

抗转铁蛋白受体单链抗体的可溶性表达及其对脑的靶向性研究

颜 冰* 朱恒奇 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘 要 分段合成大鼠抗转铁蛋白受体单链抗体基因(ox26-scFv),经三轮 PCR 拼接成 794bp 的完整片段。测序后构建 pTIG-Trx/ox26-scFv 表达载体,在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得了可溶性表达,经 Ni-NTA 金属螯合层析柱纯化,在 29 kD 处可见单一条带。大鼠 GH3 细胞免疫组化显示,该单链抗体能识别并与转铁蛋白受体结合。将单链抗体尾静脉注射大鼠,于鼠脑组织切片上可见阳性染色,尤其是脑血管处着色明显,说明该单链抗体对脑血管具有较好的靶向作用,并在受体的介导下通过了血脑屏障。

关键词 转铁蛋白受体,单链抗体,血脑屏障,可溶性表达,药物转运

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)03-0342-06

近年来蛋白质、多肽等大分子脑治疗药物的研究发展迅速,其中许多药物具有很好的疗效,但因血脑屏障的屏蔽无法进入脑中,成为中枢神经系统疾病诊断治疗的瓶颈。目前的临床医生多尝试鞘内或脑室穿刺直接给药以绕过血脑屏障,或是通过渗透压休克法开放血脑屏障,这些方法技术要求高,副作用大,易造成颅内感染。最近几年国外文献报道受体(主要是转铁蛋白受体和胰岛素受体)介导的血脑屏障转运载体法特异性好、转运效率高、副作用小,为大分子药物透血脑屏障的研究提供了新途径^[1-5]。针对这些研究采用的载体多为单克隆抗体,存在分子较大,制备成本高等问题,本文采用基因工程方法克隆表达了小分子的抗大鼠转铁蛋白受体的单链抗体蛋白(ox26-scFv),细胞和动物试验显示该单链抗体能与转铁蛋白受体特异性结合,并对脑有一定的靶向作用,可能是一种新型的血脑屏障转运载体。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株:大肠杆菌 JM109、BL21(DE3)为本实验室保存。

NO1	CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGGGCTGCGCTGCTGAGGCCTGGAGCTTCAATGAGGCTG
NO2	CTGGAGCTTCAATGAGGCTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACTCCTTACCACCTACTGGA
NO3	CTCCTTACCACCTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCCTTGA

1.1.2 质粒载体:大肠杆菌 pTIG-Trx 表达载体由本所赵志虎博士惠赠,是在 pET-22b(+)载体的 *Nde* I、*Eco*R I 之间插入了硫氧还蛋白(Trx)基因改构而成。

1.1.3 细胞系和动物:大鼠垂体瘤细胞系 GH3 购自北京细胞中心;SD 大鼠(每只约 200g)购自军事医学科学院试验动物中心。

1.1.4 试剂:Tag Plus I 聚合酶为上海生工生物工程公司产品;T4 DNA 连接酶、*Not* I、*Eco*R I、DNA Marker DL2 000 为 TaKaRa 公司产品;含 E. tag 标签的无关抗肝癌单链抗体 mscFv₂₅ 为本实验室制备;Anti-E. tag 单克隆抗体购自 Amersham 公司;羊抗鼠-HRP 购自 Santa Cruz 公司;生物素标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记的链霉卵白素购自中山生物公司;Ni-NTA agarose 购自 QIAGEN 公司;Ultrafree-15 超滤柱购自 Millipore 公司;200bp DNA Ladder、蛋白分子量标准购自华美公司。

1.2 方法

1.2.1 ox26-scFv 基因的合成:分 18 段合成 ox26-scFv 基因^[6],每段基因首尾各有 20bp 的序列相互重叠搭桥,以利于 PCR 反应中片段的延伸。

收稿日期 2003-10-17,修回日期 2004-02-16。

基金项目 国家自然科学基金资助(No.30300102 和北京市自然科学基金资助(No.5042022))。

* 通讯作者。 Tel:86-10-66948831; E-mail:yanbing72@hotmail.com © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

