

一种新型肿瘤血管抗体 Fab 的基因克隆与表达

吴小平 张志强 杨东玲 阎锡蕴*

(中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发重点实验室 北京 100080)

摘要 鼠单克隆抗体 AA98 是我室研制的一株新型抗肿瘤血管抗体,体内实验证明它可以抑制血管生成,抑制肿瘤生长。从分泌抗体 AA98 的杂交瘤细胞中提取总 RNA,采用逆转录-PCR(RT-PCR)分别扩增重链 Fd 及轻链 κ ,并进行序列测定。将 Fd 和 κ 链依次与噬菌粒 pComb3H 连接,构建 pComb3H-AA98Fab 表达载体。在大肠杆菌中表达了 AA98Fab。免疫印迹表明该 Fab 片段识别分子量为 100kD 的蛋白,具有原抗体 AA98 的抗原特异性。AA98Fab 是研究抗体 AA98 作用机理的工具,也为制备重组免疫毒素,尝试肿瘤血管靶向治疗实验打下了基础。

关键词 抗体片段 Fab,肿瘤血管

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0695-04

肿瘤的生长和转移依赖于血管生成(Angiogenesis)^[1]。肿瘤的迅速生长、浸润和转移,均需要肿瘤血管供给氧和营养。如果没有血管生成,实体瘤的生长直径不会超过 2mm;血管生成亦是肿瘤转移过程的关键环节,无血管期的肿瘤没有转移能力。通过抑制肿瘤血管生成,切断肿瘤的血供,可以有效地抑制肿瘤的生长和转移。针对肿瘤血管上的特异性的靶标研制肿瘤抑制剂,是目前肿瘤研究领域的一大热点。

用经肝癌细胞培养上清刺激的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)免疫小鼠,本室制备了一株肿瘤血管特异抗体 AA98,它可与 20 余种肿瘤组织的血管特异结合,不仅能够抑制和杀伤 HUVEC 细胞,而且能够抑制平滑肌肉瘤和胰腺癌的生长和转移,是一株特异、高效的肿瘤血管抗体,有希望成为理想的肿瘤血管导向治疗抗体^[2]。初步的鉴定实验表明,AA98 所对应的靶标不同于目前已知的血管内皮标志物,如 $\alpha v\beta 3$ ^[3],VEGF 受体^[4],E-选择素^[5],Endosialin^[6]及 Endoglin^[7]等,很可能是一种新的血管内皮标志分子。本实验从分泌抗体 AA98 的杂交瘤细胞中克隆了 AA98 基因,构建并在大肠杆菌中表达了抗体片段 Fab,它保持了抗体 AA98 的抗原特异性,在新型基因重组免疫毒素的制备及肿瘤血管靶向治疗等方面有着广阔的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

分泌抗体 AA98 的杂交瘤细胞由本室保存。噬菌粒 pComb3H 承海军总医院王琰教授惠赠。大肠杆菌 XL1-Blue 为本室保存。碱性磷酸酶(AP)标记抗鼠 Fab 抗体购自 Sigma 公司。Trizol 试剂(用于提取细胞总 RNA)和 Superscript Preamplification System(用于反转录合成 cDNA)均为 GIBCO 公司产品。PCR 产物回收试剂盒,购自 QIAGEN 公司。pGEM-T 质粒、限制酶及 T4 连接酶购自 Promega 公司。抗体 AA98 对应的抗原提取液为本实验室从人脐静脉内皮细胞中制备。其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 抗体 AA98 基因克隆及 Fab 重组表达质粒的构建 细胞总 RNA 提取及 cDNA 合成参照试剂盒说明进行,离心收集细胞(约 $5 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$)加入 1mL Trizol 试剂,吸打细胞,室温放置 5min,氯仿抽提,取水相,等体积异丙醇沉淀 RNA,75%乙醇洗涤沉淀,室温干燥,用去 RNase 水悬起沉淀。以所得 RNA 作模板,oligodT 为引物,反转录合成 cDNA,用作 PCR 扩增的模板。用于扩增重链 Fd 的引物是 1 5'agg tcc agc tgc tgc agt ctg g3 (含 XhoI 切

收稿日期 2000-05-24,修回日期 2000-01-24。

基金项目 国家高技术研究发展与计划项目(102-09-0204)。

* 通讯作者。

点和 2.5'gat atc act agt ggg ccc gct ggg etc3 (含 *SpeI* 切点)。用于扩增轻链 κ 的引物是 3.5'gat att gag ctc gtg atg ac(c/a)ca(g/a)(t/a)ct cc3 (含 *SacI* 切点)和 4.5'gc tct aga aag ctt a tta aca ctc att cct gtt gaa3 (含 *XbaI* 切点)。PCR 反应条件 94°C, 1min 52°C, 1min, 72°C, 1min, 35 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 回收约 700bp 处的特异扩增带, 分别与 pGEM-T 质粒连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。采用 PCR 和酶切筛选重组 pGEM-T-Fd 和 pGEM-T- κ , 分别以 T₃ 和 T₇ 通用引物从两个方向测序。

