

# 超抗原 SEA 与抗黑色素瘤 ScFv 融合基因的构建及表达

孙 静<sup>1</sup> 吕安国<sup>1,2\*</sup> 吴文芳<sup>1,2</sup> 白向阳<sup>1,2</sup> 任秀宝<sup>3</sup> 刘 虹<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016)

<sup>2</sup>(中国科学院研究生院, 北京 100039)

<sup>3</sup>(天津市肿瘤医院免疫室, 天津 300060)

**摘 要** 采用酶切连接和重叠 PCR 连接两种方法将抗黑色素瘤单链抗体基因和去除 N 端信号肽的金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因进行融合, 并将融合基因克隆于 pET28-a 表达载体上, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 用 Ni-NTA 系统对表达产物进行分离、纯化。MTT 法检测融合蛋白对黑色素瘤细胞的体外抑制率。结果表明 6His-ScFv-SEA 融合蛋白可在 *E. coli* BL21(DE3) 中稳定表达, 表达量占菌体蛋白的 30%, 主要以包涵体的形式存在。融合蛋白可通过激活效应细胞对表达相关抗原的黑色素瘤细胞发挥抑制作用。

**关键词** 抗黑色素瘤单链抗体, 金黄色葡萄球菌肠毒素 A, 融合蛋白, 靶向治疗

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0750-04

金黄色葡萄球菌肠毒素 A (Staphylococcal enterotoxin A, SEA) 是金黄色葡萄球菌产生的系列肠毒素之一, 也是一种重要的细菌超抗原。它在主要组织相容性复合体 (MHC) II 类分子的递呈下, 只需极小的剂量 ( $10^{-12}$  mol/L) 就可以刺激比普通抗原多数千倍的  $V\beta$  特异性 T 细胞增殖, 并释放大量细胞因子, 是一种极好的免疫调节剂和增效剂<sup>[1]</sup>, 近年来被广泛应用于肿瘤治疗。为了增强 SEA 的抗肿瘤特异性, Kalland 等用基因工程手段构建了 SEA 和抗结肠癌单克隆抗体 C215、C242 Fab 片段的融合蛋白, 并证明它可以提高 SEA 对肿瘤细胞的亲和力, 减少对 MHC II 类分子的依赖性, 同时保持其强烈的激活 T 细胞的特性<sup>[2,3]</sup>。Alpaugh 等已将 C242Fab-SEA 融合蛋白用于 I 期临床, 并取得较好的治疗效果<sup>[4]</sup>。我国对单抗导向的 SEA 研究尚处于起步阶段, 目前尚无融合基因的报道。本研究将抗黑色素瘤单链抗体 (Single chain variable fragment, ScFv) 基因和 SEA 基因进行了融合表达, 并证实它可以通过激活效应细胞, 对表达相关抗原的黑色素瘤细胞发挥抑制作用。为研究 SEA 对黑色素瘤的靶向杀伤作用奠定了可靠的实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细菌、载体及细胞

抗黑色素瘤单链抗体表达质粒 pET28a-SF 和金黄色葡萄球菌肠毒素 A 表达质粒 pSEAm 为本室构建。大肠杆菌 BL21(DE3) 及表达载体 pET28a 为本室保存。载体 pGEM T-easy 购自 Promega 公司。人黑色素瘤细胞株 LiBr 来自美国细胞菌种库 (American Type Culture Collection, ATCC), 人乳腺癌细胞株 MCF7 由天津肿瘤医院免疫室提供。

### 1.2 工具酶和试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制酶 *Nde* I、*Eco*R I、*Hind* III 购自 TaKaRa 公司; 罗氏 DNA 纯化试剂盒购自罗氏公司。Ni-NTA 纯化系统购自 Invitrogen 公司。

### 1.3 引物设计

根据单链抗体和 SEA 基因<sup>[5,6]</sup>的已知序列, 遵循引物设计原则, 设计了 3 组引物, 用于酶切连接和 PCR 连接, 构建 ScFv-SEA 融合基因。

第 1 组:

ScFv F 5' CATATG CAGGTGAAGCTGCAGCAGTC 3'

*Nde* I 位点

ScFv R 5' GAATTC CCGTTTGATTTCCAGCTT 3'

*EcoR* I 位点

第 2 组

SEA F 5' AAGCTTTTAACTTGTATATAAATAATATATC 3'

