

EGFRvIII 胞外区基因重组腺病毒的构建及单域抗体的制备

张慧敏^{1#}, 徐嘉奇^{1#}, 程艺¹, 付山¹, 刘艳龙¹, 胡宇靖¹, 杜雅楠^{1,2}, 包福祥^{1,2}

1 内蒙古农业大学 兽医学院, 内蒙古 呼和浩特 010018

2 内蒙古农业大学 农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

张慧敏, 徐嘉奇, 程艺, 付山, 刘艳龙, 胡宇靖, 杜雅楠, 包福祥. *EGFRvIII* 胞外区基因重组腺病毒的构建及单域抗体的制备. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3551-3562.

ZHANG HM, XU JQ, CHENG Y, FU S, LIU YL, HU YJ, DU YN, BAO FX. Construction of recombinant adenovirus expressing *EGFRvIII* extracellular domain gene and preparation of single domain antibody. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3551-3562.

摘要: 本研究旨在构建能够表达人表皮生长因子 *EGFRvIII* 胞外区基因的重组腺病毒, 并通过免疫骆驼构建噬菌体单域抗体库, 筛选和制备 *EGFRvIII* 胞外区特异性单域抗体并对其进行鉴定。从人前列腺癌细胞系 PC-3 细胞中提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板扩增 *EGFRvIII* 胞外区基因, 并连接 pAdTrack-CMV 质粒载体, 转化含有 pAdEasy-1 的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BJ5183 感受态细胞, 获得同源重组质粒转染 HEK293A 细胞, 得到表达 *EGFRvIII* 胞外区蛋白的重组腺病毒。利用重组腺病毒免疫双峰驼, 构建 *EGFRvIII* 胞外区特异性噬菌体单域抗体库, 并以 *EGFRvIII* 蛋白为筛选抗原, 对其进行筛选, 对筛选得到的单域抗体进行诱导表达、纯化及鉴定。结果表明获得了表达 *EGFRvIII* 胞外区基因的重组腺病毒。构建得到的 *EGFRvIII* 特异性噬菌体单域抗体库的库容为 1.4×10^9 ; 经过 3 轮富集和筛选, 通过噬菌体 ELISA 筛选出 31 个与 *EGFRvIII* 胞外区蛋白结合的阳性克隆, 并对 OD_{450} 值较高的重组单域抗体 E14 进行了表达和纯化。经 ELISA 鉴定, 重组单域抗体 E14 可与 *EGFRvIII* 胞外区蛋白产生抗原抗体结合反应, 具有较高的亲和力。说明制备的 *EGFRvIII* 特异性噬菌体单域抗体库具有较高的库容和多样性, 且筛选得到的单域抗体具有较高的抗原活性和免疫学反应性, 为今后以 *EGFRvIII* 为靶点的恶性肿瘤的诊断和治疗提供新的实验依据。

关键词: *EGFRvIII*; *EGFRvIII* 胞外区蛋白; 重组腺病毒; 单域抗体; 抗体库

Received: February 18, 2022; **Accepted:** May 24, 2022; **Published online:** May 26, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81660297); the Innovation Fund for Young Talent at College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University (2015QNJJ01)

[#]These authors contributed equally to this study

Corresponding author: BAO Fuxiang. Tel: +86-471-4309179; E-mail: baofuxiang@imau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (81660297); 内蒙古农业大学兽医学院青年人才创新基金 (2015QNJJ01)

Construction of recombinant adenovirus expressing *EGFRvIII* extracellular domain gene and preparation of single domain antibody

ZHANG Huimin^{1#}, XU Jiaqi^{1#}, CHENG Yi¹, FU Shan¹, LIU Yanlong¹, HU Yujing¹, DU Yanan^{1,2}, BAO Fuxiang^{1,2}

1 College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China
2 Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Techniques for Animal Disease (LDTA), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, Inner Mongolia, China

Abstract: The aim of this study was to construct a recombinant adenovirus expressing extracellular domain gene of human epidermal growth factor receptor variant III (*EGFRvIII* ECD), and to prepare single domain antibody targeting *EGFRvIII* ECD by immunizing camels and constructing phage display antibody library. Total RNA was extracted from human prostate cancer cell line PC-3 cells and reversely transcribed into cDNA. *EGFRvIII* ECD gene was amplified using cDNA as template, and ligated into pAdTrack-CMV plasmid vector and transformed into *E. coli* BJ5183 competent cells containing pAdEasy-1 plasmid for homologous recombination. The recombinant adenovirus expressing *EGFRvIII* ECD was obtained through transfecting the plasmid into HEK293A cells. The recombinant adenovirus was used to immunize Bactrian camel to construct *EGFRvIII* ECD specific single domain antibody library. The single domain antibody was obtained by screening the library with *EGFRvIII* protein and the antibody was expressed, purified and identified. The results showed that recombinant adenovirus expressing *EGFRvIII* ECD was obtained. The capacity of *EGFRvIII* specific phage single domain antibody library was 1.4×10^9 . After three rounds of enrichment and screening, thirty-one positive clones binding to *EGFRvIII* ECD were obtained by phage-ELISA, and the recombinant single domain antibody E14 with highest OD_{450} value was expressed and purified. The recombinant E14 antibody can react with *EGFRvIII* ECD with high affinity in ELISA assessment. The results indicated that the *EGFRvIII* specific single domain antibody library with high capacity and diversity was constructed and the single domain antibody with binding activity to *EGFRvIII* was obtained by screening the library. This study may facilitate the diagnosis and treatment of *EGFRvIII* targeted malignant tumors in the future.