SacI 和 *XbaI* 双酶切 pGEM-T- κ , 与经同样双酶切的 pComb3H 质粒大片段连接, 转化大肠杆菌 XL1-Blue, 鉴定重组质粒 pComb3H- κ 。

设计 Fd 链 5'端引物 5'agg tcc agc tgg tcg act ctg g3 (含 *SalI* 切点), 将原 *XhoI* 切点换为与其有匹配粘端的 *SalI*, 以 pGEM-T-Fd 为模板, 与引物 2 再扩增 Fd, 经 *XhoI* 和 *SpeI* 双酶切, 与经同样双酶切的 pComb3H- κ 质粒连接。构建 pComb3H-Fab。用 *NheI* 和 *SpeI* 切除噬菌粒 pComb3H 上的噬菌体外壳蛋白 III 基因, 然后载体自连, 即构建成功 pComb3H-Fab 可溶性表达质粒。

1.2.2 AA98Fab 在大肠杆菌中的表达及 AA98Fab 粗提液制备 重组可溶性表达质粒 pComb3H-Fab 转化大肠杆菌 XL1-Blue, 在 LB 培养基中培养至 OD = 0.5, 加 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 30°C 诱导培养 12h, 离心收集菌体。采用超声法破碎细胞, 离心收集破碎上清液, 即为重组 Fab 粗提液。

1.2.3 Western Blotting 检测重组 Fab 的表达 Fab 粗提液经 10% SDS-PAGE, 电转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉 PBS 封闭后, 用碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗鼠 Fab 抗体检测 Fab 的表达, 具体操作参见文献 [8]。

1.2.4 Western Blotting 检测重组 Fab 的抗原结合活性及特异性 将抗体 AA98 对应的抗原提取液经 8% SDS-PAGE, 电转移至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉/PBS 封闭 1h, 加 Fab 粗提液, 37°C 温育 2h, 0.05% Tween-20/PBS 和 PBS 各洗膜 3 次, 每次 5min, 加 AP-抗鼠 Fab 抗体, 用氮蓝四唑 (NBT) 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸 (BCIP) 底物显色。以抗体 AA98 作阳性对照, 抗原与 AP-抗鼠 Fab 抗体的反应以及抗原与空菌包周质提取液的反应作阴性对照。

1.2.5 重组 Fab 相对亲和力的测定 [9]: 将抗体 AA98 对应的抗原提取液包被 96 孔酶标板, 5% 脱

脂奶粉/PBS 封闭后, 分别加入 Fab 粗提液和抗体 AA98, 37°C 温育 2h, 0.05% Tween-20/PBS 和 PBS 各洗板 3 次。加入不同浓度 (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0mol/L) 的 NH₄SCN 溶液各 50 μ L, 室温放置 15min, 用 PBS 洗板 3 次。加 AP-抗鼠 Fab 抗体, 37°C 温育 1h, 用对硝基苯磷酸 (PNPP) 底物显色, Bio-Rad model 550 酶标仪上测定 A₄₁₀。A₄₁₀ 下降 50% 时相应的 NH₄SCN 浓度作为相对亲和力的指数。

2 结果与讨论

2.1 AA98 抗体片段基因克隆和重组 Fab 表达质粒的构建

从分泌抗体 AA98 的杂交瘤细胞中提取总 RNA, 以 oligo-dT 为引物, 合成 cDNA, 并以此为模板, 分别扩增 Fd 和 κ 链, 琼脂糖电泳检测, 可在约 700bp 左右见到特异的扩增带。胶上回收扩增带, 分别与 pGEM-T 载体连接, 测序。与 Kabat 免疫球蛋白基因数据库 [10] 相比较, 确证所扩增的是抗体基因。

测序结果表明, Fd 链基因的恒定区中有一个 *XhoI* 切点, 因此用 *XhoI* 和 *SpeI* 直接将 Fd 链亚克隆至 pComb3H 载体上时, 会切断 Fd 基因, 重新设计合成 Fd 的 5'引物为 5'agg tcc agc tgg tcg act ctg g3', 将原引物中的 *XhoI* 切点换成 *SalI* 切点, 以 pGEM-T-Fd 作模板, 扩增出 Fd 链, 然后依次将 Fd 和 κ 链装入 pComb3H 质粒。以 *NheI* 和 *SpeI* 双酶切去除噬菌体基因 III (约 500bp) 后, 完成 pComb3H-Fab 表达质粒的构建。Fd 和 κ 链 PCR 产物及重组质粒酶切鉴定如图 1 所示。

