

抗人 VEGF 受体 II 基因 III 区单链抗体基因的构建和表达

李 容 熊冬生* 邵晓枫 许元富 刘 嘉 朱祯平 杨纯正

(中国医学科学院/中国协和医科大学 血液学研究所实验血液学国家重点实验室,天津 300020)

摘 要 采用 RT-PCR 技术从分泌抗人血管内皮生长因子受体 II(kinase insert domain-containing receptor, KDR)基因 III 区单克隆抗体 Ycom1D3 的杂交瘤细胞中克隆出 V_H 和 V_L 可变区基因,通过重叠延伸拼接(splice-overlap extension) PCR 方法在 V_H 和 V_L 基因之间引入柔性短肽(Gly₄ Ser)_n,体外构建 Ycom1D3 单链抗体基因(Ycom1D3-ScFv),将其克隆至 pAYZ 表达载体,在大肠杆菌中表达。SDS-PAGE 和 Western-blot 分析结果表明,Ycom1D3-ScFv 在 *E. coli* 16C9 中获得表达,重组蛋白的相对分子量为 30kD,与预期结果一致。表达产物主要以不溶性包涵体形式存在,经过溶解包涵体,TALON 金属亲和层析基质(TALON metal affinity resin)纯化和体外复性过程,获得了高纯度的单链抗体片段。流式细胞分析结果证实该单链抗体可与人脐静脉内皮细胞结合,保留了鼠源单抗与 KDR 抗原的特异性结合活性。抗 KDR III 单链抗体基因 Ycom1D3-ScFv 的成功构建和功能性表达为靶向诊断治疗及进一步基因工程改造奠定了基础。

关键词 血管内皮生长因子, KDR, 单链抗体(ScFv), 原核表达

中图分类号 R392.33 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0187-05

人血管内皮生长因子受体 II(Kinase insert domain-containing receptor, KDR)是血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的主要受体之一,在介导血管内皮细胞增殖、迁移、分化、微管形成、血管通透性增加等一系列生物活性中发挥重要的作用^[1]。KDR 几乎完全表达于被激活的内皮细胞(如肿瘤位点),是一个高特异性的肿瘤治疗靶点。通过抑制肿瘤相关血管新生,而达到抑制肿瘤生长、转移的目的。

本室采用重组可溶性 KDR 胞外 III 区表达产物(KDR III)作为抗原免疫小鼠,目前已获得一株分泌抗 KDR III 单克隆抗体杂交瘤细胞株 Ycom1D3。体外研究结果表明其可阻断 VEGF₁₆₅ 诱导的脐静脉内皮细胞增殖,从而显示出抗肿瘤血管新生的潜在治疗价值^[2,3]。但由于鼠源性单抗具有较高的免疫原性,多次用药易产生人抗鼠抗体(HAMA)反应,严重限制了其在临床的应用。为此我们将鼠源性抗体经基因工程方法改造成单链抗体,并成功地在大肠杆菌中进行了功能性表达,为靶向诊断治疗及进一步基因工程改造奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与菌株:抗 KDR III 单抗杂交瘤细胞株 Ycom1D3 由本室研制并建株。原核表达载体 pAYZ 及宿主菌 *E. coli* 16C9 由本室保存。

1.1.2 试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、M-MLV 逆转录酶、Trizol 试剂盒为 Invitrogen 公司产品。Pyrobest DNA 聚合酶为宝生物工程有限公司产品,胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品,FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为北京中山生物技术公司产品,鼠抗 Penta-His 抗体为 Qiagen 公司产品,TALON 金属亲和层析基质(TALON metal affinity resin)为 Clontech 公司产品。

1.1.3 PCR 引物:P1、P2、P3、P4 为扩增抗体轻重链可变区基因通用兼并性引物;P5、P6、P7、P8 为构建抗 KDR III 单链抗体基因使用引物。引物均由上海生工公司合成,画线部分为酶切位点。

P1 5'-CTCAAACCGGTAGGT(C)(C)AA(C)CTGCAG(C)AGTCA(T)GG-3'(Mlu I)

P2: 5'-GCGTCATTCGCGCCCGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-
CCCTTGGCCCC-3'(Not I)