NO4 CCTGACAAGGCCTTGAGTTGATTGGCATGATTCATCCTTCCGATAGTGAAGTTAGGTTA
NO5 CCGATAGTGAAGTTAGGTTAAATCAGAAATTCAGGACAAGGCCACATTGACTGTTGACA
NO6 GGCCACATTGACTGTTGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCCGAC
NO7 ATGCAACTCAACAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTGCGGC
NO8 ATTACTGTGCAAGATTGCGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCCACCACTCTCACAGTCTCCT
NO9 CACCACTCTCACAGTCTCCTCCGGTGGAGGCGGTTACAGGTGAGGTGGCTCTGGCGGTGG
NO10 GGAGGTGGCTCTGGCGGTGGAGGCTCAGATATCGTGATCACCCAATCTCCATCCAGTCTG
NO11 CCCAATCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGCGACACAATTCTCATCACTTGCCATG
NO12 AATTCTCATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGTTTGTTAAGTTGGTTCCAGCA
NO13 TGGTTAAGTTGGTTCCAGCAGAAACCAGGAAATGCTCCTAAACTGTTGATCTATAAGGCT
NO14 AACTGTTGATCTATAAGGCTTCCAACCTTGCACACAGGCGTCCCATCAAGATTTAGTGGA
NO15 CCCATCAAGATTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTCACATTAACCATCAGCAGCCT
NO16 ACATTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGT
NO17 CTTACTACTGTCAACAGGGTCAAAGTTATCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCCACCAAGCTGG
NO18 CGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAATCAAACGGGCT

1.2.2 ox26-scFv 全长基因的获得：

(1)引物设计:设计了4对用于 ox26-scFv 基因拼接和扩增的引物。

P1 : 5' CGGAATCTCTAAATGCAGGTGCAGCTGCAG 3'	与片段1的5'端序列相同,含有 <i>Eco</i> R I 位点、终止密码子及起始密码子。
P2 : 5' GTCGGGCTGTTGAGTTGCATG 3'	与片段6的3'端序列互补。
P3 : 5' CCGATAGTGAAGTTAGGTTAA 3'	与片段5的5'端序列相同。
P4 : 5' CAGACTGGATGGAGATTGGGT 3'	与片段10的3'端序列互补。
P5 : 5' CACCACTCTCACAGTCTCCTG 3'	与片段9的5'端序列相同。
P6 : 5' TGCCACTAAATCTTGATGGGA 3'	与片段14的3'端序列互补。
P7 : 5' TGGTTAAGTTGGTTCCAGCAG 3'	与片段13的5'端序列相同
P8 : 5' ATAAGAATCGCGCCGC TTA GTGATCGTGCATGATGGTG ACGCGGTTCCAGAGGATCAGGATACGGCACCGGCGCACC AGCCCGTTT- GATTTCCAG 3'	与片段18的3'端序列互补,含有 <i>Not</i> I 位点、终止密码子 TTA。并 引入了6个氨基酸的 His. tag 纯化标签和13个氨基酸的 E. tag 检测标签

(2)片段 F1、F2、F3、F4 的扩增：分别以片段 NO1.....NO6 为模板，P1、P2 为引物扩增片段 F1；NO5.....NO10 为模板，P3、P4 为引物扩增片段 F2；NO9.....NO14 为模板，P5、P6 为引物扩增片段 F3；片段 NO13.....NO18 为模板，P7、P8 为引物扩增片段 F4。每个片段浓度 0.02mol/L，引物浓度 50pmol/L。94℃ 30s，58℃ 30s，72℃ 30s，10 个循环，94℃ 30s，68℃ 30s，72℃ 30s，20 个循环。

(3)片段 F₁₋₂和片段 F₃₋₄的扩增：PCR 产物 F1、F2、F3、F4 纯化后各取 1μL 稀释 20 倍。以 F1、F2 的稀释产物各 2μL 为模板，P1、P4 为引物，扩增片段 F₁₋₂；F3、F4 的稀释产物各 2μL 为模板，P5、P8 为引物，扩增片段 F₃₋₄。反应条件：不加引物，94℃ 30s，72℃ 50s，7 个循环。添加引物，94℃ 30s，65℃ 30s，72℃ 40s，28 个循环。

