

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)15-1349-04

# 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

孟艳玲<sup>1\*</sup>, 温伟红<sup>1\*</sup>, 薛茜<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 张巍<sup>1</sup>, 鲍炜<sup>1</sup>, 任君琳<sup>1</sup>, 贾林涛<sup>2</sup>, 王成济<sup>2</sup>, 杨安钢<sup>1</sup>(第四军医大学基础部:<sup>1</sup>免疫学教研室,<sup>2</sup>生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710033)

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

MENG Yan-Ling<sup>1\*</sup>, WEN Wei-Hong<sup>1\*</sup>, XUE Qian<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, BAO Wei<sup>1</sup>, REN Jun-Lin<sup>1</sup>, JIA Lin-Tao<sup>2</sup>, WANG Cheng-Ji<sup>2</sup>, YANG An-Gang<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Immunology, <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】** AIM: To construct a fusion gene of human anti-HBsAg ScFv/tP and analyze the binding activity of ScFv/tP fusion protein with the antigen and DNA after the protein was expressed and purified in *E. coli*. METHODS: Three oligonucleotide primers were designed and used to amplify the ScFv HBs15 gene. Coding sequence of tP was added in the 3' primer terminus. The ScFv/tP gene was amplified by PCR and cloned into expression vector pET-32a 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/tP fusion protein was confirmed by indirect ELISA, and the DNA binding ability was confirmed by EMSA. RESULTS: Restriction endonuclease digestion and DNA sequencing proved that ScFv/tP gene was correctly cloned into expression vector. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that ScFv/tP fusion protein was successfully expressed in *E. coli* BL21. Indirect ELISA assured that the fusion protein had antigen-binding activity, and EMSA confirmed that it had specific DNA binding activity. CONCLUSION: The anti-HBsAg ScFv/tP fusion protein expressed in *E. coli* could specially bind with both HBsAg

and DNA fragment.

**【Keywords】** single chain antibody; HBsAg; protamine

**【摘要】**目的 构建人抗 HBsAg 单链抗体(ScFv)/鱼精蛋白截短体(truncated protamine, tP)融合基因,在大肠杆菌中进行表达纯化并分析 ScFv/tP 融合蛋白的活性.方法 设计引物扩增人抗 HBsAg ScFv HBs15 基因,在其 3' 端引物引入 tP 的编码基因,PCR 扩增获得 ScFv/tP 融合基因,将其克隆入原核表达载体 pET-32a 后,在大肠杆菌 BL21(DE3) LysS 内诱导表达.表达产物经 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定后,用 Ni-NTA 螯合层析介质纯化.间接 ELISA 分析 ScFv/tP 融合蛋白的亲合活性,凝胶迁移阻滞实验检测 ScFv/tP 融合蛋白与 DNA 结合的情况.结果 成功获得人抗 HBsAg ScFv/tP 融合基因,经 IPTG 诱导后在大肠杆菌中表达,表达的 ScFv/tP 融合蛋白不仅保持了与 HBsAg 结合的能力,同时具有 DNA 结合活性.结论 ScFv 与 tP 融合后,同时具有与抗原和 DNA 结合的活性,为该 ScFv 的进一步应用奠定了基础.

**【关键词】** 单链抗体; 肝炎表面抗原; 乙型; 鱼精蛋白类**【中图分类号】** R392.116**【文献标识码】** A

## 0 引言

单链抗体(ScFv)相对于完整抗体具有免疫源性低、组织穿透力强的特点,日益成为诊断和治疗的良好导向载体<sup>[1-2]</sup>. 鱼精蛋白是一种碱性蛋白,能与 DNA 结合<sup>[3]</sup>,鱼精蛋白截短体(truncated protamine, tP)是一段长 15 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 DNA 结合功能<sup>[4]</sup>. 我们旨在将 ScFv 基因和 tP 编码序列融合,获得同时具有抗原结合活性和 DNA 结合活性的 ScFv/tP 融合基因, DNA 与该融合蛋白结合后,在其引导下,有望实现 DNA 的靶向输送,为该 ScFv 在乙型肝炎靶向治疗中的应用奠定基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 质粒 pEGFP-N3-HBs15<sup>[5]</sup>, pET-32a 载体,大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , BL21(DE3) LysS(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、连接酶及 IPTG(TaKaRa 公司);质粒小量提取试剂盒、