P3: 5'-CTACAAACGCGTGACATTGAGCTACCCAGTCTCCA-3'
(Mlu I)

P4: 5'-GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTC(T)ATC(T)TCCAA
(G)CTT(G)TGTCC-3'(Not I)

P5: 5'-GCTACAAACGCGTACGCTCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCT-
GG-3'(Mlu I)

P6: 5'-ACCGCCGATCCACCGCCACCCGAGCCACCGCCACCTG-
AGGAGACGGTGACCGTGG-3'

P7: 5'-GGCTCGGGTGGCGGTGGATCCGGCGGTGGCGGTTCGGA-
CATTGAGCTACCCAGTCTCTCT-3'

P8: 5'-CGGCGCACCTGCGGCCCGCGTTTTATTTCAGCTTGGT-
CCC-3'(Not I)

1.1.4 人脐静脉内皮细胞的培养:无菌条件下取新生儿脐带 30~50 cm(天津市中心妇产科医院),向脐静脉内灌注 2.5 g/L 胰酶溶液约 15 mL,37℃消化 15 min,收集消化液,1300 r/min 离心 8 min,沉淀细胞重悬于 20% FCS/M199 培养液,接种至塑料培养瓶,于 37℃,5% CO₂ 条件下培养 12 h 后换液。4~6 d 后细胞融合,胰酶消化传代,取 2~3 代细胞用于实验。

1.2 方法

1.2.1 抗 KDR III 单抗(Ycom1D3)轻、重链可变区基因的克隆:取生长良好能持续分泌抗 KDR III 单抗的杂交瘤细胞,用 Trizol 试剂提取总 RNA,逆转录合成 cDNA。然后采用通用兼并性引物特异性扩增抗体轻、重链可变区基因,并在 5' 端和 3' 端分别引入 *mlu* I 和 *Not* I 限制性内切酶酶切位点,通过酶切、连接,将 V_H 和 V_L 基因组装到 pAYZ 载体,构建成含轻重链可变区基因的克隆载体 pAYZK3-V_L、pAYZK3-V_H,分别转化 *E. coli* 16C9 感受态细胞,随机挑取 20 个克隆,进行菌落 PCR 电泳鉴定阳性克隆。

1.2.2 序列及分析:各挑取 4 个阳性克隆采用 Sandger 双脱氧链末端终止法测序,并参照基因序列分析(PDB)库中抗体特征对氨基酸序列进行分析,以区分抗体轻链、重链框架区(FR)和抗体互补决定区(CDR)。

1.2.3 抗 KDR III 单链抗体(Ycom1D3-ScFv)表达载体的构建:根据轻、重链可变区基因的酶切图谱及构建载体 pAYZ 的酶切位点,设计并合成了用于 V_H 及 V_L 基因拼接的引物。首先分别采用引物 P5、P6 及 P7、P8 扩增重链、轻链可变区基因,再用重叠延伸拼接(splice-overlap extension)PCR 方法将抗体重链、轻链可变区基因用一编码(Gly₄Ser)₃ 柔性短肽的 DNA 片段拼接成 5'V_H-Linker-V_L 3' 片段,最后使用 P5 和

P8 扩增全长 ScFv 基因,并在 5' 端和 3' 端分别引入 *Mlu* I 和 *Not* I 限制性内切酶酶切位点,通过酶切,将全长 Ycom1D3-ScFv 基因组装到 pAYZ 表达载体,构建抗 KDR III 单链抗体表达载体 pAYZKDR ScFv。

1.2.4 目的基因的诱导表达:将载体 pAYZKDR ScFv 转化 *E. coli* 16C9,挑取单菌落接种于含氨苄青霉素 50 g/L 的 2 × YT 培养基,37℃振荡培养 10 h 后,按 1:4 的比例转接于含氨苄青霉素 50 g/L 的 AP₅ 诱导培养基(每 1000 mL 含葡萄糖 1.5 g,酪氨酸蛋白水解物 11 g,酵母抽提物 0.6 g,硫酸镁 0.19 g,氯化铵 1.07 g,氯化钾 3.73 g,氯化钠 1.2 g,1 mol/L 三乙醇胺 120 mL,pH 7.4),30℃振荡培养 24 h 后,4℃离心收集菌体。

