

# 抗肝癌人源化 Diabody 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定

孙志伟, 赵君, 王双, 俞炜源, 刘彦仿

孙志伟, 王双, 俞炜源, 军事医学科学院生物工程研究所 北京市 10071  
赵君, 刘彦仿, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室  
陕西省西安市 710032  
国家自然科学基金资助, No. 30171065  
项目负责人: 孙志伟, 100071, 北京市军事医学科学院生物工程研究所蛋白  
质工程研究室, szwyh@263.net  
电话: 010-66948819 传真: 010-63833521  
收稿日期: 2004-08-30 接受日期: 2004-10-11

## 摘要

**目的:** 构建人源化抗肝癌双价抗体, 并实现其在大肠杆菌中的可溶性表达。

**方法:** 缩短人源化抗肝癌单链抗体 hscFv<sub>25</sub> 的连接肽为 5 肽, 构建(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 基因, 克隆入原核表达载体后, 转化入大肠杆菌表达, 并纯化目的蛋白, 细胞 ELISA、免疫组织化学法检测其生物活性。

**结果:** 目的基因在大肠杆菌中得到了可溶性表达, 纯化蛋白的相对亲和力比亲本抗体提高了 10 倍左右, 对肝癌组织切片的免疫组织化学染色呈强阳性, 阳性率为 75%。

**结论:** 成功制备了人源化抗肝癌双价抗体, 该抗体具有较高的亲和力, 为进一步的临床研究奠定了基础。

孙志伟, 赵君, 王双, 俞炜源, 刘彦仿. 抗肝癌人源化 Diabody 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2740-2742  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2740.asp>

## 0 引言

Diabody 是单链抗体的二聚体形式, 相对分子质量大约  $M_r$  55 000 的双价抗体, 具有较高的亲和力和较强的穿透能力, 同时血清廓清时间又比较合适, 因此是比较理想的肿瘤放射免疫诊断和治疗载体<sup>[1]</sup>。我们已经制备了一株亲和力较好、特异性较高的人源化抗肝癌单链抗体 hscFv<sub>25</sub>, 该抗体具有良好的靶向定位功能<sup>[2]</sup>。我们将 hscFv<sub>25</sub> 的连接肽改成 5 肽(GGGGS), 构建人源化抗肝癌双价抗体基因并在大肠杆菌中对该基因进行可溶性表达研究, 目的获得高亲和力的人源化抗肝癌双价抗体(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub>, 为进一步的临床应用研究奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** *E.coli* BL21(DE3)菌株为本室保存。表达载体 pTIG 为军事医学科学院生物工程研究所赵志虎副研究员惠赠, 含促进可溶性表达的伴侣分子硫氧还蛋白基因(Trx), Trx 与下游抗体基因之间引入了翻译终止启动序列 TAAATG。IPTG、琼脂糖、SDS-PAGE 所用材料及限制性内切酶等, 购自 Sigma 公司。Taq DNA 聚合

酶和 T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品。PCR 引物由上海生物工程公司合成, 序列如下: P1: 5' -CGGAATTCTAAATGGAGCTACAGCTGGTTGA ATC-3' (V<sub>H</sub> 5' 端引物, 引入 *EcoR* I 酶切位点和终止启动序列 TAAATG); P2: 5' -CAGGAGCTCTGG AACTGGCCTGGCTT-3' (V<sub>H</sub> 3' 端引物, 3' 端引入 *SacI* 酶切位点); P3: 5' -CGGAGCTC GGAGGTGGAGGTTCTATGACCCAGACTCC ATCTCC-3' (V<sub>L</sub> 5' 端引物, 包含 5 肽 Linker 和引入的 *SacI* 酶切位点); P4: 5' -CCCAAGCTTACGCGTTCC AGCGGA TCCGG-3' (3' 端引物, 于模板上 V<sub>L</sub> 3' 端后面的检测标签 E-tag 相配对, 同时引入 *Hind* III 酶切位点)。

### 1.2 方法

**1.2.1 重链可变区(V<sub>H</sub>)、含 5 个连接肽的轻链突变体(Linker-V<sub>L</sub>-E-tag)基因的 PCR 扩增** 以 pTIG-hscFv<sub>25</sub>-E-tag 为模板, P1 和 P2 为引物, PCR 扩增 V<sub>H</sub> 基因片段; 以 P3 和 P4 为引物, PCR 扩增 Linker-V<sub>L</sub>-E-tag 基因片段。

