

两种人源化单链抗体-尿激酶融合基因的构建与表达

刘志刚 俞炜源 王 翔

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

关键词 表达 单链抗体 低分子量尿激酶 融合基因 连接肽

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0514-03

Scu-PA-32K 是单链尿激酶(Scu-PA)分子的 N 端肽段被水解后的产物,其分子量小但具有与 Scu-PA 相同的体内外生物活性^[1]。在过去的工作中,本实验室利用噬菌体表面呈现技术筛选到 1 株对人纤维蛋白特异的鼠源单链抗体^[2],并构建了鼠抗人交联纤维蛋白单链抗体—Scu-PA-32K 融合基因。为解决该融合基因在大肠杆菌中的高表达问题,通过在大肠杆菌中表达构建的一系列融合基因的缺失突变体,初步认定 Scu-PA-32K 基因中两个连排的大肠杆菌稀有密码子 AGG(精氨酸)是影响该融合基因表达的主要因素。用 PCR 定位诱变法把两个 AGG 均改造成 CGT 后,融合基因在大肠杆菌中表达量从改造前的 2%~3% 提高到 30%^[3],而且表达产物经变性、复性后具有双功能,该融合蛋白极有希望用于导向溶栓制剂的开发。为降低鼠源抗体在人体内的免疫原性,减少 HAMA 反应,本实验室利用 Biosym 公司的计算机辅助分子设计系统对鼠抗体 Fv 进行三维结构建模,确定鼠 Fv 的表面残基,并与同源程度最高的人源性抗体比较,然后在有差异的位置将鼠 Fv 表面残基换成人的表面残基,即通过对鼠抗体 Fv 的表面重塑而完成鼠抗体 Fv 的人源化设计。而且本实验室已构建和在大肠杆菌中表达了人源化单链抗体(hscFv),并对其生物活性进行了初步鉴定,结果表明其与鼠单链抗体具有相似的体外生物学活性^[4]。在此基础上,本文构建和在大肠杆菌中表达了两种 hscFv 与 Scu-PA-32K 的融合基因,并对表达产物的体外生物活性进行了初步的比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒: *E. coli* DH5 α 及 BL21(DE3), 本室保存。PET15b, 为带 T7 启动子的表达质粒, 本室保存; pUC19-HSCFV, 为本室构建, 其中克隆有人源化鼠抗人交联纤维蛋白单链抗体基因; pET3b-msp, 为本室构建, 其中克隆

有改构后的低分子量尿激酶基因(Scu-PA-32K)。

1.1.2 工具酶及生化试剂: 限制酶 *Nco*I, *Not*I, *Nde*I, *Bal*I 及 T4 DNA 连接酶均购自 Promega 公司; 尿激酶标准品购自北京生物制品检定所。兔抗人尿激酶抗体由本室制备, HRP 标记羊抗兔抗体购自北京中山生物技术有限公司; IPTG 购自上海生工生物工程股份有限公司; 抗原 D-二聚体由本室制备; 其他均为国产分析纯生化试剂。

1.1.3 PCR 引物:

P1: 5' CGGAATTCATATGGCCATGGCACAAGTTC-AGCTGGTTGAATCTGGTGC3'

P2: 5' GCTCTAGACATATGTTATCAGAGGGCCAGGCCATT3'

P3: 5' ATAAGAATGCGGCCGCTGGCGGTGGAGGCA-GCGGAGGTGGCGGAAGCGG

AGGCGGAGGTAGCTTAAATTTTCAGTGTGGCCAA-AAG3'

引物 P1 能够与人源化单链抗体基因的 5' 端配对; 引物 P2 能够与 Scu-PA-32K 基因的 3' 端配对; 引物 P3 的 3' 端能够与 Scu-PA-32K 基因的 5' 端配对, 且在配对区含有 *Bal*I 酶切位点, 而 P3 的 5' 端设计有 *Not*I 位点, 中间为连接肽 (Gly₄Ser)₃ 的编码序列。

1.2 方法

1.2.1 常规分子生物学操作按文献 [5] 进行。

1.2.2 融合基因在大肠杆菌中的诱导表达: 把构建正确的含两种融合基因的表达质粒转化 *E. coli* 宿主菌 BL21(DE3), 挑单克隆接种液体培养基 LB, 37°C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 5 h, 5 000 g, 4°C, 10 min 离心收获诱导培养物。

