

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0054- 04

抗 PSA 单链抗体/p53 四聚功能域融合基因的构建及表达

武国军¹, 王 栋¹, 于 磊¹, 王 禾¹, 郝晓柯², 袁建林¹(1. 第四军医大学西京医院泌尿外科, 西安 710032; 2. 第四军医大学西京医院检验科, 西安 710032)

[摘 要] 目的: 构建抗人前列腺特异抗原(PSA)单链抗体(scFv)/人 p53 四聚功能域融合基因, 并进行真核表达和活性测定。方法: 利用递归 PCR 法扩增人 IgG3 上游铰链区与人 p53 四聚功能域融合基因, 克隆入 pUC19 载体中构建 pUC19/IgG3/p53 克隆载体。将抗 PSA scFv 克隆入 pUC19/IgG3/p53 载体中, 构建抗 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因。经酶切鉴定及序列测定证实后, 将融合基因克隆入真核表达载体 pSecTag2-B 中, 转染 HeLa 细胞进行表达, 表达产物纯化后利用流式细胞仪进行活性测定。结果: 获得了抗 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因, 基因全长 891 bp, 可编码 297 个氨基酸, 与已发表的抗 PSA scFv、人 IgG3 上游铰链区和人 p53 四聚功能域基因 cDNA 序列一致。表达产物经 SDS-PAGE 和 Western 印迹实验证实为约 35 kD 的特异蛋白条带, 纯化后经流式细胞仪检测可以特异性地结合 PC-3 细胞, 亲和力高于 scFv。结论: 获得了可与 PC-3 细胞特异结合的抗 PSA scFv 四聚体, 为进一步临床应用奠定基础。

[关键词] 前列腺特异抗原; p53 四聚功能域; 融合基因

[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A

Construction of the Tetramerizing Single Chain Fv Antibody Gene Specific for Human Prostate Specific Antigen and Its Expression in HeLa Cells

WU Guo-jun¹, WANG Dong¹, YU Lei¹, WANG He¹, HAO Xiao-ke², YUAN Jian-lin¹(1. Department of Urology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China; 2. Department of Clinical Laboratory Examination, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

[Abstract] Objective: To construct anti-human prostate specific antigen (PSA) single chain Fv antibody (scFv)/human p53 tetramerization domain fusion gene and express fusion protein in HeLa cells. Methods: The human IgG3 upper hinge/human p53 tetramerization domain fusion gene was obtained by recursive polymerase chain reaction (PCR), and was inserted into pUC19 to construct cloning plasmid pUC19/IgG3/p53. The anti-PSA scFv was then cloned into pUC19/IgG3/p53 to construct anti-PSA scFv /human p53 tetramerization domain fusion gene which was then subcloned into the pSecTag2-B expression plasmid. Then the pSecTag2-B plasmids concluding the fusion gene were transfected HeLa cells. The expression products were analyzed by both SDS-PAGE and Western blot, then were purified with Ni²⁺-NTA superflow affinity chromatography. The binding affinity for PC-3 cells was measured by flow cytometry. Results: The anti-PSA scFv/human p53 tetramerization domain fusion gene consisted of 891bp encoding 297 amino acid residues, and was the same as that reported before. The expression products of the tetrameric anti-PSA scFv, which relative molecular mass (Mr) was about 35 000, were confirmed by SDS-PAGE and Western blot. After purified with Ni²⁺-NTA superflow affinity chromatography, the tetrameric anti-PSA scFv showed significantly stronger binding to PC-3 cells than scFv. Conclusion: The tetrameric anti-PSA scFv which could bind to PC-3 cells has been successfully gained for the potential use in clinical studies.

