

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)07-0581-04

人源抗 HER2 单链抗体/轻链恒定区/鱼精蛋白截短体融合蛋白的基因构建、表达及活性鉴定

王 凯¹ 温伟红² 王 涛¹ 张 瑞¹ 秦炜炜¹ 雷小英¹ 杨安钢²(第四军医大学基础部¹ 生物化学与分子生物学教研室,²免疫学教研室 陕西 西安 710033)

Construction and expression of human anti-HER2 ScFv/Ck/tP fusion protein in *E. coli* and identification of its activity

WANG Kai¹, WEN Wei-Hong², WANG Tao¹, ZHANG Rui¹, QIN Wei-Wei¹, LEI Xiao-Ying¹, YANG An-Gang²¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, ²Department of Immunology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To construct a fusion protein gene of human anti-HER2 ScFv/light chain constant region/truncated protamine (ScFv/Ck/tP) and analyze the binding activity of the expressed protein. **METHODS:** Two pairs of oligonucleotide primers were designed and used to amplify the ScFv and the Ck gene. After they were linked as ScFv/Ck, the synthesized tP coding sequence was added in the 3' terminus of it, then the fusion protein gene ScFv/Ck/tP was cloned into expression vector pET32a and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Expressed protein was detected by SDS-PAGE and Western Blot and purified by Ni-NTA chelating agarose. The antigen-binding activity of the ScFv/Ck/tP fusion protein was confirmed by cellular ELISA, and the DNA binding ability was confirmed by gel shift assay. **RESULTS:** Restriction endonuclease digestion and DNA sequencing proved that ScFv/Ck/tP was correctly cloned into expression vector. SDS-PAGE and Western Blot analysis showed that ScFv/Ck/tP fusion protein was successfully expressed in *E. coli* BL21. Cellular ELISA confirmed that it had specific antigen binding activity; gel shift assay assured that it had DNA binding ability. **CONCLUSION:** The ScFv/Ck/tP fusion protein expressed in *E. coli* could specially bind with both HER2 antigen and DNA.

【Keywords】 HER2; single chain antibody; protamine

【摘要】目的 构建人抗 HER2 单链抗体(ScFv)/人轻链恒定区(Ck)/鱼精蛋白截短体(tP)融合蛋白基因,在大肠杆菌中表达、纯化并分析该融合蛋白的活性。方法:设计引物扩增人抗 HER2 单链抗体 e23sFv 基因和轻链恒定区编码序列(Ck),连接成 ScFv/Ck 片段,人工合成 tP 序列,连接于 ScFv/Ck 末端,构建成 ScFv/Ck/tP 融合基因,将其克隆入原核表达载体 pET32a 后,在大肠杆菌 BL21(DE3)lysS 中诱导表达,表达产物经 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定后,用 Ni-NTA 螯合层析介质纯化。细胞 ELISA 分析 ScFv/Ck/tP 融合蛋白抗原亲和力,凝胶迁移实验检测 ScFv/Ck/tP 融合蛋白与 DNA 的结合活性。结果:成功构建了人抗 HER2 ScFv/Ck/tP 融合基因,经 IPTG 诱导后在大肠杆菌中实现了可溶性表达。表达的 ScFv/Ck/tP 融合蛋白保持了与抗原的结合活性,同时具有结合 DNA 的能力。结论:ScFv 与 Ck, tP 融合后,同时具有抗原和 DNA 结合活性,为该 ScFv 用于 HER2 阳性肿瘤的靶向基因治疗奠定了基础。

【关键词】 HER2 单链抗体 鱼精蛋白

【中图分类号】 R392.116 **【文献标识码】** A

0 引言

HER2 是癌基因 *erbB2/neu* 的表达产物,在乳腺癌、卵巢癌等多种人类肿瘤细胞中高度表达,是目前公认的肿瘤细胞表面的特异性标志分子^[1-2]。单链抗体(single chain variable fragment ScFv)和亲代抗体相比,具有分子小、穿透力强、免疫原性低的特点,日益成为诊断和治疗的良好导向载体^[3-4]。鱼精蛋白是一种碱性蛋白,能与核酸结合^[5]。鱼精蛋白截短体(truncated protamine tP)是一段长 22 个氨基酸的短肽,它保留了富含碱性氨基酸的序列,同样具有核酸结合功能。我们将抗 HER2 ScFv 基因和 tP 编码序列融合,同时为了避免 ScFv 和 tP 之间空间结构的相互影响,在其间插入了一段轻链恒定区编码序列(kappa light chain constant region, Ck),以期获得同时具有抗原和核酸结合活性的 ScFv/Ck/tP 融合蛋白,核酸与该融合蛋白结合后,在其引导下,有望实现核酸的靶向输送,旨在为该 ScFv 在 HER2 阳性肿瘤的靶向基因治疗的应用中奠定基础。