**1.2.2 重组表达载体 pTIG(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 的构建** 上述 PCR 产物经胶回收后分别用 *EcoR* I、*SacI* 和 *SacI*、*Hind* III 酶切并与 *EcoR* I、*Hind* III 酶切的表达载体 pTIG 大片段进行 3 片段连接, 构建重组表达载体 pTIG(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub>, 转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态细菌, 碱裂解法提取质粒并用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 对酶切鉴定阳性克隆进行序列测定。

**1.2.3 诱导表达** 含重组表达载体 pTIG(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 的宿主菌 BL21(DE3), 以 IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L)于 28 °C 诱导表达 6 h, 离心收集菌体, 超声碎菌。进行 12% SDS-PAGE 及以鼠抗 E-tag 抗体为二抗的 Western blot 鉴定。

**1.2.4 可溶性表达产物的纯化** 诱导表达 pTIG(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 菌体 100 mL, 离心收集菌体, 超声碎菌 15 min 后, 取上清, 用 Ni-NTA Agarose 亲和层析法纯化表达产物(载体多克隆位点下游含 6×His)。表达产物的纯度采用 SDS-PAGE 鉴定, 经核酸蛋白检测仪定量后, 除菌分装, 4 °C 保存备用。

### 1.2.5 (hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 的活性的鉴定

**1.2.5.1 细胞 ELISA 检测 (hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 相对亲和力和特异性** SMMC-7721 肝癌细胞及正常肝细胞 HL-02 铺 96 孔板, 经固定和封闭后, 以上述纯化产物(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 为一抗(做倍比稀释, 最高终浓度为 20 mg/L), 以鼠抗 E-tag 抗体为二抗, 进行细胞 ELISA, 酶标仪测定 A<sub>492/630</sub> 值, 达到饱和后的 A<sub>492/630</sub> 值降低到 50% 时的抗体浓度为 (hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 的相对亲和力。以亲本单链抗体 hscFv<sub>25</sub>-E-tag

为平行对照。

1.2.5.2 临床肝癌患者石蜡切片免疫组织化学染色 上述纯化的(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub>对60例临床确诊的肝癌、3例肝硬化及2例正常肝的石蜡切片进行常规免疫组织化学染色,显微镜下观察结果。

## 2 结果

2.1 重组表达载体 pTIG(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 的构建 V<sub>H</sub> 基因 PCR 扩增片段、Linker-V<sub>L</sub>-E-tag PCR 基因扩增片段与 pTIG 表达载体大片段进行 3 片段连接,转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细菌,提取质粒。该质粒经 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切,可切出约 760 bp 大小的片段,与目的基因大小相符,后经序列测定证实序列与设计一致,说明重组表达载体 pTIG(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 构建成功。

2.2 (hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 的诱导表达和纯化 将重组 pTIG(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 表达载体转化的宿主菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导(以未诱导的同一菌株为对照)表达,碎菌上清进行的 12% SDS-PAGE 显示,约在 *M*<sub>r</sub> 30 000 处出现 1 条新生蛋白带(图 1),与目的蛋白的大小相一致,表达量约占细

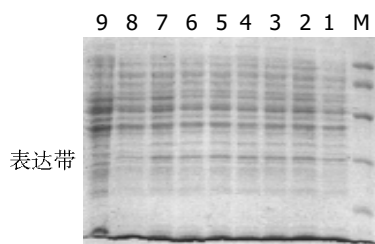


图1 重组(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub>表达产物的SDS-PAGE分析。M: 蛋白标记物 *M*<sub>r</sub>×10<sup>3</sup>: 97, 66, 43, 31 和 20; 1-8: 诱导表达不同时间的(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 宿主菌碎菌上清。9: 未诱导表达(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 宿主菌碎菌上清。

菌裂解上清总蛋白量的 8% 左右,说明是可溶性表达,可溶性表达产物经 Nie 柱(His 亲和层析柱)纯化,纯度达到电泳纯。可溶性表达产物经 Western blot 鉴定,证实为目的基因表达产物。

2.3 表达产物抗体活性的检测 细胞 ELISA 检测结果显示,所纯化的表达产物可与 SMMC-7721 肝癌细胞结合而与正常肝细胞 HL-02 不结合,Diabody 的相对亲和力约为 0.25 mg/L,而亲本单链抗体的相对亲和力约为 2.50 mg/L,即 Diabody 的相对亲和力提高了 10 倍左右。肝癌石蜡切片脱蜡、封闭后,加纯化产物 37 °C 作用 1 h,洗涤三次,加鼠抗 E-tag 抗体(1:2 000),37 °C 作用 1 h,洗涤三次,加 HRP 标记的兔抗鼠抗体,37 °C 作用 30 min 后显色,衬染封片后在显微镜下观察。结果显示,有 45 例为阳性,阳性率为 75%,抗原主要定位于肿瘤细胞膜上,少数病例细胞质或细胞核也呈阳性,癌旁肝、正常肝及肝硬化组织未见阳性着色(图 2),这于亲本单克隆抗体相一致,说明我们所制备的人源化抗肝癌(hscFv<sub>25</sub>)<sub>2</sub> 较好地保持了亲本抗体的特异性,其相对亲和力比其亲本单链抗体大约高 10 倍。

