

CNIC-01035

SMC-0124



CN9700478

中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE
AND TECHNOLOGY REPORT

抗人活化血小板单克隆抗体
SZ-51 嵌合 Fab 片段在大肠杆菌中的表达

CONSTRUCTION AND EXPRESSION OF A
FUNCTIONAL MONOCLONAL ANTIBODY
SZ-51 SPECIFIC FOR GMP-140 CHIMERIC
FAB FRAGMENT IN ESCHERICHIA COLI

(In Chinese)



中国核情报中心
原子能出版社

China Nuclear Information Centre
Atomic Energy Press

VOL 20 No 09



顾建明：苏州医学院博士研究生。1989年毕业于苏州医学院，1992年获苏州医学院内科血液学硕士学位。

Gu Jianming: Doctoral candidate of Suzhou Medical College in 1989, and received MS degree in haematology at Suzhou Medical College in 1992.

CNIC-01035

SMC-0124

抗人活化血小板单克隆抗体 SZ-51 嵌合 Fab 片段在大肠杆菌中的表达

顾建明 张效民 夏利军 万海英 刘跃 李佩霞 阮长耿

(苏州医学院)

摘 要

应用基因重组技术将抗人活化血小板 α 颗粒膜蛋白 GMP-140 单克隆抗体 SZ-51 可变区基因片段与人免疫球蛋白 $\gamma 1$ 重链 CH1 和 κ 轻链恒区基因进行拼接,应用 PCR 方法扩增上述重组基因片段,构建噬菌体质粒 pHEN1 SZ-51Fab/Hu 表达载体,将 pHEN1-51Fab/Hu 转入非抑制性大肠菌株 HB2151 中,经 ELISA 法定量测定 SZ-51Fab/Hu 表达量约为 $500 \mu\text{g/L}$; Western 转移电泳证实表达的 SZ-51 嵌合 Fab 片段能特异地与 GMP-140 结合。

**Construction and Expression of a Functional
Monoclonal Antibody SZ-51 Specific for
GMP-140 Chimeric Fab Fragment in Escherichia Coli**
(*In Chinese*)

GU Jianming ZHANG Xiaomin XIA Lijun WAN Haiying
LIU Yue LI Peixia RUAN Changgeng

(Suzhou Medical College)

ABSTRACT

The variable region cDNAs of a monoclonal antibody SZ-51 specific for α -granule membrane protein (GMP-140) on the surface of activated human platelets were spliced with the constant region cDNA of the heavy chain CH1 and light chain κ of human Ig G by means of the gene recombination techniques. The above recombinant gene was amplified by the polymerase chain reaction (PCR). The expression vector of phage plasmid pHEN1 SZ-51 Fab/Hu was constructed. The pHEN1-51 Fab/Hu was introduced into non-suppressor E. coli HB2151. The amount of expression of SZ-51 Fab/Hu measured by quantitative ELISA was about 500 $\mu\text{g/L}$. Western blot demonstrated that the SZ-51 chimeric Fab fragment could specifically bind to GMP-140.

引言

1975年,由Köhler和Milstein创立的单克隆抗体技术是分子免疫学发展史上的一个重要里程碑,在疾病的诊断、治疗等方面显示了广阔的应用前景。然而,鼠源性单抗对人体具有免疫原性,限制了其在人体内的广泛应用。80年代,基因工程嵌合抗体、人源化单抗以及各种新型小分子功能抗体如Fab、Fv、scFv(单链抗体)的研制,克服了鼠源性单抗难以避免的缺点,为单抗介导的导向诊断与导向治疗开辟了崭新途径^[1]。

我院于1989年制备了一株抗人活化血小板(GMP-140)单克隆抗体SZ-51^[2],该单抗在动物体内显示了很好的导向血栓显像与导向溶栓效果^[3,4],因而可以作为特异载体用于人体内的导向血栓显像诊断与导向溶栓治疗。最近,我们应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术成功地克隆出SZ-51单抗重链与轻链的可变区基因片段^[5]。本文将SZ-51单抗可变区基因分别与人免疫球蛋白 γ 1重链CH1和 κ 轻链恒区进行拼接,并在大肠杆菌中表达,获得了具有抗原结合特性的嵌合Fab片段。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