Keywords: *EGFRvIII*; *EGFRvIII* extracellular domain; recombinant adenovirus; single domain antibody; antibody library

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR), 即 HER1 或 ErbB1, 是 ErbB 受体家族中的一种跨膜酪氨酸激酶受体。ErbB 受体家族由 4 种受体 (ErbB1-4 或 HER1-4) 组成, 其中 EGFR 的特征最为明显^[1]。EGFR 基因

与肿瘤细胞的增殖、血管生成、侵袭转移及抑制凋亡有密切关系^[2]。

EGFRvIII 首次发现于人胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM)。研究发现正常细胞中不表达 *EGFRvIII*, *EGFRvIII* 仅表达于癌细胞中, 这

一发现使其成为癌症治疗的理想生物标志物^[3]。许多恶性肿瘤异常表达 EGFR, 其中包括肺小细胞癌、膀胱癌、胶质瘤及乳腺癌等^[4]。EGFRvIII 突变是一种最常见的 EGFR 胞外区突变。国内外研究发现: 40%–60% 的 GBM 显著表达 EGFR, 其突变体形式主要为 EGFRvIII^[5]。有研究表明 18.6% 的 GBM 出现 EGFRvIII 高表达, 25% 的 EGFRvIII 阳性肿瘤也表达野生型 EGFR^[6]。GBM 是一种高侵袭性的恶性胶质瘤^[7], EGFRvIII 在调控胶质母细胞瘤的生长、转移和血管生成方面发挥重要作用。尤其是在肿瘤的放疗和化疗过程中, 发挥类似逃逸的功能, 其放疗和化疗的效果均不甚理想, 术后常有复发, 5 年相对存活率仅有 3%–5%^[8]。

单域抗体 (single domain antibody, sdAb), 分子量约 12–15 kDa, 是一种特殊的二聚体抗体。sdAb 又称为纳米抗体 (nanobody) 或重链抗体 (heavy chain antibody, HcAb)。单域抗体的体积只有传统抗体的 10% 且功能完整^[9], 仅具有单一重链可变区, 保留了完整的抗原结合活性特征。与传统的单克隆抗体 (150 kDa) 相比, sdAb 具有体积小、亲和力高、易表达、渗透性好、稳定性高 (热、pH 和离液介质)、生产成本低等特点^[10]。目前用于疾病的诊断和治疗的功能性 sdAb 的主要制备方法为噬菌体展示抗体库技术^[11]。

本试验通过构建 EGFRvIII 胞外区重组腺病毒, 用重组腺病毒免疫双峰驼后构建 EGFRvIII 特异性噬菌体单域抗体库。通过噬菌体展示技术对构建的特异性噬菌体单域抗体库进行富集和筛选, 对筛选出的克隆进行诱导表达、纯化及鉴定, 最终得到的单域抗体具有较高抗原结合活性和免疫学反应性。为今后以 EGFRvIII 为靶点的恶性肿瘤的诊断和治疗提供新的试验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞、菌株及试剂

人前列腺癌细胞系 PC-3 由内蒙古农业大学生命科学学院巩培老师惠赠, 人胚肾细胞系 HEK293A 细胞由北京交通大学何金生教授惠赠。用于构建重组腺病毒的穿梭质粒 pAdTrack-CMV 及携带重组腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BJ5183 感受态细胞购自北京博迈德基因技术有限公司。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。凝胶回收试剂盒、Not I、Sal I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 牛外周血淋巴细胞分离液试剂盒购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司; Pme I、Pac I 限制性内切酶购自 NEB (北京) 公司; EZ Trans 细胞转染试剂购自上海李记生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒购自 AXYGEN 公司; SDS-PAGE 蛋白胶试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 琼脂粉、酵母提取物、胰化蛋白胨购自 OXOID 公司; ELISA 终止液、牛血清白蛋白、ELISA 包被液均购自索莱宝生物科技有限公司; TMB 显色液购自普洛麦格生物技术有限公司。全蛋白提取试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; EGFR 胞外区蛋白 (Human EGFR/HER1/ErbB1 Protein (IsoformvIII, His Tag))、EGFR 抗体 (EGFR/HER1/ErbB1 Antibody, Rabbit mAb) 购自义翘神州生物技术有限公司; HRP 标记 Anti-HA tag 购自南京金斯瑞生物技术有限公司。

1.1.2 实验动物

成年 3 岁双峰驼, 雄性, 体重约为 350 kg, 无疫病史。所有动物实验均在内蒙古农业大学实验动物福利与伦理委员会 (编号: NND2021035) 的监督和指导下进行。

1.2 实验方法

1.2.1 引物合成

根据 GenBank 中双峰驼抗体基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 对特异性引物 P1/P2 和 P3/P4; 根据 *EGFRvIII* 基因序列, 设计特异性引物 EGFR1/EGFR2, 分别插入 *Not I*、*Sal I* 酶切位点, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。*EGFRvIII* 胞外区基因长度为 1 056 bp, P1/P2 扩增产物长度为 900 bp 和 600 bp, P3/P4 扩增产物长度为 400 bp, 引物序列信息见表 1。

1.2.2 重组腺病毒载体的构建

从 PC-3 细胞中提取总 RNA, 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 以 EGFR1/EGFR2 为引物, 扩增 *EGFRvIII* 胞外区基因。将 *EGFRvIII* 胞外区基因与 pAdTrack-CMV 质粒分别用 *Sal I* 和 *Not I* 限制性内切酶进行酶切。将回收的基因片段与 pAdTrack-CMV 质粒用 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化至 *E. coli* Trans-T1 感受态细胞后于 LB/Kana 固体培养基中培养。次日挑取 3 个单菌落接种于 LB/Kana 液体培养基培养, 提取质粒后用 *Sal I* 和 *Not I* 进行双酶切鉴定, 反应产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳。将鉴定正确的菌落过夜培养, 提取质粒后用 *Pme I* 限制性内切酶酶切, 将线性化产物通过电转化至 *E. coli* BJ5183 感受态细胞 (含有 pAdEasy-1 质粒) 中让其发生同源重组, 电转产物于 LB/Kana 平板上培养。次日挑取单克隆, 提取质粒后进行电

