DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.04.020

抗骨形成蛋白单链抗体的构建与表达

孙 远* 杨连甲** 高玉好** 金 岩** (第三军医大学附属西南医院口腔科) 重庆,400038

提 要 目的: 构建抗骨形成蛋白单链抗体并获得表达。方法: 应用一段人工合成的含15个氨基酸的连接肽,采取亚克隆技术,将一株鼠抗BMP单克隆抗体的重链可变区(V_H)的N端和轻链可变区(V_L)的C端连接起来;将连接产物克隆入融合蛋白表达载体pEGX-4T-1,在大肠杆菌JM109中进行表达。结果: 构建的单链抗体(ScFv)全长705 bp,并获得融合表达产物约52×10^3u。结论: 亚克隆方法是一种构建单链抗体快速、简便、可靠的方法。

关键词 BMP;连接肽;单链抗体;表达
中图法分类号 R392.11

骨形成蛋白(BMP)在正常组织中含量很低,当骨肿瘤发生时,其含量明显增高,因此可作为一种相关抗原应用于骨肿瘤的诊断和导向治疗[1]。但鼠源性BMP单抗所具有的免疫性,限制了其在临床上的直接应用。近年来随着基因工程技术的不断进步,鼠源性单克隆抗体的改建工作得到了突飞猛进的发展,如F(ab′)2、F(ab′)、ScFv等抗体分子片段的构建,更是倍受关注[2],临床应用前景十分广阔[3,4]。在此背景下,我们利用从BMP单抗杂交瘤中扩增、克隆的轻、重链可变区基因片段,并应用一种亚克隆方法,成功地构建了BMP单链抗体,在一种融合蛋白表达载体中获得了表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 BMP单抗基因片段 鼠BMP单抗杂交瘤由第四军医大学口腔医学院病理教研室制备并保存,此杂交瘤能稳定地分泌BMP单抗。BMP单抗轻、重链(V_L、V_H)分别克隆于pUC18/19质粒。

1.1.2 试剂 限制性内切酶、T_4 DNA快速连接Kit、cDNA合成Kit购自Boehringer公司,T_7 DNA聚合酶测序Kit购自Promega公司。

1.1.3 引物和连接肽 由上海肿瘤所合成。

1.1.3.1 PCR扩增引物,见图1

V_H Back 5′-CCGAATTCATGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGG-3′
V_H For 5′-CCGAGCTCTGAGGAGACTGTGAGACTGGTCC-3′
V_L Back 5′-GAAGATCTATGGATATCGAGCTGACTCAGTCTCC-3′
V_L For 5′ ATGTCGACACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC-3′

图1 PCR引物核苷酸序列

Fig 1 Neucleotide sequeces of PCR primers

1.1.3.2 连接肽 LinkerFor中引入SacI和BamHI酶切粘端序列,见图2

Linker Back: 5′-GGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCG-3′
Linker For: 5′-GATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCGAGCT-3′

图2 链接肽核苷酸序列

Fig 2 Neucleotide sequeces of linkers

1.1.3.3 质粒 融合表达载体pGEX-4T-1由胡川闽博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 BMP单链抗体(BMP ScFv)的构建

1.2.1.1 多肽链的退火 取LinkerBack和LinkerFor各0.1μg/10μl,加入3 mol/L NaAc 1μl煮沸5 min,令其自然冷却,再经SacI/BamHI双酶切后纯化。

1.2.1.2 多肽链的克隆 将pUC19用SacI/BamHI双酶切后,与酶切纯化的多肽链进行连接反应,连接产物常规转化大肠杆菌,挑取阳性克隆酶切鉴定。

1.2.1.3 以pUC 19-V_L重组质粒为模板,V_L Back、V_L For为引物,常规扩增出V_L片段。V_L片段经BglⅡ/SalI双酶切,pUC19-Linker重组质粒亦经BamHI/SalI双酶切后进行连接反应,常规转化和鉴定。

1.2.1.4 以pUC 19-V_H重组质粒为模板,V_H Back、V_H For为引物,常规扩增出V_H片段。V_H片段经SacI/EcoRI双酶切后,与经同样双酶切的pUC 19-Linker-V_L进行连接反应,反应产物常规转化与鉴定。

1.2.2 BMP单链抗体(BMP ScFv)的表达

* 孙 远,男,35岁,主治医师,讲师,博士
** 第四军医大学口腔医学院病理学教研室 西安,730032

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

1.2.2.1　表达载体的构建　　先将 pUC 10-V_H-Linker-V_L重组质粒用 EcoRI酶切、Klenow酶补平后,再经 SalI酶切,回收切下的约 710 bp片段,和用 SmaI/SalI双酶切的 pGEX-4T-1进行连接反应,连接产物转化大肠杆菌 JM 109

