

Mn-SOD 与抗癌胚抗原单链抗体基因的融合及高效表达

贺华君^{1,2} 杨卫东² 常雅宁¹ 施惠娟¹ 杨冠珍² 吴祥甫^{*2} 袁勤生^{*1}

(¹ 华东理工大学生物化学研究所 上海 200237)

(² 中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 将 Mn-SOD 与抗癌胚抗原(CEA)单链抗体基因(ScFv gene)融合,重组到含 T7 启动子的表达载体 pET-22b(+)中,构建表达质粒 pETMn-SOD-ScFv,并转化大肠杆菌 BL21(DE3),进行高效表达。表达物占菌体可溶性总蛋白的 24%。SDS-PAGE 和蛋白质印迹图谱显示表达物分子量为 45kD 与融合基因编码蛋白质的理论值相符。该蛋白质在大肠杆菌中为分泌型表达有利于纯化。RIA 测定表明表达产物能特异性的与抗原 CEA 结合,同时邻苯三酚法测定也表明表达产物具有 SOD 酶的活性,该融合蛋白为分泌 CEA 肿瘤的靶向性治疗提供新的途径。

关键词 癌胚抗原 单链抗体 Mn-SOD 融合表达

中图分类号 Q544.Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0566-04

利用单克隆抗体与相应抗原特异性结合的特性将其与化学药物、放射性核素、免疫制剂或其它治疗肿瘤药物相连接进行靶向性治疗已得到广泛研究,并取得一定效果。癌胚抗原(CEA)单克隆抗体放免治疗对结直肠癌等分泌 CEA 的肿瘤治疗有重要意义。但传统以杂交瘤技术制备的完整单抗其分子量难以穿过血管,到达靶组织量较少效果不佳,而单链抗体(ScFv)在保持抗原抗体结合特性的同时又有效降低了其分子量,从而易于到达靶组织,所以是较为理想的药物载体^[1]。近年来随着对 SOD 家族的深入研究,表明人 Mn-SOD 是一个由位于 6q25 基因编码的抗氧化酶,由于其紧挨着胶质细胞瘤、淋巴瘤、卵巢癌等多种肿瘤染色体畸变的频发部位,Bravard^[2]等提出 Mn-SOD 是潜在的新型肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene),Millikin^[3]等研究表明 Mn-SOD 具有抑制肿瘤细胞生长的功能;近年来的研究表明 Mn-SOD 对恶性肿瘤细胞有抑制作用^[4,5]。本实验将 Mn-SOD 与抗癌胚抗原单链抗体基因融合进行表达,拟为分泌 CEA 的肿瘤的靶向治疗开辟另一新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、试剂、质粒:

大肠杆菌菌株 TG1、BL21(DE3),载体 pSK

(+),pET-22b(+),为中国科学院上海生物化学研究所吴祥甫教授组保存;限制酶、T4DNA 连接酶、低熔点琼脂糖、碱性磷酸酶底物 NBT、BCIP 均为 Gibco-BRL 公司产品;DNA 测序试剂盒为 USB 公司产品; [³⁵S]-dATP 为 Amersham 公司产品;丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺等为 Sigma 公司产品;IPTG 为 Boehringer Mannheim 公司产品;DNA 回收试剂盒为华舜公司产品,其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.2 PCR 引物: Mn-SOD 引物 1: 5'-TACCATG-GAAGCACAGCCTCCCCGACC-3',含 NcoI 位点,引物 2 为 5'-ACTCTAGATCCGCTCCACCCTTTT GCAAGCCATG-3',含 XbaI 位点;ScFv 引物 1 为: 5'-GATCTAGACTGCAGGAGTCTGGAGGAG-3',含 XbaI 位点,引物 2 为: TACTCGAGCAGCTTGG TCCCAGCACCGAAC-3'含 XhoI 位点。

