

# 抗 CEA 免疫毒素的表达、纯化、复性与生物学活性的研究

杨 慧<sup>1</sup> 何 丹<sup>2</sup> 晁 开<sup>3</sup> 林 晴<sup>2</sup> 游 松<sup>1</sup> 黄华樑<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>( 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110015 )

<sup>2</sup>( 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101 )

<sup>3</sup>( 西北农林科技大学生命科学院, 杨陵 712100 )

**摘 要** 以抗癌胚抗原( Carcinoembryonic antigen, CEA )单链抗体与假单胞菌外毒素( *Pseudomonas* exotoxin A, PEA )的截短和修饰形式 PE38/KDEL 构建重组免疫毒素 CEA/PE38/KDEL, 并在大肠杆菌菌株 BL21( DE3 )-star 中表达。采用镍离子螯合层析法纯化变性的包涵体样品, 并用连续梯度透析的方法对纯化后的包涵体进行复性。采用流式细胞术鉴定复性产物与靶细胞的结合活性, 结果表明免疫毒素 CEA/PE38/KDEL 具有与靶细胞特异性结合的活性。以 MIT 法检测免疫毒素对肿瘤细胞的体外杀伤活性, 结果表明该免疫毒素对 SW1116 和 CNE-2 细胞具有特异性杀伤活性。证明了经包涵体复性的抗 CEA 免疫毒素 CEA/PE38/KDEL 对表达 CEA 抗原的肿瘤细胞具有良好的结合和杀伤活性。

**关键词** CEA, 重组免疫毒素, 亲和层析, 蛋白复性, 体外杀伤活性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061( 2004 )03-0348-04

免疫毒素用于肿瘤治疗是在现代医学生物学发展的基础上提出的一种新的治疗策略<sup>[1]</sup>。免疫毒素是由抗体分子或细胞因子等与毒素分子组合而成的产物。抗体端负责与细胞表面抗原或细胞因子受体结合, 而毒素负责引发细胞死亡<sup>[2]</sup>。重组免疫毒素是指经基因工程技术表达的免疫毒素, 其中研究较为深入的是由能与细胞表面抗原结合的抗体 F<sub>v</sub> 段与截短形式的毒素通过基因融合组成的产物<sup>[3,4]</sup>。重组免疫毒素用于肿瘤生物治疗早已被证实具有良好的应用前景<sup>[5,6]</sup>, 在国外部分免疫毒素已进入临床实验阶段, 一些产品已经成为处方药物。

癌胚抗原( Carcinoembryonic antigen, CEA )是广泛存在于多种肿瘤细胞表面的一种抗原, 因而我们选择了抗 CEA 单链抗体作为导向分子, 截短并改造的假单胞菌外毒素 PE38/KDEL 作为效应分子, 采用基因融合技术构建免疫毒素表达载体 pET28a( + )-CIT, 并以包涵体形式在原核生物中表达, 在此基础上对该免疫毒素的纯化、复性和生物学活性等方面进行了研究, 最终获得了具有较高生物学活性的免疫毒素。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

质粒 pET-28a( + )购自 Novagen 公司。抗 CEA 的单链抗体片段基因是由文献报道<sup>[7]</sup>的抗 CEA 抗体的 VH 和 VL 部分氨基酸序列, 以重复性连接肽( G<sub>4</sub>S )连接, 反向翻译成核苷酸序列, 经本实验室合成、拼接而成。PE38/KDEL 片段基因来自毒素表达载体 pMS8-38 f + T, 由 Brinkmann 博士惠赠( LMB, DCBDC, NCI, NIH, USA )。E. coli 菌株 BL21( DE3 )-star 细胞株 3T3、SW1116 和 CNE-2 为本室保存。鼠抗 c-Myc 抗体 9E10 由本室制备, FITC 标记的羊抗鼠 Ig 为 BD Pharmingen 产品, HRP-羊抗鼠 Ig 购自中山生物技术公司。限制酶和连接酶购自 TaKaRa 公司。镍离子金属螯合柱填料 Ni-NTA Agarose 购自 QIAGEN 公司。DNA 测序由上海博亚( BioAsia )公司完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素基因表达载体的构建** 将 pET-28a( + )载体中插入抗 CEA 的单链抗

