肠杆菌中进行了表达。SDS-PAGE 分析结果表明,以 pComb3 为载体,在大肠杆菌 JM83 中 scFv 未获得有效表达,而以 pET-22b(+) 为载体的 scFv 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中,30℃ 诱导培养获得了高效表达,表达水平占全菌蛋白的 35.5%。

关键词 结肠癌 scFv, 大肠杆菌, 表达

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0082-04

单链抗体(scFv)是抗体重链可变区和轻链可变区由一短的连接肽连接而成的抗体分子片段,是抗体结合抗原的最小单位。scFv 分子小,免疫原性低,组织渗透能力强,与细胞的非特异结合少,用于临床的影像学诊断和肿瘤定位具有本底低、图像清晰的特点。解放军总医院肿瘤生物学研究室用结肠癌细胞系 LS174T 免疫小鼠获得了分泌抗结肠癌相关抗原的单克隆抗体细胞株 CL-4,本室已成功地构建了该抗体的 Fab 基因片段并在大肠杆菌中获得了高表达。但是由于 Fab 片段仍然存在着分子量较大,难以大量制备,不便于与其它蛋白融合等问题,为了进一步降低其免疫原性,使其以分子量较小的单链分子表达,便于与放射性核素标记用于体内造

1.1.3 PCR 引物:

引物 1: 5'-CGG CTCGAGGT(G/C)(A/C)(G/A) CTGCAQ(G/C)ACTC(T/A)GG-3'
XhoI PstI

引物 2: 5'-GCT CTAGACGC GAGCTCCGATCCGCCACCGCCAG-3'
XbaI SacI

引物 3: 5'-CCAGTTCC GAGCTCGTGATGAQ(C/A)CA(G/A)(T/A)CTCC-3'
SacI

引物 4: 5'-GC TCTAGA AAGCTTATTATTTGA(T/G)(T/C)TCCAGCTTGGT(G/C)CC-3'
XbaI HindIII

引物的设计参照文献 [1],由本所合成。引物 1 和引物 2 用于扩增抗体重链可变区及 linker 序列,引物 3 和引物 4 用于扩散抗体轻链可变区,划线部分为限制酶识别位点。

1.2 方法

1.2.1 DNA 常规操作: 质粒 DNA 的提取、酶切、DNA 片段的回收、连接、转化均参照文献 [2] 方法进

行。影诊断,本文进行了单链抗体的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: *E. coli* JM83、BL21(DE3)由本室保存;质粒 pComb3、pET-22b(+), pL19、p5E-scFvA11、pComb3G 由本室构建和保存。

1.1.2 酶类及主要生化试剂: 各种限制酶购自 New England Biolabs 公司, T4 DNA ligase 为 Promega 公司产品, Taq DNA polymerase 购自北京原平公司。PCR marker、 λ DNA/*EcoRI* + *HindIII* marker 和低分子量蛋白标准购自华美生物工程公司。其他试剂均为分析纯。

行。

1.2.2 DNA 序列的测定: 采用 Sandger 双脱氧链终止法。

1.2.3 抗结肠癌相关抗原 scFv 基因的表达: 含有 scFv 基因的重组质粒转化大肠杆菌,30℃ 活化过夜,次日 1:100 扩大培养,接种于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中,振荡至 $OD_{600} = 0.2 \sim 0.4$,

加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导,分别取诱导 1~5h 的菌体,离心收菌。

1.2.4 SDS-PAGE: 参照文献[2]方法进行。

1.2.5 表达水平的测定: 采用凝胶薄层扫描确定表达产物占全菌蛋白的百分含量。

1.2.6 包涵体蛋白的变性、复性: 参照文献[3]方法进行。

2 结 果

2.1 抗结肠癌相关抗原 scFv 基因的构建

抗结肠癌相关抗原 scFv 重组质粒 pComb3-scFv 的构建是在含有连接肽(linker)序列,抗结肠癌相关抗原抗体重链可变区序列和轻链可变区序列等 3 个质粒的基础上,通过 PCR 扩增、酶切、连接等 DNA 操作构建而成的。其中,质粒 p5E-scFvA11 含有鼠抗人纤维蛋白重链可变区(V_H)及 linker 序列,与引物 1 和引物 2 退火,PCR 扩增得到了 V_H 及 linker 序列的片段,通过 *XhoI* 和 *XbaI* 双酶切,将其连接到载体 pComb3 上,这样就得到了含有 V_H 及 linker 序列的载体 pComb3L。质粒 pComb3G 含有抗结肠癌相关抗原抗体重链可变区(V_H)片段,与重组质粒 pComb3L 有共同的酶切位点 *XhoI* 和 *BstEII*,且都位于重链可变区序列的两端,通过酶切连接,将 V_H 替换到 V_H 的位置,得到含有抗结肠癌相关抗原重链可变区 V_H 的重组质粒 pComb3VH。质粒 pL19 含有抗结肠癌相关抗原抗体轻链可变区(V_L)基因,与引物 3 和引物 4 退火,PCR 扩增得到 V_L 片段,通过 *SacI* 和 *XbaI* 双酶切,连接 V_L 及