1.1.3 抗体及免疫学试剂: 鼠抗 6×His 的单克隆抗体为 QIAGEN 公司产品。AKP 标记的羊抗鼠多克隆抗体为华美生物公司产品。

1.2 方法

1.2.1 基因操作: 质粒提取、酶切、连接、转化、鉴定等按 Sambrook 实验手册^[6]略加修改进行。

1.2.2 Mn-SOD 与抗癌胚抗原单链抗体基因融合及表达质粒的构建: 用 Mn-SOD 引物 1 和引物 2 以含有 Mn-SOD 基因的 pSK Mn-SOD 质粒为模板^[7]

收稿日期:1999-12-05,修回日期:2000-06-05。

* 联系人(吴祥甫):Tel 021-64374430-292 Fax 86-21-64338357 E-mail xfwu@sunm.shnc.ac.cn

* 联系人(袁勤生):Tel 021-64252255 Fax 86-21-64518645 E-mail qsyuan@ccust.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

进行 PCR 扩增 ,条件为 :94℃ 变性 45s ,62℃ 退火 1min ,72℃ 延伸 75s ,30 个循环 ,最后延伸 10min ,扩增后的产物平端连入 pSK(+)载体 ,连接产物转入大肠杆菌 TG1 ,经测定其序列正确后以 *Nco*I 及 *Xba*I 酶切 ,低熔点胶分片段 ;用 ScFv 引物 1 和引物 2 以含 ScFv 基因的 pET ScFv 质粒为模板^[8]进行 PCR 扩增 ,94℃ 变性 45s ,56℃ 退火 1min ,72℃ 延伸 75s ,30 个循环 ,最后延伸 10min。扩增后的产物平端连入 pSK(+)载体 ,连接产物转入大肠杆菌 TG1 ,经序列测定正确后以 *Xba*I 及 *Xho*I 酶切 ,低熔点胶分片段。把两片段和经 *Nco*I 及 *Xho*I 双酶切的载体 pET-22b(+)相连接 ,连接产物转入大肠杆菌 TG1 ,经酶切鉴定 ,质粒构建如图 1。

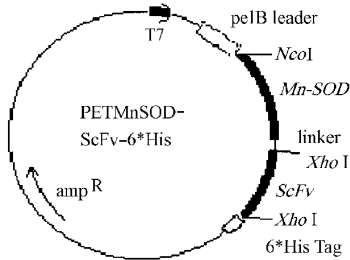


图 1 Mn-SOD 和 ScFv 融合基因表达质粒
pET Mn SOD-ScFv 构建图

Fig.1 Construction of MnSOD and ScFv fusion gene
expression plasmid pETMn SOD-ScFv

1.2.3 Mn-SOD 与抗癌胚抗原单链抗体融合基因在大肠杆菌中的表达 :所用表达质粒 pET-22b(+)启动子为噬菌体的 T7 启动子 ,IPTG 诱导表达 ,含表达质粒的单克隆菌 BL21(DE3)37℃ 培养过夜 ,按 2%接种量转接于 6mL LB 培养基中 ,37℃ 培养 2h 后 ,取 1mL 菌液 ,测 A_{600} 并收集菌体作为诱导表达前的对照 ,其余菌液中加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L ,加 Mn^{2+} 至终浓度为 500 μ mol/L ;最佳诱导表达条件 A_{600} 为 0.4~0.6 左右 ,IPTG 诱导表达约 3h 后 ,取 1mL 菌液测 A_{600} 并收集菌体。

1.2.4 SDS-PAGE 和蛋白质印迹 :按 Sambrook 实验手册进行 ,诱导前和诱导后的样品按 0.1OD 值 10 μ L PBS 悬浮菌体 ,加等体积的 2 \times 上样缓冲液 ,沸水浴 5min ,进行 12% SDS-PAGE 以考马斯亮蓝染色。蛋白质印迹在 SDS-PAGE 后电转移至硝酸纤维素膜上。以鼠抗 6 \times His 的单克隆抗体为一抗 ,AKP 标记的羊抗鼠多克隆抗体为二抗 ,用诱导前样品作为阴性对照。

