维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0787-03

人源乳腺癌单链抗体基因的构建

唐树彬,段 红,蒲 军,李少林,彭志平

(重庆医科大学基础医学院核医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建人源抗乳腺癌单链抗体(scfv)基因片断。方法:首先利用乳腺癌患者癌旁淋巴组织提取总 RNA,然后通过 RT-PCR 分别扩增 VH 和 VL 基因片断,再将经纯化的 VH 和 VL 基因片断通过"重叠-延伸-拼接 PCR"(SOE-PCR)而形成单链抗体(scfv)基因片断。结果:构建了 750bp 的人源抗乳腺癌单链抗体(scfv)基因片断。结论:成功地构建了人源抗乳腺癌单链抗体基因片断,为进一步构建人源抗乳腺癌单链抗体库提供了试验基础。

【关键词】乳腺癌;单链抗体;构建

【中国图书分类法分类号】R730.51 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-04-19

Construction of human single-chain antibody gene for breast cancer

TANG Shubin, et al

(*Department of Nuclear Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objiective***: To construct human single-chain antibody gene fragment for breast cancer. ***Methods***: Total RNA was isolated from tumor adjacent lymphatic tissue of breast cancer patients. Then heavy and light chain (VH and VL) genes of antibody were amplified separately by RT-PCR, and assembled into ScFv genes by SOE-PCR. ***Results***: The human single-chain antibody gene fragment for breast cancer was constructed and its size was about 750bp . ***Conclusion***: The human single-chain antibody gene fragments were constructed successfully, which provides a way for constructing the human single-chain antibody library of anti-breast cancer.

【Keywords】Breast cancer; Scfv; Construction

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,全世界每年约有 120 万妇女发生乳腺癌,有 50 万妇女死于乳腺癌,发病率占全年各种恶性肿瘤的 7%~10%[1]。在我国,乳腺癌的发病率虽较西方国家为低,但近年来亦有上升趋势。目前,以超声及 X 线等为主的乳腺癌诊断方法,对早期乳腺癌的诊断尚缺乏足够的准确性和特异性。而以手术,化疗,放疗及生物治疗为主的综合治疗又因副作用太大而在临床应用中受到诸多限制。因此,许多学者把目光投向了乳腺癌的抗体诊断及治疗。但是,无论是早期利用肿瘤细胞免疫小鼠得到的多克隆抗体,还是以后运用杂交瘤技术生产的单克隆抗体都因为抗体的特异性低或者人抗鼠免疫反应等原因而不适用于临床肿瘤治疗。直到 1998 年 FDA 正式批准人源化鼠源单克隆抗体赫赛汀(Herceptin)应用于临床 CerBb2 受体阳性的乳腺癌的治疗,才为肿瘤的抗体治疗带来了新的挈机。但是在临床使用中发现这种被寄予厚望的单克隆抗体仅能对 30%的 Her2/neu 阳性的乳腺癌患者产生抗肿瘤效果[2]。Micheu 等[3]认为单克隆抗体分子量较大,组织穿透性差,使其在肿瘤部位的浓聚减少是 Herceptin 治疗效果不甚理想的一个重要原因。单链抗体(scfv)分子量较小、组织穿透性强、能够迅速到达靶抗原部位,在肿瘤的诊断及治疗中有很强的应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

RNA 抽提试剂盒(Tissue RNA Kit),胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit),质粒抽提试剂盒(Plasmid Kit)均购自上海华舜生物工程有限公司。RT-PCR 试剂盒(RNA PCR Kit)、Sfi I 和 Not I 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为大连宝生物公司产品。噬菌粒载体 pCANTAB5E、辅助噬菌体 M13K07、大肠杆菌 E. coli TG1 购自法玛西亚。引物参照 Yang[4]设计,由北京三博志远生物技术有限公司合成。扩增 VH 基因的引物:5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT

作者介绍:唐树彬(1977-),男,住院医师,硕士研究生,主要研究方向:放射肿瘤学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370422)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

