

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0117-05

抗膀胱癌单抗 Fab 段基因的克隆及表达

周丽君¹, 王 琰¹, 白 银², 张海荣¹, 余莉章²(1. 海军总医院中心实验科, 北京 100037; 2. 北京大学第一临床医院)

[摘要] 目的: 克隆抗膀胱癌单抗 BDI 的 Fab 段基因并在大肠杆菌中表达。方法: 用逆转录-聚合酶链反应技术(RT-PCR), 从分泌抗人膀胱癌的鼠单抗杂交瘤细胞系中克隆 κ 链和 Fd 段基因, 克隆到 Fab 表达载体中, 在大肠杆菌表达噬菌体抗体和可溶 Fab; 运用 PCR 介导的定位点突变改造 V_H 氨基端序列; 用 ELISA、免疫组化法等进行特异性鉴定。结果: 从分泌抗膀胱癌的鼠单抗杂交瘤细胞系中克隆了重链 Fd 段和 κ 链基因, 在大肠杆菌中获得有抗原结合活性的噬菌体抗体和可溶性 Fab 的表达, 但活性很弱, 将 V_H 氨基端序列矫正为亲本单抗原始序列后, 明显改善了其活性, 通过 ELISA、免疫组化及模拟抗体库筛选证实了所获抗体片段的特异性结合及在抗体库技术中的可用性。结论: 获得了功能性抗膀胱癌小分子抗体, 并再次提示抗体氨基端序列对抗体活性的影响的重要性。

[关键词] 抗膀胱癌单抗; 免疫球蛋白可变区基因; Fab

[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A

Cloning of Fab Gene of an Anti-Human Bladder Cancer Monoclonal Antibody and Its Expression in *E. coli*

ZHOU Li-jun, WANG Yan, BAI Yin, ZHANG Hai-rong, YU Li-zhang (Navy General Hospital, Beijing 100037, China)

[Abstract] **Objective:** To clone the Fab gene of a monoclonal antibody (mAb) BDI against human bladder cancer and its expression in *E. coli*. **Methods:** Fd and κ genes of mAb BDI were cloned by RT-PCR and inserted into an Fab expression vector. Phage displaying Fab and soluble Fab were expressed in *E. coli*. The N-terminal sequence of V_H region was corrected by PCR mediated mutagenesis. The antigen-binding characteristics of the Fab were tested by ELISA and immunohistochemistry. **Results:** Fd and κ genes were cloned into the expressing vector p3MH and the phage displaying antibody and soluble Fab were expressed in *E. coli*, which showed weak binding activity to bladder cancer cells. Correction of the N-terminal sequence of the V_H improved the binding activity dramatically. The feasibility of the application of the Fab in phage antibody library screening was confirmed by a simulated panning procedure. **Conclusion:** The Fab gene of an anti-human bladder cancer mAb was expressed in *E. coli*. The importance of the N-terminal sequence on antibody binding activity was suggested.

[Key words] anti-human bladder cancer mAb; antibody variable region gene; Fab

* 自单克隆抗体制备技术问世以来, 鼠单抗被广泛用于临床诊断、预防及研究领域, 但在治疗方面的应用则受到限制。主要是由于小鼠单抗是异源蛋白, 重复使用会引起人抗鼠抗体反应。随分子生物学技术发展, 人们可在基因水平上改造抗体结构: 一方面制备更接近人免疫球蛋白的人源化抗体; 另一方面构建各种新型小分子抗体和抗体融合蛋白, 以利于抗体在人体

内应用^[1]。BDI-1 是一株抗人膀胱癌的鼠源性单抗, 在放射免疫显像诊断和治疗应用中取得较好的效

* [基金项目] 国家自然科学基金项目(30070706)资助

[作者简介] 周丽君(1963-), 女, 河北人, 军事医学科学院博士研究生, 副研究员, 主要从事抗体工程研究。

[通讯作者] 王琰, E-mail: wangy@95777.com

果^[2],为使其更好的应用于临床,我们用 RT-PCR 方法克隆了 BDI-1 的 Fd 段和 κ 链基因,构建了 Fab 段表达载体并在大肠杆菌中获得功能性表达。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒、菌株

