论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1770-03

抗粘蛋白1单链抗体的构建及其功能初步分析

陈庆峰[1],马中良[1],王笑峰[2],李福年[1],郑玲莉[1] (266003 山东 青岛,青岛大学医学院 附属医院乳腺外科[1],微生物教研室[2])

【摘要】 **目的** 分离鼠源抗粘蛋白1(mucin1,MUC1)单克隆抗体可变区基因,构建有结合功能的单链抗体,并初步检测结合活性。**方法** 提取杂交瘤细胞总mRNA,合成cDNA后,PCR扩增鼠特异性抗体可变区编码基因,通过9个氨基酸的连接子构建表达单链抗体的原核重组表达载体,体外诱导表达纯化后,采用Western blot和流式细胞术方法分析单链抗体与变性或天然状态下抗原的结合活性。**结果** 在杂交瘤细胞中成功分离到抗体轻重链可变区基因,重组链接后形成单链抗体能够在大肠杆菌中分泌表达,Western blot和流式细胞术分析表明该单链抗体能够与变性或天然状态下的T47D肿瘤细胞表面MUC1特异性结合。**结论** 成功制备具有生物活性的抗肿瘤相关MUC1单链抗体,该单链抗体具有与MUC1特异性结合的生物学活性。

【关键词】 乳腺肿瘤;粘蛋白类;单链抗体
【中图法分类号】 R392-33;R392.11 【文献标志码】 A

Construction and characterization of anti-mucin1 single chain Fv antibody fragment

Chen Qingfeng[1], Ma Zhongliang[1], Wang Xiaofeng[2], Li Funian[1], Zheng Lingli[1] ([1]Department of Breast Surgery, Affiliated Hospital, [2]Department of Microbiology, Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong Province, 266003, China)

【**Abstract**】 **Objective** To construct single chain variable fragment antibody (scFv) from a mouse monoclonal anti-mucin1 (MUC1) antibody secreting cell lines. **Methods** Isolation of mRNA of hybridoma cells, synthesis of cDNA, and antibody genotyping was performed using mouse antibody specific primers. Related variable genes were fused with a 9-amino-acid linker to obtain a scFv, which was characterized on denatured and natural antigen by Western blotting and flow cytometry. **Results** Variable regions of antibodies heavy and light chain coding genes were isolated form a monoclonal anti-MUC1 hybridoma cell line. ScFv was obtained by the combination of the 2 variable genes, which could be produced in *E. coli*. Western blotting and FACS analysis showed that the obtained scFv could bind to nature and denatured MUC1 of T47D tumor cells specifically. **Conclusion** A functional anti-MUC1 scFv is obtained successfully, which can bind to tumour associated MUC1 specifically.

【**Key words**】 breast neoplasms; mucins; single-chain antibody

Corresponding author: Li Funian, Tel: 86-532-82913116, E-mail: drlifunian@yahoo.com.cn

抗粘蛋白1(mucin1, MUC1)是上皮粘蛋白家族中的一员,大约90%的乳腺癌患者存在MUC1高表达、糖基化不完全和糖基化异常等特征,导致MUC1在细胞表达中异常暴露或者某一肽段骨架或异常表位暴露,成为乳腺癌诊断和治疗中的重要靶标[1-5],许多其他恶性肿瘤细胞也存在MUC1表达水平的增高,如胃癌、前列腺癌等[1,2]。

单克隆抗体类药物是生物制药产业中最大类别的产品,如今已被成功用于治疗肿瘤等多种疾病领域,在早期临床试验中所采用的单抗多为鼠源,易于诱导患者机体产生人抗鼠抗体(HAMA),限制了这类抗体新药的安全使用。基因工程抗体技术通过分离抗体可变区编码基因与人源抗体恒定区编码基因相融合形成嵌合抗体,并可以进一步进行人源化修饰,不改变抗体结合的特异性却可以大大降低HAMA反应,在乳腺癌等疾病治疗方面获得极大的成功。在本研究中,我们对在分泌抗MUC1特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞中分离特异性抗体可变区编码基因,构建单链抗体(scFv),在*E. coli*细胞中制备表达,并对抗体的特异性结合活性进行定性分析,为人嵌合或人源化抗体的制备或乳

【通信作者】 李福年,电话:(0532)82913116, E-mail:drlifunian@yahoo.com.cn

腺癌等的靶向治疗研究准备了条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 原核表达用 XL1-Blue 大肠杆菌(美国 Stratagene 公司),T47D 细胞(ECACC No. 85102201),Jurkat 细胞(ECACC No. 88042803)等按照常规细胞培养方法进行培养,所用培养试剂参考相关说明书。