收稿日期 2006-10-27; 接受日期 2006-11-13

基金项目 国家重点基础研究发展(973)计划项目(2004CB518805);

国家自然科学基金(30370314, 30400379)

通讯作者 杨安钢. Tel (029)84774528 Email agyang@fmmu.edu.cn

作者简介 王 凯. 硕士生(导师杨安钢). Tel (029)84774516 Ext. 14

Email waunkai@163.com

1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pCMV-e23sFv-PEII-GrBa^[6], pComb3H-Fab15, pUC19, pET32a; 大肠杆菌 DH5 α , BL21(DE3) LysS 和 HER2 阳性的人胃癌细胞系 SGC7901(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室) 限制性内切酶、连接酶(日本 TaKaRa 公司); IPTG(美国 Promega 公司); 质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒(合肥优晶生物技术有限公司); HiTrap Ni-NTA 螯合层析介质(美国 Invitrogen 公司); δ His mAb(德国 Qiagen 公司); HRP-羊抗鼠 IgG(武汉博士德生物有限公司); ECL 化学发光试剂盒, BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司); RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司); 标准胎牛血清(中国医学科学院生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 引物和 tP 编码序列寡核苷酸的设计与合成 设计扩增 ScFv 基因的引物 S5 : 5'-ttt gaattcgacgtc-cagctgaccagctct-3', S3 : 5'-ttt ctcgagggagacggtagcgtggtc-cc-3' 在两端引物中分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线部分)。扩增 Ck 序列的引物 Ck5 : 5'-ttt ctcgag actgtggtcgcaccatctgt-3', Ck3 : 5'-ttt tctaga ctaacactctcccctgttga-3' 在两端引物中分别引入 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点(下划线部分)。tP 编码序列寡核苷酸合成 tP1 : 5'-ctaga cgcagccagagccggagcagatattac-gccagagacaaagaagtcgcagacgaaggagcggagc gc-3', tP2 : 5'-tgcgtcggtctcggcctctctataatggcgtctctgtttctcagcgtctgctt cctcgcctcg cgcgg-3' 寡核苷酸链的两端带有 *Xba* I 和 *Not* I 酶切位点的粘端序列(下划线部分), 能够直接与经 *Xba* I 和 *Not* I 酶切的载体连接。引物和寡核苷酸由北京奥科生物技术有限公司合成。

1.2.2 ScFv/Ck/tP 融合基因重组表达载体的构建及鉴定 分别以 pCMV-e23sFv-PEII-GrBa 和 pComb3H-Fab15 质粒为模板, S5, S3 和 Ck5, Ck3 为引物 PCR 扩增 ScFv 和 Ck 片段, 产物经相应的酶切后, 一起克隆入 pUC19 质粒, 并进行序列测定, 测序正确后的质粒命名为 pUC19-ScFv/Ck。将合成的两条 tP 编码序列寡核苷酸链缓慢退火后, 与从 pUC19-ScFv/Ck 质粒用 *EcoR* I 和 *Xba* I 切下的 ScFv/Ck 片段一起连接入经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切的 pET32a 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 后, 筛选阳性克隆, 酶切鉴定, 对酶切鉴定正确的克隆交由北京奥科生物技术有限公司测序, 将测序正确的质粒命名为 pET32a-ScFv/Ck/tP。

1.2.3 ScFv/Ck/tP 融合基因的诱导表达及鉴定 将鉴定正确的重组质粒 pET32a-ScFv/Ck/tP 转化大

肠杆菌 BL21, 挑取单克隆, 接种于含有氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 次日以 1:100 接种, 37 $^{\circ}$ C 培养至 $A_{600\text{nm}}$ 达 0.6 左右, 加入 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L, 诱导培养 3 h, 取 5 mL 未诱导及诱导菌液离心收集菌体, 以 100 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0) 重悬, 超声裂菌后离心, 取少量上清加入等量 2 \times SDS 上样缓冲液, 沉淀重悬于适量 1 \times SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 离心后取上清进行 SDS-PAGE 分析, 凝胶薄层扫描分析蛋白表达情况。同时对表达产物进行 Western Blot 鉴定, 蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后电转移到硝酸纤维素膜, 以 5 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 依次加入鼠抗 δ His mAb (1:1000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:5000 稀释, 室温 1 h), 用化学发光试剂盒于暗室条件下 X 光片感光显影。