1.1.1 PCR引物设计与合成

VH Back: 5'-CAACTGCAGGAGTCTGGACCTGAG-3'

—————
Pst I

VH For: 5'-GACGGTGACCGAGGTTCCCTGACC-3'

—————
Bst E I

VK Back: 5'-CCAGTTCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA-3'

—————
Sac I

VK For: 5'-GATCTCGAGCTTGGTTCCTCC-3'

—————
Xho I

FAB For: 5'-CCACGATTCTGCGGCCGCTGACTCTCCGCGGTTGAA-3'

—————
Not I

以上引物均由中国科学院上海细胞研究所基因室合成。

1.1.2 宿主菌株

TG1 {K12, Δ (lac-pro), supE, thi, hsdD5/F' traD36, pro A+B+, lacI^q, lacZ Δ M15} 为本室保存; HB2151 {K12, ara, Δ (lac-pro), thi/F' proA+B+, lacI^qZ Δ M15} 以及质粒 pSW1-Fab,

• 本课题由核工业科学基金和江苏省卫生厅资助。

pHEN1均由英国剑桥MRC实验室Greg Winter博士惠赠。

1.1.3 其它试剂

限制性内切酶为Boehringer Mannheim产品;T4 DNA连接酶为BioLabs公司产品;PCR扩增试剂盒为P.E.Cetus公司产品; α -[32 P]-dCTP以及随机引物标记试剂盒为Amersham公司产品;IPTG为Promega公司产品;丙烯酰胺为Pharmacia公司产品;羊抗人IgG及HRP-羊抗人IgG为Immunofech产品。

抗人血小板单克隆抗体SZ-51重链与轻链可变区基因按文献[5]制备。

1.2 方法

1.2.1 聚合酶链反应(PCR)

参照Saiki^[6]等的方法,100 μ l反应体系中,含250 μ mol/L dNTPs;10 mmol/L Tris-HCl,pH8.3;50 mmol/L KCl;2.5 mmol/L MgCl₂;各25 pmol两种引物;1 μ g DNA模板;2.5 U Taq DNA聚合酶。再覆盖100 μ l液体石蜡油,置循环仪(P.E.Cetus公司)上进行PCR扩增。扩增条件为:先94 $^{\circ}$ C变性4 min,然后94 $^{\circ}$ C 1 min,50 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,共30个循环,最后在72 $^{\circ}$ C下保温5 min。

1.2.2 PCR产物的克隆

参照分子克隆方法^[7],PCR扩增产物以等体积氯仿/异戊醇(24/1)抽提一遍,2.5倍体积乙醇沉淀后,经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离纯化SZ-51重链与轻链可变区基因片段。然后经Klenow酶补平、限制性内切酶酶切后与相应的载体片段10:1摩尔比混合,再加入1单位T4 DNA连接酶,反应总体积为20 μ l,16 $^{\circ}$ C下反应过夜。取2~5 μ l连接反应液以CaCl₂法转化感受态细菌TG1或HB2151。

应用随机引物法将 α -[32 P]-dCTP标记于SZ-51重链和轻链可变区基因片段上,并以此为探针,筛选阳性重组子。

1.2.3 可溶性Fab片段在大肠杆菌中的表达^[8]

将噬菌体质粒pHEN1-51Fab/Hu重组体转化的HB2151单个菌落接种至2 ml 2 \times TY培养液(内含100 μ g/ml氨苄青霉素,1%葡萄糖)中,37 $^{\circ}$ C震荡,待OD₅₅₀=0.5~1.0时,收集细菌,以50 mmol/L NaCl洗涤一次,细菌沉淀悬浮于2 ml 2 \times TY(内含100 μ g/ml氨苄青霉素,1 mmol/L IPTG)中,37 $^{\circ}$ C震荡16~24 h。取上清进行ELISA和Western blot直接测定表达抗体蛋白及抗体活性。

