

# 抗人黑色素瘤单链抗体基因在大肠杆菌中的融合表达

王字玲 邓健蓓 韩 骅 陈 萍 苏成芝

(第四军医大学生物化学及分子生物学教研室 西安 710032)

**摘 要** 应用 RT-PCR 技术从分泌抗人黑色素瘤单克隆抗体的杂交瘤细胞 HB8760 中克隆了抗体轻、重链可变区基因,用(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 连接肽基因将 V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> 连接成 ScFv 基因,并进行了序列测定。ScFv 基因全长 927bp,其中 V<sub>H</sub> 基因长 360bp,编码 120 个氨基酸,V<sub>L</sub> 基因长 324bp,编码 108 个氨基酸。在大肠杆菌融合表达载体 pGEX-4T-1 中表达了 GST-ScFv 融合蛋白,表达产量占菌体总蛋白的 29%。凝血酶消化后的产物具有黑色素瘤细胞结合活性。

**关键词** 单链抗体,克隆,表达,黑色素瘤

**分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0221-24

黑色素瘤恶性程度高,目前临床上主要是手术切除,放、化疗等,预后差。黑色素瘤的导向治疗主要是利用针对黑色素瘤相关抗原的单克隆抗体携带化疗药物、毒素、放射性核素等进行治疗,或交联酶进行前体药物治疗。但鼠源性抗体较强的免疫原性极大地限制了它的应用。而基因工程抗体,如单链抗体、双功能抗体等,克服了鼠源性单抗的主要缺点,有良好的应用前景<sup>[1-3]</sup>。

HB8760 为分泌鼠抗人黑色素瘤单克隆抗体的杂交瘤细胞株<sup>[4]</sup>,免疫组化实验证实,HB8760 可与黑色素瘤细胞结合,不与正常黑素细胞及良性黑痣结合<sup>[5]</sup>。所以我们用 RT-PCR 方法克隆了这株单抗的轻、重链可变区基因<sup>[6]</sup>,并连接成单链抗体基因,在大肠杆菌中进行表达,获得了有黑色素瘤结合活性的表达产物。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

LiBr:人黑色素瘤细胞株,金伯泉教授惠赠。无关抗体:鼠抗人 IL-8 单抗。

pGEX-4T-1:Pharmacia 公司产品,全长 4969bp,为含谷胱甘肽转硫酶(Glutathione S-transferase, GST)的融合表达载体。其他菌株及克隆载体均为本室保存。

反转录系统, Taq DNA 聚合酶, promega 公司产品。PCR 引物:鼠 Ig 重,轻链可变区 5'端和 J 区 3'端引物,由杨安钢副教授设计完成。

V<sub>H</sub>backw: 5'GTGAATTCATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG 3'

EcoR I

Pvu II

V<sub>L</sub>forw: 5'CAGTCGACTAAGGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC 3'

Sal I

Linker-primer mix: Pharmacia 公司产品

各种限制酶及其它有关分子生物学试剂均系 Boehringer Mannheim 公司、Pharmacia 公司或华美公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 ScFv 的组装:** 电泳回收的  $V_H$  和  $V_L$  基因片段与 Linker-primer mix 以相同或接近等摩尔浓度混合, 加入 dNTPs, Taq DNA 聚合酶, 进行 7 次循环, 反应条件为  $94^{\circ}\text{C}$  1min,  $63^{\circ}\text{C}$  4min。在上述反应体系中加入引物  $V_H$ backw 和  $V_L$ forw, 继续进行 30 次 PCR 循环, 条件为  $94^{\circ}\text{C}$  1min,  $55^{\circ}\text{C}$  2min,  $72^{\circ}\text{C}$  2min, 进行 ScFv 的扩增。

**1.2.2 GST-ScFv 重组表达质粒的构建:** 上述 PCR 产物经电泳回收 ScFv 基因片段, EcoRI + Sal I 消化, 与 pGEX-4T-1 连接, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 筛选含单链抗体基因插段的重组表达质粒 p4T-60Fv。

**1.2.3 ScFv 核苷酸序列的测定:** 经 EcoRI 和 Sal I 消化的 ScFv 片段克隆入 pUC19, 进行自动测序。

**1.2.4 GST-ScFv 基因的诱导表达:** 取过夜培养的细菌 1% 转接 2mL 含氨苄青霉素的 LB 液,  $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养 2~3h, 加入  $0.1\text{mol/L}$  IPTG  $5\mu\text{L}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养 4h, 取 1mL 菌液制备样品进行 SDS-PAGE 及 Western blot。其中一抗为羊抗 GST IgG, 二抗为 Sigma 公司的碱性磷酸酶标记的抗羊 IgG。

