DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.017
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0691-04

论著

一种可溶性单抗ScFv片段的表达及鉴定

钟小林,高会广,吉 清,黄 刚 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 利用*E. coli* HB2151表达结肠癌单抗MC3的单链可变区片段(Single chain variable fragment, ScFv),纯化并鉴定其抗原结合活性,为结肠癌体内诊断和治疗性研究提供靶向载体分子。方法 利用呈现ScFv抗体的重组噬菌体感染大肠杆菌HB2151进行可溶性抗体表达,经点印迹和Western印迹检测可溶性单抗ScFv的表达水平,经ELISA检测可溶性ScFv的抗原结合活性。用双脱氧法对组成ScFv DNA的VH和VL DNA进行序列测定。结果 可溶性MC3 ScFv获得了成功表达,表达产物主要位于周质腔中,其分子量约为32×10^3。来自所获得的3个克隆周质提取物均能抑制单抗与高水平表达MC3结合抗原的AGS细胞结合,抑制率分别为41.19%、36.89%、33.77%。对ScFv的VH和VL DNA的测序结果表明所获抗体的可变区基因属IgG1亚族,κ型。结论 利用大肠杆菌HB2151成功表达了具有抗原结合活性的MC3 ScFv,为拓展该抗体的应用范围奠定了基础。

关键词:结肠癌;单克隆抗体;单链可变区片段;噬菌体
中图法分类号:R394-33; R394.3; R735.303 文献标识码:A

Expression and identification of the soluble monoclonal antibody ScFv fragment

ZHONG Xiao-lin, GAO Hui-guang, JI Qing, HUANG Gang (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express soluble single chain variable fragments (ScFv) of monoclonal antibody MC3 recognizing colorectal carcinomas in *E. coli* HB2151 and to purify the soluble ScFv and identify its antigen-binding activities to find new target vectors for the diagnosis and therapy of colorectal carcinomas. **Methods** The phage clones displaying ScFv fragment of the monoclonal antibody MC3 were used to infect *E. coli* HB2151 to express soluble antibodies. The soluble ScFvs were identified by Dot blot and Western blot and their antigen-binding activities were determined by ELISA. The VH and VL DNAs of the ScFv DNA derived were sequenced based on the dideoxy method. **Results** The soluble MC3 ScFvs were expressed successfully. The expression products with a proximate MW of 32×10^3 were mainly secreted into the periplasm. The soluble ScFv-containing periplasmatic extracts derived from three clones could inhibit the binding of MC3 with its antigen, and the inhibition rates were 41.19%, 36.89% and 33.77% respectively. The sequences of the VH and VL DNAs of the MC3 ScFv showed that the variable antibody genes belonged to the IgG1 subgroup and κ-type. **Conclusion** Generation of *E. coli* HB2151-expressed ScFv of monoclonal antibody MC3 paves the way for further use of the antibody.

Key words: colorectal carcinoma; monoclonal antibody; single chain variable fragments; phage

抗肿瘤抗体用于肿瘤患者体内诊断和治疗是人们近年来致力研究的重要课题之一。然而,其主要问题是将动物源性的全抗体分子用于人体时容易引起人抗动物抗体反应以及过敏反应,因此有必要对动物源性抗体进行改进[1~2]。使动物源性抗体小型化是降低人体排异反应强度和减少过敏反应发生的有力措施。将抗体小型化的方法包括化学方法和基因工程方法等,其中在基因工程方法中又以噬菌体抗体技术最具优势[3]。

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤,抗结肠癌单克隆抗体MC3的肿瘤组织特异性强,有可能用于在体研究[4]。为克服全抗体分子用于在体研究时的缺陷,本研究以我们先前所构建的能呈现小型化抗体MC3 ScFv的噬菌体克隆为基础,将所获得的噬菌体克隆在原核细胞内进行可溶性表达,并进行活性检测。这种小型化抗体的制备不仅拓宽了相应单抗的应用范围,而且为结肠癌体内诊断和治疗性研究增添了新的靶向载体分子[5~7]。

作者简介:钟小林(1965-),男,重庆市人,实验师,主要从事基因工程产品开发方面的研究。电话:(023)68752261

收稿日期:2002-12-10;修回日期:2003-02-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 主要材料

