

人-鼠嵌合 Fab 片段的温度诱导表达

谷虹 叶敏

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

摘要 构建了具有 $\lambda P_R P_L$ 启动子高效表达人鼠嵌合 Fab 片段的温度诱导表达型载体 pHZ01, 并在大肠杆菌中表达了三种嵌合 Fab 片段: 抗前列腺特异抗原 (PSA) 的嵌合 Fab, 抗溶菌酶 (HEL) 的嵌合 Fab 和抗破伤风类毒素 (TT) 的嵌合 Fab, 三种表达的可溶性嵌合 Fab 都具有特异结合抗原的能力, 嵌合 Fab 的 CH1 和 CK 区均为人源的, 较之鼠源 Fab 具有更好的应用前景。

关键词 温度诱导表达, 嵌合 Fab, 载体构建

抗体片段在大肠杆菌中的高效表达是基因工程抗体研究的一个关键问题。应用噬菌体表面表达抗体库技术可以在较短时间内筛选到针对特异抗原的抗体^[1], 但这种表达系统的表达效率较低, 不能提供足够量的表达产物用于结构分析、临床诊断与治疗等方面, 所以必须寻求抗体片段的高效表达。

前后相连的 $\lambda P_R P_L$ 启动子与单独的 $\lambda (P_R$ 或 $P_L)$ 启动子以及化学诱导启动子, (如 *tac*、*trp* 或 *lac* 启动子) 相比, 具有更高地促进外源蛋白表达的能力^[2], 同时 λ 启动子也便于有效地控制表达水平。本文构建了含有 λP_R 和 P_L 启动子的载体以提高抗体基因的表达效率。

Fab 片段具有与完整抗体几乎相同的抗原结合能力。由于抗体的抗原结合能力与其糖基化无关, 同时, 研究表明 ScFv、Fab 等形式的抗体片段在大肠杆菌中能正确折叠^[3], 因而适于在大肠杆菌中表达。本文对 Fab 在大肠杆菌中的表达也进行了研究, Fab 采用人-鼠嵌合的形式, 即它的 CH1 和 CK 部分为人源, 其鼠源成分与 Fv 相当。

1 材料和方法

1.1 质粒, 菌株和细胞株

质粒 pSW1Fab (D1.3)^[4], pHEN1^[5] 均由英国剑桥大学 Winter G. 教授惠赠。pSW1Fab (D1.3) 为可诱导表达抗溶菌酶 (HEL) 人-鼠嵌合 Fab (D1.3) 的重组质粒。

质粒 pHEN (2F3A8Fab) 为表达抗破伤风类毒素 (TT) 人-鼠嵌合 Fab 的重构质粒, 其中 VH 及 VK 基因来源于杂交瘤细胞株 2F3A8。质粒 pHEN (HuCH1 - Fablink-er) 含有人抗体 CH1 区及 Fablinker 片段^[6]。以上质粒和细胞株均为本室制备。质粒 pJLA503^[7] 菌株 XL1 - Blue, TG1, DH5 α , 为本实验室保存。

中国科学院上海细胞生物学研究所研究生基金、所长基金和世界实验室 (World Laboratory) 资助。

本文于 1996 年 5 月 13 日收到。

抗前列腺特异抗原 (Prostate specific antigen, PSA) 杂交瘤细胞株 526 的总 RNA, 由 Yes Biotech Lab, Ltd. 叶庆炜博士和本所徐永华教授提供。

1.2 PCR 引物

VHBACK: 5' - AGGTC (G) A (C) AA (G) CTGCAGC (G) AGTAC (T) GG - 3'

PstI

JHFOR: 5' - TGAGGAGACGGTGACCGTGACCGTGGTCCCTGGCCCCAG - 3'

BstEII

VKBACK: 5' - GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA - 3'

SacI

VKBACKII: 5' - GATG (A) TTGAGCTCACC (T/G) CAAA (G) CTC (G) CACT (C) C - 3'