体基因序列和截短并修饰的假单孢菌外毒素 PE38/KDEL 基因序列,并在 PE 毒素结构域的末端 607 位氨基酸密码子后插入 c-Myc 标签,后面跟有结构域 604-613 位氨基酸编码区,构建成抗 CEA 免疫毒素融合表达载体 pET-28a(+)-CIT,对构建的载体进行 PCR 和测序鉴定。PCR 所用引物为:

5'引物 5'CAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGC 3'

3'引物 5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'

**1.2.2 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素的表达和纯化** 用 pET-28a(+)-CIT 转化到 *E. coli* 菌株 BL21(DE3)-star 中,挑取单克隆于 LB 培养基中 37℃ 过夜,次日按 1:50 转接,37℃ 培养至  $OD_{600}$  0.6~0.8,加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 在 37℃ 诱导 4 h,离心收集菌体。菌体重悬于 PBS 中,超声破菌,离心收集包涵体,洗涤包涵体 3~5 次。将包涵体沉淀于变性缓冲液(8 mol/L Urea, 10 mmol/L Tris·Cl, 100 mmol/L  $NaH_2PO_4$ )中,室温温和振荡 1 h,离心除去不溶物。

于变性包涵体溶液中加入咪唑至终浓度为 10 mmol/L,过 Ni-NTA 柱纯化,以 20 mmol/L 咪唑洗涤 10 个柱体积,200 mmol/L 咪唑洗脱,收集样品峰。

**1.2.3 SDS-PAGE** 按文献 [8] 的方法进行,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5% 的垂直电泳。

**1.2.4 Western blotting**: SDS-PAGE 分离后,采用电转移装置,恒流 400 mA,1.5 h,将电泳后凝胶上的蛋白成分转移到醋酸纤维素膜上。4% 脱脂牛奶封闭,以鼠抗 c-Myc 单克隆抗体、HRP-羊抗鼠单克隆抗体依次处理,DAB 显色。

**1.2.5 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素的复性** 将纯化后的变性包涵体装入透析袋中,放在含 8 mmol/L urea 的复性液(20 mmol/L Tris-Hcl pH 7.5, 0.5 mol/L arginine, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L GSH, 1 mmol/L GSSG)中透析,放在漩涡混合器上搅拌,采用恒流泵逐渐向透析液中加入复性液,控制流速使 8~10 h 后尿素的终浓度达 1 mmol/L,换含有复性剂(1 mmol/L GSH, 1 mmol/L GSSG)的 PBS(pH 7.2)中透析 3~5 h,最后换入大体积 PBS(pH 7.2)中透析过夜。离心去沉淀。

**1.2.6 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素与 SW1116 和 CNE-2 细胞的结合活性(FACS)** 采用间接荧光标记的方法,运用流式细胞术检测 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素对靶细胞的结合活性。将单细胞悬液加入小试管中,离心除去上清液;以冷的 PBA(PBS + 2% 牛血清白蛋白 + 0.1%  $NaN_3$ ) 200  $\mu$ L 离心洗涤,去上清;加入复性免疫毒素 200  $\mu$ L(200  $\mu$ g/mL),轻轻吹打混

匀,4℃ 孵育 45 min,离心弃上清;冷 PBA 洗涤离心,去除多余未结合的免疫毒素;加入 200  $\mu$ L PBA 适当稀释的抗组氨酸抗体,混匀,4℃ 孵育 45 min,离心弃上清;冷 PBA 洗涤离心,去除多余抗体;加 PBA 适当稀释的荧光素标记的二抗——羊抗鼠 Ig-FITC 200  $\mu$ L,混匀,4℃ 孵育 45 min,避光。冷 PBA 洗涤离心,去上清;将细胞重悬于 500  $\mu$ L PBA 中,流式细胞仪检测。