收稿日期 2005-11-24; 接受日期 2005-12-14

基金项目 国家重点基础研究发展(973)计划(2004CB518805);国家自然科学基金(30400379)

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

作者简介 孟艳玲. 助理实验师. Tel (029)84774531 Ext. 805 Email: wmengziyou@yahoo.com.cn. 温伟红, 博士生(导师杨安钢). Tel: (029)83374531 Ext. 805 Email wenweih@fmmu.edu.cn

\* 为共同第一作者.

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); $\delta$  His mAb(Qiagen 公司);HRP-羊抗鼠 IgG(武汉博士德生物有限公司);HBsAg 抗原(华美生物技术有限公司); $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP [北京福瑞生物技术公司];ECL 化学发光试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据已知的抗体序列设计相应的引物,序列为 SP5 5'-ttgaattcgagggtcagctggtagctc-3'; SP3 : 5'-tgtctctggcggaataatctgctccggetctggetgogctcagctcagattgattccacctgg-3'; SP3L : 5'-tttgcggccgcgctccgctcctctctgctcgcgactctttgtctctggcggaataatctg-3'。在 3' 端引物中引入了 tP 的编码序列(下划线部分),同时在两端引物中分别引入 *EcoR* I 与 *Not* I 的酶切位点。引物由北京奥科生物技术有限公司合成。

1.2.2 ScFv/tP 融合基因重组表达载体的构建及鉴定 以质粒 pEGFP-N3-HBs15 为模板,以 SP5 和 SP3 为引物进行 PCR 扩增,再以纯化的扩增片段为模板,以 SP5 和 SP3L 为引物进行 PCR 扩增,纯化第二轮扩增产物后用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,连接入表达载体 pET-32a 中,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后,筛选阳性克隆,酶切鉴定。对酶切鉴定正确的克隆进行序列测定,测序由北京奥科生物技术有限公司完成,测序正确的质粒命名为 pET32a-ScFv/tP。

1.2.3 ScFv/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/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℃ 过夜培养,次日以 1:100 接种,37℃ 培养至  $A_{600\text{nm}}$  达 0.6 左右,加入 IPTG 至终浓度分别为 0.01, 0.1 和 1 mmol/L,诱导培养 3 h,取 1 mL 未诱导及诱导菌液离心收集菌体,以 PBS 重悬,超声裂菌后离心,沉淀重悬于 1 mL/L Triton  $\times$ 100,各取少量上清和重悬后的沉淀加入等量 2  $\times$  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 分离后电转移至硝酸纤维素膜,以 5 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h,依次加入鼠抗 6-His mAb(1:1000 稀释,4℃ 孵育过夜),HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:2000 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 100 mL 诱导菌离心后收集菌体,用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)重悬,超声破碎菌体 6 次(每次 2 min,间隔 10 s),4℃,10 000 g 离心 5 min,收集上清过 0.45  $\mu$ m 滤膜,用

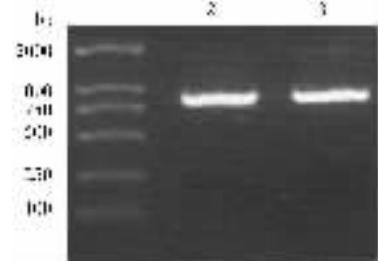
镍-次氨基三乙酸 ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA)螯合层析介质室温结合 1 h,用洗涤缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗涤 5 次后,分别用含 100, 200, 500 mmol/L 的咪唑洗脱缓冲液洗脱。各取少量不同组洗脱液加入等量 2  $\times$  SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min,离心后取上清进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 表达产物的抗原结合活性检测 间接 ELISA 法检测表达产物的抗原结合活性。用 HBsAg(10 mg/L)包被 ELISA 板,4℃ 过夜,加入不同稀释度的样品,37℃ 孵育 1 h,同时设空白和阴性对照,依次加入鼠抗 6 His mAb(1:1000 稀释),HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:2000 稀释)孵育,TMB 显色,终止反应后测定各孔  $A_{450\text{nm}}$  值。