1.2.4 表达产物的分离纯化 取 200 mL 诱导菌离心后收集菌体, 用 100 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0) 重悬, 冰浴中温和超声 6 次(每次 2 min, 间隔 10 s) 破碎菌体, 4 $^{\circ}$ C, 10 000 g 离心 5 min, 收集上清过 0.45 μ m 滤膜, 用镍-次氨基三乙酸(Ni²⁺-NTA) 螯合层析介质室温结合 1 h, 用洗涤缓冲液(100 mmol/L Tris · HCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗涤 5 次后, 分别用含 100, 200, 500 mmol/L 的咪唑洗脱缓冲液洗脱。各取少量不同组洗脱液加入等量 2 \times SDS Loading Buffer, 煮沸 5 min, 离心后取上清进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 表达产物的抗原结合活性检测 采用细胞 ELISA 的方法。胰酶消化生长铺满的 SGC7901 细胞, 重悬于含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 调整细胞密度为 5 \times 10⁵/L, 以 100 μ L/孔加入 96 孔细胞培养板, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养 24 h, 细胞充分贴壁生长。40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 3 次。每孔加入 100 μ L 含 30 mL/L H₂O₂ PBS, 室温反应 20 min, PBS 洗 3 次。在细胞包被孔中分别加入不同稀释度的蛋白样品, 每孔 100 μ L, 设复孔, 阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 依次加入鼠抗 δ His mAb (1:1000 稀释), HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:5000 稀释) 孵育, TMB 显色, 终止反应后测定各孔 $A_{450\text{nm}}$ 值。

1.2.6 表达产物的 DNA 结合活性检测 采用凝胶迁移阻滞实验。将 1 μ g 质粒 DNA 分别与不同量的 ScFv/Ck/tP 融合蛋白于 0.2 mol/L NaCl 溶液中室温孵育 30 min, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离, 观察结果。

2 结果

2.1 重组表达载体的构建及鉴定 PCR 分别扩增

出长度为 720 bp 的抗 HER2 ScFv 基因片段(图 1A)和长度为 330 bp 的 Ck 片段(图 1B),与预期长度一致,克隆入 pUC19 载体后经测序证实序列与设计序列完全相符。用 *Eco*R I 和 *Xba* I 切下 ScFv/Ck 片段后,与合成的 tP 寡核苷酸退火产物一同连接入经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切的 pET32a 载体,重组质粒经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后,出现长度为 1130 bp 左右的片段(图 1C),与预期的 ScFv/Ck/tP 片段长度一致,经测序证实序列与设计序列完全相符,表明重组原核表达质粒构建成功。

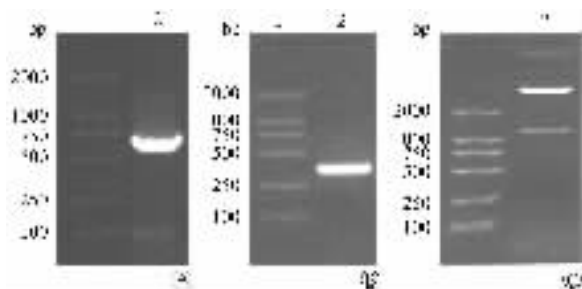


图 1 ScFv 基因, Ck 编码序列 PCR 扩增产物和重组质粒的酶切鉴定结果

2.2 ScFv/Ck/tP 融合蛋白的诱导表达及鉴定 与空载体相比,经 0.5 mmol/L IPTG 诱导后细菌裂解上清及沉淀中均出现 M_r 约为 60 ku 的新生蛋白带,与预期的 ScFv/Ck/tP 融合蛋白 M_r 相符。光度扫描显示目的蛋白的表达量占上清蛋白的 48.8%。经 Western Blot 分析证实,新生蛋白带即为带有 6 His 标签的 ScFv/Ck/tP 融合蛋白,提示目的蛋白表达成功,且以可溶性表达为主(图 2)。