## 3 讨论

我国是肝癌高发区,10 a 前的统计数字就显示,我国每年有 11 万人死于肝细胞肝癌,今年来虽未见明确的统计数字,但可以肯定的是其发病率还在呈上升趋势。对于肿瘤的治疗,基因工程抗体再次成为肿瘤诊断和治疗研究的热点。对于实体瘤的体内诊断和治疗,小分子抗体是比较理想的靶向载体,目前已有数株小分子抗体作为放射免疫诊断或治疗载体被批准上市,但尚无肝癌体内诊断性或治疗性抗体上市<sup>[3]</sup>。在我国,目

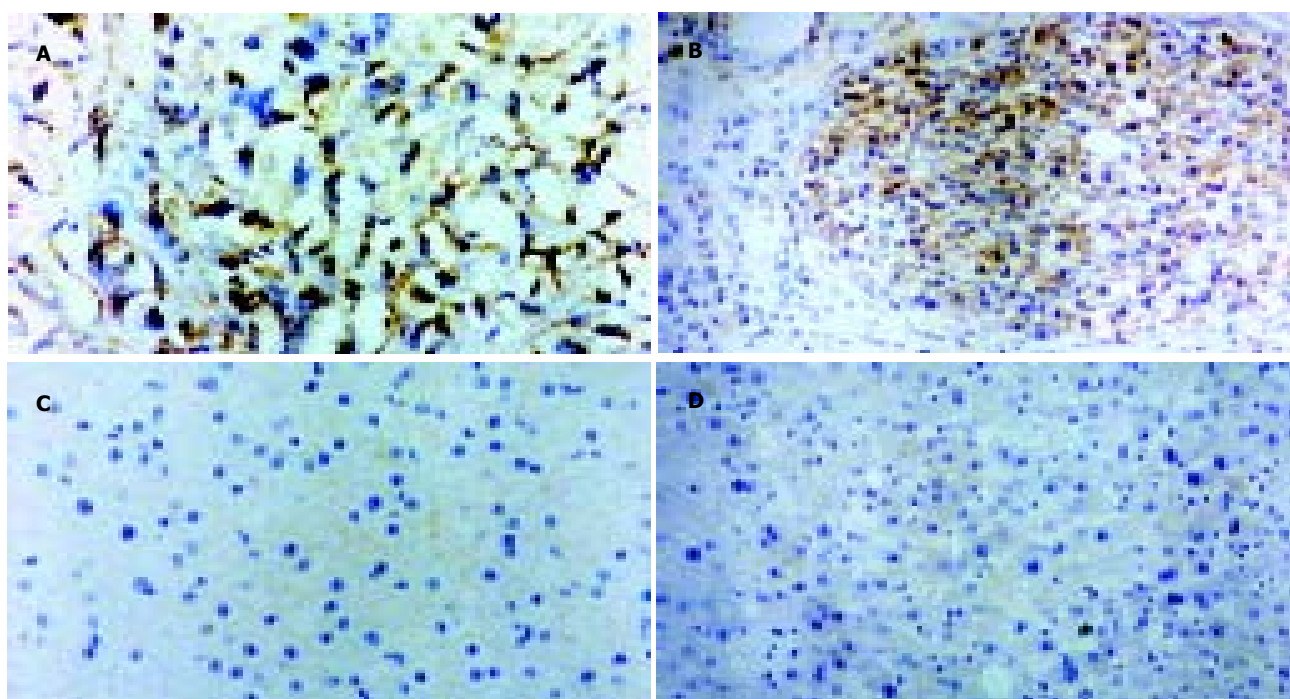


图2 重组表达产物 Diabody 对肝癌组织的免疫组织化学染色(×400)。A-B: Diabody 对肝癌组织的免疫组织化学染色; C: 正常肝的免疫组织化学染色; D: 肝再生结节的免疫组织化学染色。