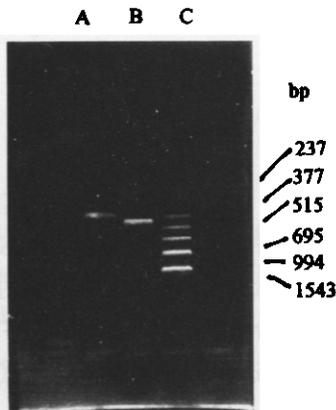


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳

Fig.1 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis

A. PCR product of V_L ; B. PCR product of V_H and linker; C. PCR marker

pComb3VH, 最终得到含有完整 scFv 基因的重组质粒 pComb3-scFv。PCR 扩增结果及各重组质粒的酶切鉴定如图 1 和图 2,表明构建的 scFv 是正确的。

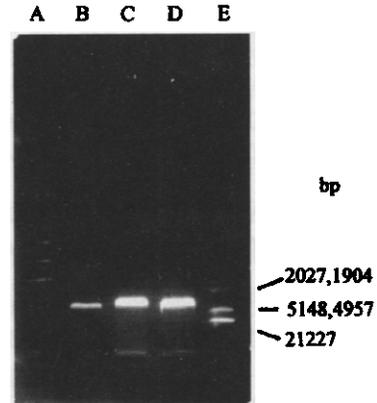


图 2 重组质粒 pComb3L, pComb3VH 和 pComb3-scFv 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction analysis of recombinant plasmid pComb3L, pComb3VH and pComb3-scFv

A. PCR marker; B. pComb3L/*BstEII*; C. pComb3VH/*PstI*; D. pComb3-scFv/*XbaI* + *SacI*; E. λ DNA/*EcoRI* + *HindIII* marker

2.2 抗结肠癌相关抗原 scFv 基因序列的测定

将 V_H 基因及 linker 序列和 V_L 基因分别连接到测序质粒 pUC19 上,按测序试剂盒使用说明书方法进行。结果见下页序列图。 V_H 基因属于鼠抗体可变区基因家族的 Mouse Heavy Chain Subgroup II (B), 由 360 个核苷酸组成。 V_L 基因属于鼠抗体可变区基因家族的 Mouse Kappa Light Chain V, 由 321 个核苷酸组成。

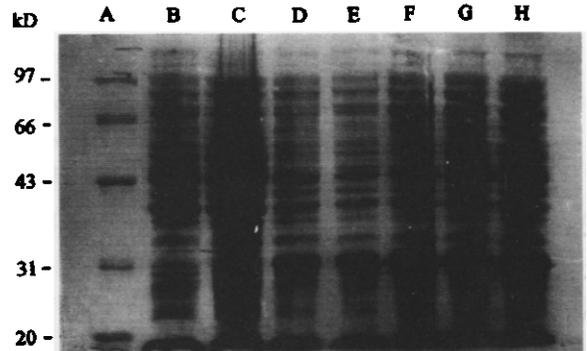


图 3 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE assay of expression products

A. Low molecular protein marker
B. *E. coli* BL21(DE3) carrying plasmid pET-22b(+) after induction for 3 hours
C. *E. coli* BL21(DE3) carrying plasmid pET22b-scFv without induction
D~H. *E. coli* BL21(DE3) carrying plasmid pET22b-scFv after induction for 1~5 hours

抗结肠癌相关抗原 scFv 基因的 DNA 序列及相应的氨基酸序列:

GAG GTC AAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAA CTG GCA AAC CCT GGG GCC TCA GTG AAG CTG 60
Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Asn Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu

TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT GCC TAC TGG ATG CAC TGG GTA AAA CAG AGG 120
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg
 H - CDR1

CCT GGA CTG GGT CTG GAA TGG ATT GGG TAC ATT GAT CCG AGC AGT GGT TAT ACT AAG TGC 180
Pro Gly Leu Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Cys
 H - CDR2

AAT CAG AAG TTC AAG GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC ATC TCC TCC AGC ACA GCC TAT 240
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

ATG CAG CTG AGC AGC CTG ACA TAT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AAA AAT TAC 300
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Tyr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Tyr

TAC GTT AGT GGC CTC TGG TTT CCT TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TAC 360
Tyr Val Ser Gly Leu Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 H - CDR3

GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAG CTC GTG ATG ACA 420
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val Met Thr
 linker

CAA TCT CCA GCC ATA CTG TCT GTG AGT CCA GGA GAA AGA GTC AGT TTC TCC TGC AGG GCC 480
Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala

AGT CAG AGC ATT GGC ACA AGC ATA CAC TGG TAT CAG CAA AGA ACA AAT GGT TCT CCA AGG 540
Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg
 L - CDR1

CTT CTC ATA AAA TTT GCT TCT GAG TCT ATC TCT GGG ATC CCT TCC AGG TTT AGT GGC AGT 600
Leu Leu Ile Lys phe Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 L - CDR2

