

肝癌特异性鼠源及人源化单链抗体基因的 构建及在大肠杆菌中的表达

袁清安 俞炜源 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 为探讨一株肝细胞癌特异性鼠源及其人源化单链抗体基因在大肠杆菌中的可溶性表达策略并比较二者对抗原的结合能力,在三种载体中分别以融合、分泌及胞内表达的方式进行了研究,表达产物均以包涵体形式存在,对复性后的单链抗体以细胞 ELISA 及竞争抑制流式细胞仪法进行检测,表明人源化单链抗体和鼠源单链抗体有相近的抗原结合能力。结论是:在大肠杆菌中表达的基因工程单链抗体的可溶性可能主要由自身氨基酸一级序列决定,先前的设计所采取的人源化方案没有影响到鼠源抗体的 CDR 的天然构象,表达的人源化单链抗体提供了免疫原性评价及临床应用的基础。

关键词 人源化 单链抗体 肝细胞癌 表达

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0086-05

抗体是免疫系统最重要的调适分子,在临床上有着极大的应用价值,但应用于体内会诱导人抗鼠抗体(HAMA)反应^[1],严重限制了它的应用前景。为降低鼠源抗体的免疫原性,必须将其进行人源化,目前的主要方法是互补决定区(CDR)移植^[2]。但单纯的 CDR 移植常常导致亲和力和/或特异性的改变,只有将人源化抗体框架区(FR)中某些残基回复突变成原残基才能重建活性^[3]。HA25 是肝细胞癌特异性鼠源单克隆抗体^[4],进行人源化改造,表达出的单链抗体将可能用于放射免疫显像及生物导向治疗。先前的研究^[5]报道了通过同源模建预测抗体可变区的三维结构及利用蛋白质工作站,以计算机辅助设计确定人源化突变方案,本文通过构建鼠源及人源化单链抗体基因并进行可溶性表达研究及活性测定,初步评估所采取的人源化方案是否会影响 CDR 的构象。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:DH5 α JM109 BL21(DE3)为本室保存。

1.1.2 质粒:pUC19 pGEX-4T-1, pET-15bs, pET-22(+)均为本室保存;

1.1.3 细胞:肝癌细胞株 SMMC-7721 为第四军医大学病理教研室保存。

1.1.4 主要试剂:各种工具酶均为 Promega 公司产品,核酸分子量标准购自华美生物工程公司,蛋白质低分子量标准购自北方同正公司。抗 E-tag 抗体(1:2000)为 Pharmacia 公司产品,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 为北京中山公司产品。

1.2 方法

1.2.1 人源化方案^[5]:在蛋白质工作站上通过同源模建获得了 HA25 可变区的三维结构。通过分析及参考 CDR 结构分类,确定了影响 CDR 结构的几类主要残基,包括正则结构关键残基、CDR 可接触残基、轻、重链界面残基,包埋残基。为确定鼠、人抗体可变区残基的差异,要进行多重序列比较。

1.2.2 质粒的构建、序列测定以及表达载体的构建:寡核苷酸片段由 DNA 合成仪自动合成,PCR 扩增按常规进行,质粒的抽提、酶切, DNA 片段的回收、连接,连接产物的转化见文献^[6],DNA 序列测定在自动测序仪(373A,ABI 公司)上进行。

1.2.3 SDS-PAGE 及包涵体变性、复性:单链抗体的表达按文献^[7]进行。SDS-PAGE 按常规方法进行。包涵体的变性、复性见文献^[8]。

1.2.4 细胞 ELISA:基本过程同常规 ELISA。简述如下:肝癌细胞系 7721 培养物稀释到 5×10^4 cell/mL,接种至 96 孔细胞培养板,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后弃去培养液,冷丙酮固定 10 min。弃去丙酮,每孔

加入 100 μ L 阻断液(10 mL PBS + 100 μ L30% H_2O_2),室温保持 30min。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。其后操作同 ELISA。鼠源及人源化单链抗体复性原液(约 30 μ g/mL)作 5 倍梯度稀释。无关抗体(无关杂交瘤上清)作阴性对照。

1.2.5 竞争抑制流式细胞仪法:见文献[9]

2 结果

2.1 单链抗体基因的构建及序列测定

HAb25 轻、重链可变区基因已被分别克隆在 pUC19-VK_m 及 pUC19-VH_{l_m}(含连接肽序列)中。合成引物 P1' (5'-CATGC CA TG GAATTCAGGTGCAGCTGTTGGAG-3',其中 5' 含 *Nco*I, *Eco*RI 酶切位点),P4(5'-CG GG AT C CGAGCTCGTGATGACCCAG-3',其中 5' 端含 *Bam*HI 位点),P α (5'-CG GG AT CC AG AT CC GC