CCC-3';5'-CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG-3'。扩增 VL 基因的引物:5'-ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3'5'-GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'。VH 连接 Linker 的引物:5'-AGA GCC ACC TCC GCC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC -3';5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC-3'。VL 连接 Linker 的引物:5'- GTT CAG GCG GAG GTG GCT CTG GCG GTG GCG GAT CGG ACA TCS WGA TGA C CC AGT CTC C-3'(S.W 为衰并引物);5'-GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'。Scfv 扩增的引物(引物的带有 Sfi I 和 Not I 内切酶位点):5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG-3';5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3'。

1.2 方法

1.2.1 组织来源 将术中分离的乳腺癌患者癌旁淋巴结用无菌纱布包好后结迅速放入液氮中冻存。共取 14 位患者癌旁淋巴结,病理分型及 Her2/neu 分型见表 1。

表 1 乳腺癌患者病理分型及 Her2/neu 分型

	浸润性导管癌	浸润性小叶癌	髓样癌
Her2/neu 阳	3	3	0
Her2/neu 阴	6	1	1

1.2.2 总 RNA 的提取 首先在盛有液氮碾钵中迅速的把淋巴组织碾成粉末,这样可以使组织脆硬同时防止 RNA 破坏[4]。然后再利用 RNA 抽提试剂盒进行提取,得到总 RNA。

1.2.3 VH 和 VL 基因片断的扩增 首先,通过以 Oligo dT-Adaptor primer 作为引物合成 cDNA,PCR 条件为:50℃30 min,99 ℃ 5 min ,5 ℃ 5 min,1 个循环。然后以 cDNA 为模板,以上下游引物配对分别扩增轻链基因片断和重链基因片断,PCR 条件为:94℃ 2min,1 个循环,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 90s,30 个循环。最后利用 Linker 引物分别扩增 VH-Linker 基因片断和 VL-Linker 基因片断,PCR 条件为:94℃ 2 min,1 个循环,94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 90s,35 个循环。得到 VH-Linker 基因片断和 VL-Linker 基因片断。

1.2.4 Scfv 基因片段的连接及 PCR 扩增 通过"重叠-延伸-拼接 PCR"(SOE-PCR)形成单链抗体(scfv)基因片断。先将胶回收纯化的 VH-Linker 基因片断和 VL-Linker 基因片断进行连接,反应条件为:94 ℃5min,一个循环,94 ℃ 1min,60 ℃ 1min,72 ℃ 90s,5 个循环。从而将 VH 基因片断和 VL 基因片断连接形成 scfv 基因片断。然后再向反应体系中加入 scfv 扩增的引物(带有酶切位点),反应条件为:94℃ 30 s,60℃ 60 s,72 ℃ 90 s,5 个循环。形成两端分别带有酶切位点的 scfv 基因片断。

1.2.5 重组质粒的构建 用 T4 DNA 连接酶连接经 sfi I 限制性内切酶和 Not I 限制性内切酶双酶切 ScFv 基因片断和 PCANTAB-5E 载体,用电穿孔法转化 TG1 感受态细胞,铺于氨苄青霉素选择培养基上,培养过夜,计算克隆数。随机挑取 24 个转化后 TG1 菌落,分别加入到 2-YT 培养液中振荡培养过夜,提取质粒,用 PCR 检查 DNA 中有无 ScFv 基因插入。

2 结 果

2.1 总 RNA 的鉴定

从淋巴组织中提取总 RNA 后,经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。电泳可见明显的 18s 和 28s 两条带,28s 亮度是 18s 的两倍以上如图 1。

2.2 VH 基因片断和 VL 基因片断的鉴定

VH 和 VL 基因扩增后,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果提示 VH 基因片断在 360bp,VL 基因片断在 300bp(图 2)。

2.3 Scfv 基因片断的鉴定

VH-Linker 基因和 VL-Linker 基因连接后,利用含有 Sfi I 和 Not I 酶切位点的引物进行 PCR 扩增。得到含有酶切位点的 scfv 基因。利用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,结果提示 scfv 基因在 750bp 左右图 3。