分泌抗膀胱癌单抗的杂交瘤细胞株 BDI-1 及膀胱癌细胞 EJ 由北京医科大学泌尿研究所提供^[3],杂交瘤所分泌的单抗为 IgG1;噬菌体抗体表达载体 p3MH 是在 pCOMB3H 的基础上由本室改造而成。大肠杆菌 XL1-Blue 和辅助病毒 VCSM13 购自 Stratagene 公司;Tag 酶及限制性内切酶类购自 Promega 公司。

1.2 BDI-Fab 表达载体的构建、筛选及酶切鉴定

1.2.1 寡核苷酸引物设计,重链 Fd 段 5'引物:MH5 5'-ACTCCAGCTCGAGCTKGTGSAGTCWGG,3'引物为:MG1 5'-AGGCTT ACTAGTACAATCCCTGGGCACAAT,分别含有内切酶 XhoI 和 SpeI 的识别序列(划线部分)。 κ 链 5'引物为 3 种引物等量混合:MK51 5'-CCAGTTCGAGCTCCTGMTSACMCAGTCTCCA, MK52 5'-CCAGTTCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA 和 MK53 5'-CCAGATGTGAGCTCGTSATGACCCAGWCTCA。3'引物为 MK3 5'-GCGCCGTCTAGAATTAACACT-CATTCCTGTTGAA。它们分别含有内切酶 SacI 和 XbaI 的识别序列(划线部分)。从前导序列扩增可变区的引物参见文献[4]。

1.2.2 Fd 和 κ 基因的扩增及克隆

用 GIBCO 公司的 TRIZOL 试剂按产品说明书提取杂交瘤总 RNA,以 RT-PCR 法扩增。PCR 产物经琼脂糖电泳分离纯化回收后,按照克隆载体 pGEM-T kit 说明书克隆到 pGEM-T 载体中。

1.2.3 抗膀胱癌 Fab 噬菌体表达载体的构建

利用引物上的酶切位点,将重组到 pGEM 载体上 κ 链用 SacI + XbaI 消化后组装到载体 p3MH 上的 SacI 和 XbaI 部位,电穿孔转化 XL1-Blue 细菌,扩增转化后的细菌,提取含有 κ 链 DNA 的质粒。再经 XhoI + SpeI 消化,与相同内切酶消化的 Fd 片段连接,得到抗膀胱癌 Fab 表达载体 pBDI,电穿孔转化 XL1-Blue 细菌,以相应酶酶切鉴定正确的重组子。

1.3 噬菌体抗体的表达

挑单个阳性菌落在含氨苄青霉素的 SB 中培养至 A_{600} (吸光度值)=0.6,加入辅助病毒 VCSM13 和卡那霉素(70 $\mu\text{g}/\text{ml}$),培养过夜。离心收获上清。

1.4 可溶性 Fab 的表达

以 NheI 消化 pBDI 除去基因 III 片段,自身连接,得到表达可溶性 Fab 的载体 pBDIS。以其转化大肠杆菌

XL1-Blue,挑单菌落在含有氨苄青霉素的 SB 中培养至 $A_{600}=0.2$,加入 IPTG 至 1 mmol/L,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。离心收上清。

1.5 细胞酶联免疫吸附实验(ELISA)

以 10^4 /孔的密度将膀胱癌细胞 EJ 接种于 96 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。以丙酮/无水乙醇(1:1)固定细胞,1% BSA/PBS 封闭,加入 50 μl 含噬菌体抗体或可溶性 Fab 的细菌培养上清,孵育洗涤后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体(抗 M13 或抗小鼠 Fab),OPD 显色。

1.6 竞争抑制实验

以 10^4 /孔的密度将膀胱癌细胞 EJ 接种于 96 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。以丙酮/无水乙醇(1:1)固定细胞,1% BSA/PBS 封闭后加入 100 μl /孔噬菌体抗体,其中分别含有抗膀胱癌鼠单抗或抗乙肝单抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,0.05% Tween/PBS 洗涤后,加入 100 μl /孔 HRP 标记抗噬菌体抗体(1:1 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后 OPD 显色。

抑制率的计算:抑制率(%)=(对照 A_{495} -实验组 A_{495})/对照 $A_{495} \times 100\%$,对照组 A_{495} 为不加竞争抑制剂时所测值,实验组为加抑制剂时所测值。