E. coli HB2151，抗-E-Tag 抗体及 ScFv DNA 测序引物均为 Pharmacia 公司产品；HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、DAB 显色试剂盒均为华美公司产品。低分子量标准蛋白为上海东风生物技术公司产品。NC 膜为美国基因有限公司产品。能呈现 MC3 ScFv 的噬菌体克隆由何凤田博士制备。

1.2 可溶性 MC3 ScFv 的表达

将 3 个具有强竞争结合 MC3 靶抗原能力的噬菌体抗体克隆上清（克隆编号分别为 1、2、3，其中以 1 号克隆的噬菌体竞争能力最强）2 μl 分别加入 400 μl 对数期大肠杆菌 HB2151 中，于 37 ℃中速摇 30 min，然后划线接种于 SOBAG-N 平板上，30℃培养至长出单菌落。从 3 个不同克隆来源的平板上各挑 1 个克隆，分别接种于 5 ml 2× YT-AG 培养基中，于 30 ℃以 250 r/min 摇过夜。将 5 ml 过夜菌加到 50 ml 新鲜 SB-AG 培养基中，于 30℃以 250 r/min 摇 1 h，室温下 1 500× *g* 离心 20 min，弃上清。将沉淀重悬于 50 ml 新鲜 SB-AI（I：IPTG，1 mmol/L）培养基中，于 30 ℃以 250 r/min 摇 5 h。把培养物分至两个不同的离心管中，室温下 1 500× *g* 离心 20 min，从两管中小心取上清，过滤除菌后备用，短期内不用的上清于－20 ℃储存。将 1 管沉淀用 0.5 ml 冰冷的 1× TES 重悬，然后加入 0.75 ml 冰冷的 1/5× TES 进行涡旋，继而冰浴 30 min。把内容物移至 1.5 ml 管中，在微量离心机上 12 000× *g* 离心 10 min，小心取上清备用（此即周质提取物），短期内不用的周质提取物于－20 ℃储存。将另一管沉淀用 0.5 ml PBS 悬浮，煮沸 5 min，在微量离心机上 12 000× *g* 离心 10 min，小心取上清备用（此即全菌提取物），若短期内不用，则于－20 ℃储存。

1.3 检测可溶性 MC3 ScFv 的表达[8]

1.3.1 点印迹检测可溶性 MC3 ScFv 的表达　向细菌培养上清中加入等体积的冰冷的 20% TCA，充分混匀后冰浴 20 min。在微量离心机上 12 000× *g* 离心 10 min，弃上清，沉淀溶解后加入 Tris 碱中和，调整体积至最初上清体积的 1/5。将上清原液、上清的 5 倍浓缩物、周质提取物和全菌提取物各取 3 μl 点于 NC 膜上。同时点 MC3 单抗稀释液做阳性对照。膜彻底干燥后，浸泡于封阻缓冲液 BB（含 10%脱脂奶粉的 PBS）中，室温缓摇 2 h。室温下，将膜与 PBS/BBT（等体积的 PBS 与含 0.05%吐温 20 的 BB 的混合物）稀释的抗-E-Tag 抗体（终浓度为 8 μg/ml）振荡温育 1 h。用含 0.05%吐温 20 的 PBS 洗膜 1 次，再用 PBS 洗膜 4 次，继而将膜在 PBS 中浸泡 5 min，用滤纸将膜吸干。室温下，将膜与 PBS/BBT 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG（按 1∶150 稀释）振荡温育 1 h。同法洗膜并吸干，用 DAB 显色，以未行 IPTG 诱导的相应产物作对照。

1.3.2 Western 印迹检测可溶性 MC3 ScFv 的表达[9]　基于点印迹实验结果，将 3 个克隆上清的 5 倍浓缩物和 2 倍稀释的周质提取物在 Bio-Rad 电泳装置上进行 SDS-PAGE 电泳（积层胶 5%，分离胶 12%），然后将蛋白从胶上转移至 NC 膜上，后续步骤同点印迹。