泳 (0.8% 的琼脂糖凝胶)。将电泳正确的质粒用 *Pac I* 限制性内切酶进行酶切鉴定。

1.2.3 重组腺病毒载体的包装及纯化

用含 10% 新生牛血清、1% 双抗 (100 U/mL 青霉素及 0.1 mg/mL 链霉素) 的 DMEM 液体培养基于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养, 待细胞密度约 80% 时更换含 2% 新生牛血清的 DMEM, 每 25 mm 细胞培养瓶用 EZ Trans 细胞转染试剂转染 4 μg 质粒。37 °C 培养 6 h 后更换新鲜培养基。待细胞开始变圆呈现葡萄串状, 约 70% 细胞漂浮后收取细胞, 冻融 3 次, 离心取上清液, 即为第 1 代重组腺病毒。将 HEK293A 细胞接种至 75 mm 细胞瓶, 待细胞培养汇合度约达到 70% 后, 加入 600 μL 第 1 代重组腺病毒。3 d 后约 60%–70% 细胞漂浮, 用移液枪将细胞瓶中的细胞吹下连同培养液一起转移至离心管, 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min; 沉淀用 5 mL PBS 重悬, 于液氮反复冻融 4 次, 4 °C、15 000 r/min 离心 15 min, 收集上清分装于 1.5 mL 离心管内, 病毒原液于 -80 °C 保存。反复感染 HEK293A 细胞, 扩增至第 5 代重组腺病毒。利用 PCR 方法检测重组腺病毒中的 *EGFRvIII* 基因。提取细胞全蛋白, 采用 Western blotting 方法验证 *EGFRvIII* 胞外区基因在 HEK293A 细胞中能否正常表达。采用 CsCl 梯度离心法纯化病毒, 透析后采用 TCID₅₀ 法测定重组腺病毒滴度, 用 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primers used in this study

Name	Primer sequences (5'→3')
EGFR1	ACGCGTCGACGAGGAAAAGAAAGTTGAATTTAAAGACTCACTCTCC
EGFR2	AAGGAAAAAGCGGCCGCTCACTCCACAAGCTCCCTCTC
P 1	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC
P 2	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG
P 3	AGTTGTTCTTCTATGCGGCCAGCCGCCATGGCTGAKGTBCAGCTGGTGGAGTCTGG
P 4	ATTGCGTCAGCTATTAGTGCGGCCGCTGAGGAGACRGTGACCCWGGGTCC

1.2.4 EGFRvIII 特异性噬菌体单域抗体库的构建

使用剂量为 1 mL 1×10^{10} PFU/mL 的重组腺病毒采用肌肉注射的方式对双峰驼进行免疫, 每隔 14 d 免疫一次。采集双峰驼免疫后的全血, 使用牛外周血淋巴细胞分离试剂盒分离淋巴细胞, 并提取总 RNA, 通过 RT-PCR 转化为 cDNA。将 cDNA 作为 PCR 的模板, 以 P1/P2 作为引物进行第 1 轮扩增, 回收目的条带为 600 bp 的产物。将回收产物作为第 2 轮 PCR 的模板, P3/P4 作为引物进行第 2 轮扩增, 回收目的条带为 400 bp 的产物。使用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Not* I 将第 2 轮 PCR 回收的产物及 pMECS 噬菌粒载体进行双酶切, 将酶切产物进行切胶回收并使用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物通过化学转化的方法转化至 *E. coli* TG1 感受态细胞, 于 2×YT/AG 固体培养基进行培养, 构建 EGFRvIII 特异性噬菌体单域抗体库, 构建成功后测定其抗体库容量及转化效率。

1.2.5 EGFRvIII 特异性单域抗体的富集与筛选

EGFRvIII 胞外区蛋白以每轮递减的方式将抗原包被在酶标板上。加入 300 μL/孔 PBST, 洗 5 遍。加入待筛选的噬菌体抗体库, 于 37 °C 放置 1 h。加入 300 μL/孔 PBST, 洗 5 遍。100 μL/孔三乙胺洗脱缓冲液 (100 mmol/L), 室温下静置 10 min; 加入 50 μL/孔 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.7) 缓冲液进行中和。将洗脱后的重组噬菌体感染大肠杆菌 TG1, 涂布于 2×YT/AG 固体培养基过夜培养, 此步骤重复 3 次。从 3 轮洗脱产物涂布的 2×YT/AG 固体培养基上随机挑取 90 个单克隆过夜培养。次日各取 50 μL 加入到含有 400 μL 2×YT/AG+M13K07 的液体中, 37 °C、250 r/min 培养 2 h 后 14 000 r/min 离心 5 min, 用 400 μL 的 2×YT/AK 液体培养基重悬沉淀后过夜培养。次日 4 °C、14 000 r/min 离心 5 min 后收集上清

液。加入 20% 的 PEG8 000 充分混匀, 于 4 °C 静置 30 min 后 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 离心后弃上清, 取 100 μL PBS 重悬重组噬菌体, 用于 phage ELISA 的鉴定。

将 EGFRvIII 胞外区蛋白按照 2 μg/孔包被在酶标板中, 每孔加入 100 μL 重组噬菌体, 以 PBS 缓冲液作为空白对照, 辅助噬菌体 M13K07 作为阴性对照。室温结合 2 h 后每孔加入 100 μL HRP 标记的 anti-M13 抗体 (1:5 000 稀释)。室温结合 1 h 后每孔加入 100 μL TMB 溶液进行显色, 显色结束后加入 50 μL/孔 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应并测定 OD₄₅₀ 值。将 (试验组 OD₄₅₀ 值-空白组 OD₄₅₀ 值)/(阴性对照 OD₄₅₀ 值-空白组 OD₄₅₀ 值) ≥ 2.1 (P/N 值) 以上即判定为阳性。