1.2.6 凝胶迁移阻滞实验 采用 PCR 方法,用  $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP 标记 DNA 探针,探针序列为 HBsAg 片段,引物序列为 HBS5 5'-caactgtctctggttatcgc-3', HBS3 5'-aagccctacgaaccactgaa-3'。以 HepG2. 2. 15 细胞的 cDNA 为模板,以 HBS5 和 HBS3 为引物,进行 PCR 扩增,琼脂糖电泳后用胶回收试剂盒纯化,取 10 ng 标记探针分别与不同浓度的纯化蛋白于 0.2 mol/L NaCl 溶液中室温孵育 30 min,用 80 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,干胶, X 光片 -70℃ 压片 24 h,暗室显影。

## 2 结果

2.1 重组表达载体的构建及鉴定 PCR 及二次 PCR 分别扩增出长度为 800 bp 左右的基因片段(图 1)与预期大小一致。重组质粒经 *EcoR* I 与 *Not* I 双酶切后,出现长度为 800 bp 左右的片段(图 2),经测序证实序列与设计序列完全一致,表明重组原核表达质粒构建正确。

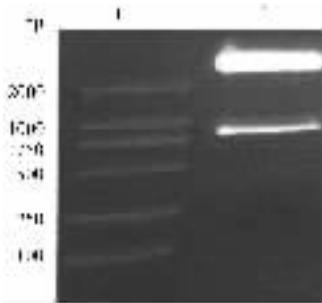


1 : marker DL2000 ; 2 , 3 : ScFv/tP 基因的 PCR 产物。

图 1 ScFv/tP 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 ScFv/tP 融合蛋白的诱导表达及鉴定 与未诱导菌相比,不同 IPTG 浓度诱导后细菌裂解上清及沉淀中均出现  $M_r$  约为 50 ku 的新生蛋白带,与预期的  $M_r$  相符,光度扫描显示目的蛋白的表达量分别占上

清蛋白的 51.1%、53.8% 和 61.8%。3 种诱导浓度对蛋白表达量影响不明显。经 Western blot 分析证实, 该条带即为带有 6 His 标签的 ScFv/tP 融合蛋白, 提示 ScFv/tP 融合蛋白表达成功, 且以可溶性表达为主 (图 3)。



1: marker DL2000; 2: EcoRI 和 NotI 双酶切后的 pET32a-ScFv/tP。

图 2 pET32a-ScFv/tP 质粒的酶切鉴定结果

ELISA 检测结果显示, 随着稀释度的增加, ScFv/tP 融合蛋白与 HBsAg 抗原的结合也增强, 提示 ScFv/tP 融合蛋白具有 HBsAg 结合活性 (图 5), 且此结合活性与 ScFv 无明显差别, 说明 tP 的融合对 ScFv 的结合活性没有明显影响。

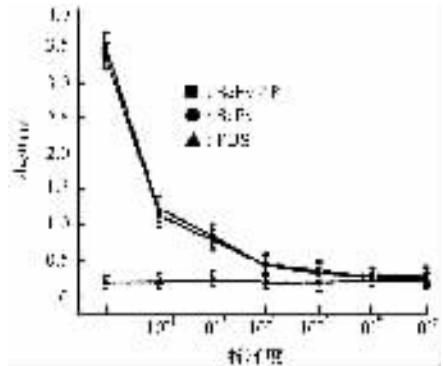


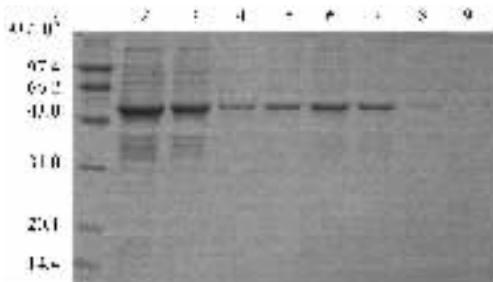
图 5 ScFv/tP 融合蛋白抗原结合活性的 ELISA 检测

2.5 凝胶迁移阻滞实验 ScFv/tP 融合蛋白与 DNA 作用后, 可以使 DNA 的迁移速度变慢, 并且随着 ScFv/tP 融合含量的增加, DNA 的迁移明显滞后, 提示该融合蛋白能够与 DNA 结合 (图 6)。