1.2.3 表达产物的胞内定位: 参见 Novagen 公司 pET 系统用户手册(第 6 版)。

1.2.4 包涵体蛋白的变性及复性: 重悬收集的包涵体于原

培养物 0.1 倍体积的变性液 (Urea 8 mol/L, Na_2HPO_4 0.02 mol/L, NaCl 0.5 mol/L) 中, 室温放置 3 h, 中间振荡数次, 然后 4°C 34 000 g 离心 20 min, 取上清, 置 4°C 保存。用 Bradford 法测定变性蛋白的浓度, 并用变性液调整蛋白浓度至 0.5~1.0 mg/mL, 取 5 mL 样品, 加入 9 倍体积复性液 (Tris-HCl 50 mmol/L, L-Arg 0.2 mol/L, EDTA 1 mmol/L, Urea: 100 mmol/L, 氧化型谷胱甘肽 0.25 mmol/L, 还原型谷胱甘肽 1 mmol/L), 10°C 复性 48 h。然后置复性样品于截留分子量为 8~10 kD 的透析带中对 50 倍体积 PBS 透析 48 h (4°C), 中间换透析液 PBS 1 次; 再用 25% PEG 20 000 (以 PBS 配制) 浓缩至 5 mL, 最后 12 000 g 4°C 离心 10 min 收集上清置 -20°C 保存备用。

1.2.5 溶圈法测定融合蛋白的尿激酶纤溶活性: 参照文献 [6] 进行。

1.2.6 ELISA 检测融合蛋白的抗体活性: 以抗原 D-Dimer 包被酶联板, 用 1% BSA 进行封闭, 随后依次加等量的复性样品, 兔抗人尿激酶抗体和 HRP 标记羊抗兔抗体, 以邻苯二胺 (OPD) 作为 HRP 底物进行显色, 最后以 2 mol/L 硫酸终

止反应。测定 OD_{492} 。

2 结果与讨论

2.1 连接肽为 (Ala)₃ 的融合基因的构建

以 *Not*I、*Nco*I 双酶切从克隆质粒 pUC19-HSCFV 上切下单链抗体基因 HSCFV, 以 *Not*I、*Nde*I 双酶切从表达质粒 pE3b-msp 上切下 *Scu*-PA-32K, 并对表达质粒 pET15b 进行 *Nco*I、*Nde*I 双酶切消化后回收载体大片段, 然后进行三片段连接构建含融合基因的表达质粒 pET15b-HSF (图 1)。连接产物转化 *E. coli* DH5 α 。经 *Nco*I、*Nde*I 双酶切鉴定, 表明构建正确。

2.2 连接肽为 (Gly₄Ser)₃ 的融合基因的构建

以 P2 和 P3 为引物, 以质粒 pET15b-HSP 为模板进行 PCR 扩增得到在 5' 端带有连接肽 (Gly₄Ser)₃ 编码基因的 *Scu*-PA-32K 基因, 对 PCR 产物和质粒 pET15b-HSP 分别进行 *Not*I、*Nde*I 双酶切并分别回收各自大片段进行连接, 构建质粒 pET15b-HLSP1 (图 1), 然后转化 *E. coli* DH5 α 。经 *Not*I、*Nde*I 双酶切鉴定, 表明构建正确。

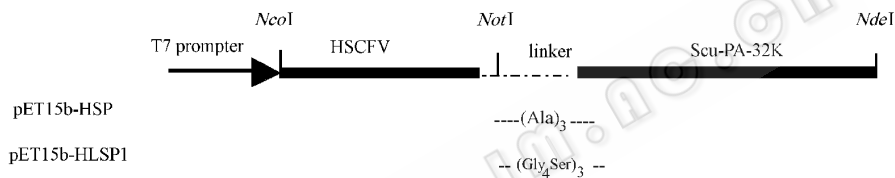


图 1 两种融合基因 pET15b-HSP 和 pET15b-HLSP1 的结构示意图

为了消除可能因 PCR 而出现的突变, 我们以质粒 pET15b-HSP 中的 *Scu*-PA-32K 替换了 pET15b-HLSP1 中的经 PCR 扩增的 *Scu*-PA-32K, 即对 pET15b-HSP 和 pET15b-HLSP1 进行 *Bal*I 单酶切, 前者回收约 4387 bp 的大片段, 而后者回收约 3200 bp 的小片段, 在对长约 4387 bp 的大片段进行除磷酸化之后对回收的两个片段进行连接, 构建质粒 pET15b-HLSP2, 然后转化宿主菌 DH5 α 。经 *Nco*I、*Nde*I 双酶切鉴定, 表明构建正确。

2.3 两种融合基因的表达

把构建正确的含两种融合基因的表达质粒转化宿主菌 BL21 (DE3), 以 1 mmol/L IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 检测表明两者都获得高表达, 经凝胶薄层扫描表明, 两者的表达量都占全菌蛋白的 30% 以上, 而且以胞内可溶和包涵体两种形式存在 (图 2)。

2.4 表达产物变性、复性及其生物活性分析

虽然表达产物中有一部分以胞内可溶形式存在, 但利用溶圈法未能在裂菌上清中测到尿激酶的活性, 推测可溶部分亦未能正确折叠。于是对包涵体进行了初步的变性和复性研究。在收获包涵体后, 利用含 8 mol/L 脲的变性液进行变性, 采用稀释复性法对变性产物进行了初步复性。