1.2.6 EGFRvIII 特异性单域抗体的表达和纯化

取 phage ELISA 阳性克隆菌液 50 μL 加入到 5 mL 2×YT 液体培养基中, 37 °C、250 r/min 过夜培养, 对培养后的菌液进行质粒提取并基因测序。经序列分析后, 将正确的克隆质粒用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Not* I 进行双酶切, 与相同的限制性内切酶酶切的 pET-22b(+) (*Not* I 和 *Xho* I 位点中间携带 HA 标签序列) 质粒进行连接, 将连接产物转化至 *E. coli* Transetta (DE3) 感受态细胞, 于 2×YT/A 固体培养基培养。挑取单克隆至 5 mL 2×YT 液体培养基中, 37 °C、250 r/min 过夜培养。取 500 μL 菌液加入到 50 mL 2×YT/A 液体培养基通过 IPTG 诱导表达, 培养 8–12 h 后离心收集菌体。加入 10 mL PBS 重悬菌体后使用超声波破碎仪进行破碎, 待菌液破碎至几乎透明后于 4 °C 离心机离心, 分别收集上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。利用 Ni-NTA 纯化填料对破碎后上清进行纯化并纯化获得的重组单域抗体。

1.2.7 ELISA 鉴定重组单域抗体对抗原结合特性

用 100 μL/孔 5 μg/mL 的 EGFRvIII 胞外区

蛋白包被酶标板, 3% BSA 封闭 2 h 后用 PBST 洗涤; 以不同浓度稀释的重组单域抗体作为一抗, 以 PBS 为空白对照, pET-22b(+) 空质粒的细菌破碎液为阴性对照 (培养及诱导纯化条件与 1.2.6 相同), 100 μ L/孔孵育 1 h 后用 PBST 洗涤; 以 1:8 000 比例稀释的 HRP 标记的 Anti-HA tag 为二抗, 100 μ L/孔孵育 1 h 后用 PBST 洗涤; 100 μ L/孔 TMB 溶液显色 10 min 后加入 50 μ L/孔 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测定 OD₄₅₀ 值。当 (试验组 OD₄₅₀ 值-空白组 OD₄₅₀ 值)/(阴性对照 OD₄₅₀ 值-空白组 OD₄₅₀ 值) \geq 2.1 (即 P/N 值) 以上即判定为阳性。

2 结果与分析

2.1 EGFRvIII 胞外区基因重组腺病毒的构建

以反转录得到的 cDNA 为模板, EGFR1/EGFR2 为引物扩增 EGFRvIII 胞外区基因, 得到的目的条带大小为 1 056 bp (图 1A), 与预期大小一致。将 EGFRvIII 胞外区基因与 pAdTrack-CMV 质粒的连接产物转化 *E. coli* Trans-T1 感受态细胞后涂布于 LB/Kana 固体培养基上进行培

养。次日挑取 3 个单克隆于 5 mL LB/Kana 液体培养基中进行培养, 提取质粒后用 *Sal* I 和 *Not* I 进行双酶切鉴定, 反应产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳。得到一条 9 000 bp 和一条 1 000 bp 左右的条带 (图 1B), 与预期大小一致。

将重组腺病毒穿梭载体线性化后通过电转化的方法转入 *E. coli* BJ5183 感受态细胞后涂布于 LB/Kana 固体培养基上培养, 次日挑取单克隆培养, 提取质粒, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶检测。在 15 000 bp 以上有特异性条带, 理论大小约 30 000 bp, 初步判断重组腺病毒载体构建成功, 结果如图 2 所示。将电泳正确的质粒用 *Pac* I 限制性内切酶进行单酶切鉴定。在 15 000 bp 以上和 4 500 bp 左右有特异性条带 (图 3), 与理论值相符, 重组腺病毒载体构建成功。

2.2 EGFRvIII 胞外区重组腺病毒的包装及纯化

将重组腺病毒载体转染到 HEK293A 细胞进行重组腺病毒的包装, 转染后持续观察 HEK293A 细胞中荧光表达量, 3 d 后可见荧光蛋白的表达, 7 d 后表达量显著增多, 结果如图 4 所示。

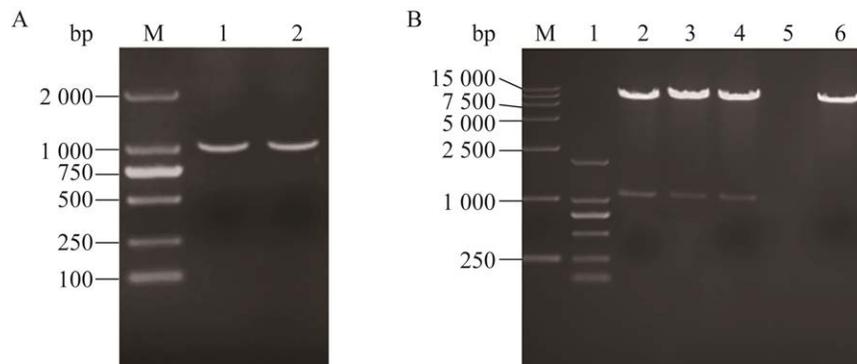


图 1 EGFRvIII 胞外区基因 PCR 扩增 (A) 及重组腺病毒穿梭载体双酶切鉴定 (B)

Figure 1 PCR amplification of EGFRvIII ECD gene (A) and identification of recombinant adenovirus shuttle vector by enzyme digestion (B). (A) Lane M: DL2000 DNA marker; lane 1-2: PCR products of the EGFRvIII ECD gene. (B) Lane M: DL15000 DNA marker; lane 1: DL2000 DNA marker; lane 2-4: the digestion product of recombinant shuttle vector; lane 6: the digestion product of pAdTrack-CMV vector.