[Key words] prostate specific antigen; p53 tetramerization domain; fusion gene

* 前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)是一种灵敏度较高的前列腺癌肿瘤标志物, ¹³¹I 标记抗 PSA 单克隆抗体用于前列腺癌放射免疫显像, 有较高的灵敏度和特异性^[1]。针对鼠源性单克隆抗体对人体

[基金项目] 国家自然科学基金(39900180)资助、全军重点实验室研究基金(1997 - 71 - 22)资助

[作者简介] 武国军(1972-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 主治医师, 硕士, 主要从事前列腺癌免疫治疗研究。

[通信作者] 于 磊

存在着免疫原性的问题,自 80 年代以来人们利用基因工程技术对鼠源性单克隆抗体进行结构改造,构建单链抗体(single chain Fv antibody, scFv),嵌合抗体,人源化抗体等^[2,6]。基因工程抗体的研究领域相当广泛,尤其在肿瘤的免疫诊断和免疫治疗方面有很多探索^[7]。自 1988 年起,我室先后获得了抗人 PSA 的鼠源性单克隆抗体,基因工程单链抗体和 scFv,均有较高的灵敏度和特异性^[6,8,9]。scFv 只有一个抗原结合区,抗原结合力较完整的单克隆抗体低。针对这一现状,我们利用人 p53 四聚功能域表达产物可自动装配成四聚体^[10-12]这一特点克隆了人 p53 四聚功能域,构建抗人 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因,并进行了真核表达和活性测定。

1 材料与方法

1.1 材料

分泌型真核表达载体 pSecTag2-B 质粒由本室保存。抗人 PSA scFv 由本室制备并培养。引物合成:博亚公司。限制性内切酶及 *E. coli* JM109 感受态细胞:TaKaRa 公司。 T_4 连接酶及 Taq 酶:华美公司。质粒提取及胶回收试剂盒:上海华舜公司。 Ni^{2+} -NTA super-flow 树脂、脂质体和鼠抗 6 × His 单克隆抗体为 QIAGEN 公司产品。FITC 标记的抗 myc 单克隆抗体由第四军医大学免疫教研室谢鑫博士惠赠。

1.2 人 IgG3 上游铰链区/p53 四聚功能域融合基因的扩增及克隆

根据 IgG3 上游铰链区及 p53 四聚功能域基因序列,结合递归 PCR 引物设计原则^[13],设计并合成了 PCR 引物。其序列分别如下:引物 ① 5'-tcgacaccccacttggtgacacaactcacacatccggaaaccactggatggagaatattcacccttcagatccgtggcgtgagcgttcgagat-3';引物 ② 5'-agcttggctccttc-cagcctgggcatccttgagttccaaggcctcattcagctctcgaacatctcgaagcgtca-3';引物 ③ 5'-cgtcgacaccccacttggtgacacaa-3';引物 ④ 5'-agaagcttggctccttcagcctgggc-3'

利用递归 PCR 得到 IgG3 上游铰链区与人 p53 四聚功能域融合基因^[12],并在两端引入 Sal I 与 Hind III 酶切位点。将 PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,切下目标条带后回收,用 Sal I 与 Hind III 酶切,与用 Sal I 与 Hind III 双酶切后的 pUC19 载体用 T_4 连接酶连接,转化 JM109 感受态细胞,涂布于 LB 平板(含氨苄青霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),用蓝白法筛选出阳性克隆,在 PE310 全自动荧光测序仪上进行序列测定。