对复性产物, 首先利用溶圈法检测复性后融合蛋白的尿激酶活性, 结果表明两种融合蛋白经变性、复性后都体现出尿激酶活性 (图 3)。然后利用 ELISA 检测融合蛋白的单链

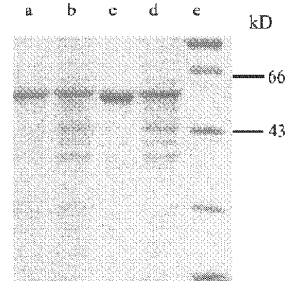


图 2 pET15b-HSP/BL21 (DE3) 和 pET15b-HLSP2/BL21 (DE3) 包涵体蛋白和胞内可溶蛋白的 SDS-PAGE
a. Insoluble fraction of pET15b-HSP/BL21 (DE3)
b. Soluble fraction of pET15b-HSP/BL21 (DE3)
c. Insoluble fraction of pET15b-HLSP2/BL21 (DE3)
d. Soluble fraction of pET15b-HLSP2/BL21 (DE3)
e. Protein molecular weight marker

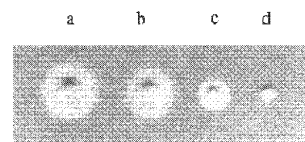


图 3 溶圈法检测融合蛋白的尿激酶活性

a. 1.0u urokinase; b. Fusion protein with linker (Gly₄Ser)₃;

c. Fusion protein with linker (Ala)₃; d. PBS

抗体活性。我们以 D-二聚体作为包被抗原,利用兔抗人尿激酶抗体和 HRP 标记的羊抗兔抗体实现了对人源化单链抗体活性的检测。ELISA 结果表明复性后的融合蛋白都具有单链抗体活性(表 1)。

以上实验说明两种表达产物经变性、复性后都具有单链抗体结合抗原 D-二聚体的功能和尿激酶激活纤溶酶原的功能,而且在本试验中常规的复性条件下,连接肽为 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 的融合蛋白表现出较高的复性效率。这与对低分子量尿激酶-鼠单链抗体融合蛋白的研究结果是一致的。本实验室在研究低分子量尿激酶-鼠单链抗体融合蛋白时,也发现当连接肽较长时,纯化的复性产物中尿激酶的比活有明显的升高(待发)。这可能与 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 连接肽较长且柔软,在复性时能够降低融合蛋白的两组份间的空间位阻,从而更有利于融合蛋

表 1 ELISA 检测融合蛋白中单链抗体的抗原(D-二聚体)亲和性

A	OD_{492}			
	1	2	3	4
	0.02	0.76	1.75	2.26

ELISA process coated with antigen(D-Dimer)+ tested sample + rabbit anti-UK antibody + goat anti-rabbit IgG/HRP OPD as substrate for HRP.

A1 :PBS as tested sample ;A2 :Fusion protein with linker(Ala)₃ as tested sample ;A3 :Fusion protein with linker(Gly₄Ser)₃ as tested sample ;A4 :UK as coated antigen and PBS as tested sample

白的各个结构域的正确折叠有关^[7]。这些工作为该融合蛋白复性条件进一步优化及对其各种特性更细致的鉴定奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Stump D C ,Lijnen H R ,Collen D *et al.* *J Biol Chem* ,1986 ,**261** :17120~17126
- [2] 黄君健 ,俞炜源 ,黄翠芬.生物技术通讯 ,1996 ,**7**(1):1~5
- [3] 王 翔 ,俞炜源.生物工程学报 ,1999 ,**15**(1) 23~27
- [4] 刘志刚 ,俞炜源 ,黄君健.军事医学科学院院刊 ,1999 ,**23**(1) 5~8
- [5] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* ,2nd ed ,New York :Cold Spring Harbor Lab. Press ,1989
- [6] 韩素文 ,俞炜源 ,李秀珍等.军事医学科学院院刊 ,1987 ,**11** :101~108
- [7] Huston J S ,Mudgett-Hunter M ,Tai M S *et al.* *Methods Enzymol* ,1991 ,**203**(1) 46~88

The Construction and Expression of Two Humanized scFv-urokinase Fusion Genes

LIU Zhi-Gang YU Wei-Yuan WANG Xiang

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

Abstract By using PCR and DNA recombination ,two fusion genes of humanized mouse anti-human fibrin scFv and low molecular weight single chain urokinase(Scu-PA-32K)was constructed. The difference of these two fusion genes lay in the linker between two moieties ,one was $(\text{Ala})_3$ and another was $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$. These two fusion genes were both overexpressed in *E. coli* with the expression level at 30% . Both expression products showed the activity of binding antigen D-Dimer and activating plasminogen after the denaturation and renaturation ,but under general refolding conditions ,the one with linker $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ showed better effect in the renaturation of fusion protein.

Key words Gene expression , Scu-PA ,scFv ,fusion gene ,linker