1.4 竞争 ELISA 检测可溶性抗体的活性

通过检测可溶性抗体与相应单抗竞争结合抗原的能力来判断可溶性抗体的活性。主要过程：包被 AGS 细胞于 96 孔板，进行固定和封阻后，按 50 μl/孔加入阳性克隆的周质提取物（加入前，先与 1/4 体积的 2%脱脂奶粉混匀，室温作用 15 min），室温作用 1 h，弃上清，用 PBST 洗 6 次，然后按 50 μl/孔加入 MC3 单抗（终浓度为 50 μg/ml），室温作用 1 h，洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG（1∶1 000 稀释，50 μl/孔），室温作用 1 h，洗涤后用 TMB 显色，450 nm 测 *A* 值。实验设 2 个平行孔，按下式计算 ScFv 抑制 MC3 结合抗原的情况：抑制率（%）＝ 1－（实验孔 *A* 值/ 对照孔 *A* 值）×100%。

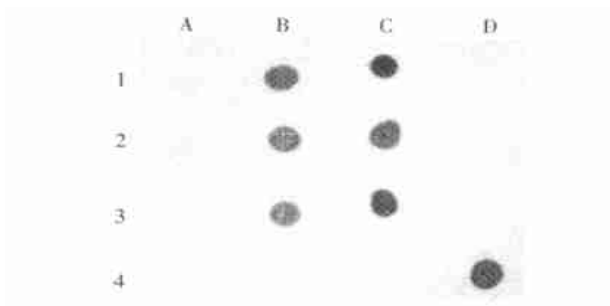
1.5 DNA 序列测定

提取 1 号克隆的噬粒，利用 ScFv DNA 测序引物，经双脱氧链末端终止法，对 ScFv DNA 中的 VH 和 VL DNA 分别进行序列测定。

2 结果

2.1 可溶性抗体表达水平及分子量检测

2.1.1 点印迹检测　如图 1 所示，被检测的 3 个克隆，在全菌提取物无可检测信号，在上清原液仅为弱阳性，而上清浓缩物和周质提取物则呈阳性信号。



1A－3A：Extracellular fractions derived from clones 1－3 respectively；1B－3B：periplasmatic fractions derived from clones 1－3 respectively；1C－3C：TCA-precipitated extracellular fractions (to 1/5 of the original volume) derived from clones 1－3；1D－3D：Whole cell extracts derived from clones 1－3；4A－4C：Periplasmatic fractions，extracellular fractions and whole cell extracts derived from clone 1 without IPTG induction，respectively；4D：Monoclonal antibody of MC3 as positive control

图 1　点印迹检测可溶性 **MC3 ScFv** 在各组分中的分布

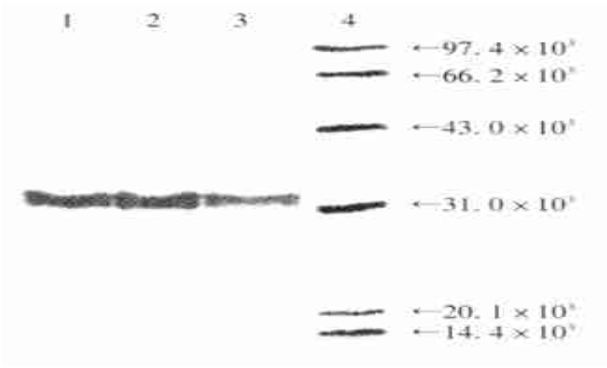
Fig 1　Detection of soluble MC3 ScFv in different fractions by dot blotting

2.1.2 Western 印迹检测　如图 2、3 所示，被检测的 3 个克隆，在周质提取物和上清浓缩物，均在大约 32×10^3 处呈现阳性条带，其中以周质提取物者更强，这一条带与预计的可溶性 ScFv 的分子量相符。

2.2 可溶性抗体的活性检测

经竞争 ELISA 检测，3 个克隆的周质提取物均能抑制 MC3 单抗与 AGS 细胞的结合，抑制率分别为 41.19%、36.89%、33.77%。表明所获 ScFv 与初始单抗 MC3 的抗原结合位点完全相同，其中 1 号克隆来源的 ScFv 的抗原结合能力最强。