1.2.5 包涵体蛋白的变性、纯化和复性:菌体沉淀重悬于预冷的 50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA (pH 7.0),超声破碎细胞,13000 r/min,4℃离心 30 min。沉淀用 3 mol/L 尿素,50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)洗涤,13000 r/min,4℃离心 30 min 收集包涵体。包涵体溶解于 6 mol/L 盐酸胍和 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.0)中,4℃摇动过夜。13000 r/min,4℃离心 30 min 收集上清,用 0.45 μm 的滤膜过滤后上样于 TALON 金属亲和层析柱。用 6 mol/L 尿素,50 mmol/L Tris-HCl,20 mmol/L 咪唑 (pH 7.0)洗柱,用含 250 mmol/L 咪唑,6 mol/L 尿素,50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)洗脱。收集洗脱峰,将洗脱液加到透析袋中,用 TEA 缓冲液(0.4 mol/L 精氨酸-HCl,0.1 mol/L Tris-HCl,2 mmol/L EDTA,pH 7.0)充分透析复性 24 h 后,继续用 PBS 透析 24 h。超滤浓缩样品至适当体积,Lowry 法测定蛋白含量,-20℃分装保存。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测:表达产物经 15% SDS-PAGE 电泳,将其转移至醋酸纤维素膜上,5% 脱脂奶溶液 40℃封闭过夜,基于表达产物末端的 6 × His-tag 短肽,用鼠抗 Penta-His 抗体室温孵育 2 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次后,加入稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 多抗,室温孵育 1 h,Tween-Tris 缓冲液(TBST)洗 3 次,每次 10 min,然后用二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.2.7 Ycom1D3-ScFv 与 HUVEC 细胞结合活性测定:培养的人脐静脉内皮细胞经胰酶消化洗脱后,用磷酸缓冲液洗 2 次,加入 40 孔细胞培养板,1 × 10⁶ 细胞/孔,用含 10 g/L 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液 37℃封闭 1 h。加入 Ycom1D3-ScFv (终浓度为 100 μg/mL)4℃孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次,然后加入稀释

的鼠抗 Penta-His 抗体 4℃ 孵育 1 h, 用 PBS 洗 3 次; 最后加入羊抗鼠 IgG-FITC 4℃ 孵育 45 min, 用 PBS 洗去未结合的荧光抗体, 用流式细胞仪测定 HUVEC 细胞的阳性率。

2 结 果

2.1 Ycom1D3 轻、重链可变区基因的克隆

从 Ycom1D3 杂交瘤细胞中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增后, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 见清晰的 V_H 和 V_L 扩增条带, 片段大小分别约为 350bp 和 330bp。扩增的 V_H 和 V_L 基因分别经 *Mlu* I 和 *Not* I 酶切插入到 pAYZ 载体, 分别得到含抗体重链、轻链可变区基因的重组质粒 pAYZK3- V_H , pAYZK3- V_L 。PCR 扩增结果及各重组质粒的酶切鉴定见图 1 和图 2。分别转化 *E. coli* 16C9 感受态细胞, 挑取克隆测序。

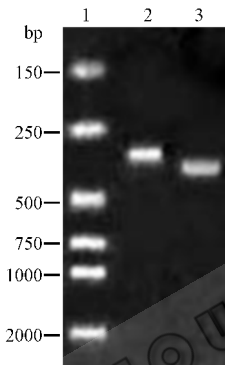


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis
1: PCR marker (DL 2000); 2: PCR product of V_L ; 3: PCR product of V_H

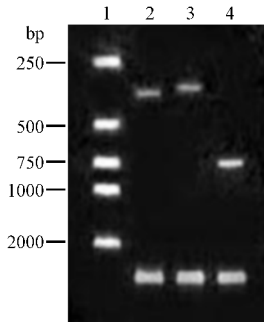


图 2 重组质粒 pAYZK3- V_H 、pAYZK3- V_L 和 pAYZKDR ScFv 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction analysis of recombinant plasmid pAYZK3- V_H 、pAYZK3- V_L and pAYZKDR ScFv