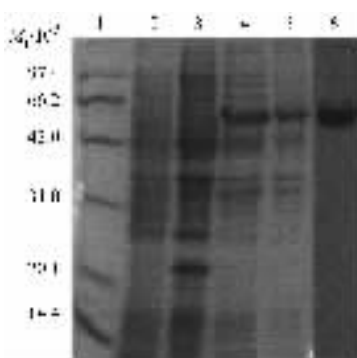


图 2 ScFv/Ck/tP 融合蛋白的 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析

2.3 ScFv/Ck/tP 融合蛋白的纯化 SDS-PAGE 显示 ScFv/Ck/tP 融合蛋白得到有效纯化,经薄层扫描分析纯度分别达到 90% 以上(图 3)。用 BCA 法测定纯化蛋白的平均浓度分别为 400 μ g/mL。

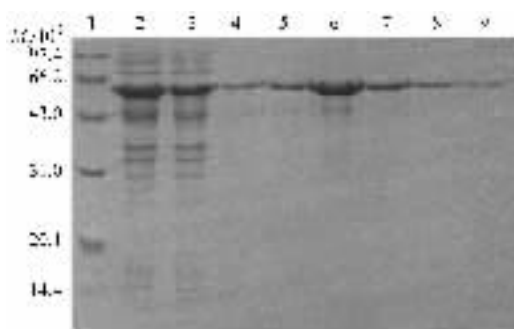


图 3 ScFv/Ck/tP 融合蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

2.4 ScFv/Ck/tP 融合蛋白的抗原结合活性检测

细胞 ELISA 检测结果显示,随着稀释度的增加,ScFv/Ck/tP 融合蛋白与抗原的结合减弱,提示表达的融合蛋白能与 SGC7901 细胞表面的 HER2 抗原特异性结合,并且与 ScFv 相比,ScFv/Ck/tP 融合蛋白的结合活性无明显差别,说明 Ck tP 的融合对 ScFv 的结合活性没有显著影响(图 4)。

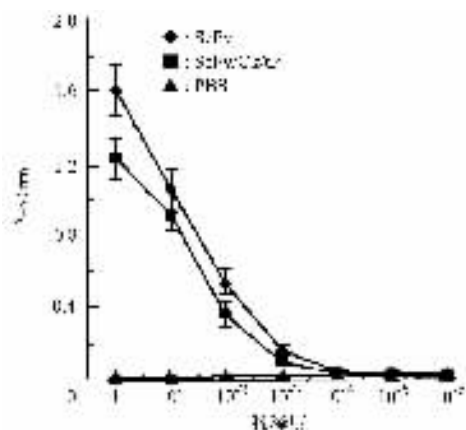


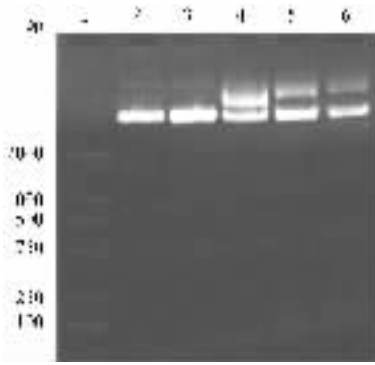
图 4 ScFv/Ck/tP 融合蛋白抗原结合活性的 ELISA 检测

2.5 ScFv/Ck/tP 融合蛋白的 DNA 结合活性检测

凝胶迁移阻滞实验结果显示,ScFv/Ck/tP 融合蛋白与质粒 DNA 作用后,可以使 DNA 的迁移速率变慢,并且 ScFv/Ck/tP 融合蛋白含量越高, DNA 的迁移速率越慢,提示该融合蛋白能够与 DNA 结合(图 5)。

3 讨论

HER2 分子是与肿瘤生长、侵袭、转移有关的重



1: DL2000 marker; 2: 1 μ g 质粒 DNA; 3: 1 μ g 质粒 DNA + 10 μ g ScFv; 4: 1 μ g 质粒 DNA + 1 μ g ScFv/Ck/tP; 5: 1 μ g 质粒 DNA + 4 μ g ScFv/Ck/tP; 6: 1 μ g 质粒 DNA + 10 μ g ScFv/Ck/tP.