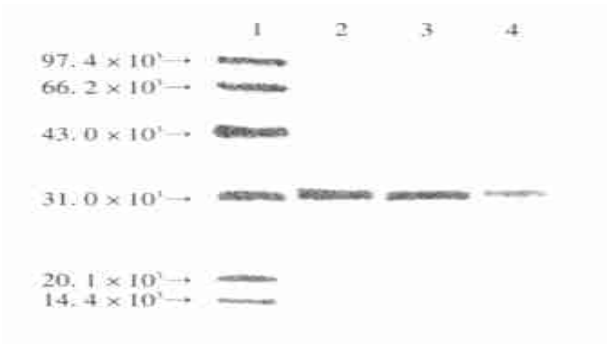
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



1～3: Periplasmatic extracts derived from phage clones 1-3 respectively; 4: Low molecular weight protein marker

图2　MC3 的各克隆周质提取物的免疫印迹

Fig 2　Detection of soluble MC3 ScFv in periplasmatic extract by Western blot



1: Low molecular weight protein marker; 2～4: TCA-precipitated extracellular fractions (to 1/5 of the original volume) derived from the phage clones 1－3 respectively; 4: Low molecular weight protein marker

图3　MC3 的各克隆上清浓缩物的免疫印迹

Fig 3　Detection of soluble MC3 ScFv in TCA-precipitated extracellular fraction by Western blot

2.3　DNA 序列分析

对 1 号克隆来源的噬粒进行 DNA 测序, 结果显示 MC3 ScFv DNA 中的 VH 和 VL DNA 分别为 336 bp 和 312 bp。同源分析表明所得抗体可变区基因隶属于 IgG1 亚族, κ 型。VH 和 VL DNA 的具体序列如下

MC3 ScFv 的 VH DNA 序列(336 bp)

5′- ATGGCCCAGG　TGAAACTGCA　GCAGTCAGGA　CCTGAACTGA　AGAAGCCTGG
AGAGACAGTC　AGGATCTCCT　GCAAGGCTTC　TGGATATACC　TTCACAACTG
CTGGAATGCA　GTGGGTGCAA　AAGATGCCAC　GAAAGGTTT　GAAGTGGATT
GGCTGGATAA　ACACCCACTC　TGGAGTGCCA　AAGTATGCAG　AAGAGTTCAA
GGGAAGCTTT　GCCTTCTCTT　TGGAAACCTC　TGCCAGCACT　GCATATTTAC
AGATAAGCAA　CCTCAAAAAT　GAGGACACGG　CTAGTATTT　CTGTATGAGA
TGGGATTACG　ACGGGGGGTT　TGCTTACTGG　GGCCAA-3′

MC3 ScFv 的 VL DNA 的序列(312 bp)

5′- GCTTCTTTGG　CTGTGTCTCT　AGGGCAGAGG　GCCACCATCT　CCTGCAGAGC
CAGCGAAAGT　GTTGATAATA　TTGGCATTAG　TTTTATGAAC　TGGTTCCAGC
AGAAACCAGG　ACAGCCACCC　AAACTCCTCA　TCTATGCTGC　ATCCAAGCAA
GGATCCGGGG　TCCCTGCCAG　GTTTACTGGC　AGTGGGTCTG　GGACAGATTT
CAGCCTCAAC　ATATATCCTA　TGGAGGAGGA　TGATCCTGCA　GTGTATTTCT
GTCACCAAAG　TAAGGAGGTT　CCTTACACGT　TCGGAGGGGG　GACCAAGCTG
GAGCTGAAAC　GG-3′

3　讨论

近年来, 人们致力于将抗肿瘤抗体用于肿瘤患者体内诊断和治疗研究。然而, 将动物源性的全抗体分子用于人体时容易引起人抗动物抗体反应以及过敏反应, 将抗体小型化后可大大降低这些不良反应, 从而更适用于临床实际应用。使抗体小型化的方法包括化学方法和基因工程方法等, 其中在基因工程方法中又以噬菌体抗体技术最具优势[3]; 用噬菌体呈现技术制备小型化抗体具有如下优点: 在制备过程中不再需要动物和大规模细胞培养, 从而使制备更为快速、经济; 可提供稳定的遗传背景; 容易进行基因水平上的控制和操作; 对异源性抗体而言, 因抗体分子小, 用于在体研究时不易产生抗-抗体反应及过敏反应; 穿透力强, 容易进入肿瘤周围的微循环; 无 Fc 段, 不与具有 Fc 受体的非靶细胞结合, 利于影像学诊断等。