CACCGCCAGA-3',其中 5'端含 *Bam*HI 位点)。以 P1' 及 P4 为引物,以 pUC19-VH_{l_m} 为模板扩增 VH1,回收目的条带并以 *Eco*RI, *Bam*HI 双酶切;以 P6 及下游公用引物 P1212 为引物, pUC19-VK_m 为模板扩增得到 VK,以 *Bam*HI, *Sal*I 双酶切;二者回收与经 *Eco*RI, *Sal*I 双酶切的 pUC19 连接,构建出 HAb25 的鼠单链抗体(scFv-m25)基因的载体 pUC19-V_m,酶切鉴定和序列测定证明构建正确。

根据人源化替换方案,重链可变区将对 21 处进行人源化,保留 8 处,轻链进行 2 处替换而保留其余 7 处差异残基。由于重链可变区的人源化突变集中于前 80 个氨基酸,可通过部分基因合成、重叠 PCR 方法构建人源化重链可变区基因;轻链可变区的两个突变则在引物中引入。设计时同时考虑大肠杆菌翻译的偏性,合成的人源化抗体重链基因相应的寡核苷酸片段 F1~F5 及引物 P1, P2, P3, P β 序列为:

F1 5'-GAATTCGAGGTACAGCTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGC-3';

F2 5'-AGCCTGTTTAACCCAGTG CATCCAGTAAGAACTGAAAGTGTAAC CAGAAGCAGCGCAAGACAGACGCAGAGAAC-3';

F3 5'-GCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCGGGTAAAGGTCTGGAATGGATC GG TGAAATCAACCCGTCTAACGGTCTGATC-3';

F4 5'-GTTCTTAGATTTGTCAACAGTCAGAGTAGCTTTGTTCTTGAACCTTTT CGTTGTAGATACGACCGTTAGACGGG-3';

F5 5'-ACTGTTGACAAATCTAAGAACACTGCTTACCTGCAGATGAACTCTCTG CGTGCTGAGGACACTGTGGTCTATTA-3';

P1 5'-CAT GCCATGGAATTCGAGGTACAGCTGG-3';

P2 5'-CTGAGGACACTGTGGTCTATTACTG-3';

P β 5'-AATCTTGACAAGAATAGACCGCCGCAGAGTCCTCAG-3';

P3 5'-CCGCTCGAGTCAGTCGACACGTTTGTATCTCGACCTTGGTCCCTCCCAACG-3'。

重叠延伸 PCR 法构建 HAb25 的人源化单链抗体(scFv-h25)全基因,得到克隆载体 pUC19-V_h。序列测定结果表明与设计一致。

2.2 鼠及人源化单链抗体基因的表达

2.2.1 融合表达:外源开放的阅读框架与 pGEX-4T-1 的 GST 编码区融合,通过亲和纯化可一步获得融合蛋白,利用 X_a 因子可以将目的蛋白切出。如果融合蛋白可溶,则十分有利于产物纯化及测活。

通过酶切(*Eco*RI, *Sal*I)及回收,分别将 scFv-m25 及 scFv-h25 基因与载体 pGEX-4T-1 连接,转化 DH5 α 后,筛选得到表达质粒 pGEX-4T-n(鼠)和 pGEX-4T-h(人源化)。以 JM109 作受体菌,按常规

方法诱导(IPTG 终浓度 1 mmol/L)培养表达,分别制备表达菌体的全菌、胞浆及沉淀,进行 SDS-PAGE (12%),结果见图 1。表达的融合蛋白预期为 54 kD,电泳表明表达产物以包涵体形式存在。

降低培养温度至 30 $^{\circ}$ C,诱导物 IPTG 浓度降至 0.2 mmol/L,进行表达产物的表达形式分析,融合蛋白仍是包涵体形式(图略)。

2.2.2 胞内表达:为探讨单链抗体在细菌胞浆内的可溶性,仅将单链抗体基因进行表达。考虑到活性检测,将单链抗体基因转移至含 E-tag 序列(来源于 Pharmacia 公司的 pCANTAB-5E 载体)的 pET-15bs 载体上。为便于克隆,合成引物 P α (37 bp, 5'-

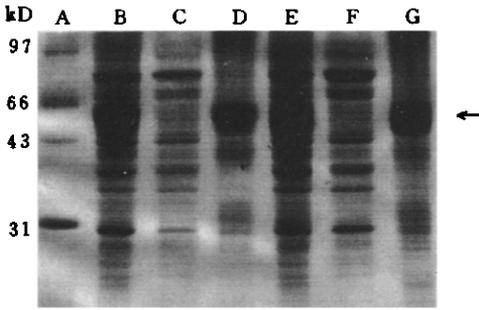


图1 两种融合表达菌株的 SDS-PAGE 分析
Fig.1 SDS-PAGE analysis of the two expression strains

JM109/pGEX-4T-m and JM109/pGEX-4T-h.