(4)ox26-scFv 全长基因的获得：以 PCR 产物 F₁₋₂和 F₃₋₄为模板，P1、P8 为首尾引物，反应条件同上 [1.2.2(3)]

1.2.3 ox26-scFv 表达载体的构建及序列测定：PCR 产物和 pTIG-Trx 载体分别用 *Eco*R I、*Not* I 双切后，T4 DNA 连接酶 4℃ 连接过夜。取上述连接产物转化 *E. coli* JM109 铺板后，37℃ 倒置培养过夜。挑取克隆，酶切鉴定分析，操作方法见《分子克隆实验指南》。选取阳性克隆送交上海生工生物工程公司测序，5'端测序引物为 T7 promoter primer，3'端测序引物为 T7 terminator primer。

1.2.4 ox26-scFv 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达：转化测序正确的 pTIG-Trx/ox26-scFv 质粒入大肠杆菌 BL21(DE3)，37℃ 培养过夜。挑取重组单菌落于 200ml 含 Amp^r 的 LB 培养基中，37℃ 培养至

$A_{600} = 0.5$, 在不同温度(37℃ , 30℃ , 25℃ , 20℃), 不同 IPTG 诱导浓度(1mmol/L , 0.1mmol/L , 0.02 mmol/L)下, SDS-PAGE 观察目的蛋白在胞浆中的表达情况。

1.2.5 可溶性表达产物的纯化: 诱导表达 500mL 重组菌, 离心收集菌体, 重悬于 1/10 体积的 lysis buffer(NaH_2PO_4 1.8g , NaCl 5.26g , 咪唑 0.2g , 30mL 10% 甘油, 补足水至 300mL)中, 置于冰上超声碎菌。4000g 4℃ 离心 20min, 去除菌体碎片, 收集上清, 12 000g , 4℃ , 离心 60min。以 2mL Ni-NTA agarose 溶液装柱(约含 1mL 分离胶), 10 倍柱体积的 lysis buffer 平衡后, 加入上述胞浆上清, 上样完毕后用 15 倍柱体积的 Wash buffer(NaH_2PO_4 1.8g , NaCl 5.26g , 咪唑 0.41g , 30mL 10% 甘油, 补足水至 300mL)洗涤, 最后以 Elution buffer (NaH_2PO_4 1.8g , NaCl 5.26g , 咪唑 5.1g , 30mL 10% 甘油, 补足水至 300mL)洗脱目的蛋白(1mL/管), 紫外监测下收集蛋白峰, 取 10 μ L SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.6 大鼠 GH3 细胞免疫组化染色检测单链抗体的结合活性: 大鼠垂体瘤 GH3 细胞滴加于免疫组化片上, 冷丙酮固定 10min。以单链抗体可溶性表达上清为一抗, 含 E. tag 标签的无关抗肝癌单链抗体 mscFv₂₅ 为阴性对照, 抗 E. tag 的单克隆抗体为二抗(1:500 稀释), HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为三抗(1:1000 稀释), 底物 DAB 显色, 显微镜下观察染色情况。

1.2.7 单链抗体对脑的靶向作用研究: Ox26-scFv 蛋白纯化后, PBS 透析过夜。以 Ultrafree-15 超滤柱浓缩蛋白, Bradford 法定量后(见《精编分子生物学实验指南》) 过针头滤器除菌, 每 1mL/份贮存于无菌小离心管中备用。

200g 左右的 SD 大鼠随机分为两组, 一组尾静脉注射目的蛋白 Ox26-scFv, 另一组注射肝癌抗体 mscFv₂₅ 500 μ g/只。给药 4 h 后, 将大鼠处死, 取鼠脑冰冻切片, 片厚 10 μ m。以抗 E. tag 的单克隆抗体为一抗(1:300 稀释), 生物素标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, HRP 标记的链霉卵白素为三抗, 充分洗涤后, 底物 DAB 显色, 显微镜下观察鼠脑的染色情况。