图5 凝胶迁移实验检测 ScFv/Ck/tP 融合蛋白与 DNA 结合活性

要分子,在多种肿瘤中高度表达且与患者预后密切相关,是目前公认的肿瘤细胞表面的特异性标志分子^[1-2]。研究证实,以 HER2 分子为靶点的导向生物治疗,能够抑制多种肿瘤恶性表型,对肿瘤进行有效控制^[7]。完整抗体分子因其较强的免疫原性和较弱的组织穿透性,临床应用受到限制。ScFv 将抗体重链可变区和轻链可变区通过一段柔性短肽连接起来,由于只保留了 V 区,免疫原性大大降低,同时由于没有 Fc 段,不能与非靶细胞的 Fc 受体结合,减少了抗体的非特异性结合而更集中到达特定部位,因而成为导向药物的理想载体^[3-4]。ScFv 可与其他效应分子融合构建多种具有双重功能的分子,最常见的如免疫毒素、双特异抗体、放射性同位素标记的 ScFv 等^[8]。目前,部分 ScFv 及其衍生物已进入临床 I、II 期试验阶段^[9]。

鱼精蛋白最初发现于精子细胞,它能够把基因组 DNA 集中在精子的头部,保证遗传信息的传递^[4]。tP 也能够与 DNA 结合,这与它所具有的碱性氨基酸序列有关^[5]。我们将抗 HER2 ScFv 与 tP 融合,同时为了避免两个结构域之间空间结构的相互影响,又在两个基因之间插入了一段 Ck,以期获得既有抗原结合活性,又同时具有 DNA 结合活性的 ScFv/Ck/tP 融合蛋白,DNA 与 ScFv/Ck/tP 融合蛋白结合后可以在 ScFv 引导下到达特定组织,并在特定组织内表达,不仅可以降低免疫原性,还可直接在体内获得有活性的蛋白,将更有利于进一步应用^[10]。

目前,单链抗体表达主要的宿主体系为大肠杆菌,由于大肠杆菌遗传背景清楚、培养操作简单、成本低廉,加之小分子抗体不存在 Fc 段糖基化修饰问题,故较适合小分子抗体的表达。我们将重组的 pET32a-ScFv/Ck/tP 表达载体转化大肠杆菌 BL21,经 IPTG 诱导后 ScFv/Ck/tP 融合蛋白以可溶性表达为主,表达量占上清蛋白的 40% 以上,利用载体 pET32a 上的 6 His 融合标签,我们采用 Ni^{2+} -NTA 螯合层析介质成功的从表达菌裂解上清中纯化出了高纯度的融合蛋白。和 ScFv 相比,ScFv/Ck/tP 融合蛋白与 HER2 抗原的亲合活性没有显著差别,同时具有 DNA 结合活性,为该 ScFv 用于靶向输送 DNA 或 siRNA 的研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Kumar R, Yarmand-Bagheri R. The role of HER2 in angiogenesis [J]. *Semin Oncol*, 2001, 28(5 Suppl 16): 27-32.
- [2] Baxevasis CN, Sotiropoulou PA, Sotiriadou NN, et al. Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(3): 166-175.
- [3] Suzuki M, Takayanagi A, Shimizu N. Targeted gene delivery using humanized single-chain antibody with negatively charged oligopeptide tail [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(5): 424-429.
- [4] Junghans M, Kreuter J, Zimmer A. Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles [J]. *Nucleic Acid Res*, 2000, 28(10): 45.
- [5] Li X, Stuckert P, Bosch I, et al. Single-chain antibody-mediated gene delivery into ErbB2-positive human breast cancer cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(8): 555-565.
- [6] Zhao J, Zhang LH, Jia LT, et al. Secreted antibody/granzyme B fusion protein stimulates selective killing of HER2-overexpressing tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(20): 21343-21348.
- [7] Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-P185 HER2 antibody for human cancer therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(2): 4285-4289.
- [8] Stockwin LH, Holmes S. The role of therapeutic antibodies in drug discovery [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(2): 433-436.
- [9] Lamers CH, Sleijfer S, Willemsen RA, et al. Adoptive immunogene therapy of cancer with single chain antibody [scFv(Ig)] gene modified T lymphocytes [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2004, 18(2): 809-812.
- [10] 孟艳玲, 温伟红, 薛茜, 等. 人抗 HBsAg 单链抗体/鱼精蛋白截短体融合蛋白基因的构建、表达及活性鉴定 [J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(15): 1349-1352.