前有一株同位素标记的,通过全抗体消化而制备的鼠源性抗肝癌抗体片段进入临床研究的报道,在国外还未见类似报道。Diabody具有穿透能力强、亲和力较高和半衰期较合适等特点,同时又具有基因操作简单,容易进行高效表达和大规模生产,因此是比较理想的放射免疫诊断或治疗载体<sup>[2,4]</sup>。Diabody是单链抗体通过自然折叠而形成的二聚体形式,两条链间无共价键连接,但和单链抗体一样,轻重链可变区之间也需要连接肽连接,连接肽的长度以5-10个氨基酸为宜,多数报道为5肽,即GGGGS。连接肽长度不宜过长,否则活性蛋白会以单链抗体的形式存在,但也不宜过短,否则活性蛋白会以多聚体的形式存在(三价抗体活四价抗体)<sup>[5-6]</sup>。

我们已经制备了一株抗肝癌人源化单链抗体,该抗体与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、PE38等基因融合表达的抗肝癌双功能抗体,对荷肝癌移植裸鼠具有一定的导向杀伤作用<sup>[7]</sup>,表明单链抗体具有良好的靶向性能,因此我们将该单链抗体改造成Diabody,为应用该型抗体进行临闯肝癌的放射免疫诊断或治疗奠定基础。

#### 4 参考文献

- 1 Yazaki PJ, Wu AM, Tsai SW, Williams LE, Ikler DN, Wong JY, Shively JE, Raubitschek AA. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and T84.66 minibody: comparison to radiolabeled fragments. *Bioconjug Chem* 2001;12:220-228
- 2 张静,刘彦仿,杨守京,孙志伟,乔庆,张素珍.抗肝癌单链抗体融合人突变型TNF $\alpha$ 的构建与表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:616-620
- 3 陈惠鹏.医药生物工程进展.北京:人民军医出版社,2004:89-108
- 4 Tahtis K, Lee FT, Smyth FE, Power BE, Renner C, Brechbiel M W, Old LJ, Hudson PJ, Scott AM. Biodistribution properties of (111)indium-labeled C-functionalized trans-cyclohexyl diethylenetriaminepenta acid humanized 3S193 diabody and F(ab')<sub>2</sub> constructs in a breast carcinoma xenograft model. *Clin Cancer Res* 2001;7:1061-1072
- 5 Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Meth* 2001;248:47-66
- 6 Wu AM, Chen W, Raubitschek A, Williams LE, Neumaier M, Fischer R, Hu SZ, Odom-Maryon T, Wong JY, Shively JE. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 1996;2:21-26
- 7 孙志伟,刘彦仿,袁清安,俞伟源,黄翠芬,马兰花,于继云.抗肝癌人源化单链抗体融合肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的导向作用. *中华肝脏病杂志* 2000;8:352-355

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 应用基因芯片技术筛查大肠癌相关基因

南清振,张振书,杨希山,肖冰,高蕾,叶方鹏,武金保

南清振,张振书,杨希山,肖冰,高蕾,叶方鹏,武金保,南方医科大学附属南方医院消化研究所 广东省广州市 510510

国家自然科学基金资助项目, No.39970825

项目负责人:南清振, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学附属南方医院消化研究所. nanqzh@fimmu.com

收稿日期: 2004-08-31 接受日期: 2004-09-19

### 摘要

目的: 筛选与大肠癌相关的差异表达基因。

方法: 用包含8 000个cDNA的基因芯片法检测4例大肠高分化腺癌组织及其癌旁正常肠黏膜组织标本RNA表达谱, 通过对比分析寻找与大肠癌相关的基因。

结果: 大肠癌差异表达基因中有1 807个基因发生了显著性变化, 其中上调表达的基因有936个, 最有显著上调的有36个; 下调表达的基因有871个, 最有显著下调的有30个。

结论: 大肠癌的发生是一个多基因表达失调的过程, 大肠癌与癌旁正常肠黏膜组织间存在差异表达的基因。

南清振, 张振书, 杨希山, 肖冰, 高蕾, 叶方鹏, 武金保. 应用基因芯片技术筛查

大肠癌相关基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2742-2744

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2742.asp>

### 0 引言

随着人类基因组计划的开发研究和分子生物学、分子遗传学的迅速发展成熟, 人类对肿瘤的认识已进入分子水平<sup>[1]</sup>。寻找大肠癌相关基因, 深入了解该相关基因在肿瘤发生及转移过程中的作用已成为可能。基因芯片技术适用于大规模的基因检测和基因功能的研究、疾病发生机制的研究及临床诊断等方面<sup>[2-4]</sup>。本研究系选用有8000条人类基因的cDNA表达谱芯片, 以临床切除的大肠癌及癌旁正常肠黏膜组织标本为研究对象, 筛查大肠癌发生、发展过程中与肿瘤相关的基因, 为大肠癌的早期诊断与治疗提供理论依据。

### 1 材料和方法

1.1 材料 我院2003年收治的4例大肠高分化腺癌患者组织标本和其对应癌旁5 cm以上的正常大肠黏膜组织。