SacI

JKFOR: 5' - GTTTGATCTCGAGCTTGGTGCC - 3'

XhoI

ReverseVH: 5' - GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA - 3'

BstEII

Reverse VK: 5' - GGAGACTGGGTGAGCTCAATGTC - 3'

SacI

Hu CKFORNot:

5' - GACTTGCGGCGCGCAGACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT - 3'

NotI

引物设计参考^[8,9]。

1.3 cDNA 合成与扩增

采用反转录 - PCR 扩增抗 PSA 抗体轻、重链可变区基因: 以抗 PSA 单抗杂交瘤细胞株 526 总 RNA 为模板分别用引物 JHFOR 和 JKFOR 采用引物延伸法 (Primer extension) 合成抗体轻、重链 V 区第一链 cDNA。分别取轻、重链 cDNA, 用轻链引物 VKBACKII, JKFOR 和重链引物 VHBACK, JHFOR 进行 PCR 扩增。

1.4 嵌合 Fab 温度诱导表达载体的构建

1.4.1 抗溶菌酶嵌合 Fab 温度诱导表达载体 pHZ01 (D1.3Fab) 的构建: 先将 pSW1Fab 用 HindIII 酶切, 再用 T4DNA 聚合酶补平切口, 然后以 EcoRI 酶切, 经 1.5% 低熔点胶回收纯化得到 1.5kb 的片段, 将其插入经 XhoI 酶切, T4 DNA 聚合酶补平, EcoRI 酶切, 并经 1% 低熔点胶纯化的 pJLA503 中, 即构成表达载体 pHZ01 (D1.3Fab)。

1.4.2 抗破伤风类毒素 (TT) 嵌合 Fab 温度诱导表达载体 pHZ01 (2F3A8) Fab 的构建: 按照 1.4.1 的方法将 pHEN (2F3A8Fab) 中的 Fab 基因切下, 插入到 pJLA503 中即构建成 2F3A8 嵌合 Fab 温度诱导表达载体 pHZ01 (2F3A8Fab)。

1.4.3 表达载体 pHZ01 的构建: 1) 将人轻链恒定区基因 (HuCK) 插入到 pJLA503 中: 用 XhoI 和 EcoRI 从 pSW1FabD1.3 中酶切出下 HuCK 片段, 从限制位点 XhoI 和 EcoRI 处插入到 pJLA 503 中, 得到 pJLA (HuCK)。2) 用引物 Reverse JH 与 Reverse VK 从 pSW1FabD1.3 中扩增得到 HuCH1 - Fab linker 片段。T4 DNA 聚合酶补平末端,

然后用 2% 低熔点胶回收纯化。载体 pHEN1 经 SalI 酶切, T4DNA 聚合酶补平末端。与 HuCH1 - Fab linker 进行平头连接, 转化大肠杆菌菌株 XL1 - Blue, 并经酶切鉴定。3) 用 HindIII 和 XhoI 从 pHEN (HuCH1 - linker) 中酶切下一条 550bp 的片段, 用 1.5% 的低熔点胶回收纯化, 再与经 XhoI 酶切的 pJLA (HuCK) 进行连接, T4 DNA 聚合酶补平末端, 再继续连接, 连接产物转化大肠杆菌 XL1 - Blue, 用酶切和 PCR 方法筛选和鉴定克隆, 即为 5.8kb 的 pHZ01。在其中包含了前导序列 pe1B, 人 γ 链恒定区 CH1, 人 κ 链恒定区 CK 和温度诱导启动子 P_R 、 P_L 以及用于插入抗体可变区基因的一系列限制酶切位点。

1.4.4 抗 PSA 嵌合 Fab 温度诱导表达载体 pHZ01 (526Fab) 的构建: 将 526VK PCR 扩增片段用 SacI 和 XhoI 酶切, 并与经 SacI、XhoI 酶切的 pHZ01 连接, 构成 pHZ01 (526VK)。由于在 pHZ01 中带有两个 PstI 位点, 为此将 526VH 片段从 PstI 和 BstEII 位点插入到 pHEN (HuCH1 - linker) 中, 然后从 HindIII 和 BstEII 切下来, 用 2% 低熔点胶回收。pHZ01 (526VK) 经 HindIII、BstEII 酶切, 1% 低熔点胶回收 5.4kb 片段。这两条片段进行连接即得到 pHZ01 (526Fab)。