1.2.5 RIA 法抗原结合能力测定 :表达产物 50 μ L ,¹²⁵I-CEA 100 μ L(8000cpm)和 0.1% BSA 150 μ L 混

匀 ,37℃ 温育 3h ,加入 25% PEG(6kD)和正常人血清混匀 ,4℃ ,3000r/min ,20min 测定放射性记数 ,计算结合率 ,阳性对照为鼠抗 CEA 单抗 E7B₁₀ ,阴性对照为诱导前样品。

1.2.6 SOD 活性测定 :收集的菌体溶于 PBS ,超声处理 ,取上清用邻苯三酚法^[9]测定表达产物的酶活性 ,以诱导前样品作为阴性对照。

2 结果

2.1 Mn-SOD 与抗癌胚抗原单链抗体基因融合及表达质粒的构建

Mn-SOD 与抗癌胚抗原单链抗体基因融合的中间连入了一段编码连接肽(GGGG)的 12 个核苷酸和编码两个氨基酸残基 SR 的 *Xba*I 酶切位点 ,以保证两蛋白的空间构型相互影响较少 ,其 3'端与表达载体上 6 \times His 相接 ,并保持阅读框架不变(见图 2)。

2.2 Mn-SOD 与抗癌胚抗原单链抗体融合基因在 *E. coli* 中的高效表达

2.2.1 SDS-PAGE 分析 :从 SDS-PAGE 结果(图 3)可以看到 ,诱导后的样品有明显的表达条带 ,凝胶灰度扫描显示其表达量占其可溶性总蛋白量的 24% ,从标准曲线上可见其表达的分子量约为 45kD ,与其理论推算值相符。

2.2.2 Western 印迹分析 :Western 印迹分析结果显示 ,经诱导后的表达产物在分子量为 45kD 处呈阳性结果 ,而对照没有(见图 4)。

2.2.3 RIA 法 CEA 结合性测定 :RIA 法进行 CEA 结合性测定表明 ,融合的诱导表达产物结合抗原 CEA 结合力约为 34% ,阳性对照其结合力约为 42% ,而阴性对照其结合力小于 10%。可见表达产物具有特异性结合抗原 CEA 的能力。

2.2.4 SOD 活性测定 :邻苯三酚法测定结果表明诱导表达的产物具有 SOD 活性约为 123u/mg 总蛋白 ,而未经诱导的样品其酶活力约为 1.4u/mg 总蛋白。

3 讨论

超氧化物歧化酶(SOD)是广泛存在于动物、植物和微生物中的金属酶 ,对生物体防御毒性是关键性的。对 SOD 的深入研究已经证实其具有广泛的医用价值 ,而且其应用范围正日益扩大。Bravard 等发现 Mn-SOD 基因表达量伴随细胞的癌变过程呈正相关下降的普遍现象^[2] ,并通过对恶性黑色素瘤