1.2.2.2　诱导表达　　阳性克隆经酶切鉴定后,取 2μl过夜菌加入 2 ml LB(含氨苄青霉素)中,剧烈振摇 2~3 h至对数生长期,加入 IPTG至终浓度 1 mmol/L,继续剧烈振摇培养 4 h,收集菌体进行 SDS-PAGE电泳观察结果。

2　结果

2.1　抗 BMP单链抗体构建结果

pUC 19-linker重组质粒经 EcoRI/SalI双酶切后,20%聚丙烯酰胺凝胶电泳观察,见一约 60 bp片段切下。pUC 19-BMPscFv、pGEX-4T-1-BMPscFv 重组质粒均用 SalI/EcoRI双酶切后,1.5%琼脂糖凝胶电泳观察,均可见有约 710 bp片段切下,见图 3



图 3　BMP ScFv重组质粒的酶切鉴定

A:重组质粒 pUC19-BMP ScFv　B:重组质粒 pGEX-4T-1-BMP ScFv　C:标准分子量

Fig 3　Identification of pUC19-BMPscFv and pGEX-4T-1-BMP ScFv recombinant plasmid digested with SalI and EcoRI

A: pUC19-BMPscFv (3.40 kb)　B: pGEX-4T-1-BMPscFv(5.68 kb)　C: PCR markers

2.2　pGEX-4T-1-BMPscFv的诱导表达

经 IPTG诱导的 pGEX-4T-1-BMPscFv质粒菌体,在 SDS-PAGE电泳谱上出现一条约 52×10^3u左右的新蛋白表达带。其分子量与预计的 GST蛋白和 BMPscFv抗体蛋白分子量之和一致,见图 4

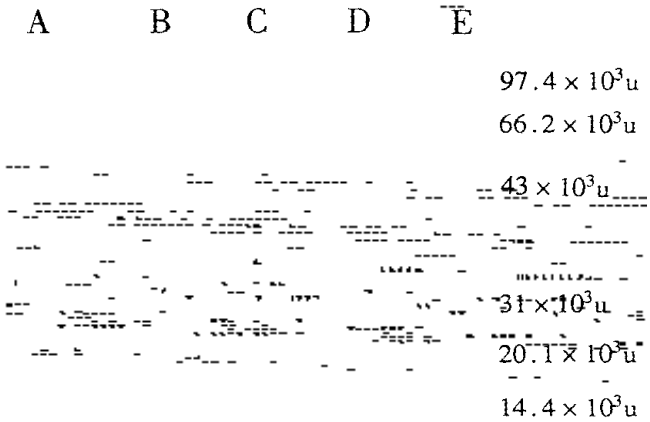


图 4　BMP ScFv融合蛋白 SDS-PAGE电泳结果

A:未诱导的 pGEX-4T-1　B:诱导的 pGEX-4T-1　C:未诱导的 pGEX-4F1-BMP ScFv　D:诱导的 pGEX-4T-1-BMP ScFv　E:蛋白标准分子量参照

Fig 4　SDS-PAGE of pGEX-4T-1-BMPscFv

A: without induction of pGEX-4T-1　B: induction of pGEX-4T-1　C: without induction of pGEX-4T-1-BMPscFv　D: induction of pGEX-4T-1-BMPscFv　E: molecular weight standard

3　讨论

由于天然抗体的 Fv片段中 V_H与 V_L为非共价性结合,只是依靠两链之间的两个二硫键以维持其结构和功能,因此在去除 Fc片段后,V_H与 V_L片段在浓度很低的条件下极易解离而失去活性。为解决定问题,有人采取了用戊二醛使 V_H、V_L表面的亮氨酸和半胱氨酸聚合、或在 Fv骨架区设计链间二硫键等方法来加强 V_H、V_L的联系,但近年来倍受关注的是单链抗体的研究[6,7]。单链抗体是用一条人工合成的多肽链将 V_H、V_L连接起来,使之即保持抗原结合区的完整基因,又不易发生解离的抗体分子片段。为了不影响 Fv的空间结构与稳定性,多肽链的设计十分重要,一般是长度为 15个氨基酸为最佳,同时具有疏水性和伸展性。Huston等人根据 Fab片段 X线衍射分析资料,设计出(Gly4Ser)3连接肽,研究表明此连接肽将 V_H的 C端与 V_L的 N端连接后,不影响 Fv的二级结构,使之具有较好的稳定性与活性。此连接肽已成为"通用 Linker",广泛应用于 ScFv的构建[8]。作者在应用(Gly4Ser)3Linker时,在其 For引物上引入了 SacI/BamHI限制性酶切位点,便于克隆,同时为 V_H、V_L的定向亚克隆提供了条件。在构建单链抗体的方法上,作者所采用的定向亚克隆方法是一种快速、简便易行的方法,且结果可靠。将所构建的 BMPScFv克隆入融合蛋白表达载体 pGEX-4T-1中,经 IPTG诱导,获得表达。表达产物的进一步纯化与活性检测有待于今后的

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

工作。

(对第三军医大学基础医学部分子生物学教研室、预防医学系防原医学教研室、免疫学教研室及附属西南医院放射科的大力支持和刘昕、王燕、胡川闽、粟永萍、陈克敏等同志的热情支持与帮助表示衷心感谢!)