2 结果

2.1 ox26-scFv 基因的获取

ox26-scFv 基因的获取共经历了三轮 PCR。第一轮 PCR 将 18 个片段每 6 个为一组拼接成了 4 个片

段 F1(283bp) , F2(260bp) , F3(260bp) 和 F4(250bp) , 第二轮 PCR 以纯化后的 PCR 产物 F1 和 F2 为模板, 扩增了片段 F₁₋₂(443bp) ; 以 F3 和 F4 为模板, 扩增了片段 F₃₋₄(410bp) 。第三轮 PCR 以片段 F₁₋₂ 和 F₃₋₄ 为模板, 获得了 ox26-scFv 的全长基因, 共 794bp。

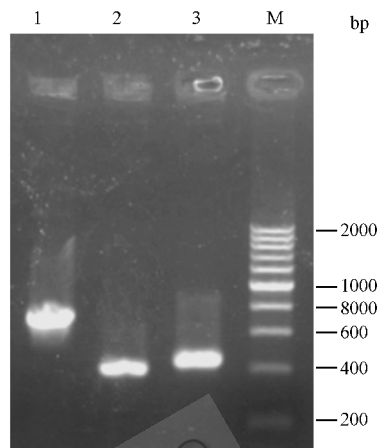


图 1 ox26-scFv 全长基因的扩增

Fig. 1 Amplification of ox26-scFv full gene

1 : ox26-scFv (794bp) ; 2 : F₃₋₄ (410bp) ;
3 : F₁₋₂ (430bp) ; M : 200bp DNA ladder

2.2 ox26-scFv 表达载体的构建及序列测定

PCR 产物导入 pTIG-Trx 载体中, 构建大肠杆菌表达质粒 pTIG-Trx/ox26-scFv。EcoR I 、 Not I 酶切鉴定获阳性克隆 8 个, 经测序结果证实, 其中两个克隆目的基因序列正确。

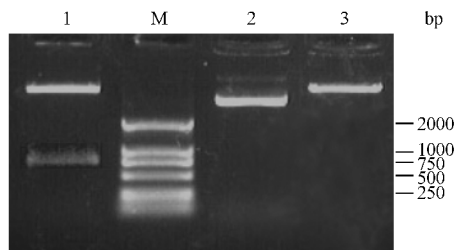


图 2 表达载体的双酶切分析

Fig. 2 Restrictive digestion analysis of expression vector

by EcoR I and Not I

1 : pTIG-Trx/ox26-scFv vector digested by EcoR I and Not I ;
M : DL2000 DNA Marker ;
2 : pTIG-Trx/ox26-scFv vector ;
3 : pTIG-Trx/ox26-scFv vector digested by EcoR I

2.3 Ox26-scFv 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

pTIG-Trx/ox26-scFv 重组质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中获得了表达, SDS-PAGE 于 29kD 处可见表达条带, 目的蛋白以可溶成分和包涵体两种形式存在。在常规诱导条件(1mmol/L IPTG , 37℃)下, 目的

蛋白主要为包涵体,可溶成分很少。随诱导温度及 IPTG 浓度的降低,目的蛋白可溶性组分明显增加,由此得到的可溶表达诱导条件为 0.02mmol/L IPTG 20℃ 诱导 24 h,此条件下目的蛋白总表达量约占菌体蛋白总量的 31%,其中可溶成分约占目的蛋白总表达量的 35%,包涵体约占 65%。

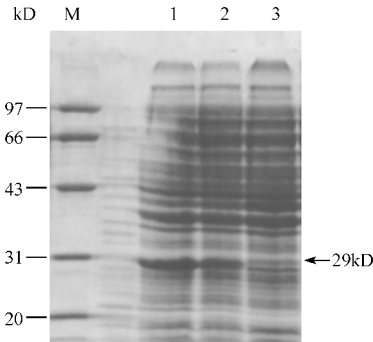


图 3 重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

Fig.3 Expression of recombinant plasmid in *E. coli* BL21 (DE3)

- M : protein marker
1 : recombinant bacteria induction with 0.02mM IPTG , 20℃
2 : cytoplasm suspension of recombinant bacteria induction with 0.02mmol/L IPTG , 20℃
3 : cytoplasm suspension of BL21 (DE3) without induction