NcoI
CCATGGGTAAGCACAGCCTCCCGACCTGCCCTACGACTACGGCGCCTGGAACTCAGCATCAACGGCGAGATCATG
M G K H S L P D L P Y D Y G A L E P H I N A Q I M
CAGCTGCACACAGCAAGCACCACGCGCTACGTGAGCAACCTGAACGTCAAGGAGAGATACAGGAGGGCTGT
Q L H H S K H H A A Y V S N L N V T E E K Y Q E A L
GCCAAGGAGATGTTACAGCCAGATAGCTCTTCAGCTGCACTGAAGTTCATGGTGGTGCATATCAATCATAGC
A K G D V T A Q I A L Q P A L K F N G G G H I N H S
ATTTTCGGAACAACCTCAGCCCTAACGGTGGTGGAGAACCCAAAGGGAGGTGCTGGAAAGCATCAACGTGACTTT
I F W T N L S P N G G G E P K G B L L E A I K R D F
GGTTTCCTTTGACAAGTTTAAGGAGAAGCTGACGGCTGCATCTGTTGGTCCAAAGGCTCAGGTGGGGTTGGCTTGGT
G S F D K F K E K L T A A S V G V Q G S G W G W L G
TTCATAAGGAACGGGACACTTACAAATTGCTGCTGTGCAATCAGGATCCAGTGAACAGGCTTATTCCACTGCT
F N K E W G H L Q I A A C P N Q D P L Q G T T G L I
GGGATGTAGTGTGGAGCAGCTTACTACCTTCAGTATAAAATGTGAGGCTGACAAGAACTATCTAAAAGCT
P L L G I D V W E H A Y Y L Q Y K N V R P D Y I K A
XbaI
ATTGGAATGTAATCAACTGGGAGAATGTAAGTAAAGATACATGGCTGCAAAAGGGTGGAGCGGATCTAGA
I W N V I N W E N V T E R Y M A C K K G G G G S R
CTGCAGAGTCTGGAGGAGCTTGGTACAGCTGGGGCTTCTCTGAGACTCTCTCTGCAACTCTGGGTCACCTTC
L Q E S G G G L V Q P G A S L R L S C A T S G F T F
ACTGATTACTACATGAGCTGGGTCGCGCAGCCTCCAGGAAGGCACCTTGAGTGGTGGGTTTATTGGCAACAAGCT
T D Y Y M S W V R Q P P G K A L E W L G F I A N K A
AATGGTTACACACAGAGTACAGTGCATCTGGAAGGCTGGTTCACCATCTCCAGAGACATTTCCAAAGGCATCCTC
N G Y T T E Y S A S L K G R P T I S R D I S Q G I L
TATCTTCAATGAACACACTGGGAATCTGAGGACAGTGCCTTATCTGTTGGAAGATAGGGGAATACGATGGTAC
Y L Q M N T L G T E D S A T Y Y C G R D R G I R W Y
TTTGACTACTGGGGCAAGGGACCGGTACCGTCTCTCAGTGGCGGTTCGGCGGTGGGTGGGTGGCGGATCT
F D Y W G Q G T T V T V S S G G G S G G G S G G G S
CTGCAGACCCAGTCTCCAGCAATCCTGCTGCTGCTCCAGGGGAGAGGTCATACTGACTTGCAGGGCAGTTACAGT
L Q T Q S P A I L S A S P G E K V I L T C R A S S R
GTGACTTATATCATCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCTCTCCCGCAGACCTGGATTATGCTCATCCACCTGGCT
V T Y I I W Y Q Q K P G S S P R P W I Y A S S T L A
TCTGGATCTGCTGCTGCTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCAACATCAGCAGAGTGGAGGCTGAG
S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S R V E A E
XhoI
GATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTCATAACCCACCCAGTTCGGTGGTGGGACCAAGCTGCTCCAG
D A A T Y Y C Q Q W S H N P P T F G A G T K L L E
CACCACCAACCAACCACTGA
H H H H H H End

图2 Mn-SOD-ScFv 的核苷酸和氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid
sequence of Mn-SOD-ScFv gene

细胞的研究证实了 Mn-SOD 是肿瘤抑制基因的假设^[10] ;Millikin 等^[3]发现在恶性黑色素瘤细胞中过度表达 Mn-SOD 可使其恶性表型逆转成正常细胞 ; Church 等^[11]研究发现人 Mn-SOD 基因表达的增加能够抑制辐射诱发的肿瘤形成和增加鼠成纤维细胞的分化能力 ,因此认为 Mn-SOD 是潜在的新型肿瘤抑制基因 ;Huang 等^[12,13]提出 Mn-SOD DNA 甲基化可能是使癌生长转录失活的一种机制 ,并得到证实。