1.7 抗体库模拟筛选

将获得阳性克隆经适当扩大培养后加入 VCSM13 辅助病毒诱导、培养过夜,离心收集上清,得到噬菌体抗体。再以 1:10 000 的比例与抗乙肝表面抗原(HBsAg)噬菌体抗体混合,与 2.5×10^6 EJ 细胞在室温下旋转混匀 1 h,用 PBS 洗 8 次,离心去上清,与 10 ml 半对数期生长的 XL1-Blue 细菌室温孵育,经扩增后,加入辅助病毒 VCSM13,制备次级噬菌体抗体库,进行下一轮筛选,依次共进行 3 轮的筛选。每轮筛选完成后,取少量回收的噬菌体抗体感染 XL1-Blue 细菌后铺盘,挑选细菌集落,制备单克隆的噬菌体抗体,用 PCR 及 ELISA 检测其基因构成及特异性。

1.8 免疫细胞化学法

对数生长 EJ 细胞消化后吹打成单细胞悬液滴加到盖玻片上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,用 PBS 洗后以冷乙醇/丙酮固定、封闭,分别加入可溶性 Fab 的细菌培养上清 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 洗后加 HRP-抗鼠 Fab 孵育 2 h,以 DAB 显色,抗 HBsAg 代替一抗为阴性对照。

2 结果

2.1 BDI 单抗 κ 和 Fd 基因的扩增、及克隆

从杂交瘤细胞提取总 RNA,合成单链 cDNA,常规 RT-PCR 方法扩增抗膀胱癌单抗 BDI 的 κ 和 Fd 段基因,所用 5'端引物与第一骨架区互补,以适用于 Fab 表达载体 p3MH。利用 pGEM-T 套盒将 PCR 产物克隆到

pGEM 载体上, 测序证明所获为小鼠可变区基因 (图 1), 其轻、重链分别属于 $M\kappa IV$ 和 $MH3D$ 亚群。

图 1 BDI 单抗 Fab 段的重链和轻链可变区的 DNA 和氨基酸序列

Fig. 1 DNA and amino acid sequences of BDI V_H and V_K
underlined are CDRs

2.2 Fab 段的表达及活性的初步检测

将所获 κ 和 Fd 段基因亚克隆到噬菌体抗体表达载体 p3MH 上(图 2), 用辅助病毒超感染制备噬菌体抗体, ELISA 检测其与膀胱癌细胞系 EJ 的结合, 证明其具有结合活性, A 值(吸光度)为 0.422 ± 0.008 。进一步去除载体中的基因 III 片段, 表达可溶性 Fab 段, 仍具有膀胱癌细胞结合活性(表 1)。但二者的结合活性均很弱, 尤其可溶性 Fab 段, 其 A 值仅为 0.193 ± 0.008 。相对其 80 ng/ml 的浓度, 与亲本单抗的活性相差较大。

图 2 Fab 表达载体 p3MH 图谱

Fig. 2 Fab antibody expression vector p3MH

Omp A and Pel B; leader sequences;

Myc: c-myc epitope that can be recognized by mAb 9E10;

G III: gene III fragment; His6: Histidine hexamer

2.3 BDI 单抗可变区原始序列扩增及表达载体的改造

由于上述所获 Fab 结合活性较弱, 我们怀疑与 5' 端引物导入的可变区氨基端序列的改变有关。为此, 用前导序列部位的引物再次扩增了 BDI 的可变区基因, 测序后与上述序列相比, 2 种方法所获轻重链可变区为相同序列, 但 V_H 的氨基端由骨架区引物导入了 3 个残基的突变并增加了 3 个残基(图 3), V_K 的氨基端导入 3 个氨基残基的突变。由于 V_H 变化较大, 我们设计了一条引物(图 3), 通过 PCR 介导的定位突变, 利用载体中 V_H 5' 端侧翼的 *NcoI* 位点, 将表达载体中的 V_H 序列矫正为 BDI 单抗的原始序列。

2.4 矫正后 Fab 的表达及活性检测

表达矫正后的 BDI 可溶性 Fab 段, 将 Fab 段含量调整到 80 ng/ml , ELISA 测定其与人膀胱癌细胞系 EJ 的结合活性, 结果如表 1 所示, 经矫正后, 抗体活性明显改善, 与原始鼠单抗大体相当。

2.5 竞争抑制实验

为核实改造后 Fab 的结合特异性, 我们进行了竞争抑制实验, 以小鼠单抗抑制表达于噬菌体表面的 Fab 与膀胱癌 EJ 细胞的结合, 结果见表 2 所示, 鼠单抗 BDI 能抑制表达于噬菌体表面的 Fab 与膀胱癌 EJ 细胞的