1.1.2 抗体可变区基因的分离 肿瘤相关 MUC1 特异性鼠单克隆抗体杂交瘤细胞系 6E3,是由乳腺癌肿瘤组织匀浆后,离心去除沉淀,按照单克隆抗体制备常规免疫方法免疫BALB/c小鼠 6 次,分离脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,制备杂交瘤细胞,然后经化学合成的源于 MUC1 胞外区 VNTR 区的生物素化的 16 个氨基酸的多肽 NH2-APDT(GalNAC) RPAPGSTAPPAC-COOH 筛选确定具有结合特异性的单克隆抗体细胞系。取约 10^6 生长状态良好的杂交瘤细胞用 Oligotex Direct mRNA Purification Kit(QIAGEN 公司)提取细胞 mRNA,具体操作方法参照试剂盒说明书。应用 SuperScript Ⅲ RT 逆转录试剂盒(Invitrogen 公司),参照说明书以 Oligo-dT 为引物逆转录合成 cDNA 作为 PCR 反应模板。采用鼠源抗体特异性引物进行 PCR 分型扩增,然后根据抗体基因型特点分别扩增轻链和重链可变区编码基因片段,所用引物序列如下:重链可变区 5′端引物 5′-GAATAGGCCATGGCGGAGGTCCAGCTGCAGGAGTCTGG-3′,重链可变区 3′端引物:5′-GGCCAGTGGATAAAGCTTTGGGGGTGTCGTTTTGGC-3′,轻链可变区 5′端引物 5′-TACAGGATCCACGCGTAGACATTGTGATGACCCAGTCT-3′,轻链可变区 3′端引物 5′-TGACAAGCTTGCGGCCGCGGATACAGTTGGTGCAGCATC-3′。将获得的可变区基因采用两步克隆法,经 *Nco* Ⅰ、*Hind* Ⅲ和 *Mlu* Ⅰ、*Not* Ⅰ限制性酶切将抗体可变区基因分别克隆入 pOPE101-215(Yol) scFv 表达载体,获得表达质粒 pOPE101-6E3,并对可变区基因进行序列分析。所构建单链抗体表达质粒可在单链抗体 scFv 羧基端加上有 10 个氨基酸残基的 c-myc 标签蛋白和 6 个组氨酸标签,便于 scFv 的检测和纯化。

1.2 方法

1.2.1 单链抗体表达纯化 将质粒 pOPE101-6E3 转化 XL1-Blue 感受态细胞,挑选单克隆于 5 ml LB 培养基中过夜培养,转接至 100 ml LBGA 培养基中(LB 培养基含 100 mmol/L 葡萄糖、100 μg/ml 氨苄青霉素),22 ℃、20 μmol/ L IPTG 诱导 scFv 基因表达 3 ~ 4 h。离心收集菌体,用 10 ml PBS 洗涤沉淀 1 次,然后用休克缓冲液[50 mmol/L Tris/HCl, pH = 8.0,20%(质量体积比) 庶糖,1 mmol/L EDTA]提取在细菌周质腔内可溶性表达的蛋白,充分透析后,使用 HiTrap Chelating HP(GE 公司)预装 his-tag 纯化柱纯化 scFv 抗体,具体操作参照说明书进行。取 10 μl 纯化的 scFv 经 15% SDS-PAGE 电泳和免疫印迹分析,10 μl XL1-Blue 细菌悬液为阴性对照,将电泳分离的 scFv 蛋白转移到硝酸纤维素膜,5% PBS 脱脂奶封闭 30 min 后,依次加入鼠抗 c-myc 单克隆抗体(1∶500),HRP 标记羊抗鼠 IgG Fab 特异性抗体(Sigma 公司),各孵育 1 h,每步骤之间用 PBST 洗 3 次,每次 5 min,最后 DAB 显色成像观察。

1.2.2 Western blot 分析 取约 10^6 乳腺癌细胞系 T47D 和 T 细胞瘤 Jurkat 细胞,PBS 洗涤 1 次,沉淀加 200 μl 裂解液(10 mmol/L Tris, pH = 7.6,150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% Nonidet P-40),使用前加蛋白酶抑制剂(1 mmol/L PMSF, Aprotinin 5 μg/ml, Leupeptin 5 μg/ml, Pepstatin 5 μg/ml)作用后,12 000 r/min 离心,取上清,经 10% SDS-PAGE 电泳分离,半干电转到硝酸纤维素膜,经封闭后加一抗大肠杆菌表达 scFv 抗体,二抗鼠抗 c-myc 单克隆抗体(1∶500),三抗 HRP 标记羊抗鼠 IgG 特异性抗体(Sigma 公司),各孵育 1 h,每步骤之间用 PBST 洗 3 次,每次 5 min,最后 DAB 显色成像观察。