**1.2.7 体外细胞杀伤实验** 将细胞以  $10^4$  个/孔铺入 96 孔板,37℃ 培养 24 h。更换培养基,按不同的浓度梯度加入滤菌的免疫毒素样品,37℃ 培养 48 h。MTT 法检测活细胞数。细胞死亡率计算方法如下:

肿瘤细胞死亡率(%) =  $\left(1 - \frac{\text{实验组 } OD}{\text{活细胞对照 } OD}\right) \times 100\%$

2 结果

2.1 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素基因表达载体的构建

成功构建了免疫毒素基因表达载体 pET-28a(+)-CIT,5'端带组氨酸标签,毒素末端含 c-Myc 标签(图 1)。PCR 鉴定结果为,阳性克隆在 2000bp 处有一条特异的亮带,而空载体对照没有条带(图 2),核苷酸序列测定结果为正确的。

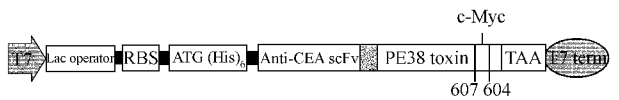


图 1 抗 CEA 免疫毒素基因表达载体 pET-28a(+)-CIT

Fig.1 Expression vector pET-28a(+)-CIT of anti-CEA immunotoxin

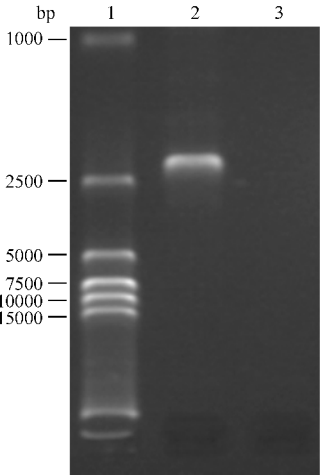


图 2 表达载体 pET-28a(+)-CIT 的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of the expression vector pET-28a(+)-CIT

1: DL-15000 DNA size marker; 2: expression vector

pET-28a(+)-CIT; 3: empty vector pET-28a(+)

2.2 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素的表达和纯化

用 pET-28a( + )-CIT 表达载体转化大肠杆菌 BL2( DE3 )-star 经摇瓶培养 超声破碎 包涵体的洗涤 洗后的包涵体以 8 mol/L 尿素变性 经 Ni-NTA 柱纯化后得终产物 平均每克菌体( 湿重 )的产量为 5mg。

2.3 SDS-PAGE 和 Western blotting

纯化的免疫毒素经 SDS-PAGE 分析显示 在分子量为 66 kD 处有一条蛋白质带 无其他明显蛋白质带( 图 3(A) )。 Western blotting 结果表明纯化产物为目的蛋白( 图 3(B) )。

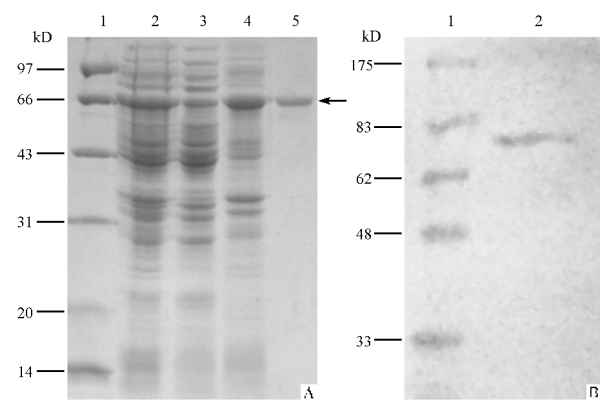


图 3 表达及纯化产物的 SDS-PAGE ( A ) 和 Western blotting ( B ) 分析

Fig.3 SDS-PAGE( A ) and Western blotting( B ) analysis of the expressed and purified production

A. 1 : protein molecular weight markers ; 2 : total expression products ; 3 : supernatant of sonicate ; 4 : precipitate of sonicate ; 5 : purified CEA/PE38/KDEL  
B. 1 : prestained protein molecular weight markers ; 2 : purified CEA/PE38/KDEL

2.4 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素的复性

纯化后的免疫毒素样品采用连续梯度透析法进行复性获得了成功 蛋白基本上没有聚集。复性后可溶形式的蛋白浓度可达 0.5 mg/mL , 复性过程蛋白回收率约为 80%。复性蛋白的稳定性较好 4℃ 长时间存放未发生再聚集。