1.5 嵌合 Fab 片段在大肠杆菌中的表达

将重组质粒转化大肠杆菌阳性克隆接种于 LB 培养基中, 28℃ 振荡培养过夜, 按 1% 的量接种到新鲜的 LB 培养基中, 28℃ 继续培养至 $OD_{600nm} = 0.5$, 升温至 42℃ 热诱导 4h, 离心, 保存上清液待分析, 细菌沉淀低渗破细胞, 离心, 上清液即为周质 (Periplasm) 样品。沉淀经超声波破碎细胞, 离心, 上清为可溶性胞质 (Cytoplasm) 部分。

1.6 SDS - PAGE 及 Western-blotting 分析

参照文献 [10] 的方法进行。

1.7 ELISA 分析

按常规方法进行。

2 结果

2.1 嵌合 Fab 表达载体的构建

以质粒 pHZ01 (526Fab) 为模板, 用引物 HuCKFORNot 和 VHBACK 进行 PCR 扩增得到 1.5kb 的扩增片段, 用 VHBACK 和 HuIgGCHFOR 引物扩增得到 700bp 的扩增片段, 用 VKBACK 与 HuCKFORNot 引物进行扩增得到 700bp 的扩增片段, 用 Reverse JH 与 JKFOR 引物扩增得到 750bp 的扩增片段 (图 1), 说明在质粒 pHZ01 (526Fab) 中含有 Fab 基因, 它的各个元件的插入方向正确。

2.2 抗溶菌酶嵌合 Fab 片段的表达

pHZ01 (D1.3Fab) 温度诱导表达 4h, 菌

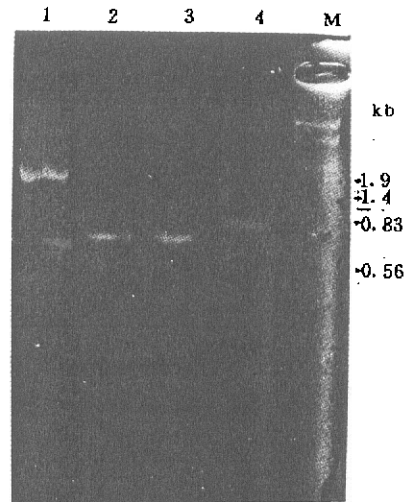


图 1 表达载体 pHZ01 (526Fab) 的 PCR 鉴定

Fig.1 Identification of expression vector pHZ01 (526Fab) by PCR
M λ /Hind III, EcoRI; 1.526 Fab; 2.526 Chimeric Fd; 3.526 Chimeric κ chain; 4.HuCH1-Fab linker-526VK

体裂解液（包括周质与胞质成分）进行 ELISA 检测，从图 2 上可见，它与 HEL 的结合能力明显高于与其它几种抗原的结合能力，表明它具有特异结合溶菌酶的活性。

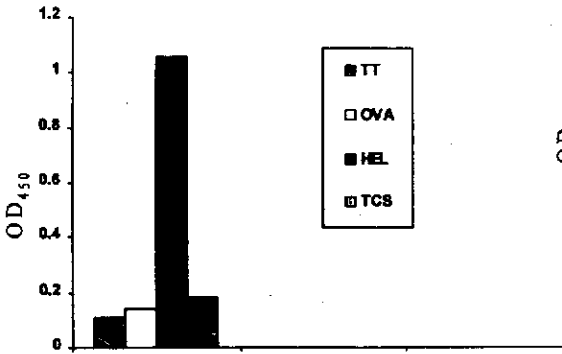


图 2 温度诱导表达的 D1.3 嵌合 Fab 与抗原的结合
Fig.2 Antigen specificity of temperature induced D1.3 chimeric Fab