2.2 AA98Fab 在大肠杆菌中的表达

pComb3H 是一双顺反子质粒, LacZ 启动子控制一个转录单位, 一条 mRNA 翻译出 Fd 和 κ 链, 分别在 OmpA 和 PelB 信号肽引导下至细菌包周质腔, 两者通过二硫键连接, 组装成 Fab。用 AP 标记的抗鼠 Fab 抗体检测 Fab 的表达如图 2 所示, 在约 48kD 处可见特异条带, 分子量与根据核酸序列所预测的一致。表明在大肠杆菌中获得了重组 AA98Fab 的表达, 但其表达量较低, 约 5 μ g/mL。

2.3 重组 Fab 的抗原结合活性

采用 Western blotting 方法检测重组 Fab 的抗原结合活性。抗原经 SDS-PAGE, 电转移到硝酸纤维素膜上, 与 Fab 粗提液反应后, 用 AP 标记的抗鼠 Fab 抗体检测。结果表明, Fd 特异识别分子量约

100kD 的条带 ,其识别的抗原与抗体 AA98 的相一致 结果如图 3 所示。

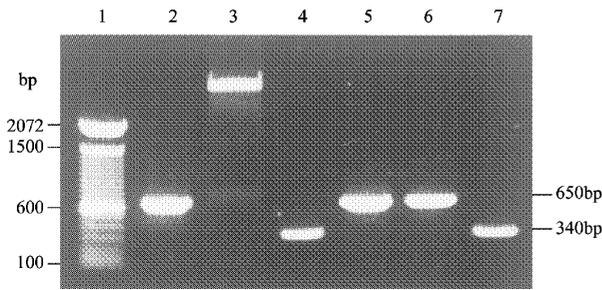


图 1 Fd 和 κ 链基因扩增产物及重组 pComb3H-Fab 的酶切鉴定

Fig.1 RT-PCR amplified genes of AA98 and enzyme digestion identification of recombinant pComb3H-Fab

1. DNA marker 2. κ chain amplified from cDNA 3. Sac I and Xba I digestion of recombinant pComb3H-κ 4. V_L 5. Fd chain amplified from cDNA 6. Fd chain amplified from recombinant pComb3H-Fab 7. V_H

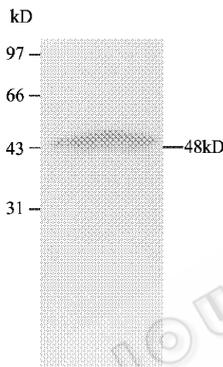


图 2 Western blotting 鉴定 AA98Fab 的表达

Fig.2 Western blotting analysis of the expression of AA98Fab

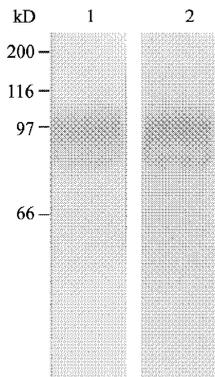


图 3 Western blotting 分析重组 Fab 的抗原特异性

Fig.3 Western blotting analysis of the antigen specificity of recombinant Fab

1. The recognition of AA98 to its antigen 2. Recombinant Fab recognized the same protein band as its parent AA98 did

2.4 重组 Fab 的相对亲和力

用硫氰酸盐洗脱法测定 Fab 与 AA98 的相对亲和力。对于 Fab ,当纵轴数值下降为 1.699 ,即 OD 下降为不加硫氰酸氨时的 50% 时 ,相应的硫氰酸氨浓度是 1.2 ,即 Fab 的相对亲和力指数是 1.2。而对于 AA98 相应的硫氰酸氨浓度是 1.6 ,其相对亲和力指数是 1.6(图 4)。说明大肠杆菌表达的重组 Fab 对抗原的亲和力略低于原抗体 AA98。

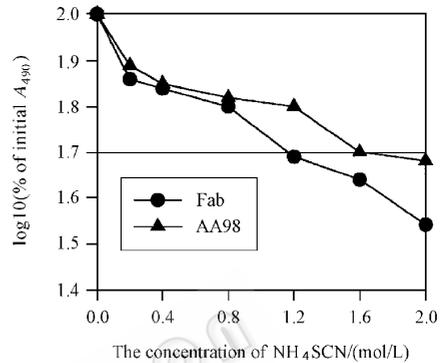


图 4 硫氰酸盐洗脱法比较重组 Fab 与抗体 AA98 相对亲和力

Fig.4 Comparison of relative affinity between recombinant Fab and AA98

3 讨论

由于杂交瘤中也可能存在多克隆抗体可变区 mRNA ,有时仅用 RT-PCR 不能得到功能性单抗基因^[11] ,通过建立杂交瘤 cDNA 噬菌体抗体库 ,用固相抗原筛选有可能获得功能性的抗体基因。噬菌粒 pComb3H 用来构建噬菌体文库。所幸我们用 RT-PCR 法即获得了抗体基因 ,且可溶性表达后 ,检测到了其抗原结合活性 ,无需建库筛选功能 Fab 片段。