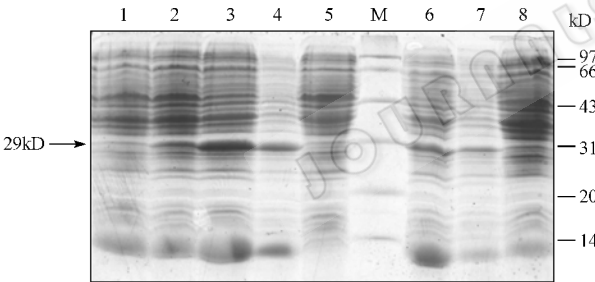


图 4 不同诱导条件下重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中的可溶性表达

Fig.4 Soluble expression of recombinant plasmid in *E. coli* BL21(DE3) induction with different conditions

- M : Protein Marker
1 : cytoplasm suspension of recombinant bacteria induction with 1mmol/L IPTG 37℃ ;
2 : cytoplasm suspension of recombinant bacteria induction with 1mmol/L IPTG 20℃ ;
3 : cytoplasm suspension of recombinant bacteria induction with 0.02mmol/L IPTG 20℃ ;
4 : cytoplasm suspension of recombinant bacteria induction with 0.1mmol/L IPTG 20℃ ;
5 : cytoplasm suspension of recombinant bacteria induction with 0.02mmol/L IPTG 37℃ ;
6 : cytoplasm suspension of recombinant bacteria induction with 0.02mmol/L IPTG 25℃ ;
7 : cytoplasm suspension of recombinant bacteria induction with 0.02mmol/L IPTG 30℃ ;
8 : cytoplasm suspension of BL21 (DE3) without induction

2.4 可溶性表达产物的纯化

20℃ , 0.02mmol/L IPTG 诱导表达 500mL pTIG-Trx/ox26-scFv 重组菌,沉淀细菌和超声破碎后,上清过 Ni-NTA 金属螯合层析柱纯化。SDS-PAGE 显示: Ox26-scFv 蛋白在 29kD 处可见单一纯化条带。

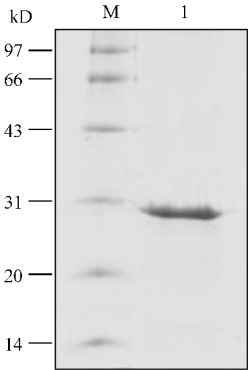


图 5 Ox26-scFv 蛋白纯化后的 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE analysis of purified ox26-scFv protein

- M : protein marker ;
1 : purified ox26-scFv protein

2.5 大鼠 GH3 细胞免疫组化染色检测单链抗体的结合活性

转铁蛋白受体在正常组织器官中含量很少,主要集中于脑毛细血管内皮细胞、胎盘、肝脏枯否细胞等处,不易提取。近年来研究发现,转铁蛋白受体在增殖迅速的肿瘤细胞表面表达很高,与铁离子的转运、细胞的活化、增殖、分化、肿瘤细胞的恶变密切相关^[7],因此常将肿瘤细胞用作表达转铁蛋白受体的检测细胞。本实验以大鼠垂体瘤 GH3 细胞^[8]作为抗原,固定于免疫组化片上,以含 E. tag 标签的 Ox26-scFv 蛋白纯化产物为一抗,含 E. tag 标签的肝癌抗体 mscFv₂₅ 为阴性对照,以抗 E. tag 抗体为二抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为三抗进行了免疫酶染色。结果表明,滴加 Ox26-scFv 蛋白纯化产物的组化片辣根过氧化物酶染色阳性,肝癌抗体 mscFv₂₅ 对照无显色,说明该 Ox26-scFv 蛋白能识别并与转铁蛋白受体特异性结合。