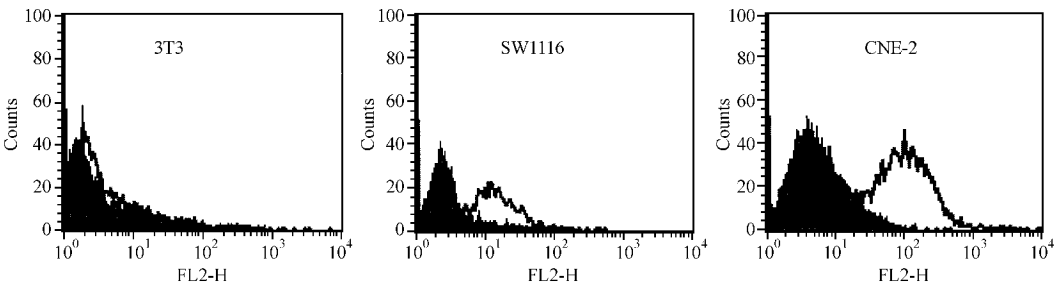


图 4 CEA/PE38/KDEL 靶细胞结合活性的检测

Fig.4 Cell binding assay of CEA/PE38/KDEL

Solid peak : negative control ; Empty peak : CEA/PE38/KDEL  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2.5 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素与靶细胞的结合活性

流式细胞术分析图表明 , CEA/PE38/KDEL 免疫毒素具有与 SW1116 和 CNE-2 细胞结合的活性而没有与 3T3 等对照细胞的结合活性。这表明该免疫毒素与靶细胞的结合是特异性的( 图 4 )。

2.6 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素的体外杀伤实验

活细胞体外杀伤实验结果表明 , CEA/PE38/KDEL 免疫毒素具有特异性杀伤表达 CEA 抗原的靶细胞的活性 对表达 CEA 抗原较多的细胞的杀伤活性高 对表达 CEA 抗原少或不表达该抗原的细胞的杀伤活性低 并且特异性杀伤活性与免疫毒素的浓度呈正相关( 图 5 )。

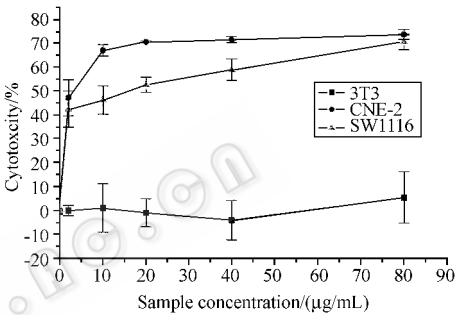


图 5 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素的杀伤活性

Fig.5 Cytotoxicity of CEA/PE38/KDEL immunotoxin

3 讨论

癌症治疗的关键在于治疗药物的靶向性 免疫毒素用于肿瘤治疗充分利用了抗体的特异性识别特性 靶向结合肿瘤细胞 将治疗药物集中在病灶中 提高治疗效率 降低对其他组织的毒性和损伤。免疫毒素的治疗用剂量很小 因为毒素 PE 是一种具有高催化效率的酶 可以对翻译延伸因子-2 进行 ADP-核糖基化修饰而使其失活 从而抑制靶细胞蛋白质的合成 导致细胞凋亡 这就意味着只需要有少量的分子传递进细胞质就可以起到杀伤靶细胞的作用<sup>[2]</sup>。我们选择了在众多肿瘤细胞表面广泛存在的