1.3 抗 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因的克隆、测序、空间构象分析和表达

将抗 PSA scFv cDNA 和 pUC19/IgG3/p53 克隆载

体 DNA 分别用 EcoR I 和 Sal I 双酶切,用 T_4 连接酶连接,转化 JM109 感受态细胞,筛选阳性克隆进行序列测定。将抗 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因(scFv 四聚体基因)对应的氨基酸序列输入计算机,用 3D-PSSM 软件进行空间构象分析。提取测序正确的抗 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因/pUC19 质粒及 pSecTag2-B,用 EcoR I 与 Hind III 双酶切,连接后转化 JM109 感受态细胞,筛选阳性克隆。将脂质体 $1.5 \mu\text{l}$ 用 DMEM 稀释至 $20 \mu\text{l}$ 后,与 $20 \mu\text{l}$ 抗 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因/pSecTag2-B 质粒充分混合,室温下静置 5 min,转染 HeLa 细胞,用同样方法将 pSecTag2-B 空质粒转染 HeLa 细胞作为对照,5 h 后给转染后的 HeLa 细胞换液,在 37°C 的 CO_2 孵箱中培养 72 h 后,分别收集细胞培养液并冻干,称取 $0.1 \mu\text{g}$ 蛋白干粉,加 H_2O 和 $2 \times$ Loading buffer 各 $60 \mu\text{l}$,充分混匀后,放于 100°C 沸水中煮 10 min,12 000 转离心 10 min,各取上清 $30 \mu\text{l}$ 进行 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。另外各取处理后的蛋白样品 $30 \mu\text{l}$ 进行 Western 印迹实验。将收集备用的细胞培养上清液以 $10 \sim 15 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速过 Ni^{2+} -NTA 柱,随后以 MCAC-0 缓冲液洗柱,再分别用 MCAC-30(MCAC-0 中加入咪唑至 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,以此类推),MCAC-100,MCAC-200,MCAC-300 洗柱,收集洗脱液,待 SDS-PAGE 分析后合并含洗脱蛋白的组分。

1.4 表达产物的活性鉴定

取对数生长的 PC-3 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 调整细胞浓度为 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$,取 $40 \mu\text{l}$ 细胞悬液分别加入纯化后的四聚体 scFv $10 \mu\text{g}$ 和用同样方法表达并纯化的抗人 PSA scFv $10 \mu\text{g}$,再加 $50 \mu\text{l}$ 1:20(用 DPBS 稀释)灭活正常兔血清, 4°C 放置 30 min,用洗涤液洗涤 2 次,每次加洗涤液 2 ml,1 000 × 5 r/min 离心,弃上清,加入 $50 \mu\text{l}$ 1:1 500 的 FITC 标记的抗 myc 单克隆抗体,充分振摇, 4°C 放置 30 min,用洗涤液洗涤 2 次,每次加洗涤液 2 ml,1 000 × 5 r/min 离心,弃上清,加入 1 ml 固定液,进行流式细胞仪(FCM)检测。取 PC-3 细胞悬液按同样方法只加入灭活正常兔血清作为阴性对照。

2 结果

2.1 人 IgG3 上游铰链区/p53 四聚功能域融合基因的克隆及鉴定

递归 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见一约 160 bp 大小的特异性条带(见图 1)。将 PCR 产物及 pUC19 载体双酶切后连接并转化 JM109 感受态细胞,随机挑选白色菌落提取质粒 DNA,经 Sal I

与 Hind III 酶切后,电泳可见重组质粒切出约 160 bp 大小的片段(见图 1)。取阳性克隆经单向自动测序,所得结果与已发表的 IgG3 上游铰链区和人 p53 四聚功能域核苷酸序列一致。

图 1 人 IgG3 上游铰链区/p53 四聚功能域融合基因的扩增和克隆

Fig.1 Amplification and cloning of human IgG3 upper hinge/p53 tetramerization domain fusion gene

M: λDNA/Hind III + EcoR I marker (1 543, 994, 695, 515, 377 bp from top to bottom); 1: PCR product; 2: Positive recombinant plasmid; 3: Negative control