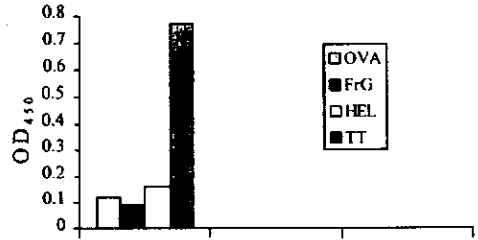


图 3 温度诱导表达的 2F3A8 嵌合 Fab 与抗原的结合
Fig.3 Reactivity of temperature induced 2F3A8 chimeric Fab with antigens

2.3 抗 TT 嵌合 Fab 片段的表达

同上将 pHZ01 (2F3A8) 温度诱导表达产物进行 ELISA 检测。从图 3 可见它与 TT 的结合能力明显高于与 OVA, FrG, HEL 的结合。图 4 为 pHZ01 (2F3A8Fab) 表达产物的 Western-blotting 结果，从行 3 可见在 LB 培养基中表达产物的 Fd 与 κ 链条带，从行 2 可见在 SB 培养基中轻链的表达量很高，而 Fd 则较少。

2.4 抗 PSA 嵌合 Fab 片段的表达

从图 5 可见，pHZ01 (526Fab) 转化大肠杆菌的温度诱导表达产物经 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色，在箭头所指的分子量 24kDa 左右的位置显示出了明显的产物条带。

2.5 细菌表达抗 PSAFab 片段的抗原结合活性检测

表 1 表明表达达到周质和胞内的 526Fab 能与 PSA 特异结合，而与 FyG、OVA 和 HEL 反应则很弱，说明表达的嵌合 Fab 具有特异的抗原结合能力。

3 讨论

在 pJLA503 中有一高效的核糖体结合顺序 atpE TIR 可大大促进外源基因的表达，但表达水平过

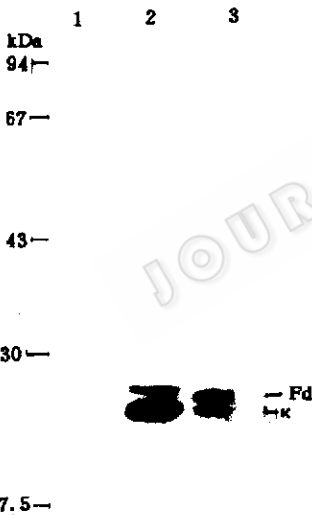


图 4 pHZ01 (2F3A8 Fab) 温度诱导表达产物 Western-blotting 结果
Fig.4 Western-blotting result of the temperature induced expression products of pHZ01 (2F3A8 Fab)
1. Control: expression products without 42°C induction
2. Expression products induced with 42°C for 4 h in SB medium
3. Expression products induced with 42°C for 4 h in LB medium

高, 往往会形成包含体 (Including body) 使之错误折叠, 从而影响其活性, 并会造成轻、重链表达的不平衡, 所以我们在构建抗体温度诱导表达载体时去掉了这一部分。

我们在表达 Fab 时, 对表达条件进行了研究, 分别采用 SB、LB、2YT、2YT + 1% Glu 培养基, 结果发现 LB 培养基效果最为理想, 在营养高度丰富的 SB 培养基中, 抗体片段表达的总量高出其它培养基, 但其抗原结合活性很低, Western-blotting 分析, 其轻链的表达高于 Fd (见图 4 行 2), 可能是两条片段表达不平衡造成折叠错误的结果。

对 Fab 非还原条件下的 Western-blotting 分析, 在轻链位置也出现一条带, 这可能是由于轻链的表达量略高于重链的结果。

据认为抗体 Fab 在大肠杆菌表达轻、重链的装配是通过前导肽作用分泌到周质在周质中形成二硫键而装配成的, 我们在周质与胞质部分都检测到了 Fab, 可能是由于低渗作用没有完全破开细胞壁, 周质部分没有完全释放出来, 也有可能是因为抗体轻、重链片段在胞质中也能装配成 Fab。