参考文献

1 Jin Yan, Yang Lian-jia. The relationship between bone morphogenetic and neoplastic bone disease. Clin Orthop, 1990, 259(2): 233

2 Winter G, Harris W. Humanization antibodies. Immunology Today, 1993, 14(6): 244

3 Debinski W, Pastan I. Monovalent immunotoxin containing trucated form of pseudomonas exotoxin as potent antitumor agent. Cancer Res, 1992, 52(21): 5379

4 吴永刚,胡锦跃,苏见知,等. ^{99}m标记单抗 Hb3及其片段 F(ab′)2在大肠癌显像中的初步应用.中华核医学杂志, 1996, 16(2): 73

5 孙 远,杨连甲,高玉好,等.小鼠 BMP-McAb可变区基因的体外扩增、克隆与序列测定.细胞与分子生物学杂志, 1997, 13(4): 12

6 Nieroda C A, Milenic D E, Carrasquillo J A, *et al*. Improved tumor radioimmunodetection using a single-chain Fv and γ-interferon: Potential clinical applications for radio immunoguided surgery and γ scanning. Cancer Res, 1995, 55(10): 2858

7 Reiter Y, Brinkmann U, Kreitman R T, *et al*. Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions. Bio Chem, 1994, 33(18): 5451

8 Huston J S, Leuinson D, Mudgett-Honter M, *et al*. Protein engineering of an antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(16): 5 879

(收稿: 1998-08-11;修回: 1998-12-31)

(编辑 王 红)

Construction and expression of bone morphogenetic protein (BMP) single-chain Fv

Sun Yuan, Yang Lianjia, Gao Yuhao, Jin Yan (Department of Oral-facial-maxillary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To construct and express bone morphogenetic protein (BMP) single-chain Fv (ScFv). Methods: A synthetic linder containing 15 amino acids being used, the C end of the heavy chain gene fragment (V_8) and the N end of the light chain gene fragment (V1) of BMP monoclonal antibody were connected with a subclonal method. Then the recombinant BMP ScFv was cloned into pGEX-4T-1 plasmid and induced to express in JM 109 *E. coli*. Results: BMP ScFv gene consisted of 705 base pairs and the BMP ScFv fusion protein was about 52 kd. Conclusion: Subclonal method is a rapid, simple and reliable way to construct ScFV.

Key words bone morphogenetic protein; linker; single-chain Fv; expression

(上接 275页)

着肺动脉压力下降其含量亦下降,提示 TNF确实与肺动脉高压的形成有关,其可能的机制有:① TNFα有抗内皮细胞源性舒张因子(EDRF)的作用,可能通过调节血管活性物质来调节肺血管的收缩[3]。② TNFα可激活血管平滑肌细胞信号传递系统,激活蛋白激酶,从而引起血管平滑肌收缩[4]。③ TNFα可激活 PLA_2,并且是 PAF合成的激动剂,前列腺素、血栓素及 PAF在肺动脉高压形成中具有重要作用(如前述)[5]。

综上,PLA_2、TNF在合成、释放、激活上相互作用,可能最终通过血管活性物质的调节在肺动脉高压的形成中产生重要作用,但其具体作用机制尚待进一步研究。

关键词 缺氧;肺动脉高压;磷脂酶 A_2; TNF

中图法分类号 R345.61; R544; R730.3

参考文献

1 陈思锋,吴中力,丁自强,等.狗急性胰腺炎时磷脂酶 A_2的变化及其在急性肺损伤中的作用.第二军医大学学报, 1989, 10(1): 105

2 王 烨,薛全福,许澎淮,等.常压缺氧大鼠血浆和肺组织 TXB_2和 6-keto-$PGF_{1\alpha}$的动态变化.基础医学与临床, 1995, 15(1): 40

3 Stevens T, Patrick L, Janssen M, *et al*. Acute and long-term TNFα administration increases pulmonary vascular reactivity in isolated rat lungs. J Appl Physiol, 1992, 73(2): 708

4 Miyata M, Sakuma F, Yoshimura A, *et al*. Pulmonary hypertenson in rats. Int Arch Allergy Immunol, 1995, 108(3): 281

5 Chang S W. TNF potentiates PAF-induced pulmonary vasoconstriction in the rat: role of neutrophils and thromboxane A_2. J Appl Physiol, 1994, 77(6): 2 817

(收稿: 1998-04-13;修回: 1999-02-01)

(编辑 汪勤俭)

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