2.2 抗 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因的克隆、序列测定和空间构象分析

将抗人 PSA scFv cDNA 克隆入克隆载体 pUC19/IgG3/p53 后,随机挑取克隆,提取质粒 DNA,经 EcoR I, Sal I 双酶切鉴定,结果重组质粒可得到 750 bp 大小的抗人 PSA scFv 插入片段(见图 2)。将抗人 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因阳性重组质粒测序,结果表明:基因全长 891 bp,可编码 297 个氨基酸,与已发表的抗人 PSA scFv,人 IgG3 上游铰链区和人 p53 四聚功能域基因 cDNA 序列一致。将抗人 PSA/人 p53 四聚功能域融合基因对应的氨基酸序列输入计算机,用 3D-PSSM 软件分析,分析结果显示:融合基因表达产物可自动组装成 scFv 四聚体形式,N 端的 22 个氨基酸不参加四聚体的构成,构成一条较长的、柔性较好的多肽。

2.3 融合基因的真核表达及纯化

SDS-PAGE 结果显示:转染抗 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因/pSecTag2-B 质粒的 HeLa 细胞培养上清中有新生蛋白条带(见图 3),该蛋白表达量低于总蛋白 10%,不特异,为进一步证实该蛋白为目的蛋白,进行 Western 印迹实验,结果显示:HeLa 细胞培养上清中含有融合 6 × His 的大小约为 35 kD 的表达蛋白。表达的融合蛋白经 Ni²⁺-NTA 偶联的琼脂糖珠“锚定”纯化,在洗脱液 MCAC-200,MCAC-300 中得到较高纯度的表达蛋白(见图 3)。

2.4 表达产物的活性鉴定

经 FMC 分析后,结果显示表达产物具有较好的生物学活性,与 PC-3 细胞的阳性结合率为 69.5%,而 scFv 的阳性结合率为 22.4%(见图 4)。

图 2 抗 PSA scFv/人 p53 四聚功能域融合基因的克隆和酶切鉴定

Fig.2 PCR product and identification of anti-PSA scFv / human p53 tetramerization domain fusion gene-pUC19 recombinant plasmids digested with restriction endonucleases

M: DNA marker (2 000, 1 500, 1 000, 750, 500 and 250 bp from top to bottom); 1, 2: Plasmid pUC19/IgG3/p53 cut with EcoR I + Sal I; 3: Anti-PSA scFv PCR product; 4: Anti-PSA scFv /human p53 tetramerization domain fusion-pUC19 recombinant plasmid cut with EcoR I + Sal I

图 3 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析和 Western 印迹实验

Fig.3 SDS-PAGE and Western blot of fusion protein

M: Marker proteins; 1: Culture supernatant of HeLa cells transfected by pSecTag2-B plasmid; 2: Culture supernatant of HeLa cell transfected by fusion gene-pSecTag2-B plasmid; 3: Eluted fraction of MCAC-30; 4: Eluted fraction of MCAC-200; 5: Eluted fraction of MCAC-300; 6: Western blot analysis

3 讨论

p53 基因的表达产物主要以四聚体形式存在,由第 319 ~ 360 位氨基酸组成的结构域能将其自身组装成四聚体,故该结构域被称为四聚功能域,其晶体结构分析表明^[10-12]:一个甘氨酸残基将一个 α 螺旋与一个 β 折叠连接构成一个单体,2 个单体反向平行连接后构

成一个二聚物,2个二聚物之间通过 α 螺旋与 β 折叠之间的疏水键作用形成四聚体。因此,若将scFv与p53四聚功能域基因融合,其表达产物将会自动组装成四聚体。scFv只有一个抗原结合区,抗原结合力较完整的单克隆抗体低,因此,我们选择p53四聚功能域基因与抗人PSA scFv基因融合,利用p53四聚功能域基因表达产物会自动组装成四聚体这一特性,使抗人PSA scFv基因表达产物形成四聚体,该抗体具有四个功能区,将增加对抗原的结合力。为保证四聚功能域

与scFv的空间构象互不影响,我们把人的IgG3上游铰链区融合在p53四聚功能域的N端。人的IgG3上游铰链区由11个氨基酸组成,柔性好,不但可以保证四聚功能域与scFv的空间构象互不影响,还可以使scFv四聚体中4个抗体同时与距离较远的抗原结合,进一步增加功能性亲和力^[14]。另外,由于p53四聚功能域与IgG3上游铰链区基因均为源性,因此为构建完全人源化scFv,减少免疫排斥反应提供了可能。