1: 中分子量蛋白 marker; 2: pET32a-ScFv/tP 未诱导菌; 3, 5, 7 分别用 0.01, 0.1, 1 mmol/L IPTG 诱导后的 pET32a-ScFv/tP 细菌裂解上清; 4, 6, 8 分别用 0.01, 0.1 和 1 mmol/L IPTG 诱导后的 pET32a-ScFv/tP 细菌裂解沉淀; 9: ScFv/tP 融合蛋白的 Western blot 结果。

图 3 ScFv/tP 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

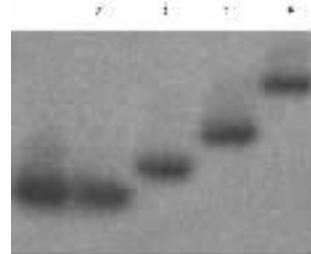
2.3 ScFv/tP 融合蛋白的纯化 SDS-PAGE 显示目的蛋白得到有效纯化, 经薄层扫描分析纯度达 90% 以上 (图 4), 用 BCA 法测定纯化蛋白的平均浓度为 150 mg/L。



1: marker; 2, 3: 与 Ni-NTA 结合前的细菌裂解上清; 4, 5: 100 mmol/L 咪唑洗脱液; 6, 7: 200 mmol/L 咪唑洗脱液; 8, 9: 500 mmol/L 咪唑洗脱液。

图 4 ScFv/tP 融合蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

2.4 ScFv/tP 融合蛋白的亲合活性检测 间接



1: 10 ng DNA 片段; 2: 10 ng DNA 片段 + 10 ng ScFv; 3: 10 ng DNA 片段 + 2 ng ScFv/tP; 4: 10 ng DNA 片段 + 4 ng ScFv/tP; 5: 10 ng DNA 片段 + 10 ng ScFv/tP。

图 6 检测 ScFv/tP 融合蛋白与 DNA 结合的迁移阻滞实验

### 3 讨论

较强的免疫源性和较弱的组织穿透性是阻碍 mAb 进入临床的关键问题。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, 免疫源性大大降低, 同时由于没有 Fc 段, 不能与非靶细胞的 Fc 受体结合, 更易集中到达特定部位, 有利于作为导向药物的载体<sup>[1-2]</sup>。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、双特异抗体等<sup>[6-7]</sup>。目前, 部分 ScFv 及其衍生物已进入临床 I、II 期试验阶段<sup>[8]</sup>。

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<sup>[3]</sup>。tP 也能够与 DNA 结合, 这与它所具有的碱性序列有

关<sup>[4]</sup>。我们将 ScFv 与 tP 融合,使其不仅具有抗原结合活性,同时具有与 DNA 结合的功能,DNA 与 ScFv/tP 融合蛋白结合后,可以在 ScFv 引导下到达特定组织,在特定组织内表达,不仅可以降低免疫源性,并且可直接在体内获得有活性的蛋白,将更有利于进一步的应用<sup>[9]</sup>。