抗体片段在细菌包周质中的折叠是抗体产量的瓶颈因素^[12] ,我们用酶标抗 κ 链抗体检测结果显示 ,有大量的未组装成 Fab 的 κ 链 ,分子量约 24kD ,这是造成重组 Fab 表达量较低的重要原因之一。影响 Fab 组装和有效折叠的因素很多 :降低细菌培养温度可能有助于抗体的组装和折叠 ;抗体基因中部分氨基酸的点突变可能影响抗体的折叠效率 ;宿主菌的种类也是影响功能性抗体片段产率的因素 ,不同宿主菌的二硫键异构酶和脯氨酸顺反异构酶的活性 ,及蛋白水解酶的活性都将会影响抗体片段的组装、折叠和分泌。在我们实验中发现 ,用 DH5α 作宿主菌表达时 ,Fab 的得率较低 ,Western blotting 鉴定

中出现分子量小于 Fab 但可被抗 κ 链抗体识别的阶段。而用 XL1-Blue 作宿主时,则没有观察到这一现象。

AA98 抗体所识别的抗原位于新生的血管内皮上,其分子量约 100kD。本室目前正通过层析分离提纯、蛋白质氮末端测序,以及建立内皮细胞 cDNA 表达文库,对该抗原的进行鉴定。初步的实验表明,该抗原分子可能含有多个亚基,与目前已报道的肿

瘤血管内皮特异标志物均有所不同。该分子可能是肿瘤新生血管所特有并参与肿瘤生长和转移的一种新的靶分子。

比较抗体片段 Fab 和完整 AA98 抗体在体内对血管的作用,有助于了解 AA98 抑制血管生成的作用机理,如是否通过 Fc 段介导而起作用,是否与抗体的“价”有关,或其作用仅仅是抗体对于其内皮细胞上抗原的封闭作用。

参 考 文 献

- [1] Folkman J, Engl N. *J Med*, 1971, **285**(21):1182~1186
- [2] Yan X Y, Yang D L, Wu X P *et al*, International Conference on Immunology, Oct 23~26, Shanghai, China, 1999, pp25
- [3] Brooks P C, Montgomery M P, Rosenfeld M *et al*. *Cell*, 1994, **79**:1157~1164
- [4] Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana C D. *Cancer Research*, 1995, **55**(18):3964~3968
- [5] Nguyen M, Strubel N A, Bischoff J. *Nature*, 1993, **365**(6443):267~269
- [6] Rettig W J, Garin-Cheda P, Healey J H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(22):10832~10836
- [7] Li D Y, Sorensen L K, Brooke B *et al*. *Science*, 1999, **284**:1534~1537
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯著, 金冬雁, 黎梦枫等译. 分子克隆实验指南(第二版), 北京: 科学出版社, 1992
- [9] Macdonald R A, Hosking C S, Jones C L. *J Immunol Method*, 1988, **106**:191~194
- [10] Kabat E A, Wu T T, Perry H M *et al*. Sequence of Proteins of Immunological Interests (5th edition), US Department of Health and Human Service, Public Health Service, National Institute of Health
- [11] Knight D W, Trink H, Le J *et al*. *Mol Immunol*, 1993, **30**:1443
- [12] Borrebaeck Carl A K. *Antibody Engineering* (Second Edition), Oxford University Press, New York, NY, 1995

A Novel Tumor Blood Vessel Specific Fab Antibody Fragment : Gene Cloning, Expression and Activity

WU Xiao-Ping ZHANG Zhi-Qiang YANG Dong-Ling YAN Xi-Yun

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract A tumor blood vessel specific antibody fragment Fab was constructed and expressed in *E. coli*. Our lab had generated a mouse monoclonal antibody, referred to as AA98. Targeting tumor blood vessel, AA98 potently inhibited tumor growth and metastasis *in vivo*. Total RNA was extracted from hybridoma secreting AA98 and cDNA was then synthesized. Using PCR, heavy chain and light chain of AA98 were amplified and ligated into phagemid pComb3H to construct recombinant expression vector pComb3H-Fab. Soluble Fab was then expressed in *E. coli* XL1-Blue. Immuno-blotting showed that the expressed Fab could recognize a 100kD band, maintaining the same specificity of its parent antibody AA98. This recombinant FAb fragment is an important reagent to investigate the mechanism of AA98 inhibiting tumor angiogenesis and to develop recombinant AA98 conjugated immuno-toxin for tumor blood vessel targeted therapy.

Key words Antibody fragment Fab, tumor blood vessel