**1.2.5 表达产物的纯化:** 收集 100mL 诱导表达菌体, GTE 重悬并加入适量溶菌酶搅拌, 加入  $100\mu\text{L}$  脱氧胆酸钠 ( $40\text{mg/mL}$ ), 混匀至溶液粘度变低。离心后沉淀为包涵体, 用含  $0.5\%$  Triton X-100 的 STE 和含  $3.5\text{mol/L}$  脲的 TE 溶液洗涤数次, 经  $6\text{mol/L}$  盐酸胍缓冲液变性和精氨酸复性液复性后, 用 GST 亲和色谱柱纯化。收集洗脱峰, SDS-PAGE 分析。纯化产物用质量分数为  $0.2\%$  凝血酶切下 GST 蛋白。

**1.2.6 结合活性的测定(竞争结合抑制试验):**  $1 \times 10^6$  LiBr 细胞经 PBS 洗涤后, 加 ScFv ( $0.1\text{mg/mL}$ )  $4^{\circ}\text{C}$  作用 45min 后, 加等量的亲本抗体作用 45min, 加荧光素 (FITC) 标记的羊抗鼠抗体作用 45min, 流式细胞仪检测标记荧光细胞的百分率和荧光强度。同时设立亲本抗体阳性对照和无关抗体阴性对照。

## 2 结果与讨论

### 2.1 ScFv 的组装

$V_H$ 、 $V_L$  基因片段回收并纯化后与连接臂 (Linker-primer) 等摩尔浓度混合, 经过 7 次循环, 进行重叠延伸反应 (Overlap extension), 得到  $V_H$ -Linker- $V_L$  (ScFv), 其中 Linker 长度为 45bp。然后再以此为模板进行加端 PCR, 结果如图 1 所示, 可见扩增产物大小符合预期结果, 约为 730bp, 没有明显非特异条带。

### 2.2 ScFv 基因序列的测定

将含 ScFv 插段的 pUC19 质粒纯化后进行序列测定。核苷酸序列见图 2。基因全长为 729bp, 包括预期的  $V_H$ 、 $V_L$

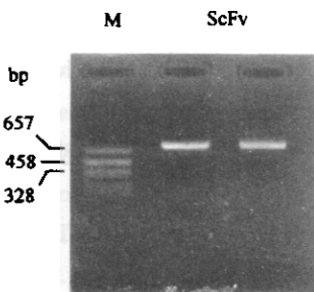


图 1 ScFv 基因的 PCR 扩增  
Fig. 1 Amplification of ScFv gene

和 linker 序列,  $V_H$  处于 linker 的上游,  $V_L$  处于 linker 的下游。

```

CAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AAG CCA GGG GCC TCA GTC AAG
TTG TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC ACC TAT ATG CAC TGG GTG AAG
CAG AGG CCT GAA CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AAT GGT AAT
ACT AAA TAT GAC CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATA ACA GCA GAC ACA TCC TCC
AAC ACA GCC TAC CTG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC
TGT GCT AGA TAC TAT AGG TAC CCT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC
ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC
GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA GCC ATC CTG TCT GTG ACT CCA GGA GAA
ACG GTC AGT CTT TCC TGT AGG GCC AGC CAG ACT ATT TAC AAG AAC CTA CAC TGG TAT
CAA CAG AAA TCA CAT CGG TCT CCA AGG CTT CTC ATC AAG TAT GGT TCT GAT TCC ATC
TCT GGG ATC CCC TCC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TAC ACT CTC AAT
ATC AAC AGT GTG AAG CCC GAA GAT GAA GGA ATA TAT TAC TGT CTT CAA GGT TAC AGT
ACA CCT TGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGT

```

图 2 ScFv 基因的核苷酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence of ScFv gene

### 2.3 GST-ScFv 融合表达质粒的构建

ScFv 的加端 PCR 产物, 以 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后, 插入经相同酶切的融合表达载体 pGEX-4T-1 中, 转化大肠杆菌 JM109, 酶切鉴定, 筛选含 730bp 插段的阳性克隆, 结果见 8 个克隆均含有插段。选取其中一个再用 *Kpn* I + *EcoR* I 酶切, 切出了 310bp 的片段。说明插入的为 ScFv 基因。

### 2.4 p4T-ScFv 的诱导表达

含 p4T-60Fv 重组表达质粒的菌株经 IPTG 诱导后, 与未诱导的同一菌株对照, 在 SDS-PAGE 电泳图上出现一新生蛋白带, 大小约为 52kD, 与预计的 GST + ScFv 大小一致。光密度扫描结果显示, GST-ScFv 融合蛋白占菌体总蛋白的 29%。以 anti-GST 做 Westernblot, 在 52kD 处有一显色条带。见图 3、图 4。