2.6 单链抗体对脑的靶向作用研究

目的蛋白 Ox26-scFv 尾静脉注射 SD 大鼠 4h 后,取鼠脑作免疫组化染色。结果显示目的蛋白组脑组织切片可见明显阳性染色,尤其是脑血管处着色明显,对照组无特异性染色。显示 Ox26-scFv 对脑血管有较好的靶向作用,并通过与脑血管内皮细胞膜上转铁蛋白受体的相互作用转运到了脑组织中,为我们研究建立以转铁蛋白受体为介导的血脑屏障转运系统打下了基础。

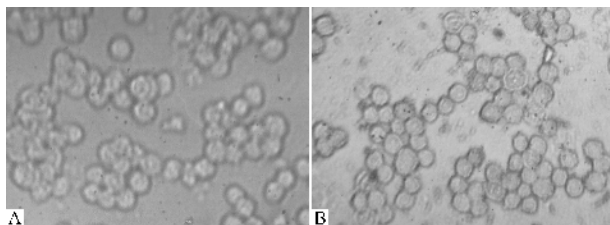


图6 大鼠 GH3 细胞免疫组化染色检测单链抗体的结合活性

Fig.6 Ox26-scFv proteins can bind to transferrin receptors on the surfaces of GH3 cells

A :negative control first antibody is mscFv₂₅
B :positive result : first antibody is Ox26-scFv

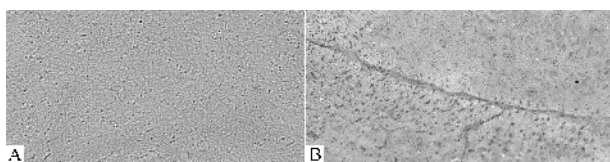


图7 单链抗体对脑的靶向作用研究

Fig.7 Target function of Ox26-scFv proteins to brain

A :negative control :Injection with mscFv₂₅
B :positive result : Injection with Ox26-scFv

3 讨论

血脑屏障是一层位于脑组织和血液之间的屏障系统,主要由脑毛细血管内皮细胞紧密排列而成。正常生理情况下只允许分子量小于 400 ~ 600 D (约合 4 个氨基酸)的脂溶性小分子通过,蛋白、多肽、抗体等极性大分子是无法透过血脑屏障发挥作用的。转铁蛋白受体介导大分子药物入脑的机理是:脑为维持生命活动需从血液中吸收大量的铁,生理状态下,铁是与转铁蛋白一起进行转运的,大分子的铁-转铁蛋白复合物自身不能通过血脑屏障,靠与脑血管内皮细胞壁上的转铁蛋白受体结合,经受体介导的胞吞胞吐作用,向脑组织供铁。内源性转铁蛋白在血液中含有量很高,与受体的结合近于饱和,所以转铁蛋白自身并不适于作为转载体。抗转铁蛋白受体的单克隆抗体 OX26 是迄今被认为最有前途的脑转载体,抗体-药物复合物通过和铁-转铁蛋白与受体结合的类似机制,且抗体与受体的结合位点不同于转铁蛋白和受体的结合位点,在转运中无竞争抑制作用,大大提高了转运效率。本文利用基因工程方法,克隆了抗转铁蛋白受体的单链抗体基因,并在大肠杆菌中获得了可溶性表达,经细胞和动物实验显示,该单链抗体对脑组织具有靶向作用。为我们建立一条以 scFv 为导向,通过转铁蛋白受体介导

