

抗转铁蛋白受体单链抗体的表达、纯化及活性测定 Expression, Purification and Activity Analysis of Anti-human Transferrin Receptor ScFv

赵莉霞, 颜 冰, 许 龙, 蒋世卫, 张莹莹, 杨志新, 周晓巍, 黄培堂*

ZHAO Li-Xia, YAN Bing, XU Long, JIANG Shi-Wei, ZHANG Ying-Ying, YANG Zhi-Xin,
ZHOU Xiao-Wei and HUANG Pei-Tang*

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

摘 要 根据转铁蛋白受体和转铁蛋白特异性结合的性质, 利用亲和纯化的方法从胎盘中提取转铁蛋白受体。以转铁蛋白受体为抗原包被免疫管, 从全合成人源噬菌体单链抗体库中筛选其抗体。对筛选到的抗体进行特异性鉴定后, 将抗体基因插入表达载体 pET22b(+), 转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导后获得可溶性表达。HeLa 细胞的免疫组化结果显示, 表达的抗体可以与转铁蛋白受体结合。表达产物经 Ni-NTA 金属螯和层析柱纯化、脱咪唑后, 从尾静脉注射小鼠。1h 后, 去除血液及毛细血管的干扰, 在脑实质中检测到了抗体的存在, 说明该抗体可以通过血脑屏障。

关键词 转铁蛋白受体, 单链抗体, 表达, 纯化, 血脑屏障

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0488-04

Abstract Human transferrin receptor (TfR) was isolated from homogenates of placental tissues by affinity chromatography on transferrin-Sepharose, and then used to screen human scFv against it from a fully-synthesized phage scFv library. After verifying the specificity, gene fragment of one of the selected scFv was inserted into the plasmid pET22b(+) and transformed into *E. coli* BL21(DE3). Expression of scFv in transformant was induced with 0.5mmol/L IPTG. ELISA assay on HeLa cells showed that scFv protein could recognize and bind to TfR on the surface of HeLa cells. The scFv was purified by one-step affinity chromatography with Ni²⁺-NTA agarose, and injected into Kunming mouse via tail veins. This scFv was detected in brain tissues 1h later by capillary depletion method, which indicates that scFv protein can permeate through the blood brain barrier by mediation of the TfR receptor. Our works lay the foundation for the treatment of tumors and central nervous system diseases.

Key words transferrin receptor, scFv, expression, purification, blood brain barrier

血脑屏障阻止外源性物质进入脑的同时, 也阻止了潜在治疗药物的进入。然而, 在脑毛细血管内皮细胞上存在特定的受体介导的转运机制, 我们可

以利用这种转运机制将药物运送到脑内。在大鼠体内, 已成功利用转铁蛋白受体的抗体 OX26 将神经营养因子 BDNF 转运入脑^[1]。目前, 能作用于人的

Received: January 18, 2005; Accepted: February 17, 2006.

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

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948832; E-mail: amms832@126.com

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

转运抗体报道很少,而且多为鼠源抗体或人源化的嵌合抗体,应用于人会产生人抗鼠抗体。为了解决这个问题,我们利用人的转铁蛋白受体从全人源噬菌体抗体库中筛选其特异性抗体,目的是构建一个以转铁蛋白受体为介导的跨血脑屏障的转载体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)及质粒 pET22b(+)由本室保存。

1.1.2 细胞系和动物:HeLa 细胞由本实验室保存;昆明小鼠(25~30g)购自军事医学科学院实验动物中心。

1.1.3 试剂:Taq Plus I 聚合酶购自上海生工生物工程公司;T4 DNA 连接酶、*Sal* I、*Not* I 购自 NEB 公司;Ni-NTA agarose、ECL plus Western Blotting Detection Reagents、2-D Quant Kit、Anti-E Taq 单克隆抗体及蛋白分子量标准购自 Amersham 公司;羊抗鼠-HRP 购自中山生物公司;DNA marker III、DNA 快速纯化/回收试剂盒及质粒快速提取试剂盒购自天为时代科技有限公司;DNA 序列合成及测定由华诺公司完成;其余试剂为本室保存。