1: PCR marker (DL 2000); 2: pAYZK3- V_H /Mlu I + Not I; 3: pAYZK3- V_L /Mlu I + Not I; 4: pAYZKDR ScFv/Mlu I + Not I

2.2 序列测定及分析

对构建的抗体轻、重链可变区基因克隆载体进行测序, 结果显示分别挑取的 4 个克隆的轻、重链可变区基因序列均一致。其中 V_H 基因全长 351bp, 编码 117 个氨基酸, V_L 基因全长 333bp, 编码 111 个氨基酸。序列分析显示该基因符合蛋白质数据库中小鼠抗体基因所具有的特点, 该序列为小鼠抗体基因序列。

2.3 Ycom1D3-ScFv 表达载体 pAYZKDR ScFv 的构建

采用重叠延伸拼接 PCR 方法将抗体重、轻链可变区基因用一编码 (Gly₄Ser)₃ 短肽的 DNA 片段拼接成 5' V_H -Linker- V_L 3' 片段, PCR 扩增该片段, 并在 5' 端和 3' 端分别引入 *Mlu* I 和 *Not* I 限制酶酶切位点, 通过酶切, 将全长 ScFv 基因组装到 pAYZ 表达载体, 构建抗 KDR III 单链抗体表达载体 pAYZKDR ScFv (见图 3), 重组质粒的酶切鉴定如图 2 所示。质粒转化 *E. coli* 16C9 感受态细胞, 挑取克隆测序, 测序结果显示所构建的 pAYZKDR ScFv 质粒与抗 KDR III 单抗 Ycom1D3 轻、重链可变区基因一致, 两者间由连接肽 (Gly₄Ser)₃ 相连, 与实验设计相符。

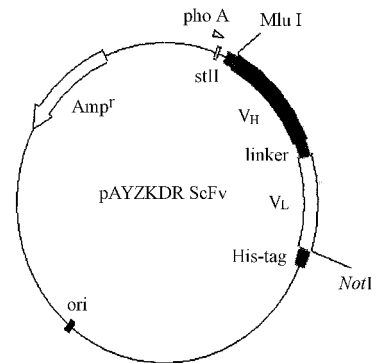


图 3 抗 KDR III 单链抗体表达载体 pAYZKDR ScFv 的构建

Fig.3 Construction of expression vector pAYZKDR ScFv

2.4 Ycom1D3-ScFv 的诱导表达、鉴定和纯化

含有表达载体 pAYZKDR ScFv 的 *E. coli* 16C9 经低磷培养基 AP5 诱导, 表达产物除少量为可溶性活性产物外, 主要以包涵体形式存在。SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示在分子量约为 30 kD 处有一明显的诱导条带, 与该单链抗体的理论计算值相符, 表达量约占菌体总蛋白的 10%。Western blot 实验结果则进一步证实了其特异性。包涵体经盐酸胍溶解变性, TALON 金属亲和层析柱纯化和体外复性过程, 最终获得高纯度的单链抗体片段, 纯度达 90% 以上 (图 4)。

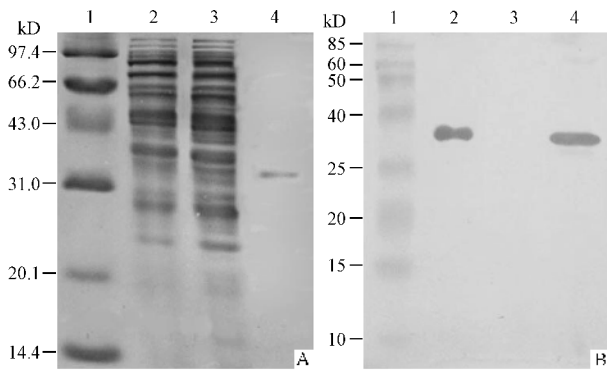


图4 抗 KDR III ScFv 的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

Fig.4 SDS-PAGE and Western blot analysis of anti-KDR III ScFv

A SDS-PAGE 1. protein marker ; 2. flow through from the TALON metal affinity column ; 3. the whole cell extract ; 4. Ycom1D3-ScFv purified by TALON metal affinity column