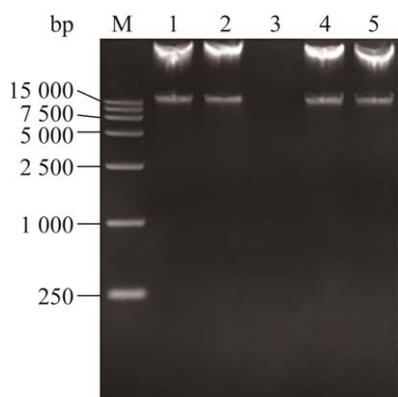


图2 重组腺病毒表达载体鉴定

Figure 2 Identification of recombinant adenovirus expression vectors. Lane M: DL15000 DNA marker; lanes 1–5: the recombinant plasmid.

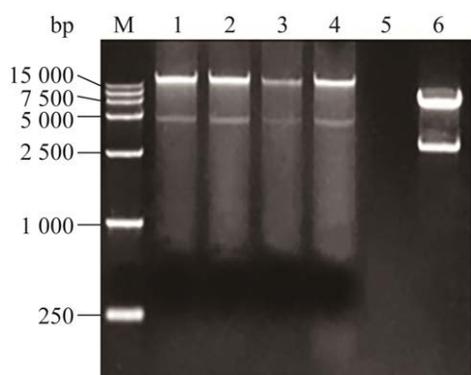


图3 重组腺病毒表达载体酶切鉴定

Figure 3 Identification of recombinant adenoviral expression vectors by enzyme digestion. Lane M: DL15000 DNA marker; lanes 1–5: the recombinant adenovirus plasmid with pAdEasy-1 backbone expression vectors and *EGFRvIII* ECD gene; lane 6: pAdTrack-CMV vector.

待病毒扩增至第5代时,收集细胞上清及细胞裂解液,以 *EGFR1/EGFR2* 为引物采用 PCR 方法验证 *EGFRvIII* 胞外区基因在 HEK293A 细胞中的表达,结果如图 5 所示。提取细胞总蛋白,采用 Western blotting 方法验证 *EGFRvIII* 胞外区基因在 HEK293A 细胞中的表达。以 1 : 8 000 稀释的 *EGFR* 兔单克隆抗体作为一抗,1 : 10 000 稀

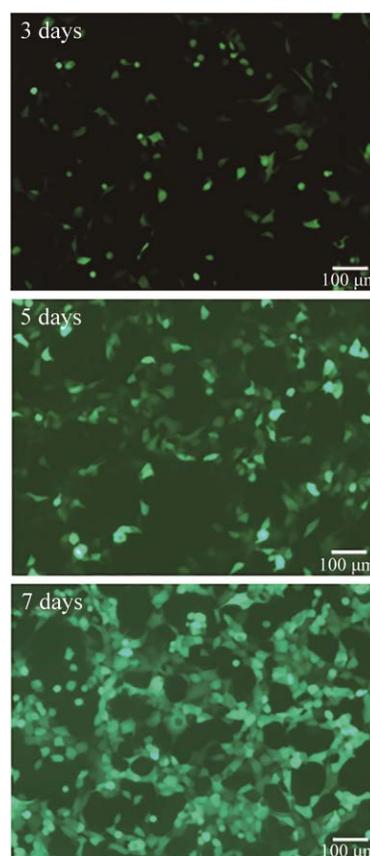


图4 *EGFRvIII* 胞外区基因重组腺病毒的包装

Figure 4 Packaging of recombinant adenovirus with *EGFRvIII* extracellular domain gene.

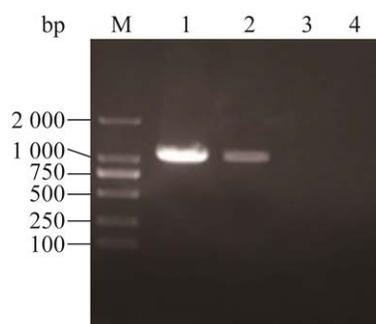


图5 PCR 鉴定 *EGFRvIII* 胞外区基因

Figure 5 PCR identification of *EGFRvIII* ECD gene. Lane M: DL2000 DNA marker; lane 1: cell lysate of recombinant adenovirus-transfected cells; lane 2: supernatant of recombinant adenovirus-transfected cells; lane 3: control cell lysate; lane 4: control cell supernatant.

释的山羊抗兔单克隆抗体作为二抗, 在 38 kDa 左右有特异性条带 (图 6), 与理论值相符。采用 CsCl 密度梯度离心法纯化重组腺病毒, 透析后获得 2.5 mL 病毒液。用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度, 用 Reed-Muench 法计算重组腺病毒滴度为 1×10^{10} PFU/mL。

2.3 EGFRvIII 特异性噬菌体单域抗体库的构建

2.3.1 VHH 基因 PCR 扩增

以骆驼的 cDNA 为模板通过两轮 PCR 扩增 VHH 基因。利用特异性引物 P1/P2 进行第 1 轮 PCR 扩增, 扩增出抗体前导肽至 CH2 区基因序列, 扩增产物在 900 bp 和 600 bp 有特异性条带 (图 7A); 切胶回收 600 bp 的条带作为第 2 轮 PCR 扩增的模板, 利用特异性引物 P3/P4 进行 PCR 扩增, 扩增出 VHH 基因 FR1-FR4 全长基因, 扩增产物在 400 bp 有特异性条带 (图 7B)。

2.3.2 EGFRvIII 特异性噬菌体单域抗体库容量及转化效率

通过倍比稀释的方法测定构建的抗体库容量, 计算后得出抗体库容量为 1.4×10^9 ; 通过

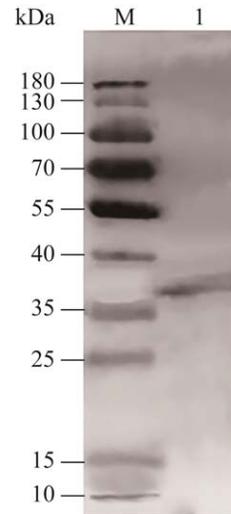


图 6 Western blotting 鉴定 EGFRvIII 胞外区基因表达

Figure 6 Western blotting identification of the expression of EGFRvIII ECD gene. Lane M: protein molecular weight marker; lane 1: total protein of HEK293A cells infected with recombinant adenovirus.