目前单克隆抗体多是经杂交瘤技术生产的鼠源性单抗 ,抗体的重复注射可产生人针对鼠源抗体恒定区的人抗鼠抗体 (HAMA) 反应^[14] ,临床应用受到限制。利用基因工程技术进行改造制备的嵌合抗体和人源化抗体与亲本单抗一样具有高特异性和高亲和力 ,但与鼠源性单抗一样完整抗体分子量很大 ,不易穿透血管到达靶组织 ,血循环延长清除缓慢 ,无法

得到高靶组织/非靶组织 (T/NT) 比值。为提高 (T/NT) 比值近年多集中于对分子量较小、穿透性更强的单链抗体的研究。癌胚抗原 (CEA) 是一种肿瘤标志性抗原 ,许多肿瘤均能分泌癌胚抗原 ,如结肠癌、卵巢癌、乳腺癌及部分肺癌。抗癌胚抗原抗体能与

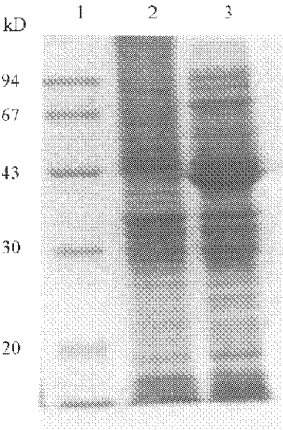


图3 Mn-SOD-ScFv 在大肠杆菌中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis Mn-SOD-ScFv expression products in *E. coli*

1. Standard protein marker 2. Sample before IPTG induction ;
3. Sample after IPTG induction

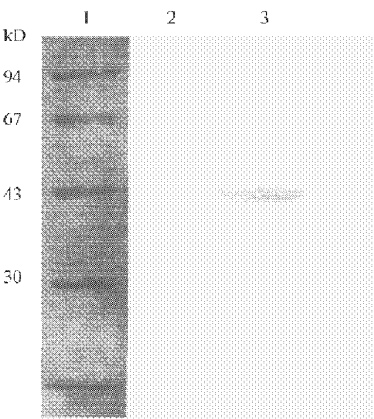


图4 Mn-SOD-ScFv 在大肠杆菌中表达产物的蛋白印迹分析

Fig.4 Western-blot analysis of Mn-SOD-ScFv expression products in *E. coli*

1. Standard protein marker 2. Sample before IPTG induction ;
3. Sample after IPTG induction

癌胚抗原高特异性结合 ,因而可用于肿瘤的靶向性治疗。在成功制备抗癌胚抗原单克隆抗体的基础上已进一步利用基因工程技术制备抗癌胚抗原的单链抗体 (ScFv) 可减少 HAMA 反应 ,为对分泌癌胚抗原的肿瘤进行靶向性治疗。本实验将 Mn-SOD 基因

与抗癌胚抗原的单链抗体基因融合并在大肠杆菌中进行表达。

本研究利用已克隆到的 Mn-SOD 基因与抗 CEA 的单链抗体基因进行拼接构建了 Mn-SOD-ScFv-6 × His 融合表达质粒 pET Mn-SOD-ScFv , pET-22k(+)为分泌型表达载体 ,细菌的信号肽 pe1k(果胶亚酯裂合酶信号肽)融合至 Mn-SOD-ScFv N 端 ,通过信号肽 ,直接将产物分泌到大肠杆菌内膜与细胞外膜之间的周质 ,超声波破碎离心后进行 SDS-PAGE ,从图谱可见表达产物主要存在于上清中 ,可以直接用上清纯化 ,因此该表达产物的分泌型表达易于其分离纯化。其表达量占菌体可溶性总蛋白的 24%。SDS-PAGE 图谱显示在分子量为

45kD 处有明显的表达条带。蛋白质印迹图谱也显示在分子量为 45kD 处有明显的条带 ,与 Mn-SOD-ScFv-6 × His 基因编码的理论推算值相符。对表达产物用 RIA 法进行 CEA 结合活性测定 ,融合蛋白具有结合其特异性抗原 CEA 的能力 ,同时邻苯三酚法测定表明表达产物具有 SOD 酶的活性。