A. Low molecule weight marker; B, E. Total cell lysate of JM109/pGEX-4T-m and JM109/pGEX-4T-h respectively; C, F. Supernatant of JM109/pGEX-4T-m and JM109/pGEX-4T-h respectively; D, G. Precipitate of the supersonic lysate JM109/pGEX-4T-m and JM109/pGEX-4T-h respectively. The target protein is indicated by an arrow.

ATAG TTT AGC GGC CGC TTT GAT CTC GAC CTT GGT CCC, 5'端含 *NotI* 位点)。以 P1, P9 为引物, 分别以 pUC19-Vm 及 pUC19-Vh 为模板, PCR 扩增 scFv-m25 及 scFv-h25 基因。PCR 产物回收的目的条带以 *NcoI*, *NotI* 双酶切, 与经过同样处理的 pET-15bs 连接, 转化 BL21(DE3); 克隆筛选得到载体 pET-mE(鼠)和 pET-hE(人源化)。序列测定表明无突变。表达菌以 IPTG(终浓度 0.2 mmol/L)于 37°C 诱导表达。菌体超声破碎, 制备全菌、上清及沉淀样品, 进行 SDS-PAGE(15%), 见图 2。

图 2 表明, 胞浆内表达的两种单链抗体都是包涵体。改变 IPTG 浓度(0.05~0.5 mmol/L)及表达温度(25、28、30、32°C)时产物仍为包涵体形式。

2.2.3 分泌表达: pET-22b(+)多克隆位点 5'-端有分泌信号肽序列 *pelB*, 可引导外源表达产物至细胞周质, 获得分泌表达; 3'-端有便于纯化的多聚组氨酸序列。以 *NcoI*, *NotI* 双酶切, 将单链抗体基因转移至 pET-22b(+), 分别得到重组表达质粒 pET-hH 及 pET-mH。两质粒的受体菌 BL21(DE3)以 IPTG(终浓度 0.2 mmol/L)诱导, 30°C 表达, 按方法 [7] 分别从周质、胞内、包涵体及全菌中制备样品进行 SDS-PAGE。结果显示, 产物仍都是包涵体(图略)。以 His-纯化柱分别从周质、胞内样品及沉淀(包涵体)中纯化目的蛋白, 结果只有离心沉淀中纯化出目的蛋白。SDS-PAGE(15%)分析见图 3。这说明, 即使有分泌信号, 本研究的两种单链抗体仍形

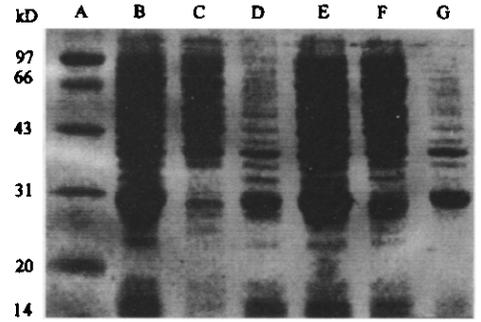


图2 重组质粒 pET-hE、pET-mE 受体菌表达产物的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the two recipients which contain the recombinant plasmids pET-hE、pET-mE respectively

A. Low molecule weight marker; B, E. Total cell lysate of pET-hE and pET-mE recipients respectively; C, F. Supersonic supernatant of BL21(DE3)/pET-hE and BL21(DE3)/pET-mE recipients respectively; D, G. Precipitate of the supersonic lysate of BL21(DE3)/pET-hE and BL21(DE3)/pET-mE recipients respectively. The target protein is indicated by an arrow

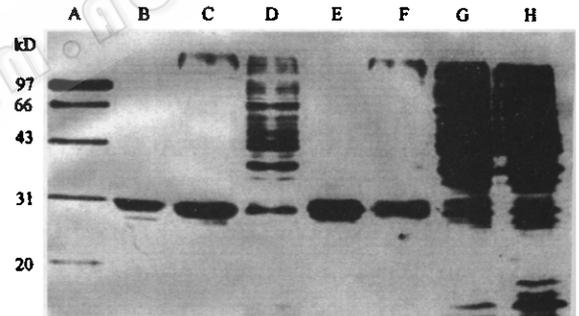


图3 两种分泌表达菌株的表达形式及纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the products and the purified proteins of the two secretory strains

A. Low molecule weight marker; B, E. Purified product from the inclusion-bodies of pET-mH and pET-hH transformants respectively; C, F. The inclusion-bodies of pET-mH and pET-hH transformants respectively; D, G. Supersonic supernatant of pET-mH and pET-hH transformants respectively; H. Negative strain control.