B Western blot analysis 1. pre-stained marker ; 2. the whole cell extract ; 3. flow through from the TALON metal affinity column ; 4. Ycom1D3-ScFv purified by TALON metal affinity column

2.5 Ycom1D3-ScFv 的 HUVEC 细胞结合活性

为进一步鉴定经复性后的 Ycom1D3-ScFv 与表达 KDR 抗原的 HUVEC 细胞的结合活性,我们应用免疫荧光标记及流式细胞仪检测,结果表明经复性后的表达产物能够与人脐静脉内皮细胞结合,阳性细胞百分率为 71%,从而显示出与亲代鼠源性抗体相类似的 KDR 结合活性(图 5)。

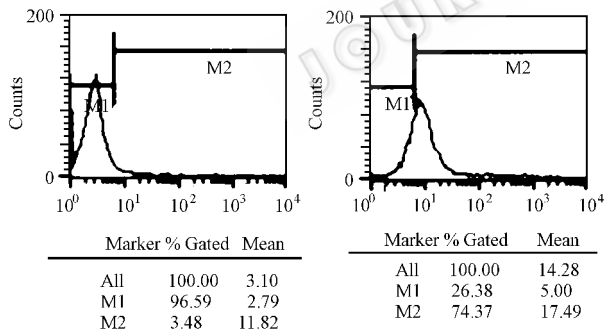


图5 流式细胞仪检测 Ycom1D3-ScFv 与 HUVEC 细胞的结合活性

Fig.5 Flow cytometric analysis of Ycom1D3-ScFv binding to HUVECs

1: PBS control ; 2: Ycom1D3-ScFv

3 讨 论

VEGF 是血管新生的重要调节因子,与肿瘤血管形成及肿瘤生长转移高度相关,而 VEGF 的促内皮细胞(EC)增殖和血管形成等生物学功能主要通过受体 KDR 介导。因而 VEGF/KDR 作用途径被认为在肿瘤相关的血管新生过程中发挥关键作用。以

KDR 为靶点,通过制备 KDR 酪氨酸激酶受体抑制剂,阻断 VEGF/KDR 的相互作用成为抑制肿瘤血管新生的一条重要途径。目前正在研究中的抑制剂包括单抗、可溶性受体、人工合成肽类和非肽类小分子化合物等,其中单抗因作用靶点特异性较强、毒副作用较小等优点成为目前开发研究的热点。由美国 Imclone 公司开发研制的抗 KDR 嵌合抗体 IMC-1C11 已进入临床 I 期试验阶段^[4,5]。我们制备的抗 KDR III 单抗 Ycom1D3 是专门针对 KDR 胞外 III 区配基结合区的单克隆抗体,体外研究结果表明其可抑制 VEGF₁₆₅ 诱导脐静脉内皮的增殖,且抑制活性呈现剂量依赖性,从而显示出其作为肿瘤血管新生抑制剂的潜在价值。由于鼠源性抗体具有较强的免疫原性,用于人体时会导致体内产生强烈的人抗鼠抗体(HAMA)反应,将严重限制其在临床的应用^[6],为此我们进行了单链抗体的研制。

单链抗体是由接头(linker)将轻链可变区和重链可变区基因以两种取向(V_L -Linker- V_H , V_H -Linker- V_L)连接而成的具有特异性抗原结合功能的小分子片段。它具有分子量小、免疫原性低、在细菌中表达易于大量生产等优点。目前构建 ScFv 基因片段应用最为广泛的 Linker 序列是由重复的 4 个甘氨酸和一个丝氨酸构成的 15 个氨基酸序列的短肽,其中甘氨酸是分子量最小、侧链最短的氨基酸,可增加侧链的柔性;丝氨酸是亲水性最强的氨基酸,可增加其亲水性。本研究采用了 $(Gly_4Ser)_3$ 构成的柔性短肽作为重链和轻链的 Linker,在复性及透析过程中表现出良好的稳定性。