2.4 质粒 DNA 的 PCR 检测

将 24 个转化的 TG1 菌落培养后,提取质粒,经 PCR 检测发现 PCANTAB-5E 中有 ScFv 基因插入者为 19/24(插入率 79%)。

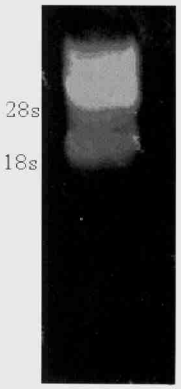
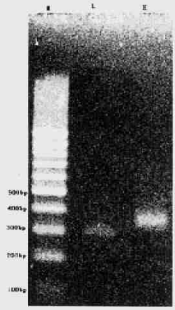


图 1 总 RNA 电泳结果

维普资讯 http://www.cqvip.com



M:maker;H:V_H 基因;L:V_L 基因

图 2 VH 基因及 VL 基因电泳结果

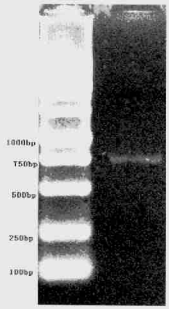


图 3 单链抗体(scfv)基因电泳结果

3 讨 论

单链抗体(scfv)具有分子量小、组织穿透性好、免疫原性低、非靶部位存留时间短、组织穿透力强、易于基因工程制备和改造等优点[4],因而在肿瘤的诊断及治疗中有广泛的应用前景。是目前的研究热点之一。但是目前报道的用于肿瘤研究的单链抗体多为鼠源性抗体，这些抗体因人抗鼠免疫反应(HAMA)等原因而不适合于临床应用。

本实验利用患者的癌旁淋巴组织提取 RNA,由于新鲜组织中含有较多得 RNA 酶，我们利用液氮碾磨方法制备淋巴组织匀浆，从而有效的避免了 RNA 的破坏[5]。然后通过 RT-PCR 分别扩增 VH 和 VL 基因片断,再将 VH 和 VL 基因片断通过“重叠-延伸-拼接 PCR”(SOE-PCR) 而形成单链抗体(scfv)基因片断。淋巴转移是乳腺癌最常见的转移方式,我们选择乳腺癌患者癌旁淋巴组织来构建抗乳腺癌单链抗体基因有助于提高单链抗体的敏感性和特异性。此外，我们选择病理类型不同及 Her2/neu 阳性与否的乳腺癌的患者,增加了抗乳腺癌单链抗体基因的多样性,有利于构建较大的抗乳腺癌单链抗体库。

综上所述,本试验构建的人源抗乳腺癌单链抗体基因为下一步得到高亲合力和高特异性的单链抗体打下了实验基础。而这种单链抗体完全克服了人抗鼠免疫反应而适合于临床的应用。

参 考 文 献

[1] 李少林,陈小品,吴凯南.乳腺癌的生物学特性和临床对策[M].第 1 版,北京:科学出版社,2004.65.

[2] Maria M, Belimezi, Danai Papanastassiou, et al. Growth inhibition of breast cancer cell lines over expressing Her2/neu by a novel internalized fully human Fab antibody fragment[J].Cancer Immunol Immunothe, 2005; 262:5-10.

[3] Michelle D, Winthrop, Sally J, et al. Selection and Characterization of Anti-MUC-1 scfvs Intended for Targeted Therapy [J]. Clinical Cancer Research, 2003;9:3845-3853.

[4] Ming-Yan Xu, Xiao-Hu Xu, Geng-Zhen Chen, et al. Production of a human single-chain variable fragment antibody against esophageal carcinoma [J].World J Gastroenterol, 2004;10:2619-2623.

[5] 何映谊,何新荣,叶铁真.人类胚胎组织完整 RNA 的分离[J].中国实验血液学杂志,2005;13(6):1058-1060.

[6] Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, et al.Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms [J]. Cancer Research, 1992;52:3402-3408.