1.2.4 表达产物测定

(1)ELISA法:用1 μ g/孔羊抗人IgG包被酶联板,2%BSA封闭过夜,尔后加入50 μ l待测上清与50 μ l 2%BSA-PBS的混和液,37 $^{\circ}$ C反应2 h后,加入HRP-羊抗人IgG,37 $^{\circ}$ C温育2 h,充分洗涤后以OPD显色,3 mol/L H₂SO₄中止反应,测定OD_{492 nm}值。同时以标准人IgG作标准曲线,从而测定Fab的表达量。

(2)Western blot^[9]:GMP-140的纯化按文献[2]进行,凝血酶活化的血小板以1% Triton X-100破碎后,过SZ-51与CNBr活化的Sepharose CL-6B偶联的亲和层析柱,结合的GMP-140以二乙胺(0.05 mol/L,pH11.5)洗脱。按10 μ g纯化的GMP-140/孔进行7%SDS-PAGE电泳^[10],尔后转移至硝酸纤维薄膜上,与表达上清37 $^{\circ}$ C温育2 h后,再加入¹²⁵I标记的羊抗人IgG,最后进行放射自显影。羊抗人IgG碘标记采用Iodogen法^[11]。

2 结果

2.1 pHEN1-51Fab/Hu 表达载体的构建

以 VH Back、VH For、VK Back、VK For 二对引物分别扩增 SZ-51 单抗 VH 与 VK 基因(图1), SZ-51VH(351 bp)用 Pst I 和 Bst E I 双酶切, SZ-51VK(320 bp)用 Sac I 和 Xho I 双酶切, 相继与同样酶切处理的包含人免疫球蛋白恒区基因(CH1 和 CK)的 pSW1-Fab/Hu 连接, 转化 TG1。转化子经碱变性法快速抽提质粒 DNA, 并经杂交筛选获得阳性克隆 pSW1-51Fab/Hu。

再以 pSW1-51Fab/Hu 为模板, 以 VH Back 和 FAB For 为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物(51Fab/Hu, 1.47Kb)及表达质粒 pHEN1 经 Pst I 和 Not I 双酶切后, 进行连接并转化 HB2151, 同样以杂交法筛选阳性质粒, 得到重组表达质粒 pHEN1-51Fab/Hu(图2)。再以双脱氧末端终止法测定阳性克隆质粒 DNA 插入片段的序列, 结果表明, SZ-51Fab/Hu 已正确装入表达载体中, 读框正确。

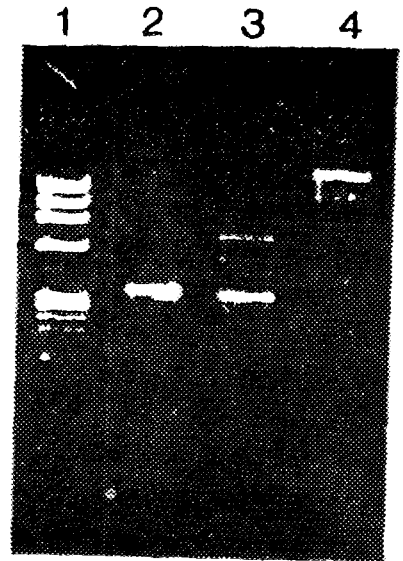


图1 PCR 扩增后2%琼脂糖凝胶电泳
1——标准分子量(ϕ 174 DNA Hae I);
2——SZ-51 VH, 3——SZ-51 VK,
4——SZ-51Fab/Hu