成了包涵体。

2.3 单链抗体的检测

2.3.1 细胞 ELISA: scFv-h25 表达载体 pET-he 和 scFv-m25 表达载体 pET-mE 转化感受态 BL21(DE3), 37°C 培养, IPTG(终浓度 0.2 mmol/L)诱导表达。超声破菌, 离心取沉淀(包涵体), 包涵体经洗涤、变性、复性、浓缩, 最后对 PBS 透析, 定量约为

30 μ g/mL。细胞 ELISA 检测与肝癌细胞系 SMMC-7721 的结合,测定 OD 值(表 1)。结果表明人源化单链抗体与鼠源单链抗体有相似的结合抗原的能力(单链抗体原液依次进行 5 倍梯度稀释)。

表 1 细胞 ELISA 检测鼠源、人源化单链抗体与肝癌细胞系 SMMC-7721 的结合(OD_{490})

Table 1 The binding value(OD_{490}) with HCC cell line SMMC-7721 by the humanized-and rodent scFves in cell ELISA assay

	1	2	3	4	5	6
ScFv-m25	2.993	2.054	0.719	0.225	0.059	0.023
ScFv-h25	3.182	2.536	1.495	0.683	0.185	0.044
Negative control	0.000	0.185	0.069	0.004	0.002	-0.009

2.4.2 竞争抑制流式细胞仪(Flow cytometer, FCM):以复性的两种单链抗体(浓度均为 30 μ g/mL)抑制亲本抗体(饱和结合浓度,约 100 μ g/mL)与肝癌细胞的结合,通过测定单链抗体抑制后亲本抗体结合于肝癌细胞系 SMMC-7721 的荧光强度变化计算单链抗体对亲本抗体的活性抑制百分数,反映人源化及鼠源单链抗体抑制亲本抗体的差异。

对鼠单链抗体(ScFv-m25)组、人源化单链抗体(ScFv-h25)组、阴性对照组及阳性对照(HAb25)各统计 5000 细胞的免疫荧光(FITC)强度,对强度值取对数,对数值-细胞计数峰形图(图 4)及 FCM 检测的荧光强度平均值、标准误、所占细胞百分数及细胞数如下(表 2)。

表 2 鼠源及人源化单链抗体对亲本抗体的抑制后 FCM 检测结果

Table 2 FCM results of the binding competition inhibition by the ScFv-m25 and ScFv-h25

	Negative	ScFv-h25	ScFv-m25	HAb25
Percentage/%	1.9	97.6	95.6	99.8
Count	87	4882	4782	4989
Magnitude	1.35	2.20	1.83	3.72
SD	0.890	1.00	0.757	1.66

单链抗体对亲本抗体的抑制活性百分数按以下公式计算:

抑制活性(%)=

$$\frac{\text{阳性平均强度} \times \text{百分数} - \text{样品平均强度} \times \text{百分数}}{\text{阳性平均强度} \times \text{百分数}} \times 100\%$$

代入相应数据,算出鼠源单链抗体的抑制活性为 52.88%;人源化单链抗体的抑制活性为 42.16%。

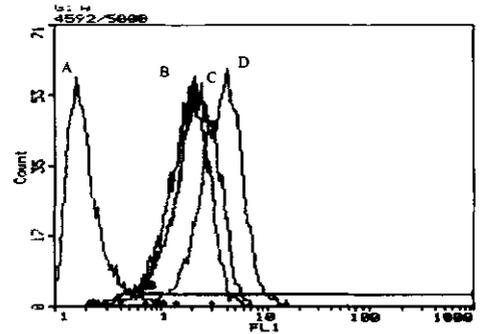


图 4 FCM 检测鼠源及人源化单链抗体对亲本抗体 HAb25 与肝癌细胞系 SMMC-7721 结合的抑制 Fig. 4 The parent mAb HAb25 is inhibited by single chain Fv in binding with HCC cell line SMMC-7721 assayed by FCM

A. Negative control; B. The mouse single chain Fv; C. The humanized single chain Fv; D. The parent mAb HAb 25 (positive control)

3 讨论

本文根据人源化设计的结果,构建了肝细胞癌特异性鼠单抗 HAb25 的鼠源及人源化单链抗体基因并以 3 种不同的表达途径进行了表达研究。结果表明,不论是融合表达、胞内表达或分泌表达,还是降低培养温度、改变诱导物 IPTG 的浓度,表达产物都是以包涵体形式存在。