### 2.5 ScFv 与黑色素瘤细胞结合活性的测定

重组蛋白表达质粒经 IPTG 诱导后, 表达的蛋白为不溶性包涵体。取细菌沉淀, 用 3.5mol/L 的脲洗涤后, 强变性剂使之完全溶解, 再经复性后取上清液进行 GST 亲和色谱纯化。纯化后的蛋白在 SDS-PAGE 上为单一的条带。GST-ScFv 凝血酶消化的产物经免疫荧光竞争实验, 流式细胞仪测定, 显示 ScFv 封闭靶细胞 LiBr 后, 再加亲本抗体, 其细胞荧光标记率大大降低。荧光标记细胞的阳性率: 无关抗体为 1.7%, ScFv 封闭后再加亲本抗体为 16%, 单纯亲本抗体 99.8%。说明 ScFv 能与靶细胞结合, 封闭了结合位点。

免疫组化实验已经证实, 此抗人黑色素瘤单克隆抗体可与黑色素瘤细胞结合, 而不与黑色素细胞及良性黑痣结合<sup>[5]</sup>。作者将此 ScFv 基因作了可溶性表达, 结果表明 ScFv 能与黑色素瘤细胞结合, 不与肝癌, 胃癌细胞结合(详细结果将在《中国生物化学与分子生物学

杂志》上报告)。说明 ScFv 与黑色素瘤细胞的结合具有特异性。

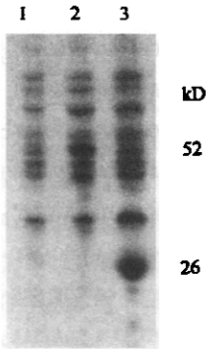


图 3 p4T-60Fv 诱导后 SDS-PAGE  
Fig. 3 SDS-PAGE of induced p4T-60Fv  
1. Uninduced; 2. GST + ScFv; 3. GST

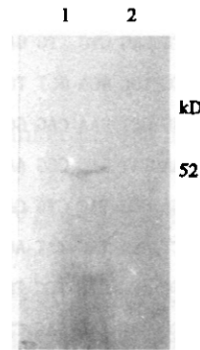


图 4 GST-ScFv 融合蛋白 Western-blot  
Fig. 4 Western-blot of GST-ScFv  
1. GST + ScFv; 2. Uninduced

### 参 考 文 献

- [1] T. M. Johnson, J. W. Smith, B. R. Nelson. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2nd 1995, 32: 689~707.
- [2] Newton-Bishop-JA; *Cancer. Surv.* 1996, 26: 321~333.
- [3] D. Neri, P. G. Natali, H. Petrucci *et al.* *J. Invest. Dermatol.* 1996, 107(2): 164~170.
- [4] L. A. Levy, H. M. Lee, R. T. Kawahata *et al.* *Clin. Exp. Immunol.* 1984, 56: 114~120.
- [5] 田 方, 金伯泉, 黄传书等. 单克隆抗体通讯, 1991, 7(4): 21~24.
- [6] 王字玲, 邓健蓓, 韩 骅等. 第四军医大学学报, 1997, 18(3): 225~227.

## Expression of an Anti-human Melanoma Single-chain Fv Gene

Wang Ziling Deng Jianbei Han Hua Yao Libo Su Chengzhi

(Dept. Biochemistry and Molecular Biology, the 4th Military Medical University, Xi'an 710032)

**Abstract** Malignant melanomas, seen mostly on the skin, originate mainly from epithelial melanocytes. Effects of conventional treatment such as surgical removal, radiotherapy, and chemotherapy are far from satisfactory. Recent developments in genetic antibodies have made it possible to use engineered antibodies in immunotherapy. Here we report a study on the cloning and expression of an anti-human melanoma single-chain antibody gene. The VH and VL gene were amplified from a mouse anti-human melanoma hybridoma cell line HB8760 by RT-PCR. The heavy and light chain variable regions were connected as ScFv by a flexible linker, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. We expressed the ScFv in a fusion protein expression vector pGEX-4T-1. SDS-PAGE and Western blotting data confirmed that the molecular weight of the fusion protein was 52kd in the form of insoluble inclusion body. Denaturation and renaturation of the fusion protein were also performed. The purification was performed by affinity chromatography. Then the purified protein was digested with thrombin and the activity of the ScFv was detected by flowcytometry. The result showed that the obtained ScFv protein had good affinity to melanoma cell line but not liver or stomach carcinoma cell line.

**Key words** Single-chain antibody, gene cloning, melanoma