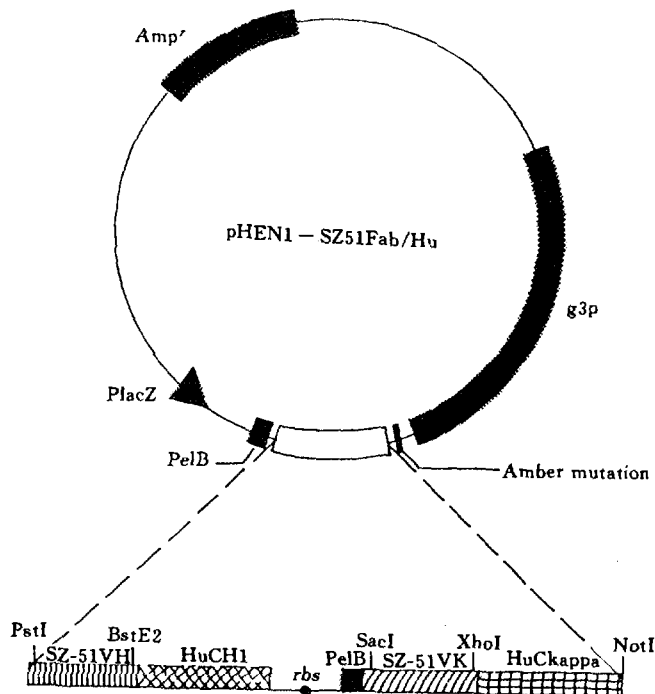


图2 pHEN1-51Fab/Hu 表达质粒构建示意图

2.2 可溶性 Fab 蛋白在大肠杆菌中的表达

噬菌体表达质粒 pHEN1 中装有噬菌体衣壳蛋白 gene III 结构,并引入琥珀突变(Amber)密码子 UAG(图2),若将 pHEN1-51Fab/Hu 导入抑制性大肠菌株如 TG1,则表达出与噬菌体衣壳蛋白 N 末端相连的抗体——噬菌体融合蛋白,抗体功能片段 Fab 呈现在噬菌体表面,而且能正确折叠,并能与特异性抗原结合。本研究将 pHEN1-51Fab/Hu 导入非抑制性大肠菌株 HB2151 中,在 IPTG 的诱导下,则表达出可溶性 Fab 片段,并分泌至培养上清中。经 ELISA 法定量测定 SZ-51Fab/Hu 表达量约为 500 $\mu\text{g/L}$;Western 转移电泳证实表达的 SZ-51 嵌合 Fab 片段能特异地与 GMP-140 结合(图3)。

3 讨论

鼠源性单抗应用于人体内具有许多缺点:(1)易引起过敏反应和免疫复合物的形成;(2)抗体分子量较大,难于渗透到肿瘤或血栓组织深部,且不易从肾脏中排泄。1984年,Morrison^[12]首次应用基因工程技术将单抗可变区基因与人恒定区基因连接,这种重组的嵌合抗体应用于人体大大减少了免疫原性。另外,通过基因工程技术还可制备抗体的最小功能片段,如 Fab、单链 Fv(scFv)^[11],小片段抗体应用于人体既可渗透到血栓组织的深部,又可加快其从肾脏中排泄,减少了单抗在血液中的积聚,因而亦减少了免疫源性。

以往的研究结果^[3,4]表明,抗人活化血小板 α 颗粒膜蛋白(GMP)140单克隆抗体 SZ-51 可用于人体内进行导向血栓显像与导向溶栓治疗。为了减少鼠源性单抗对人体的免疫原性,我们将 SZ-51 单抗可变区基因分别与人免疫球蛋白 γ 1 和 κ 恒区连接,构建鼠-人嵌合抗体 SZ-51Fab/Hu,并在大肠杆菌中表达。表达的嵌合抗体 SZ-51Fab/Hu 能特异地与活化血小板 GMP-140 结合。

文献报道大肠杆菌表达抗体有三种不同的策略^[13]:(1)抗体功能片段直接在大肠杆菌细胞质中的表达,最终产物以不溶的、无活性的包涵体形式存在,需要经溶解、复性和还原才能得到有活性的抗体蛋白。(2)抗体可变区基因插入到 lacZ 基因的 3' 端构成融合基因在细胞质中的表达,这种表达的融合蛋白通常能得到高效表达,且能防止细胞内蛋白酶的水解。(3)抗体基因与葡萄球菌蛋白 A(SPA)基因连接,表达的重组蛋白分泌到大肠杆菌细胞内膜与外膜之间的外周质中,并在其中按适当方式进行折叠和二硫键形成,细胞外膜破碎后可很快通过 IgG 亲和层析柱纯化。这种表达方式避免了细胞内蛋白酶对外源性蛋白的降解,不过抗体的表达水平可能较低。