我们在细菌中表达了嵌合 Fab, 其表达量较高, 为从细菌中大量制备有功能的抗体片段打下了基础。嵌合 Fab 具有与正常 Fab 片段同样的抗原结合能力, 因其 CH1 与 CK 部分均为人源, 它比小鼠 Fab 具有更低的鼠源性, 有更好的应用前景。

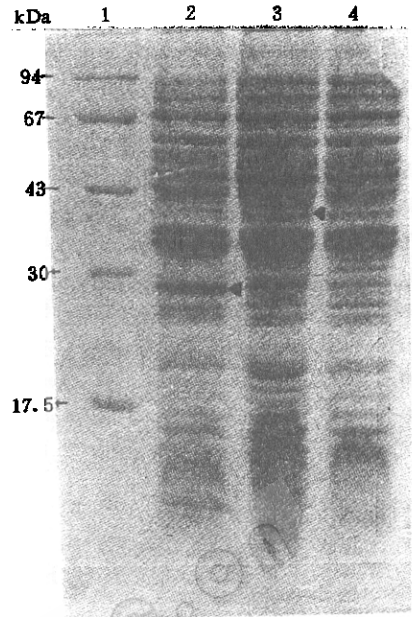


图 5 细菌表达产物 SDS-PAGE 电泳

Fig.5 SDS-PAGE assay of bacterial expression products

1. Molecular weight marker
2. pHZ01 (526 Fab)
3. Control: pHZ02 (526 ScFv-HuCK)
4. Control: pJLA503

表 1 526 嵌合 Fab 片段与抗原的结合反应

Table 1 Reactivity of 526 chimeric Fab with antigene

	OD ₄₅₀ (X ± SD)			
	OVA	FrG	HEL	PSA
Periplasmic Protein	0.21 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.71 ± 0.06
Cytoplasmic Protein	0.20 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.83 ± 0.05
Control (uninduced cytoplasmic)	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.24 ± 0.02

致 谢 衷心感谢英国 Winter G. 教授大力支持以及叶庆炜博士, 徐永华教授的

热情相助。

参 考 文 献

- [1] Winter G, Griffiths A D. *Ann Rev Immunol*, 1994, **12**: 433.
- [2] Murooka Y, Mitani I. *J Biotech*, 1985, **2**: 203.
- [3] Pluckthun A. *Immunol Rev*, 1992, **130**: 151.
- [4] Ward E S, Gussow D, Griffiths A D *et al.* 1989, **341**: 544.
- [5] Hoogenboom H R and Winter G. *J Mol Biol*, 1992, **227**: 381.
- [6] 管虹, 叶敏, 第六届中国细胞生物学会论文摘要, 1995, pp. 137.
- [7] Schauder B, Blocker H, Frank R *et al.* *Gene*, 1987, **52**: 279.
- [8] Hogenboom H R, Griffiths A D, Johnson K S *et al.* *Nucl Acid Res*, 1991, **19**: 4133.
- [9] Orlandi R, Gussow D H, Jones P T *et al.* *PNAS*, 1989, **86**: 3833.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Lab Press, 1989.

Temperature Induced Expression of Human-mouse Chimeric Fab

Zan Hong Ye Min

(*Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031*)

Abstract A temperature induced expression vector with λ P_RP_L promotor, pZH01, was constructed for the production of human-mouse chimeric antibody Fab with VH and VL from mouse and CH1 and CK from human. Antiprostate specific antigen (PSA) chimeric Fab, anti-tetanus toxoid (TT) chimeric Fab, and anti-lysozyme (HEL) chimeric Fab were efficiently expressed in bacteria system after induction at 42°C for 4 h. The three expressed chimeric Fabs all showed antigen-specific binding but not with the other three unrelated antigens in ELISA.

Key words Temperature induced expression, vector construction, chimeric Fab