图4 流式细胞仪分析抗PSA scFv四聚体、抗PSA scFv与PC-3的结合活性

Fig. 4 FCM analysis of tetrameric anti-human PSA scFv and anti-human PSA scFv binding to PC-3 cells

A: Negative control of PC-3 cells; B: Anti-human PSA scFv binding to PC-3 cells;
C: Tetrameric anti-human PSA scFv binding to PC-3 cells

本次研究通过递归PCR获得了人p53四聚功能域/IgG3上游铰链区融合基因,将抗人PSA scFv基因序列融合在新构建的四聚功能域5'端,构建了抗人PSA scFv四聚体基因,并进行了真核表达。SDS-PAGE及Western印迹结果显示:转染四聚体scFv真核表达载体后的HeLa细胞培养上清中有较高水平的表达。流式细胞仪结果显示:四聚体scFv可以特异性的结合PC-3细胞,具有较好的生物学活性,并且亲和活性明显高于scFv,从而进一步证实了本实验思路的可行性,为该抗体的进一步体内实验奠定了基础,并且为提高抗体亲和活性,制备高亲和活性抗体开辟了新思路。

[参考文献]

- [1] 郝晓柯,梁国栋,任渭涛,等. 人精浆蛋白放射免疫分析法对前列腺癌的诊断[J]. 中华泌尿外科杂志, 1989, 10(6): 326-328.
- [2] Reiter Y, Brinkmann U, Lee B, *et al.* Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: Disulfide-stabilized Fv fragments[J]. Nature Biotech, 1996, 14(10): 1239-1244.
- [3] Fell HP, Gayle MA, Yelton D, *et al.* Chimeric L6 anti-tumor antibody[J]. J Biol Chem, 1992, 267(22): 15552-15558.
- [4] Holliger P, Prospero T, Winter G. Diabodies: Small bivalent and bispecific antibody fragments[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(6): 6444-6448.
- [5] 武国军,郝晓柯,白玉杰,等. 抗人精浆蛋白单克隆抗体轻、重链可变区基因的克隆及序列分析[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(5): 484-487.
- [6] 郝晓柯,武国军,白玉杰,等. 抗人精浆蛋白单链抗体的构建及表达[J]. 中华泌尿外科杂志, 1999, 20(1): 5-8.
- [7] 刘玉英,钱和年. 单链抗体基因在大肠杆菌高效表达研究进展[J]. 国外医学免疫学分册, 1997, 20(6): 320-323.
- [8] 袁建林,王智,武国军,等. 抗人 γ -精浆蛋白V_H单链抗体基因的构建、表达及空间构象分析[J]. 西安交通大学学报医学版, 2001, 22(3): 197-200.
- [9] 郝晓柯,梁国栋,任渭涛,等. 人精浆蛋白放射免疫分析法对前列腺癌的诊断[J]. 中华泌尿外科杂志, 1989, 10(6): 326-328.
- [10] Clore GM, Omichinski JG, Sakaguchi K, *et al.* Interhelical angles in the solution structure of the oligomerization domain of p53 correction[J]. Science, 1995, 267: 1515-1516.
- [11] Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms[J]. Science, 1995, 267: 1498-1502.
- [12] Sakamoto H, Lewis MS, Sakaguchi K. Specific sequences from the carboxyl terminus of the human p53 gene product form anti-parallel tetramers in solution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 8974-8978.
- [13] Prodromou C, Pearl LH. Recursive PCR: A novel technique for total gene synthesis[J]. Protein Eng, 1992, 5: 827-829.
- [14] Pack P, Pluckthun A. Mini-antibodies: Use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*[J]. Biochemistry, 1992, 31: 1579-1584.

[收稿日期] 2002-10-23

[修回日期] 2003-01-10