的中枢神经系统给药途径打下了基础。

此外,原核系统表达二硫键较多的抗体蛋白最终获得的往往是无活性的包涵体,复性得率很低。近年来,在大肠杆菌的可溶性表达方面取得了很大进展,目前已知的影响因素主要有:外源基因自身的氨基酸序列、表达载体启动子的强弱、诱导温度、诱导剂浓度的高低、宿主菌、能促进外源蛋白可溶或正确折叠的伴侣分子等。本文选择插入了分子伴侣基因的 pTIG-Trx 作为研究的表达载体,探讨了不同温度、不同 IPTG 诱导浓度下,目的基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中可溶性表达的情况。pTIG-Trx 是在 pET-22b 载体多克隆位点的 *Nde* I 和 *Eco*R I 之间插入了硫氧还蛋白基因 Trx 的改构载体。硫氧还蛋白是一种亲水性蛋白质,常被用作分子内伴侣,促进下游目的蛋白的正确折叠,使其以可溶形式表达于胞浆中。与此相似的辅助蛋白还有谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白(MBP)等。本实验中, pTIG-Trx 载体与 pET-22b 相比目的蛋白总表达量虽有所下降,但可溶性产物大大增加,并具备了良好的生物学活性。另外,本文还在诱导条件对可溶性表达的影响方面进行了摸索,发现随诱导温度和 IPTG 诱导浓度的降低,目的蛋白的可溶性组分明显增加。原因可能是系统的表达速率得以降低,使目的蛋白折叠的更加充分。最后,我们确定的诱导条件是 0.02mmol/L IPTG, 20℃ 诱导 24h。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Pardridge WM. Recent developments in peptide drug delivery to the brain. *Pharm Toxicol*, 1992, **71** : 3 - 10
- [2] Friden PM. Receptor-mediated transport of therapeutics across the blood-brain barrier. *Neurosurgery*, 1994, **35** : 294 - 298
- [3] Friden PM, Walus LR, Watson P. Blood-brain barrier penetration and *in vivo* activity of an NGF conjugate. *Science*, 1993, **259** : 373 - 377
- [4] Coloma MJ, Lee HJ, Kurihara A *et al.* Transport across the primate blood-brain barrier of a genetically engineered chimeric monoclonal antibody to the human insulin receptor. *Pharm Res*, 2000, **17** (3) : 266 - 274
- [5] Zhang Y, Pardridge WM. Conjugation of brain-derived neurotrophic factor to a blood-brain barrier drug targeting system enables neuroprotection in regional brain ischemia following intravenous injection of the neurotrophin. *Brain Res*, 2001, **889** : 49 - 56
- [6] Li JY, Sugimura K, Boado RJ. Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression and *in vivo* application of an anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein. *Protein Eng*, 1999, **12** (9) : 787 - 796

- rine myeloma cells :one-step purification based on its physiology , and partial amino acid sequence. *J Immunol* , 1984 , **133**(6):3220 – 3223
- [8] Lee HJ , Engelhardt B , Lesley J. Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood-brain barrier in mouse. *J Pharmacol Exp Ther* , 2000 , **292**(3): 1048 – 1052
- [9] Zhang Z(张众) ,Huang HL(黄华樑). *Escherichia coli* disulfide-forming related protein : structures , functions and their application in gene engineering for expressing heterologous proteins in *Escherichia coli* . *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2002 , **18** (3) 261 – 266

Soluble Expression and Target Study to Brain of Anti- TfR ScFv

YAN Bing* ZHU Heng-Qi HUANG Pei-Tang

(Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100071 , China)

Abstract The single-chain antibody gene(ox26-scFv) to transferrin receptor(TfR) was synthesized and amplified by three-step PCR. After sequencing , the gene was cloned into prokaryotic expression vector pTIG-Trx which carried thioredoxin(Trx) gene and a C-terminal His .tag. The Ox26-scFv proteins achieved 31 % yields of total bacteria proteins at 20℃ , after 0.02mM IPTG induction using the strain *E. coli* BL21(DE3). The soluble scFv proteins in cytoplasm suspension were about 35 % and the inclusion bodies were about 65 % . The soluble products were purified by immobilized metal chelation affinity chromatography(Ni-NTA) , a single band with molecular weight 29 kD appeared on SDS-PAGE gel. Rat GH3 cell immunocytochemistry staining showed that Ox26-scFv protein could recognize and bind to transferrin receptor. Injected SD rats with Ox26-scFv proteins by tail veins , the antibodies were detected from brain tissues specially on the brain capillaries 4 h later which indicate that Ox26-scFv proteins have a good target function to brain capillaries and can permeate the blood-brain barrier mediated by the transferrin receptors.

Key words transferrin receptor(TfR) , single-chain Fv(scFv) , blood-brain barrier(BBB) , soluble expression , drug delivery

Received : 10-17-2003

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China(No. 30300102) and Natural Science Foundation of Beijing(No. 5042022).

* Corresponding author. Tel : 86-10-66948831 ; E-mail : yanbing72@hotmail.com