菌落 PCR 的方法测定抗体库的转化效率, 随机挑取 $2 \times \text{YT/AG}$ 固体培养基上 24 个单克隆进行 PCR 鉴定。结果显示有 19 个单克隆在 600 bp 左右出现特异性条带 (图 8), 初步鉴定抗体库重组率为 79%。

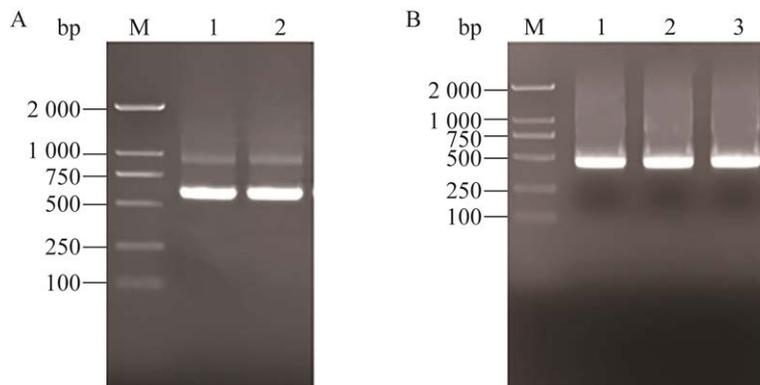


图 7 VHH PCR 扩增结果

Figure 7 VHH PCR amplification. (A) The first round of PCR amplification. Lane M: DL2000 DNA marker; lane 1-2: first round of PCR amplification products. (B) The second round of PCR amplification. Lane M: DL2000 DNA marker; lane 1-3: second round of PCR amplification products.

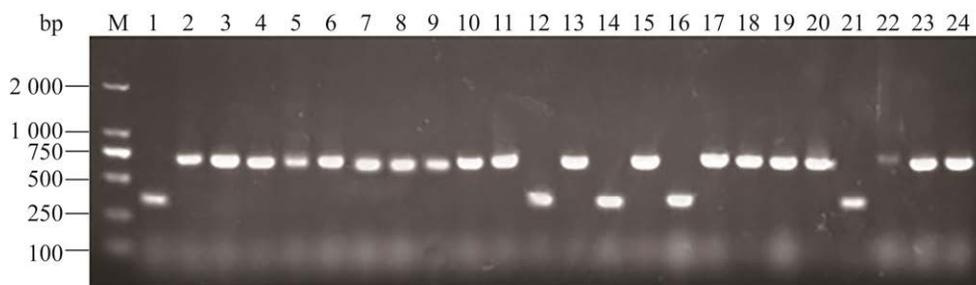


图8 抗体库转化效率检测结果

Figure 8 Antibody library transformation efficiency. Lane M: DL2000 DNA marker; lane 1–24: PCR amplification products from individual clone.

2.4 EGFRvIII 特异性单域抗体的富集与筛选

以辅助噬菌体 M13K07 为阴性对照, PBS 为空白对照, 通过 phage ELISA 的方法鉴定 3 轮筛选洗脱后的重组噬菌体。其中 M13K07 的 OD_{450} 值为 0.060。phage ELISA 结果 (图 9) 显示有 31 个重组噬菌体具有抗原结合活性, 从中选取结合活性最高的 14 号克隆 (E14) 进行表达、纯化及鉴定。

2.5 EGFRvIII 特异性单域抗体的表达和纯化

通过 SDS-PAGE 对表达和纯化后的重组 sdAb E14 进行分析, 结果显示 (图 10A), 通过诱导表达后的菌液、细菌破碎后的上清液和沉淀均

在 17 kDa 左右出现特异性条带, 与重组单域抗体 E14 理论大小相符。将纯化后的重组 sdAb E14 进行 SDS-PAGE, 结果显示 (图 10B), 通过纯化得到了纯度较高的重组 sdAb E14。

2.6 ELISA 鉴定重组单域抗体对抗原结合特性

为了检测纯化的重组 sdAb E14 对 EGFRvIII 蛋白的结合活性, 用 EGFRvIII 胞外区蛋白包被酶标板, 用重组 sdAb E14 作为一抗进行 ELISA 鉴定, 以 pET-22b(+) 空载体转化菌液的破碎液为阴性对照, PBS 为空白对照。结果显示 (图 11), EGFRvIII 蛋白与 sdAb E14 的浓度呈现相关性。与阴性对照相比, 当 sdAb E14 浓度为 312.5 ng/mL 时仍具有结合活性。

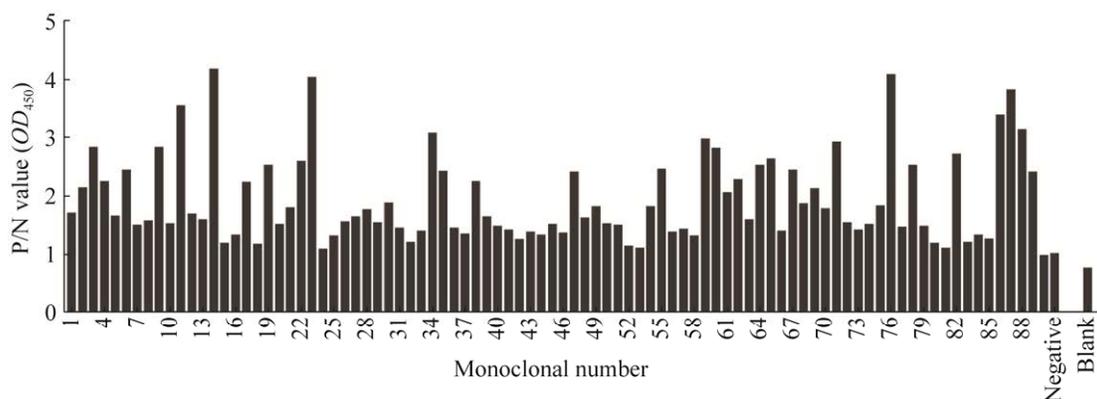


图9 重组噬菌体 phage-ELISA 检测结果

Figure 9 Phage-ELISA detection of binding of recombinant phage.