CEA 抗原作为靶目标,构建了抗 CEA 单链免疫毒素,以实现肿瘤细胞的靶向识别和杀伤,最终达到治疗目的。

以包涵体形式在大肠杆菌中表达重组蛋白是最有效率的生产克隆产物的方法之一<sup>[9]</sup>,但包涵体蛋白质的复性率一般都很低,因而根据不同的蛋白来摸索适合的复性方法成为了关键。免疫毒素是一种多功能蛋白,其各个结构区域都有着各自的功能且在复性过程中以各自独立的形式进行折叠,折叠的速率也不尽相同<sup>[10]</sup>,其复性是个缓慢的过程。对于 CEA/PE38/KDEL 单链免疫毒素,我们对其复性条件及方法进行了摸索,连续梯度透析法的复性后蛋白活性和蛋白回收率都较其他方法理想。此外这种缓慢的透析法能维持蛋白浓度在较高的水平复性而不发生聚集<sup>[11]</sup>,故能省去浓缩等步骤,使复性过程简单化。虽然变性蛋白在复性过程中若长期暴露在较低浓度的变性剂下很容易形成聚集<sup>[12]</sup>,但由于免疫毒素的复性过程需要时间较其他一些蛋白要长,且 CEA/PE38/KDEL 免疫毒素在逐渐降低变性剂的过程中比较稳定,缓慢的复性过程并非完全不利。基于此种方法的方便简捷、容易操作、不要求高端设备和经济等优点,此法比较适合应用于样品的中小型制备。我们通过包涵体复性的方法成功的制备了具有较高活性的抗 CEA 免疫毒素,实验表明,免疫毒素 CEA/PE38/KDEL 具有良好的靶细胞结合活性和特异性。体外细胞杀伤实验对 CEA/PE38/KDEL 的完整活性进行了进一步检测,验证了该免疫毒素针对表达靶抗原的肿瘤细胞的特异性疗效。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Robert J, Kreitman R. Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol*, 1999, **11**: 570 - 578
- [2] Chamow SM, Ashkenazi A. *Antibody fusion proteins*. USA: Wiley-Liss, Inc, 1999, 111 - 126
- [3] Reiter Y, Pastan I. Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**: 513 - 520
- [4] Pastan I, Chaudhary V, FitzGerald DJ. Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annu Rev Biochem*, 1992, **61**: 331 - 354
- [5] Kuan C, Pastan I. Recombinant immunotoxin Containing a Disulfide-Stabilized Fv Directed at erbB2 that does not require proteolytic activity. *Biochemistry*, 1996, **36**: 2872 - 2877
- [6] Kuan C, Pastan I. Improved anti-tumor activity of a recombinant anti-Lewisx immunotoxin not requiring proteolytic activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 974 - 978
- [7] Koga H, Kanda H *et al.* Mouse-human chimeric monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen (CEA): in vitro and in vivo activities. *Hybridoma*. 1990, **9**(1): 43 - 56
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [9] Clark EDB. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9**: 497 - 501
- [10] Brinkmann U, Buchner J *et al.* Independent domain folding of *Pseudomonas* exotoxin and single-chain immunotoxins: Influence of interdomain connections. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 3075 - 3079
- [11] Maeda Y, Ueda T, Imoto T. Effective renaturation of denatured and reduced immunoglobulin G in vitro without assistance of chaperone. *Protein Eng*, 1996, **9**: 95 - 100
- [12] Vuillard L, Freeman A. Preparation of active proteins from inclusion bodies. <http://www.st-and.ac.uk/~lv2/>

## Studies of the Expression, Purification, Renaturation and Biologic Activity of an Anti-CEA Immunotoxin

YANG Hui<sup>1</sup> HE Dan<sup>2</sup> CHAO Kai<sup>3</sup> LIN Qing<sup>2</sup> YOU Song<sup>1</sup> HUANG Hua-Liang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>(School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China)

<sup>2</sup>(Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

<sup>3</sup>(College of Life Science, Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract** A recombinant immunotoxin named CEA/PE38/KDEL was constructed, which was composed of anti-CEA single-chain Fv and the truncated and modified form of *Pseudomonas* exotoxin (PE38/KDEL). The CEA/PE38/KDEL immunotoxin was expressed in the *E. coli* strain BL21(DE3)-star as inclusion bodies. The denatured inclusion bodies were purified with Ni-NTA chelate agarose, then the constant gradient dialysis was used to perform the refolding of the CEA/PE38/KDEL immunotoxin. Results of FACS and MTT assay indicate that the refolded immunotoxins keep potent and specific cytotoxicity to tumor cells bearing CEA antigens.

**Key words** CEA, recombinant immunotoxin, affinity chromatography, protein renaturation, cytotoxicity