*EcoR* I 位点

SEA R 5' GAATTCAGCGAGAAAAGCGAAGAAATA 3'

*Hind* III 位点

第 3 组

P1 5' TTCTCGCTCCGTTTGATTTCCAGCTT 3'

P2 5' CAAACGGAGCGAGAAAAGCGAAGAA 3'

#### 1.4 PCR 扩增 ScFv 基因

以 pET28-ScFv DNA 为模板用第 1 组引物,按照 94℃ 30s、57℃ 30s、72℃ 40s、30 个循环、72℃ 延伸 10 min 的反应条件,扩增 ScFv DNA。取 10 $\mu$ L PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳。

#### 1.5 PCR 扩增 SEA 基因

以质粒 pSEAm 为模板,用第 2 组引物,按下述条件 94℃ 30s、45℃ 30s、72℃ 40s、30 个循环,扩增 SEA DNA。取 10 $\mu$ L PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳。

#### 1.6 pGEM T-ScFv、pGEM T-SEA 重组质粒的构建

扩增的 ScFv、SEA PCR 产物经罗氏 DNA 纯化试剂盒纯化后,5u Taq 酶 70℃ 反应 30min,引入 A 尾。PCR 产物和 pGEM T-easy 载体按 3:1 的摩尔比混合,T4 DNA 连接酶 4℃ 连接过夜,连接产物转化 JM109 感受态细胞,经蓝白斑筛选,挑选重组子培养。提取质粒 DNA,酶切鉴定后送宝生物公司测序。

#### 1.7 酶切连接构建 ScFv-SEA 融合基因

经测序证实含有正确重组的 pGEM T-ScFv 质粒用 *Nde* I 和 *EcoR* I 双酶切,pGEM T-SEA 质粒用 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切,pET28-a 质粒用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切,1.5% 的琼脂糖凝胶电泳纯化后,罗氏 DNA 回收试剂盒回收 ScFv、SEA 片段及 pET28-a 粘性质粒。将三者按 5:5:1 的摩尔比混合,用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接 16~18h。连接产物转化 BL21(DE3)感受态细胞,筛选得到重组表达质粒 SFS1。*Nde* I/*Hind* III,*Nde* I/*EcoR* I,及 *EcoR* I/*Hind* III 双酶切鉴定后,再经测序证实。

#### 1.8 重叠 PCR 构建 ScFv-SEA 融合基因

分别用 ScFv F、P1 和 P2、SEAR 两组引物扩增 ScFv 和 SEA DNA,扩增条件同上。引物 P1 中含有 SEA 上游互补序列,引物 P2 中包括一段引物 P1 的重复序列。第 3 次 PCR 反应以前两次 PCR 产物为模板,以 ScFv F、SEA R 为上下游引物,按照 94℃ 40s、50℃ 30s、72℃ 1min、30 个循环、72℃ 延伸 10 min 进行聚合酶链反应,拼接 ScFv-SEA 融合基因。

同样方法连接到 pGEM T-easy 和 pET28-a 载体中,得到重组表达质粒 SFS2,进行 *Nde* I/*Hind* III 双酶切鉴定和序列测定。

#### 1.9 ScFv-SEA 融合蛋白在 *E. coli* 中的表达和 SDS-PAGE 鉴定

将含两种重组质粒的 BL21(DE3)接种于 10mL 的 LB 培养液中,30℃,300 r/min 振荡培养 3~4h,至菌液吸光度值( $OD_{600}$ )为 0.6 时,加入 IPTG 诱导 (1mmol/L)3h,分级分离菌体蛋白。进行 15% SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色,确定融合蛋白的表达强度、表达部位及形式。