1.2.3 流式细胞仪分析 取 T47D 和 Jurkat 细胞悬液(约 10^6/ml),分别加入 10 μg 表达纯化的 6E3 scFv 抗体,冰上孵育 30 min,洗涤后加入 1∶500 稀释的鼠抗 His-tag 单克隆抗体(Qiagen 公司),冰上孵育30 min,待反应完全后洗去未结合抗体,再加入荧光标记羊抗鼠多克隆抗体(Sigma 公司),冰上孵育 30 min,反应完全后洗去未结合抗体,细胞重悬于 0.5 ml 1% PBS-BSA 溶液中,保存在冰上直到检测,流式细胞仪检测中收集 5 000 ~ 10 000 个信号,资料通过仪器内置程序 CellQuest™ Pro 或 WinMDI 软件进行收集和分析。

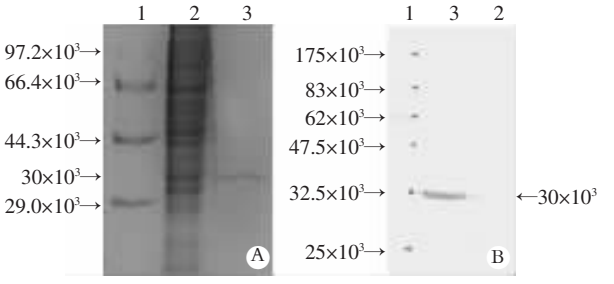
2 结果

2.1 抗体可变区基因序列分析

抗肿瘤 MUC1 抗体可变区编码基因序列分析结果显示,轻链属于 κ 型,高可变区氨基酸序列分别为 SQSLLES、SPKRLIYL 和 VYYCWQ。重链可变区属于 VH3 家族,高可变区氨基酸序列分别为 SWVRQTP、TYTSYPDSVKGRFTISR 和 SEDTAMYY。

2.2 scFv 表达纯化

纯化后 scFv 蛋白经 SDS-PAGE 分析可在约 30×10^3 处观察到单一条带,与预期单链抗体大小相符(图 1A)。Western blot 分析中,经检测单链抗体羧基段融合表达 c-myc 标签,具有单一特异性免疫印迹,显示的相对分子质量大小与 SDS-PAGE 电泳分析中显示结果一致,而未转化质粒的细菌阴性对照中无相应印迹(图 1B)。



A:SDS-PAGE 电泳结果;B:Western blot 分析结果
1:蛋白质分子量标志分子;2:细菌阴性对照;3:原核表达纯化的单链抗体

图 1 原核表达纯化的单链抗体 scFv 定性分析

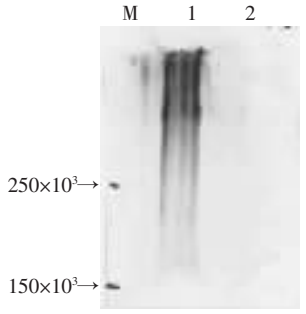
2.3 Western blot 检测

表达 MUC1 的 T47D 细胞呈现弥散的条带,而不表达 MUC1 的 Jurkat 细胞未见相应条带(图 2)。

2.4 流式细胞仪分析

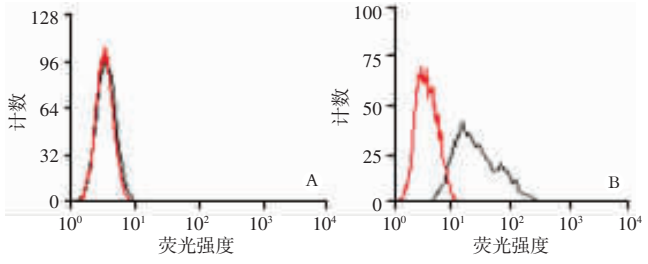
将纯化的 scFv 分别对 T47D 和 Jurkat 活细胞进行检测并用流式细胞仪进行分析,结果如图 3 所示,抗体只特异性与 T47D