1.2 方法

1.2.1 抗体基因的获得:从胎盘中提取转铁蛋白受体^[2],以转铁蛋白受体为抗原包被免疫管,从库容为 10¹⁰的全成人源噬菌体单链抗体库中筛选抗体^[3]。得到特异性及亲和力均较好的抗体后,以表 1 中所列为正反向引物,阳性单克隆噬菌体抗体所提取的质粒为模板,扩增抗体基因。上游引物中加入 *Sal* I 位点,下游引物中加入 *Not* I 位点及 E.tag 标签。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Primer name	Primer sequence
Forward	5'-ACGC GTCGAC TAATG GCC AGC TAC GAA CTG-3'
Reverse	5'-TT GCGGCCGC ACG CGG TTC CAG AGG ATC AGC ATA CGG CAC CGC CGC ACC AAGCTT GCT CGA CAC GGT CAC CAG-3'

1.2.2 表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达:用 *Sal* I 及 *Not* I 双酶切 PCR 产物和 pET22b(+)载体,电泳纯化、回收抗体基因和线性化的载体,T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,37℃ 培养 16h 后,挑取单克隆进行酶切鉴定并测序。测序正确后,将重组质粒转化大肠杆菌

BL21(DE3),37℃ 培养过夜。挑取单菌落接种于含 Amp 的 LB 培养基中生长过夜,然后以 2% 的接种量转接于 500mL 含有 Amp 的 LB 培养基中,37℃ 培养至 A₆₀₀ = 0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L,16℃ 诱导 20h。离心收集菌体进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 ELISA 试验检测 scFv 与 HeLa 细胞的结合活性:将 HeLa 细胞稀释到 5 × 10⁴ 细胞/mL,每孔接种 100 μ L 至 96 孔细胞培养板,37℃ 培养 24h;弃去培养液,PBS 漂洗,加入 4℃ 预冷的甲醇;丙酮固定 10min;弃去固定液,PBS 漂洗,每孔加入 100 μ L 阻断液(10mL PBS,100 μ L 30% H₂O₂),室温 30min,以去除内源性过氧化氢酶活性;弃去阻断液,PBS 漂洗,滴加 2% BSA 37℃ 封闭 2h;甩去封闭液,加入表达后的全菌蛋白,37℃ 温育 2h;PBS 漂洗,加入抗 E.tag 抗体(1:5000 稀释),37℃ 温育 1h;PBS 漂洗,滴加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(1:5000 稀释),37℃ 温育 1h;PBS 漂洗,底物 OPD 显色,待充分显色后用 1mol/L H₂SO₄ 终止显色,测定 A₄₉₂。

1.2.4 表达产物的纯化:收集的菌体重悬于 50mL PBS 中,置于冰上超声破碎。12 000 r/min 离心 30min,取上清并加入终浓度为 50mmol/L 的咪唑。用 Ni-NTA agarose 亲和柱进行纯化。纯化的抗体超滤去除咪唑后,用 2-D Quant Kit 测定蛋白浓度。

1.2.5 抗体对脑的靶向作用研究:以 2.0 μ g 抗体蛋白/g 小鼠的剂量,将单链抗体从尾静脉注射小鼠。1h 后,尾静脉注入 0.9% 生理盐水配制的戊巴比妥钠(35mg/kg 小鼠),使其麻醉。将降主动脉阻断,颈静脉剪断,从左心室注入冰预冷的 PBS 20mL。取脑组织(2mL PBS/0.5g 脑组织),用玻璃匀浆器匀浆,取出一部分用于电泳分析,其余加入终浓度为 26% 的葡聚糖。充分混匀后,4℃ 5 400g,离心 15min。沉淀为脑毛细血管,上清为脑组织^[5,6]。用裂解缓冲液(PBS,1% Triton X-100,0.1% SDS)裂解^[5]。取样 50 μ L,加入 50 μ L 2 × 上样缓冲液,开水中煮 15min,13 000r/min 离心 1min,取上清用于蛋白电泳。转膜(恒流,1mA/cm² PVDF 膜)并用 5% 的脱脂奶粉封闭后,用抗 E.tag 的抗体(1:1000 稀释)为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(1:3000 稀释)为二抗,Western 检测目的蛋白,ECL 显色。其余各组织(心、肝、脾、肾及肺)取出后,PBS 清洗,再用 1mL 冰预冷的 PBS 悬浮,玻璃匀浆器匀浆。6000r/min 离心 10min(4℃)收集沉淀,以去除血液中抗体的干扰。沉淀用裂解缓冲液(2mL PBS/0.5g 脑组织)裂解。样品制备方法同脑组织。