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤, 抗结肠癌单克隆抗体 MC3 的肿瘤组织特异性强, 有可能用于在体研究[4]。本研究在获得能呈现 MC3 ScFv 的噬菌体单克隆的基础上, 对 ScFv 进行了可溶性表达, 从而使其具备了上述小型化抗体的优点, 为拓宽该抗体的应用范围创造了条件。基于实验中所使用的噬粒载体 pCANTAB5E 的特性, 当宿主菌为抑制型菌株 TG1 时, 翻译可通过琥珀密码子, 使 ScFv 与噬菌体基因 Ⅲ编码的蛋白融合, 共同呈现于噬菌体表面; 在换用非抑制性菌株 HB2151 时, 琥珀终止密码子被识别, 蛋白的合成终止于 ScFv 基因下游的 E-Tag 序列。在这种情况下, 所产生的携带 E-Tag 的 ScFv 为可溶形式, 它不断被转运到周质间隙, 并且随着培养时间的延长而渗透到培养上清中。我们利用此原理, 选用抑制性菌株 HB2151 为宿主菌, 成功地表达了单抗 MC3 的可溶性 ScFv 片段。由于在进行可溶性抗体表达时有如下可能性存在: 即一个含有终止密码子的克隆可能虽不干扰抑制性(SopE)菌株 TG1 产生噬菌体呈现型抗体, 但却有可能干扰非抑制性菌株 HB2151 产生可溶性抗体。因此, 一般需要对一个以上的克隆进行可溶性抗体表达实验。

本实验结果表明, 所选的 3 个克隆均能表达可溶性抗体。经点印迹实验证实, 各表达克隆的可溶性抗体均在周质提取物中含量最高, 其次为上清。这种结果可能与诱导培养时间有关, 如果延长诱导时间, 上清

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

中的浓度可能会增加。然而,可溶性抗体富集于周质提取物更有利于从中制备高浓度的可溶性抗体,其原因在于周质提取物是从离心沉淀后的细菌中制备而来,其中不含培养基成分,其制备体积可人为控制,所以本项目经过摸索,以在30℃诱导表达5 h时,可溶性ScFv在周质腔中的浓度最高。基于点印迹实验结果(即可溶性ScFv主要存在于周质腔中),我们在后续Western印迹中,对3个克隆只使用了上清的5倍浓缩物和周质提取物这两种组分,在竞争ELISA进行可溶性抗体的活性检测时,只选用了周质提取物。

我们对1号克隆来源的ScFv DNA进行测序,结果显示MC3 ScFv DNA中的VH和VL DNA分别为336 bp和312 bp。同源分析表明所得抗体可变区基因隶属于IgG1亚族,κ型。

总之,可溶性MC3 ScFv的获得,不仅拓宽了单抗的应用范围,而且为结肠癌体内诊断和治疗研究增添了新的靶向载体分子,同时也为鉴定相关肿瘤抗原提供了更多候选探针。

参考文献:

[1] Kraeber-Bodere F, Bardet S, Hoefnagel C A, *et al*. Radioimmunotherapy in medullary thyroid cancer using bispecific antibody and iodine 131-labeled bivalent gapten: preliminary results of a phase Ⅰ/Ⅱ clinical trial[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(10 Suppl), 3190—3198.

[2] Maloney D G, Donovan K, Hamblin T J. Antibody therapy for treatment of multiple myeloma[J]. Semin Hematol, 1999, 36(1 Suppl 3): 30—33.

[3] Winter G, Griffiths A D, Hawkins R E, *et al*. Making antibodies by phage display technology[J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12: 433—455.

[4] 樊代明, 张学庸, 陈希陶, 等. 抗结肠癌细胞单克隆抗体的制备及相应抗原免疫组化鉴定[J]. 第四军医大学学报, 1988, 9(2): 74—77.