本文使用的 pAYZ 表达载体带有 stII 信号肽序列,是一种分泌性表达载体,可引导外源蛋白的分泌表达,从而直接得到活性产物。但表达过程中却发现虽然 Ycom1D3-ScFv 也有少量可溶性产物,但主要以包涵体形式存在。分析原因,可能与基因表达产物的一级结构有关。Knappik 采用定点突变结合空间结构分析的方法对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进行了研究,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^[7]。我们使用的载体多克隆位点的下游有一个能够编码 $6 \times His$ -Tag 序列,可与上游的表达序列形成融合蛋白,它通常不影响表达产物的生物学活性,因而不必通过酶水解来获得目的蛋白。同时该序列可作为蛋白标签用于目的蛋白的检测。本研究利用 TALON 金属亲和层析基质对

His-Tag 的特异性亲和性进行单链抗体纯化,得到高纯度的产物。经透析复性最终获得能特异性与表达 KDR 抗原的 HUVEC 细胞结合的单链抗体。无论是作为靶向诊断治疗的载体还是作为双功能抗体的一臂,均具有广泛的应用前景。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhu ZP, Witte L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Investigational New Drugs*, 1999, **17**(2):195 - 212
- [2] Xiong DS(熊冬生), Liu J(刘嘉), Shao XF(邵晓枫) *et al.* Cloning and expression of domain 3 of VEGF receptor II. *High Technology Letters*(高技术通讯) 2002 **12**(5):45 - 49
- [3] Li R(李容), Xiong DS(熊冬生), Shao XF(邵晓枫) *et al.* Pro-

duction of monoclonal antibody against domain III of human VEGF receptor II. *Immunological Journal*(免疫学杂志) 2003 **19**(3):193 - 197

- [4] Zhu Z, Rockwell P, Lu D *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced receptor activation with anti-kinase insert domain-containing receptor single-chain antibodies from a phage display library. *Cancer Res*, 1998, **58**(15):3209 - 3214
- [5] Zhu Z, Lu D, Kotanides H *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor induced mitogenesis of human endothelial cells by a chimeric anti-kinase insert domain-containing receptor antibody. *Cancer Lett*, 1999, **136**(2):203 - 213
- [6] Shawler DL, Bartholemew MR, Smith LS *et al.* Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol*, 1985, **135**(2):1530 - 1535
- [7] Knappik A, Pluckthun A. Engineered turns of a recombinant antibody improve its *in vivo* folding. *Protein Eng*, 1995 **8**(1):81 - 89

Construction and Expression of Single Chain Fv Gene Against Domain III of Human VEGF Receptor II

LI Rong XIONG Dong-Sheng* SHAO Xiao-Feng XU Yuan-Fu LIU Jia ZHU Zhen-Ping YANG Chun-Zheng

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract The genes encoding for the light and heavy chain variable regions (V_H and V_L) has been cloned by RT-PCR from a murine hybridoma that produced monoclonal antibody (mAb) Ycom1D3, which was against domain III of human vascular endothelial growth factor receptor II (KDR III) and were then connected to each other by a short peptide linker containing 15 amino acids (Gly_4Ser)₃ using splice-overlap extensive PCR. The recombinant Ycom1D3-ScFv gene was cloned into the expression vector pAYZ and induced to express in *E. coli* 16C9. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the recombinant Ycom1D3-ScFv gene was expressed in *E. coli* 16C9 and the relative molecular weight of the fusion protein is 30kD which was consistent with the theoretically predicted value. ScFv expression was in the form of an inclusion body and the purified fusion protein was obtained after a series of purification steps including cell breakage, inclusion body solubilization, TALON metal affinity chromatography and protein refolding. Flow cytometric analysis showed that the ScFv fragment can react with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) which express KDR on the cell surface. In Conclusion, Recombinant Ycom1D3-ScFv gene has been successfully constructed and expressed in *E. coli* 16C9, which could be useful in both diagnostic and therapeutic applications.

Key words vascular endothelial growth factor, KDR, single chain antibody (ScFv), prokaryotic expression

Received : 07-28-2003

This work was supported by Grants from the State High Technology Research and Development Program of the Chinese Government (Grant number 95-Zhuan-10) and Key fund of Tianjin City Government (Grant number 003119511)

* Corresponding author. Tel 86-22-27230740 Fax 86-22-27230740 E-mail dsxiong@public.tpt.tj.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>