#### 1.10 目的蛋白的分离、纯化

离心收集诱导菌液 50mL,用 8mL 的 Buffer A (6mol/L 盐酸胍,20 mmol/L  $NaH_2PO_4$ ,500 mmol/L NaCl pH 7.8)重悬沉淀,大功率超声破菌,3000 $\times$ g 离心 15min 取上清;8mL 的 Buffer B (8mol/L 尿素,20mmol/L  $NaH_2PO_4$ ,500mmol/L NaCl, pH 7.8)加入  $Ni^{2+}$  NTA 柱,800 g 离心 2min 平衡该亲和层析柱;8mL 的裂解上清液加入平衡过的  $Ni^{2+}$  NTA 柱,800 $\times$ g 离心 1min;4mL 的 Buffer B 洗 2 次;4mL 的 Buffer C (8mol/L 尿素,20mmol/L  $NaH_2PO_4$ ,500mmol/L NaCl, pH 6.0)洗 2 次;8mL 的 Buffer D (250mmol/L  $NaH_2PO_4$ ,2.5 mol/L NaCl,20mmol/L 咪唑 pH 8.0)洗 4 次;8mL 的 Buffer E (250mmol/L  $NaH_2PO_4$ ,2.5 mol/L NaCl,250mmol/L 咪唑 pH 8.0)洗柱,收集样品进行 SDS-PAGE。

#### 1.11 融合蛋白对人黑色素瘤 LiBr 体外抑制效应的测定

将健康人外周血单个核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cell PBMC)和对数生长期的 LiBr 黑色素瘤细胞,按效靶比 10:1 接种于 96 孔培养板。加入 ScFv-SEA 融合蛋白,使融合蛋白终浓度分别为 0.10、1.00、2.00、5.00、10.00 $\mu$ g/mL,设单加肿瘤细胞对照孔,单加 PBMC 对照孔,肿瘤细胞加融合蛋白对照孔,PBMC 加融合蛋白对照孔。并设 MCF7(抗原阴性)与 PBMC、融合蛋白共育的阴性对照组。37℃ 培养 48h,MTT 法检测细胞的 OD 值计算抑制率。

## 2 结 果

#### 2.1 pET28-a-ScFv-SEA 重组质粒的酶切鉴定

将酶切连接和 PCR 连接重组表达质粒 SFS1、SFS2,用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切,均有 1500bp 基因片段存在。SFS1 用 *Nde* I/*EcoR* I 及 *EcoR* I/*Hind* III

III 双酶切有约 750bp 基因片段存在(图 1)。DNA 测序证实酶切连接的重组质粒 S<sub>c</sub>Fv 和 SEA 两基因间有 EcoR I 酶切位点,而另一种为两基因直接拼接。

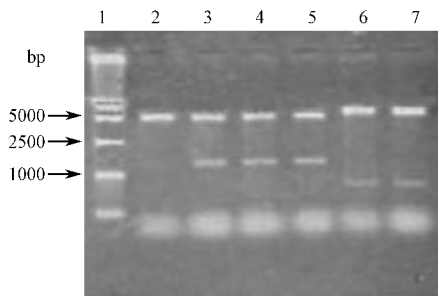


图 1 重组表达质粒 SFS1、SFS2 的酶切鉴定  
 Fig.1 The enzyme digestion of recombinant expression plasmid SFS1 and SFS2  
 1. 15 000marker ; 2. pET28-a cut with Nde I / Hind III ;  
 3 4 . SFS1 , SFS2 cut with Nde I / Hind II ;  
 6 . SFS1 cut with Nde I / EcoR I ;  
 7 . SFS1 cut with EcoR I / Hind III

### 2.2 ScFv-SEA 融合蛋白的高效表达

将含重组质粒 SFS1、SFS2 的 BL21( DE3 )接种于 10mL 的 LB 培养液中,经 30 °C 培养和 IPTG 诱导后,进行 15% SDS-PAGE,同时以空菌株和未诱导的菌液做对照(图 2)。从图 2 可见,两菌株均表达了相对分子量约 58kD 的蛋白条带,与预期的分子量吻合。经凝胶灰度扫描测得表达量占菌体蛋白总量的 30%。主要以包涵体的形式存在。

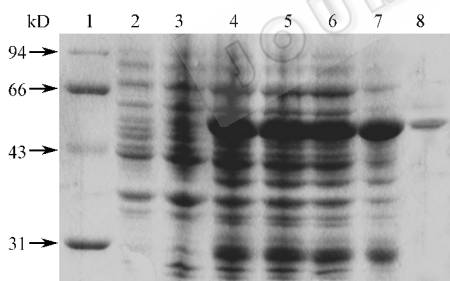


图 2 E. coli BL21/SFS1 和 BL21/SFS2 表达产物的 SDS-PAGE 分析  
 Fig.2 The SDS-PAGE analysis of expression products of E. coli BL21/SFS1 and BL21/SFS2  
 1. Protein molecular weight marker ( 94 000D ; 67 000D ; 43 000D ; 31 000D ; 16 000D ) ;  
 2. E. coli BL21 lysate ;  
 3. Total lysate of uninduced E. coli BL21/SFS1 ;  
 4 5. Total lysate of induced E. coli BL21/SFS1 and E. coli BL21/SFS2 ;  
 6 7. Inclusion body from induced E. coli BL21/SFS1 ;  
 8. Purified protein from E. coli BL21/SFS2 lysate