2 结果

2.1 抗体基因的获取

经过三轮的富集筛选,从400个单克隆噬菌体抗体中,筛选到了36个阳性克隆。以BSA、血清、转铁蛋白、白介素1受体及大肠杆菌的全菌蛋白为抗原,进行了特异性鉴定,结果得到15个特异性较好的抗体。对15个克隆进行测序,得到8个序列不同的抗体。仅对其中特异性及亲和力最好的一株抗体的实验结果进行报道,扩增抗体基因的琼脂糖凝胶电泳结果见图1,抗体基因的大小约为750bp。

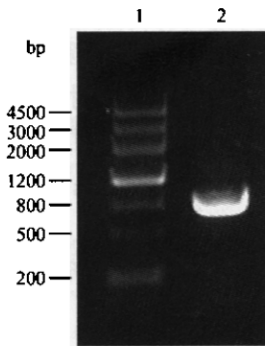


图1 抗体基因的扩增

Fig.1 Amplification of scFv gene

1:DNA marker;2:PCR product of scFv.

2.2 抗体基因的表达

抗体基因插入表达载体 pET22b(+),转化大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达后的产物经 SDS-PAGE 分析,结果显示(图2),与未插入抗体基因的空载体相比,在分子量约为33 kD处有一表达条带,与预期的目标蛋白大小是一致的。目的蛋白几乎全部存在于裂解物上清中。

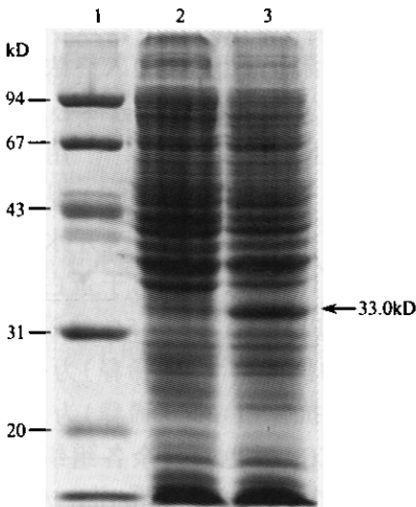


图2 重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

Fig.2 Expression of recombinant plasmid in *E. coli* BL21(DE3)

1:protein marker; 2:pET22b(+)/BL21(DE3) induction with 0.5mmol/L IPTG;3: recombinant bacteria induction with 0.5mmol/L IPTG.

2.3 scFv 与 HeLa 细胞的结合活性

转铁蛋白受体高表达于肿瘤细胞表面,因此用人源的 HeLa 细胞来检测表达的抗体与转铁蛋白受体的结合活性。实验结果显示,与阴性对照相比,表达抗体的全菌蛋白可以与 HeLa 细胞结合,且对比较明显(见图3)。

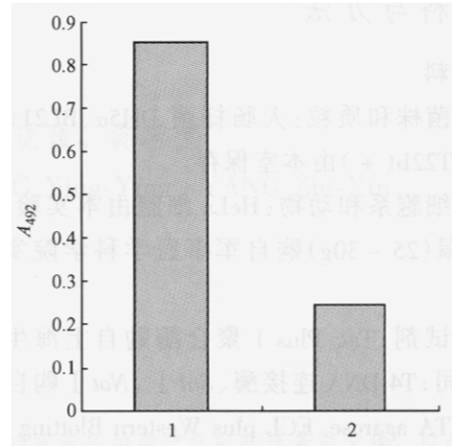


图3 HeLa 细胞的免疫组化

Fig.3 Identification of binding of scFv to TfR by ELISA

1:positive results; 2:negative control.

2.4 抗体的纯化

表达菌的超声上清经镍亲和凝胶柱纯化后,对纯化产物进行 SDS-PAGE 分析,结果显示(图4),在约33 kD处有一条较纯的蛋白条带。超滤去除咪唑后,测得蛋白浓度为0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

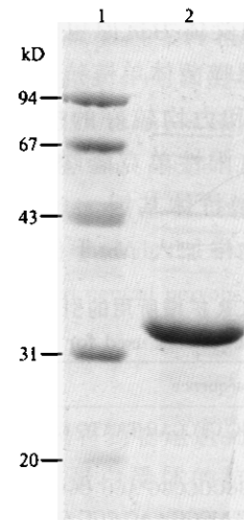


图4 抗体纯化后的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified scFv

1:protein marker;2:purified scFv protein.