细胞结合，与 Jurkat 细胞没有明显结合，与变性状态下 Western blot 分析结果一致。



M：蛋白分子量标准；1：T47D 细胞；2：Jurkat 细胞

图2 Western blot 分析 scFv 结合特异性



A：scFv 抗体（黑线）与 Jurkat 细胞（红线）结合情况；B：scFv（黑线）与 T47D 细胞（红线）结合情况

图3 流式细胞术分析 scFv 抗体与肿瘤细胞表面抗原结合情况

3 讨论

MUC1 是粘蛋白家族成员中的一员，属于Ⅰ型跨膜分子，包括跨膜区、胞内尾和胞外结构域，结构上有不同数量（30～100）的 20 个氨基酸的串联重复（variable number of tandem repeats，VNTR），上世纪 80 年代确定为肿瘤相关抗原[6]。许多研究结果显示 MUC1 可诱导抗体介导的免疫反应，能够产生明显的抗瘤效果[7,8]。临床流行病学调查显示，乳腺癌早期高天然抗 MUC1 抗体水平往往预示长的存活期，一般认为是由于抗体可以控制表达有 MUC1 的瘤细胞播散、促进循环中癌细胞免疫清除等[5]。因此抗肿瘤相关 MUC1 抗体应具有成为抗肿瘤抗体类新药的潜力，并可以作为多种肿瘤辅助诊断、指导治疗及判断预后的重要指标。关于 MUC1 的单克隆抗体制备和应用国内外均有报道，但是 MUC1 分子是一种跨膜大分子，目前报道的抗体结合特异性各不相同，有的抗体结合表位还不是很清楚，有待进一步研究。国内马道新等[9]利用噬菌体表面呈现技术分离到人源单链抗体并进行了初步分析。利用噬菌体表面呈现系统分离人源抗体过程较为复杂，实验要求条件高，所获得抗体的特异结合表位一般需要进一步确定。本研究中抗体源于经肿瘤组织免疫和化学合成多肽筛选的杂交瘤细胞系，所收获的单克隆抗体具有较明确的抗原结合表位，能够特异结合于由于糖基化不全而暴露的 MUC1 分子多肽骨架。外源完整的免疫球蛋白由于相对分子质量大，一般具有较强的免疫原性，诱导较强的排异反应，而 scFv 具有母抗体的抗原结合活性，并且具有相对分子质量小、组织穿透力强、免疫原性低等优点，是肿瘤靶向治疗等的重要工具。本研究利用分子生物学技术分离鼠源性单克隆抗体可变区编码基因，构建表达单链抗体的重组原核表达载体，体外诱导单链抗体的表达，单链抗体纯化后分别对源于乳腺癌的 T47D 细胞系和源于 T 淋巴细胞瘤的 Jurkat 细胞系细胞表面抗原在变性状态下和天然状态下分别进行检测。在变性状态下 T47D 细胞表面 MUC1 过度表达，检测出的抗原呈一定区域的弥散分布，推测可能与不同 MUC1 分子胞外区 VNTR 数量不同和糖基化程度不同有关。流式细胞仪分析抗原抗体结合时，表达纯化的 scFv 能够结合天然的 MUC1 抗原。变性抗原和天然抗原结合反应表明分离获得的 scFv 具有生物学功能，为降低鼠源单克隆抗体诱发免疫排斥反应产生的毒副作用，制备嵌合性或人源化的安全和有效的单克隆抗体提供了实验基础，为将来乳腺癌等肿瘤的诊断与治疗提供可能。

参考文献：

[1] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J M, Plunkett T, *et al*. MUC1 and the immunobiology of cancer [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002, 7(2): 209－221.

[2] Agrawal B, Longenecker B M. MUC1 mucin-mediated regulation of human T cells[J]. Int Immunol, 2005, 17(4): 391－399.

[3] Gimmi C D, Morrison B W, Mainprice B A, *et al*. Breast cancer-associated antigen, DF3/MUC1, induces apoptosis of activated human T cells[J]. Nat Med, 1996, 2 (12): 1367－1370.

[4] Miles D W, Taylor-Papadimitriou J. Mucin based breast cancer vaccines[J]. Expert Opin Investig Drugs, 1998, 7 (11): 1865－1877.

[5] von-Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten A A, Kenemans P, *et al*. Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin [J]. J Clin Oncol, 2000, 18(3): 574－583.

[6] Gendler S J, Spicer A P. Epithelial mucin genes [J]. Annu Rev Physiol, 1995, 57: 607－634.

[7] Apostolopoulos V, Osinski C, McKenzie I F. MUC1 cross-reactive Gal alpha(1, 3) Gal antibodies in humans switch immune responses from cellular to humoral[J]. Nat Med, 1998, 4(3): 315－320.

[8] Acres B, Apostolopoulos V, Balloul J M, *et al*. MUC1-specific immune responses in human MUC1 transgenic mice immunized with various human MUC1 vaccines [J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 48(10): 588－594.

[9] 马道新，孔北华，魏薇，等. Ⅰ型粘蛋白单链抗体的制备及其生物学活性的初步研究[J]. 现代妇产科进展，2004，13（1）：34－37.

（收稿 2010-02-03 修回 2010-04-01）

（编辑 吴培红）