本实验成功地在大肠杆菌中表达了 Mn-SOD 与抗癌胚抗原单链抗体的融合基因 ,该蛋白既能与癌胚抗原特异性的结合 ,又具有 SOD 酶的活性 ,为进一步研究 Mn-SOD 抑制肿瘤细胞的生长及对分泌癌胚抗原的肿瘤进行靶向性治疗奠定了基础。有关该融合蛋白是否具有抑癌功能的动物实验正在进行之中。

参 考 文 献

[1] Yokota T ,Milenic DE ,Withlow M *et al.* ,*Cancer Res.* 1992 ,**52** :3402
[2] Bravard A ,Sabatier L ,Hoffschir F *et al.* ,*Int J Cancer* ,1992 ,**51** :476~480
[3] Millikin D ,Meese E ,Vogelstein B *et al.* ,*Cancer Res.* 1991 ,**51** :5449~5453
[4] Zhong W ,Oberley L W ,Oberley T D *et al.* ,*Oncogene* ,1997 ,**14** :481~490
[5] Lam E W ,Zwacka R ,Engelhardt J F *et al.* ,*Cancer Res* ,1997 ,**57** :5550~5556
[6] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* ,2nd ed ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
[7] 施惠娟 ,贺华君 ,魏东芝等 . *生物化学与生物物理学报* ,1999 ,**31**(6) :718~721
[8] 李 彪 ,朱承谟 ,吴祥甫 . *生物化学与生物物理学报* ,1998 ,**30**(4) :369~373
[9] 谢卫华 ,姚菊芳 ,袁勤生 . *医药工业* ,1988 ,**19**(5) :217~219
[10] Bravard A ,Cherbonnel-L C ,Reillaudou M *et al.* ,*Melanoma Res* ,1998 ,**8**(4) :329~335
[11] Church S L ,Grant J W ,Ridnour L A *et al.* ,*Proc Natl Acad Sci USA* ,1993 ,**90** :3113~3117
[12] HUANG Y H ,PENG J X ,Oberley L W *et al.* ,*Free Radical Biology and Medicine* ,1997 ,**23**(2) :314~320
[13] Huang Y H ,He T R ,Domann F E. *DNA and Cell Biology* ,1999 ,**18**(8) :643~652
[14] Schroff R W ,Fcon K A ,Beatty S M *et al.* ,*Cancer Res* ,1985 ,**45** :875~879

Fusion and Expression of the Gene Encoding Human Mn-SOD to
Anti-CEA Single-chain antibody in *Escherichia coli*

HE Hua-Jun^{1,2} YANG Wei-Dong² CHANG Ya-Ning¹ SHI Hui-Juan¹
YANG Guan-Zhen² WU Xiang-Fu^{*2} YUAN Qin-Sheng^{*1}

¹(Institute of Biochemistry ,East China University of Science and Technology ,Shanghai 200237)

² Shanghai Institute of Biochemistry ,the Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200031)

Abstract The gene encoding human manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) was fused to anti-carcinoembryonic antigen single-chain antibody gene to construct the fusion gene ,then was ligated into prokaryotic expression vector pET-22k(+) ,The fusion gene was expressed in *E. coli* at high level ,accounting for 24% of the total bacteria soluble protein ; and was characterized by SDS-PAGE and Western-blot analysis ;the expression product had the CEA-binding ability in RIA ,and also had the SOD activity by pyrogallol autoxidation assay. So ,the Mn-SOD moiety retains substantial enzymatic activity ,where the ScFv moiety can deliver the fusion protein to tumor ,Mn-SOD is a potential tumor-suppressor gene , maybe the fusion protein can provide a new pathway to tumor therapy.

Key words Carcinoembryonic antigen , single-chain antibody , manganese-superoxide dismutase , fusion expression