本研究中,我们选用了噬菌体质粒 pHEN1,抗体基因插入噬菌体 gene III 中,并引入琥珀突变 UAG,当这种重组质粒在抑制性大肠菌株如 TG1 中表达时,则能表达出与噬菌体衣壳蛋白 N 末端相连的融合蛋白——噬菌体抗体。当噬菌体整装时,衣壳蛋白进入细菌外周质,同时抗体重链和轻链通过信号肽亦直接进入细菌外周质,并在其中进行折叠和聚合,这样,抗体功能片段呈现在噬菌体表面。当重组质粒 pHEN1-51Fab/Hu 在非抑制性大肠菌株

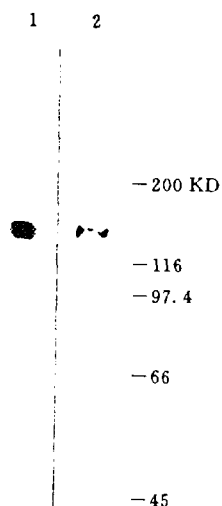


图3 Western 转移电泳

1. 为阳性对照(¹²⁵I-SZ51)

2. 为嵌合抗体(SZ-51Fab/Hu)

如 HB2151 中表达时,由于该宿主菌能识别琥珀突变,所以 gene λ 蛋白不被表达,抗体重链和轻链进入细菌外周质中进行折叠、聚合成功能性 Fab 二聚体,并以可溶性形式分泌入细菌培养上清中。通过检测表达上清中的抗体活性, SZ51-Fab/Hu 能特异地与人活化血小板 α 颗粒膜蛋白 GMP-140 结合。从而显示了 SZ-51 嵌合抗体用于人体内对血栓性疾病患者进行导向血栓显像与导向溶栓治疗的广阔应用前景。

参考文献

- 1 Rodwell J D. *Nature*, 1989, 342:99
- 2 Wu G X, et al. *Nouv. Rev. Fr. Hematol*, 1990, 32:231
- 3 Wu J C, et al. *Nucl. Med. Commun.* , 1993, 14:1088
- 4 杜鸣等. *中国科学(B辑)*, 1993, 23:32
- 5 顾建明等. *生物化学与生物物理学报*, 1995, 3
- 6 Saiki R K, et al. *Science*, 1988, 239:487
- 7 Sambrook J, et al. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. , Cold Spring Harbor, NY), 1989, Second edition
- 8 Hoogenboom H R, et al. *Nucleic Acids Res.* , 1991, 19:4133
- 9 Towbin H T, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , 1979, 76:4350
- 10 Laemmli U K. *Nature*, 1970, 227:680
- 11 Fraker P J, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 1978, 80:849
- 12 Morrison S L, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , 1984, 81:6851
- 13 Pluckthun A. *Bio/technology*, 1991, 9:545

(京) 新登字 077 号

图书在版编目 (CIP) 数据

抗人活化血小板单克隆抗体 SZ-51 嵌合 Fab 片段在大肠杆菌中的表达/顾建明等著. —北京: 原子能出版社, 1996. 4

ISBN 7-5022-1443-7

I. 抗… I. 顾… III. ①核技术-研究报告-中国②基因重组-基因-抗体③单克隆抗体 N. TL-24

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (95) 第 19732 号



原子能出版社出版发行

责任编辑: 武 洁

社址: 北京市海淀区阜成路 43 号 邮政编码: 100037

中国核科技报告编辑部排版

核科学技术情报研究所印刷



开本 787×1092 1/16·印张 1/2·字数 13 千字

1996 年 4 月北京第一版·1996 年 4 月北京第一次印刷

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

This report is subject to copyright. All rights are reserved. Submission of a report for publication implies the transfer of the exclusive publication right from the author(s) to the publisher. No part of this publication, except abstract, may be reproduced, stored in data banks or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of the publisher, China Nuclear Information Centre, and/or Atomic Energy Press. Violations fall under the prosecution act of the Copyright Law of China. The China Nuclear Information Centre and Atomic Energy Press do not accept any responsibility for loss or damage arising from the use of information contained in any of its reports or in any communication about its test or investigations.

ISBN 7-5022-1443-7



9 787502 214432 >