大肠杆菌是目前用于表达有抗原结合活性的 ScFv, Fab 等片段小分子抗体的最常用表达系统。ScFv 在原核系统中的表达方式有胞质内表达和分泌性表达两种。胞质内表达可以是可溶性表达,也可能形成包涵体,可溶性表达产物大多具有良好的生物学活性<sup>[10]</sup>,而包涵体则需要经过变性、复性的复杂过程,并且所得产物通常没有生物学活性<sup>[11-12]</sup>。我们将重组的 pET-32a-ScFv/tP 表达载体转化大肠杆菌 BL21 经 IPTG 诱导后 ScFv/tP 融合蛋白主要以可溶性表达为主,表达量占上清蛋白的 50% 以上,利用载体 pET-32a 上的 6His 融合标签,我们采用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 螯合层析介质成功地从表达菌裂解上清中纯化出了高纯度的 ScFv/tP 融合蛋白,所纯化的 ScFv/tP 融合蛋白的 HBsAg 结合活性与 ScFv 相比没有明显差别,因此 tP 的融合对 ScFv 的结合活性没有明显影响。获得的 ScFv/tP 融合蛋白同时具有 HBsAg 和 DNA 结合活性,为该 ScFv 在靶向输送中的进一步应用奠定了基础。

## 【参考文献】

- [ 1 ] Aires da Silva F, Costa MJ, Corte-Real S, et al. Cell type-specific targeting with sindbis pseudotyped lentiviral vectors displaying anti-CCR5 single-chain antibodies [ J ]. Hum Gene Ther, 2005, 16( 2 ): 223 - 234.
- [ 2 ] 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.

- [ 3 ] Junghans M, Kreuter J, Zimmer A. Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles [ J ]. Nucleic Acids Res, 2000, 28( 10 ): e45.
- [ 4 ] Li X, Stuckert P, Bosch I, et al. Single-chain antibody-mediated gene delivery into ErbB2-positive human breast cancer cells [ J ]. Cancer Gene Therapy, 2001, 8( 8 ): 555 - 565.
- [ 5 ] 温伟红, 赵晶, 于翠娟, 等. 抗人 HBsAg 单链抗体基因的构建及其在 COS7 细胞中的表达 [ J ]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19( 2 ): 163 - 167.
- [ 6 ] Stockwin LH, Holmes S. The role of therapeutic antibodies in drug discovery [ J ]. Biochem Soc Trans, 2003, 31( 2 ): 433 - 436.
- [ 7 ] 赵强子, 刘彦仿, 襄科峰, 等. 抗肝癌单链抗体融合 PE38 重组免疫毒素的构建、表达及纯化 [ J ]. 第四军医大学学报, 2003, 24( 9 ): 809 - 812.
- [ 8 ] 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 ): 134 - 140.
- [ 9 ] Chen SY, Zani C, Khouri Y, et al. Design of a genetic immunotoxin to eliminate toxin immunogenicity [ J ]. Gene Ther, 1995, 2( 2 ): 116 - 123.
- [ 10 ] 陈藏, 李旭, 王莹, 等. 抗人肝细胞癌单链抗体基因的构建和表达 [ J ]. 第四军医大学学报, 2005, 26( 14 ): 1268 - 1271.
- [ 11 ] Hu X, O'Dwyer R, Wall JG. Cloning, expression and characterisation of a single-chain Fv antibody fragment against domoic acid in Escherichia coli [ J ]. J Biotechnol, 2005, 120( 1 ): 38 - 45.
- [ 12 ] Lombardi A, Sperandei M, Cantale C, et al. Functional expression of a single-chain antibody specific for the HER2 human oncogene in a bacterial reducing environment [ J ]. Protein Expr Purif, 2005, 44( 1 ): 10 - 15.

编辑 王睿

## 欢迎投稿 欢迎订阅

《第四军医大学学报》是国内外公开征稿和发行的高级综合性医学学术期刊,曾荣获首届国家期刊奖,第二届国家期刊奖提名奖和百种中国杰出学术期刊,是中国各大检索系统源期刊,《中文核心期刊要目总览》收入期刊,美国化学文摘(CA)和俄罗斯文摘杂志(AJ)源期刊。本刊主要刊载基础医学、临床医学、预防医学、军事医学、口腔医学、航空航天医学、中医中药学、生物医学工程学方面的研究原著、研究快报、经验交流、病例报告、综述和述评等各类学术性中文文稿。

地址 ( 710033 ) 西安市长乐西路 169 号

电话 ( 029 ) 84774674, 84773456, 84773804, 84773814

传真 ( 029 ) 84774499

http://journal.fmmu.edu.cn

Email: edjfmumu@fmmu.edu.cn