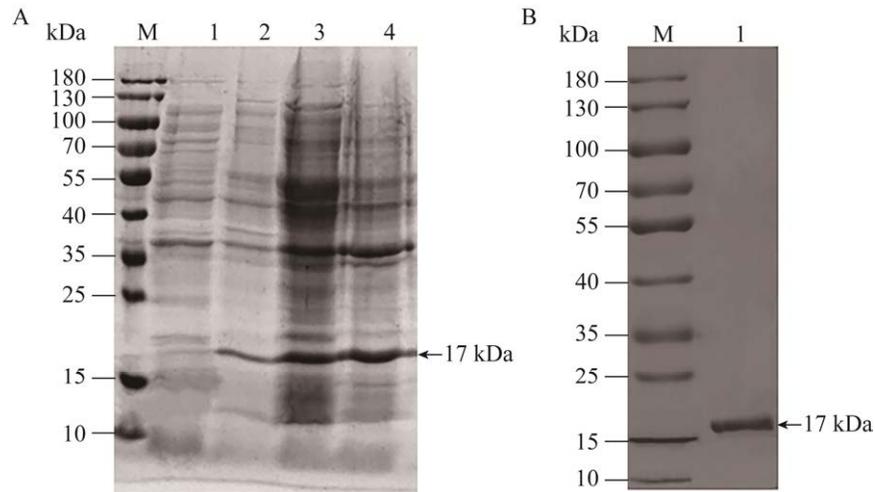


图 10 E14 抗体表达和纯化结果

Figure 10 E14 antibody expression and purification. (A) SDS-PAGE analysis of sdAb E14 expression. Lane M: protein molecular weight marker; lane 1: uninduced *E. coli* cells; lane 2: induced *E. coli* cells; lane 3: sediment of *E. coli* cells lysates; lane 4: supernatant of *E. coli* cells lysates. (B) SDS-PAGE analysis of sdAb E14 purification. Lane M: protein molecular weight marker; lane 1: purified sdAb E14 antibody.

3 讨论与结论

表皮生长因子受体 EGFR 在多种实体肿瘤细胞中高度表达, 比如肺癌、结肠癌、头颈癌、口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 等^[12]。在很长的一段时间里, 中国的

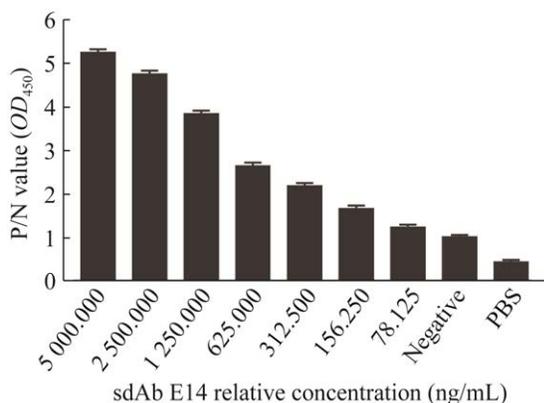


图 11 重组单域抗体对抗原结合特性 ELISA 鉴定结果

Figure 11 ELISA identification of recombinant single domain antibodies for antigen binding properties.

EGFR 靶向药物市场一直被外国进口药物所垄断, 2008 年我国第一个用于治疗恶性肿瘤的功能性单抗药物泰欣生 (尼妥珠单抗^[13-14]) 获准上市, 首次打破了国外垄断。目前用于治疗 EGFRvIII 阳性肿瘤的方法主要有西妥昔单抗等单克隆抗体或吉非替尼等小分子抑制剂, 但使用这些药物治疗的胶质瘤细胞往往表现出很强的耐药^[15]。它们只是通过增加其他生长因子的表达量或者使它们转向不同的信号通路来克服抑制作用。而 EGFR 单克隆抗体能够竞争性结合 EGFR, 阻断由 EGFR 与配体结合介导的下游信号转导通路, 从而抑制肿瘤细胞增殖和生长分化、促进细胞凋亡、抑制肿瘤新生血管的生成和增加放疗疗效, 被认为是一种有希望的免疫抑制药物^[16-17]。sdAb 可以与荧光染料、小分子药物、寡核苷酸结合, 使其应用于广泛的领域, 包括成像、治疗和检测, 以及作为递送剂。在影像学应用中, 将 sdAb 带上标签后可以用作纳米级的检测工具, 可将半衰期短的放

射性核素标记单域抗体后用于肿瘤成像; sdAb 可以单独使用或与其他中和抗体协同使用, 可以通过小螯合剂或直接与放射性治疗性核素偶联 (或与小药物偶联成抗体-药物偶联物), 从而达到快速外渗及向深部组织扩散; 在医学诊断中, sdAb 作为捕获剂和检测剂被引入即时电化学测试中, 可以缩短检测时间并提高诊断的灵敏度; 此外, sdAb 可以通过吸入的方式被输送到肺部, 可以用于呼吸系统疾病的治疗^[18-19]。目前 EGFRvIII 单域抗体药物还没有被批准上市, 因此 EGFRvIII 单域抗体药物的研发具有广阔的应用前景和研究意义。