[5] Goel A, Augustine S, Baranowska-Kortylewicz J, Colcher D. Single-dose versus fractionated radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts using 131I-labeled multivalent CC49 single-chain fvs[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(1): 175—184.

[6] Khare P D, Shao X L, Kuroki M, *et al*. Specifically targeted killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-expressing cells by a retroviral vector displaying single-chain variable fragmented antibody to CEA and carrying the gene for inducible nitric oxide synthase[J]. Cancer Res, 2001, 61(1): 370—375.

[7] Mayer A, Tsiompanou E, O'Malley D, *et al*. Radioimmunoguided surgery in colorectal cancer using a genetically engineered anti-CEA single-chain Fv antibody[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(5): 1711—1719.

[8] 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992. 880—898.

[9] Tordsson J M, Ohlsson L G, Abrahmsen L B, *et al*. Phage-selected primate antibodies fused to superantigens for immunotherapy of malignant melanoma[J]. Cancer Immuol Immunother, 2000, 48(12): 691—702.

(编辑 张 宁)

(上接690页)

轻症状、解决饮食的方法有食管胃转流手术、胃造瘘术、扩张术、激光切除术等姑息性方法,均不甚理想,患者生活质量均较差。我们采用食管内支架置入术有效解决了晚期食管癌的食管狭窄、吞咽困难。选择支架以内径1.8 cm,原形长度越过病变2~3 cm,上段喇叭口直径2.0~2.2 cm的覆膜支架为宜。既可防止肿瘤向支架两端过度生长造成再狭窄,又防止了肿瘤通过网眼向腔内生长发生再狭窄之可能[1]。

对食管外伤性穿孔引起食管纵隔瘘、晚期食管癌引起食管气管瘘、食管纵隔瘘,采用内支架置入治疗,解决了瘘的问题,明显改善了治疗效果。我们采用覆膜支架封堵瘘口,使分泌物、食物不能经瘘口进入纵隔或气管中,减少或消除外源性污染,同时疏通了食管,使分泌物、食物顺利通过食管进入胃。瘘口部位处于相对清洁环境中,使常规局部换药、引流、抗感染及全身支持措施更好地发挥作用,从而加速瘘口的愈合。文献报道,食管内支架对食管瘘术后食管吻合口瘘,自发性食管破裂亦有良好疗效,其原理亦如此[2]。

食管良性狭窄,我们采用食管内支架置入行持续性扩张,解决梗阻,行之有效。文献[3]报道对贲门失弛缓症应用支架治疗,持续扩张1周,再经胃镜下取出支架,效果较为满意。

食管支架置入常见并发症有疼痛、出血、食管穿孔等。疼痛多以支架附近胀痛为主,原因可能为支架持续压迫食管,吞咽时支架与食管运动不协调引起,一般对症处理多能缓解,个别患者可能有长期疼痛,影响生存质量。我们有1例上段食管癌行支架置入后出现长期疼痛,一般止痛治疗效果不佳,尤以进食时更为明显,因而严重影响患者进食,营养状况差,3个月后死亡。应引起重视。支架置入后出血一般量较少,多为大便潜血,一般予以对症治疗均能缓解,可能为食管狭窄后扩张,损伤食管粘膜,或者肿瘤出血有关。食管穿孔多与操作技术有关,在插入导丝时应操作轻柔,尤以完全梗阻患者,操作时应注意造影剂流动方向,亦可通过胃镜直视下配合透视置入导丝,较为安全、可靠。

关键词: 食管疾病; 内支架; 治疗
中图法分类号: R655.405 文献标识码: B

参考文献:

[1] 孙兴旺, 崔进国, 于学林, 等. 金属内支架置入并放化疗食管癌性狭窄疗效观察[J]. 临床放射学杂志, 2001, 20(2): 127—129.

[2] 王道喜, 陈文弦. 喇叭状硅胶管置入治疗食管癌术后吻合口瘘和狭窄[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(4): 380—381.

[3] 何建华, 朱锐冰, 丁惠玲, 等. 内镜直视下置放金属支架治疗上消化道狭窄[J]. 中华消化内镜杂志, 2001, 18(2): 120—121.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net