影响单链抗体基因在大肠杆菌中可溶性表达的因素有很多。一般总结为表达载体、培养条件、基因序列本身三个主要方面。载体的因素包括是否为融合、启动子强弱^[10]、分泌信号^[11]等;培养条件包括诱导物浓度、表达温度、非代谢性添加物如蔗糖等^[12];但最根本的可能是基因序列(氨基酸一级序列)本身,如连接肽序列^[13]、重链可变区第六位氨基酸残基^[14]、界面残基组成等。通过改造氨基酸序列是获得可溶性表达最可靠的方法。现在主要有 3 种改造思路:环区移植^[15]、关键位置突变^[16]及界面工程^[17],各种方法都有成功的报道。而本研究仅从载体和培养条件两个方面来探索,没有获得可溶性表达。

以胞内表达的单链抗体进行复性,通过细胞 ELISA 及竞争抑制 FCM 两种方法对人源化及鼠源单链抗体进行了初步检测。结果表明,人源化单链抗体和鼠源单链抗体具有近似的结合能力。本研究表明所采取的人源化氨基酸突变方案没有对原抗体的 CDR 空间构象产生根本性的影响。同时,本所获得

的肝癌特异性人源化单链抗体可进一步评价其免疫原性,为其临床研究和应用奠定了基础,所采取的人源化方案将也为其他抗体可变区的人源化提供了参考。

参 考 文 献

- [1] Isaacs J D. *Seminars in Immunology*, 1990, **2**: 449~456
- [2] Jones P T, Dear P H, Foote J *et al.* *Nature*, 1986, **321**: 522~525
- [3] Kettleborough C A, Saldanha J, Heath V J *et al.* *Protein Eng*, 1991, **4**: 773~783
- [4] 胡川闽,刘彦仿,陈志南等.单克隆抗体通讯,1994, **10**(2):16~19
- [5] 袁清安,王国力,俞炜源等.军事医学科学院院刊,1999, **3**(23):9~12
- [6] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T.《分子克隆实验指南》第二版,北京:科学出版社,1992
- [7] Molloy P E, Graham B M, Cupit P M *et al.* *Mol Biotechnology*, 1995, **4**: 239~245
- [8] Buchner J, Pastan I, Brinkmann U. *Ana Biochem*, 1992, **205**: 263~270
- [9] 金伯泉等.医学基础免疫学,第四军医大学免疫教研室,1992
- [10] Pluckthun A. *Bio/technology*, 1991, **9**: 545~551
- [11] Duenas M, Vazquez J, Ayala A *et al.* *Biotechniques*, 1994, **16**: 476~482
- [12] Sawyer J R, Schlom R, Kashimi S R. *Protein Eng*, 1994, **7**(11):1401~1406
- [13] Turner D J, Ritter M A, George A J. *J Immunol Methods*, 1997, **205**(1):43~54
- [14] Haard H J De, Kasimier B, Bent A van der *et al.* *Protein Eng*, 1998, **11**(12):1267~1276
- [15] Jung S, Pluckthun A. *Protein Eng*, 1997, **10**(8):959~966
- [16] Knappik A, Pluckthun A. *Protein Eng*, 1995, **8**(1):81~86
- [17] Nieba L, Honegger A, Krebber C *et al.* *Protein Eng*, 1997, **10**(4):435~444

Construction and Expression of A Hepatocellular Carcinoma Specific Rodent and Its Humanized Single-chain Fv Fragments in *Escherichia coli*

YUAN Qing-an YU Wei-yuan HUANG Cui-fen

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

Abstract The aim of this research is to exploit the expression strategies for two genes encoding a rodent and its humanized version single-chain fragments (scFv) specific for hepatocellular carcinoma (HCC) and compare these two scFvs in antigen binding activity. Three vectors were used to express these two genes in different routes of fusion pathway, secrete pathway and intracellular pathway. The refolded single-chain antibodies were examined by antigen capture ELISA. Results showed that inclusion bodies were produced in all of the applied vectors despite of variation of IPTG concentration and culture temperature. Cell ELISA and binding competition inhibition indicated that the humanized single-chain Fv retained the similar affinity as its rodent counterpart. These results implied that the solubility of genetic antibodies are determined primarily by its amino acids sequence. The adopted humanization strategy in previous design made little effect on the natural conformation of complementarity-determining regions (CDR) of the parent antibody. The humanized HCC specific scFv can be further evaluated and developed as therapeutics.

Key words Humanization, single-chain antibody, hepatocellular carcinoma, expression