### 2.3 ScFv-SEA 的分离、纯化

转化 SFS1、SFS2 的 BL21( DE3 )经 IPTG 诱导,菌体裂解后,采用 Ni-NTA 亲和层析柱分离纯化得到了单一的 58kD 蛋白条带(图 2),凝胶成像系统分析融合蛋白的纯度达 90% 以上,蛋白定量约 0.47mg/mL。

### 2.4 抗黑色素瘤 ScFv-SEA 对 LiBr 细胞的体外抑制效应

效靶比为 10:1 时,随融合蛋白浓度的增大,对黑色素瘤细胞 LiBr 的抑制率逐渐增大,融合蛋白浓度为 1 ~ 2μg/mL 时,抑制率最高,达 57% ~ 62%,大于 2μg/mL 抑制率不再增加。单加 PBMC,单加融合蛋白对 LiBr 无明显影响。对不表达相关抗原的乳腺癌细胞 MCF7,未表现明显的抑制效应(图 3)。

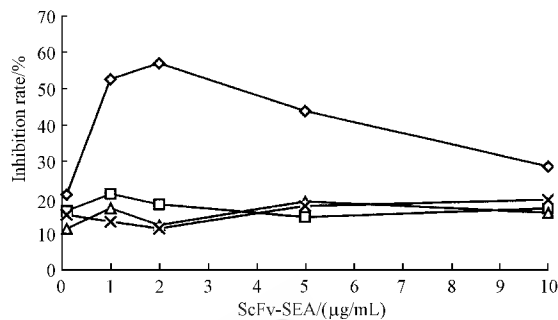


图 3 ScFv-SEA 融合蛋白对 LiBr 的抑制效应  
 Fig.3 The Inhibition effect of ScFv-SEA on melanoma cells LiBr

—◆— LiBr + PBMC + ScFv-SEA ; —□— MCF7 + PBMC + ScFv-SEA ;  
 —△— LiBr + PBMC ; —×— LiBr + ScFv-SEA

表 1 ScFv-SEA 融合蛋白对 LiBr 和 MCF7 细胞的抑制率  
 Table 1 The inhibition ratio of the fusion protein ScFv-SEA on the growth of the cell line LiBr and MCF7

Dose	LiBr	MCF7	P
0.1μg/mL	24.78 ± 11.53	16.29 ± 11.11	P > 0.05
1μg/mL	53.43 ± 12.77	22.93 ± 13.57	P < 0.05
2μg/mL	63.75 ± 13.81	25.05 ± 15.58	P < 0.05
5μg/mL	57.76 ± 12.33	21.46 ± 14.34	P < 0.05
10μg/mL	53.94 ± 11.65	24.81 ± 13.33	p < 0.05

## 3 讨论

黑色素瘤是一种常见的皮肤恶性肿瘤,发病率占全部恶性肿瘤的 1% ~ 3%,早期即可发生转移,预后差,常规的手术治疗、化疗、放疗不能取得满意效果,有必要寻求更加有效的治疗手段。“免疫毒素”因其具有高效、低毒、高特异性等特点,故又被称作“生物导弹”,已成为肿瘤生物治疗的重要分支。小分子抗体和毒素构成的免疫毒素属于“小分子免疫毒素”。与传统的免疫毒素相比,具有分子量小,免疫原性低,穿透性强,更易达到肿瘤局部等诸多优点,因此更适合临床应用。

本文中采用的抗黑色素瘤单链抗体,是通过噬菌体展示技术筛选获得的,并已证实它能和高表达神经节苷脂 2 的黑色素瘤细胞 LiBr 特异性结合(另文发表)。为了寻求一种更合理、更简便、更经济的