2.5 抗体对脑的靶向研究

抗体尾静脉注射小鼠,1h后,去除血液及与毛细血管中的转铁蛋白受体相结合的抗体的干扰,在脑实质中检测到抗体的存在,说明抗体通过转铁蛋白受体的介导作用进入了脑组织(阳性对照为纯化

的抗体)。而且,在蛋白上样量相同的情况下,与其余各组织相比,在脑中检测到的量较多(图5)。

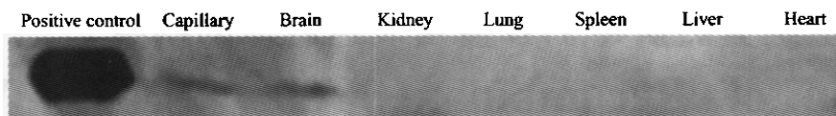


图5 抗体在脑及各组织器官中的分布

Fig. 5 Organ uptake of scFv 1h after i. v. injection

3 讨论

血脑屏障由脑毛细血管内皮细胞、周细胞、星形细胞和小胶质细胞等组成。与其它组织器官相比,脑毛细血管内皮细胞间连接紧密、缺少穿孔、胞饮作用减弱,限制了复合物从血液进入脑组织。此外,脑毛细血管内皮细胞还表达多种酶。胞质溶胶及胞外的膜也增加了血脑屏障截流的特性。也存在于脑毛细血管内皮细胞的P-糖蛋白是一种ATP依赖的外排泵,被认为可以阻止化疗试剂和疏水性复合物在胞内聚集^[7]。

鉴于以上原因,大分子药物如何通过血脑屏障一直是中枢神经系统疾病治疗的重点。目前药物通过血脑屏障主要有以下三种方法:(1)侵入性给药法,包括颈动脉注射糖溶液、鞘内或脑室注射给药;(2)非侵入性的给药方法,包括化学传递系统、吸收介导的转运、受体介导的转运、免疫脂质体和纳米给药系统等;(3)由鼻腔给药绕过BBB^[8]。

受体介导的转运主要是利用脑毛细血管内皮细胞中富含转铁蛋白受体、胰岛素受体的特点,制备这些受体的特异性抗体,并将抗体与药物分子连接,通过受体介导的内吞作用将药物分子携带入脑。该方法在小鼠、大鼠及猩猩体内均已试验成功^[9]。但人源的抗体目前尚未有报道。本研究利用从胎盘中提取的转铁蛋白受体为抗原,从全合成人源噬菌体单链抗体库中筛选到了其特异性的抗体,解决了以往抗体的免疫源性问题,并在大肠杆菌中获得了可溶性表达。动物实验表明,该抗体可以通过血脑屏障到达脑实质,为药物转运入脑打下了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] 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
- [2] Turkewitz AP, Amatruda JF, Borhani D *et al.* A high yield purification of the human transferrin receptor and properties of its major extracellular fragment. *J Bio Chem*, 1988, **263**(17): 8318 - 8325
- [3] Griffiths AD, Williams SC, Hartley O *et al.* Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoire. *EMBO J*, 1994, **13**:3245 - 3260
- [4] Yan B(颜冰), Zhu HQ(朱恒奇), Huang PT(黄培堂). Soluble expression and target study to brain of anti-TfR scFv. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2004, **20**(3):342 - 347
- [5] Triguero D, Buciak J, Pardridge WM. Capillary depletion method for quantification of blood-brain barrier transport of circulating peptides and plasma proteins. *J Neurochem*, 1990, **54**(6):1882 - 1887
- [6] Abba JK, Victoria A. Entry of CART into brain is rapid but not inhibited by excess CART or leptin. *Amer J Physio*, 1999, **277**: 901 - 904
- [7] Garcia E, Andrieux K, Gil S *et al.* Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? *Inter J Pharma*, 2005, **298**:274 - 292
- [8] Candace LG, Gary MP. Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery. *J Pharma Sci*, 2005, **94**: 1187 - 1195
- [9] Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *Neuro*, 2005, **2**(1):3 - 14