GGA TCA GGG ACA GAT TTT ACT CTT AGC ATC AAC AGT GTG GAG TCT GAA GAT ATT GCA GAT 660
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp

TAT TAC TGT CAA CAA AGT AAT AGT TGG CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGC ACC AAG CTG GAA 720
Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
 L - CDR3

CTC AAA

Leu Lys

726

1~360 位碱基是重链可变区基因;361~405 位是连接肽序列;

406~726 位是轻链可变区基因;划线部分是 CDR 区。

2.3 抗结肠癌相关抗原 scFv 基因的表达

2.3.1 pComb3 载体上的 scFv 基因在大肠杆菌 JM83 中的表达: 将重组质粒 pComb3-scFv 转化 *E. coli* JM83。取诱导培养 1~5h 的菌体进行 SDS-PAGE 分析,结果未看到特异性表达条带,说明在这一系统中,scFv 基因没有获得有效表达。

2.3.2 pET-22b(+)载体上的 scFv 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达: pET-22b(+)是带有 T7 启动子的分泌型表达载体,带有大肠杆菌 peIB 信号肽。通过 *NcoI*/*HindIII* 双酶切 pComb3-scFv 及 pET-22b(+),将 scFv 亚克隆至 pET-22b(+),构

建成重组质粒 pET22b-scFv, 将其转化至 *E. coli* BL21(DE3)中进行诱导表达。SDS-PAGE 结果(如图 3)显示,在比分子量 30kD 稍小的地方出现了一条新的条带,分子量约为 29kD。将诱导表达 5h 的菌体蛋白凝胶进行扫描,结果显示重组蛋白占全菌蛋白的 35.5%。分离表达菌的周质、胞浆及沉淀部分,将表达蛋白进行细胞内定位,发现表达产物主要集中在沉淀部分,以包涵体形式存在。

2.4 表达产物的活性检测

将表达产物的包涵体进行了变性、复性,以 ELISA 和免疫组化 SABC 法对表达上清及包涵体

复性液进行了检测,结果表明 scFv 具有与原代抗体相似的抗原结合活性和组织特异性(结果另文发表)。

3 讨论

3.1 单链抗体基因的构建

根据抗体可变区 FR 区在某些位点上保守性不高的现象,轻链可变区上下游引物的设计中分别将三个位点处理成简并位点,在很大程度上增加了引物的种类,扩大了引物的适用范围。

3.2 不同系统的表达与包涵体的形成

在两种表达系统中对 scFv 进行表达的结果表明,启动子的强弱及外源基因的转录水平直接影响表达效率。同时,宿主菌的不同对表达效率也可能有一定的影响^[4]。可见,选择恰当的载体和宿主菌有时是表达成功与否的关键。

本文使用的 pET-22k(+) 是分泌型载体,带有大肠杆菌信号肽序列,目的在于得到分泌性蛋白。但 SDS-PAGE 分析结果表明产物以包涵体形式为主。分析原因,可能与基因表达产物的一级结构有关。Knappik^[5]采用定点突变结合空间结构分析的研究方法,研究了可变区一级结构与抗体片段在大肠杆菌中可溶性表达的关系,结果表明可变区中 CDRs 序列的多样性是造成不同抗体片段表达差异的重要原因。另外,包涵体的形成也可能与采用的强启动子有关^[6],强启动子的使用,造成分泌效率、正确折叠的效率与表达速率不成比例。由于抗体片段的高水平表达,使其在胞浆中聚集形成不溶性的包涵体。此外,本文还采用了 25℃ 和 22℃ 等不同温度对重组质粒菌进行诱导,分析其表达形式,结果都是以包涵体为主,说明本文所作的 scFv 表达形式与培养温度关系不大。

参 考 文 献

- [1] Kabat E A ,Wu T T ,Perry H M. Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Edition. National Institutes of Health ,Bethesda ,MD , 1991
- [2] Sambrook J ,Fritsh E F ,Maniatis T. Molecular Cloning , A Laboratory Manual ; 2nd Edition , Cold Spring Harbor Laboratory Press , New York , 1989
- [3] Buchner J ,Pastan I ,Brinkmann U. *Analy Biochem* , 1992 , **205** :263~270
- [4] Riechman L ,Weill M. *Biochemisty* , 1993 , **32** :8848~8855
- [5] Knappik A ,Pluckthun A. *Protein Eng* , 1995 , **8** :81~89
- [6] Pluckthun A. *Bio/Technology* , 1991 , **9** :545~551

Construction and Expression of Anticolonic Cancer scFv Fragment

SONG Lin-xia YU Wei-yuan

(Institute of Biotechnology , Academy of Military Medical Science , Beijing 100071)

Abstract Anticolonic cancer scFv fragment with a V_H-linker-V_L structure was constructed and expressed in *E. coli*. SDS-PAGE analysis showed the fragment cloned in pComb3 was not expressed efficiently in JM83, while cloned in pET-22k(+) highly expressed in BL21(DE3) up to 35.5% of the total bacterial protein obtained, if the culture was incubated under 30℃.

Key words Colonic cancer, scFv, *E. coli*, expression