结合,说明我们得到的噬菌体抗体与亲本鼠单抗识别

EJ 细胞的同一抗原表位。

图3 BDI 可变区氨基端序列及 V_H 定点突变 PCR 引物的设计

Fig.3 The N terminal sequences of BDI Fab and 5' PCR primer for V_H mutagenesis

A: N-terminal sequences cloned by 5' primers at the first framework (small letters are PelB sequence in the vector);
 B: The genuine N-terminal sequence cloned by 5 primers at leader sequences (small Letters are leader sequences);
 C: PCR primer for the correction of BDI V_H N-terminal sequence

表1 BDI Fab 与膀胱癌细胞 EJ 结合反应 ELISA

Tab. 1 Binding of Fab fragments with human bladder cancer cell EJ determined by ELISA (A₄₉₀ ± s)

	Phage displaying Fab	Soluble Fab
Before correction	0.422 ± 0.008	0.228 ± 0.019
After correction	0.783 ± 0.015	1.027 ± 0.070
Negative control	0.043 ± 0.003	0.000 ± 0.008
Positive control		1.142 ± 0.021

表2 鼠单抗 BDI 的竞争抑制性 ELISA

Tab. 2 Competitive inhibition ELISA for monoclonal antibody BDI

Competitor	Amount (ng)	Percent inhibition (%)
BDI	10	7.82
BDI	20	20.12
BDI	40	37.3
BDI	80	57.48
BDI	100	96.58
HBsAg Fab	100	10.6

2.6 免疫组化实验

为核实切除基因 III 后可溶性 Fab 的特异性,我们还作了细胞免疫组化实验,结果如图 4,显示改造后

Fab 能与膀胱癌 EJ 细胞特异结合。

图4 免疫组化检测 BDI Fab

Fig.4 Immunohistochemical evaluation of the BDI Fab

A: BDI Fab; B: Anti-HBsAg Fab

2.7 抗体库模拟筛选

为进一步核实所获噬菌体抗体的特异性,并为以后用抗体库技术对鼠单抗 BDI 进行人源化打基础,我们将所获抗膀胱癌的噬菌体抗体与抗 HBsAg 抗体以 1:10 000 的比例混合,用膀胱癌细胞 EJ 为抗原,进行了 3 轮模拟抗体库筛选,分别在 1,2,3 轮各挑选 10 个单集落进行 PCR 及特异性 ELISA 鉴定,结果发现其阳性克隆分别为 0/10,3/10,9/10,第 1,2 轮筛选的富集常在 50 倍以上,证明所获噬菌体抗体性能良好,适用于抗体库技术进行人源化。

3 讨论

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,目前常规治疗方法远非理想而且从根本上不能完全消除肿瘤的复发或转移^[5]。单克隆抗体为其的诊断和治疗提供了一个新方法。自 1984 年以来,国外一些实验室已制备多株抗膀胱癌单抗,其中部分已被用于临床^[6]。针

对 BDI-1 鼠单抗的实验研究显示,该单抗可特异结合人膀胱癌细胞,在荷瘤裸鼠体内选择性分布及杀伤实验中显示良好结果^[7],在放射免疫显像临床试用中也取得预期效果。为使其更好应用于临床治疗,最大限度降低其鼠源性带来的不良反应,有必要将鼠单抗人源化。

RT-PCR 技术的建立为获得抗体可变区基因提供了简便有效方法。目前文献报道主要利用位于第一骨架区通用引物进行抗体可变区基因的克隆,由于引物的兼并性及必要的限制性内切酶位点的引入,可造成个别位置氨基酸残基的改变,尽管抗体的特异性结合能力主要取决于 CDRs,骨架区仍有一定的作用,尤其是 N 端氨基酸残基涉及到 CDR 平面的形成,该区段个别氨基酸残基的改变有可能影响抗原结合部位的构象,进而造成 Fab 活性的改变^[8]。Johnson 等曾报道 PCR 引物引入的氨基端序列变化可影响抗体片段的表达及活性^[9]。我们也曾在表达一株抗人胃癌小分子抗体时发现,轻链和重链可变区氨基端序列均对抗体活性有重要影响^[10]。在本工作中,用第一骨架区通用引物扩增得到的抗膀胱抗体的 Fab 段显示很弱的抗原结合活性,从前导序列扩增其可变区的原始氨基端序列进行比较,发现 V_H 氨基端序列变化较大,通过 PCR 介导的突变将改变的残基修正为 BDI V_H 的原始序列后,显著改善了 Fab 的抗原结合活性,为可变区氨基端在维持抗体活性中的重要性提供了又一例证。