抗体导向药物的构建方法,并使重组的融合基因在翻译后达到预期的蛋白结构和生物活性,我们设计了重叠延伸引入连接序列、重叠延伸直接拼接、酶切拼接 3 种融合方案,分别将 ScFv-Linker-SEA、ScFv-SEA 和 ScFv-EcoR I-SEA 融合基因序列输入计算机,用 GoldKey 软件对它们的二级结构进行了预测<sup>[7]</sup>。结果显示 3 种氨基酸序列的抗原性、表位、疏水性无明显差异。因此,我们采用了后两种较简捷的方法构建重组免疫毒素,并采用 Ni-NTA 螯合层析柱对融合蛋白进行了纯化、柱上复性,检测蛋白的复性率达 23%。体外细胞实验证实该融合蛋白可以通过活化效应细胞,对表达相关抗原的肿瘤细胞产生有效的抗增殖作用,而对不表达该抗原的肿瘤细胞无明显影响,这说明该融合蛋白赋予了 SEA 抗黑色素瘤特异性,达到了预期目的。由于抗体导向治疗的真正优势在于抗体-毒素融合蛋白可以在表达相关抗原的肿瘤组织中集中分布,对外周组织的不良影响少,这一特性在体内药物代谢过程中才能更好地体现出来,因此该融合蛋白的靶向优势尚需动物实验进一步验证。我们将逐渐完善纯化工艺,希望可获得有临床应用价值的抗黑色素瘤生物治疗剂。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Hedlund G, Dohlsten M, Petersson C *et al.* Superantigen-based tumor therapy: *in vivo* activation of cytotoxic T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 1993, **36**(2): 89-93
- [ 2 ] Kalland T, Dohlsten M, Abrahmsen L *et al.* Targeting of superantigen. *Cell Biophys*, 1993, **22**(3): 147-164
- [ 3 ] Rosendahl A, Kristensson K, Hansson J *et al.* Repeated treatment with antibody-targeted superantigens strongly inhibits tumor growth. *Int J Cancer*, 1998, **76**(2): 274-83
- [ 4 ] Giantonio B J, Alpaugh R K, Schultz J *et al.* Superantigen-based immunotherapy: a phase I trial of PNU-214565, amonoclonal antibody-staphylococcal enterotoxin A recombinant fusion protein, in advanced pancreatic and colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 1997, **15**(5): 1994-2007
- [ 5 ] LIANG G (梁国栋). New molecular bioscience Laboratory Manual. Scientific Publishing Center, 2001
- [ 6 ] SHI C (时成波), LU A (吕安国), WU W (吴文芳) *et al.* The Changes of rare codons increase expression level of SEA. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18**(4): 477-480
- [ 7 ] LI Z (李增山), SUI J (隋延仿), JIANG Y (姜永强) *et al.* The design and prediction of biology characteristics of recombinant toxin CD80-Linker-SEA. *Chinese Journal of Immunology* (免疫学杂志), 2001, **17**: 65-66

## The Construction and Expression of Superantigen SEA and Antimelanoma ScFv Fusion Gene

SUN Jing<sup>1</sup> LÜ An-Guo<sup>1\*</sup> WU Wen-Fang<sup>1</sup> BAI Xiang-Yang<sup>1</sup> REN Xiu-Bao<sup>2</sup> LIU Hong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( Shenyang Institute of Applied Ecology of Chinese Academy of Science, Shenyang 110015, China )

<sup>2</sup>( Department of Immunology, Cancer Hospital, Tianjin 300060, China )

**Abstract** Two strategies, direct ligation after enzyme digestion and over-lap PCR technology, were adopted to construct a fusion gene which was composed of the antimelanoma single chain antibody gene and the staphylococcal enterotoxin A gene without N-terminal signal sequence. The fusion gene was subcloned into pET28-a vector and transformed into *E. coli* BL21(DE3). Ni-NTA system was selected to separate and purify the expressed products. The inhibition ratio of the fusion protein was tested by MTT method. It is shown that the 6His-ScFv-SEA fusion protein can be expressed stably in *E. coli* BL21(DE3). The quantity of the fusion protein was shown up to 30% of the total protein of the bacteria and mainly in inclusion body. By activation the effective cells, the fusion protein can inhibit the melanoma cell which expressed corresponding antigen.

**Key words** antimelanoma single chain antibody, staphylococcal enterotoxin A, fusion protein, target therapy

Received: 04-17-2003

This work was supported by Grant from Shenyang Community of Science and Technology.

\* Corresponding author. Tel: 86-24-83970383; E-mail: w2fl@sina.com