在获得 BDI 单抗的噬菌体抗体后,为进一步验证其功能活性,同时也为下一步用抗体库技术进行人源化打下基础,我们用肿瘤细胞作为抗原进行了抗体库模拟筛选,用无关噬菌体抗体将抗膀胱癌噬菌体抗体进行 10 000 倍稀释后,仅进行了两轮筛选后,所收集克隆中就有 30% 为抗膀胱癌噬菌体抗体,其每轮富集率在 50 倍以上,说明该抗体所针对的抗原在膀胱癌细胞

系 EJ 的膜上有足够丰富的表达,足以用于以后抗体人源化过程中的筛选。

[参考文献]

- [1] 董志伟,王琰. 抗体工程 [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997,83-102.
- [2] Yu L, Gu F, Zhang C, *et al.* Targeted diagnosis and treatment of superficial bladder cancer with monoclonal antibody BDI-1 [J]. Chin Med J, 1998, 111: 404-407.
- [3] 马爱红,谢蜀生,余莉章,等. 抗膀胱癌单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 中华泌尿外科杂志,1990,11: 195-198.
- [4] 李竞,王琰,王卓智,等. 抗胃癌单抗 3H11 可变区氨基端序列对抗体活性的影响 [J]. 生物化学与生物物理进展,1999,26(4): 369-373.
- [5] Metts MC, Metts JC, Milito SJ, *et al.* Bladder cancer a review of diagnosis and management [J]. J Natl Med Assoc, 2000, 92(6): 285-294.
- [6] Bamis A, Keane P, Krausz T, *et al.* Intravesical administration of radiolabeled anti-tumor monoclonal antibody in bladder carcinoma [J]. Cancer Res, 1991, 54: 724-728.
- [7] 布卡,余莉章,张春丽,等. 抗膀胱癌单克隆抗体的^{99m}Tc 标记及荷瘤裸鼠放射免疫显像 [J]. 中华外科杂志,1996,34: 10-12.
- [8] Panka DJ, Mudgett-Hunter M, Parks DR, *et al.* Variable region framework difference result in decreased or increased affinity of variant anti-digoxin antibodies [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(8): 3080-3085.
- [9] Johnson S, Bird RE. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *E. coli* [J]. Meth Enzym, 1991, 203: 88-98.
- [10] Jing L, Wang Y, Wang Z, *et al.* Influence of amino acid sequences in FR1 region on binding activity of the scFv and Fab of an antibody to human gastric cancer cells [J]. Immunol Lett. 2000, 71: 157-165.

[收稿日期] 2001-12-03

[修回日期] 2002-02-26

《中国肿瘤》杂志、《肿瘤学杂志》联合征订启事

《中国肿瘤》杂志系卫生部主管,全国肿瘤防治研究办公室主办的综合类科技月刊,大 16 开,64 页,邮发代号:32-100。该刊以交流肿瘤防治经验,推广肿瘤科技成果,促进肿瘤防治事业的发展为宗旨,是社会各方了解我国肿瘤防治研究工作进展动态的重要途径,也是肿瘤防治研究理论与实践的重要论坛。主要刊载国家癌症控制动态和工作研究报告,肿瘤学术研究成果及进展等。好稿一个月内刊出。

《肿瘤学杂志》是面向全国的学术类科技双月刊,大 16 开,64 页,邮发代号:32-37。该刊由浙江省肿瘤医院和中国癌症研究基金会、全国肿瘤防治研究办公室共同主办,将及时反映我国肿瘤学术研究新领域的新技术、新成果和新进展,以指导科研和临床实践。该刊公平公正,择优录用稿件,力求高质量,好稿快发,1~2 个月内见刊。

以上两刊均为国内外公开发行,均已加入“中国期刊网”、“万方数据库”、“中文生物医学期刊文献数据库”,并专递中国肿瘤网站。

读者可在当地邮局订阅,漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

联系地址:浙江省杭州市半山桥广济路 38 号浙江省肿瘤医院内《中国肿瘤》编辑部 《肿瘤学杂志》编辑部

电话:0571-88147297; 0571-88144401-261 传真:0571-88147297, E-mail: zgzl@mail.hz.zj.cn