目前, 用于基因干预的方法主要有腺相关病毒导入、逆转录病毒、慢病毒和腺病毒等^[20]。20 世纪 60 年代末, 人们发现腺病毒在培养过程中是可以进行重组的, 这一发现为腺病毒作为载体奠定了基础^[21]。研究发现, 用腺病毒作为疫苗免疫人类时, 不需要免疫佐剂就能很好地刺激自然免疫反应^[22]。目前已开发出多种具有不同免疫刺激细胞因子和趋化因子的腺病毒。在最近的研究中, 已经开发出许多带有免疫激活配体和双特异性 T 细胞剪接剂 (BiTE) 分子的腺病毒, 并在临床研究中进行了测试^[23]。

本研究利用 Ad5 型重组腺病毒系统成功构建并纯化了 EGFRvIII 胞外区基因重组腺病毒, 通过 Western blotting 鉴定发现 EGFRvIII 胞外区基因可以由 HEK293A 细胞包装并在 HEK293A 细胞中稳定表达。通过测定 TCID₅₀ 计算病毒滴度为 1×10^{10} PFU/mL; 以骆驼外周血淋巴细胞作为建库基因来源, 成功构建了 EGFRvIII 胞外区特异性噬菌体单域抗体库。噬菌体抗体库的质量取决于抗体库的库容及重组率, 重组率越高的抗体库筛选到特异性抗体的概率越高, 经过计算 EGFRvIII 单域抗体库库容量为 1.4×10^9 , 达到预期标准。采用 phageELISA 筛选出 31 株阳性

克隆, 选择其中 1 株结合活性最高的 14 号克隆 (命名为 E14) 通过大肠杆菌进行表达纯化。通过 ELISA 鉴定, 重组单域抗体 E14 能够与 EGFRvIII 胞外区蛋白特异性结合。本研究通过表达 EGFRvIII 胞外区基因的重组腺病毒免疫双峰驼, 构建噬菌体抗体库, 筛选和制备了 EGFRvIII 特异性单域抗体, 为今后以 EGFRvIII 为靶点的恶性肿瘤的诊断和治疗奠定了实验基础。

REFERENCES

- [1] Arteaga CL, Engelman JA. *ERBB* receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2014, 25(3): 282-303.
- [2] Ma LR, Li JX, Tang L, et al. Immune checkpoints and immunotherapy in non-small cell lung cancer: novel study progression, challenges and solutions. *Oncol Lett*, 2021, 22(5): 787.
- [3] Yang J, Yan J, Liu BR. Targeting EGFRvIII for glioblastoma multiforme. *Cancer Lett*, 2017, 403: 224-230.
- [4] Dewi K, Aminah, Fuad AM. Periplasmic expression of EGFRvIII extracellular domain as a fusion protein in *Escherichia coli* NiCo₂₁(DE3). *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*, 2021, 762(1): 012065.
- [5] 王鹏, 董玉, 丁海霞, 等. 表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的疗效分析. *癌症进展*, 2020, 18(24): 2539-2542. Wang P, Dong Y, Ding HX, et al. Efficacy analysis of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor combined with chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Oncol Prog*, 2020, 18(24): 2539-2542 (in Chinese).
- [6] 陈淞铭, 李学军. 靶向 EGFRvIII 治疗胶质母细胞瘤的分子机制研究进展. *中南大学学报(医学版)*, 2019, 44(11): 1281-1286. Chen SM, Li XJ. Targeting EGFRvIII for treatment of glioblastoma: from molecular mechanisms to clinical strategies. *J Central South Univ (Med Sci Ed)*, 2019, 44(11): 1281-1286 (in Chinese).
- [7] Kielbus M, Rola R, Jarosz B, et al. Epidermal growth factor receptor and its oncogenic EGFRvIII variant in benign and malignant brain tumors. *Anticancer Res*, 2021, 41(2): 983-991.

- [8] Abbott RC, Verdon DJ, Gracey FM, et al. Novel high-affinity EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor T cells effectively eliminate human glioblastoma. *Clin Transl Immunology*, 2021, 10(5): e1283.
- [9] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [10] 王莉鑫. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白特异性单域抗体的制备及鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
Wang LX. Preparation and identification of single domain antibody specific for spike protein of porcine epidemic diarrhea virus[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [11] 陈敏, 张志毅, 卢孟柱. 噬菌体展示技术及其在天牛防治中的应用展望. *林业科学研究*, 2002, 15(4): 484-489.
Chen M, Zhang ZY, Lu MZ. The prospects of the phage display technique in the control of longicorn beetles. *For Res*, 2002, 15(4): 484-489 (in Chinese).
- [12] Khalil A, Jameson MJ. The EGFR inhibitor gefitinib enhanced the response of human oral squamous cell carcinoma to cisplatin *in vitro*. *Drugs R D*, 2017, 17(4): 545-555.
- [13] Lin S, Yan Y, Liu Y, et al. Sensitisation of human lung adenocarcinoma A549 cells to radiotherapy by Nimotuzumab is associated with enhanced apoptosis and cell cycle arrest in the G2/M phase. *Cell Biol Int*, 2015, 39(2): 146-151.
- [14] Si XY, Wu SF, Wang HP, et al. Nimotuzumab combined with chemotherapy as first-line treatment for advanced lung squamous cell carcinoma. *Thorax Cancer*, 2018, 9(8): 1056-1061.
- [15] Taylor TE, Furnari FB, Cavenee WK. Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(3): 197-209.
- [16] Agustoni F, Suda K, Yu H, et al. EGFR-directed monoclonal antibodies in combination with chemotherapy for treatment of non-small-cell lung cancer: an updated review of clinical trials and new perspectives in biomarkers analysis. *Cancer Treat Rev*, 2019, 72: 15-27.
- [17] Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, et al. Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem*, 2004, 279(2): 1256-1261.
- [18] Muyldermans S. Applications of nanobodies. *Annu Rev Anim Biosci*, 2021, 9: 401-421.
- [19] Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, et al. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 343: 195-224.
- [20] Lewis AM Jr, Rowe WP. Isolation of two plaque variants from the adenovirus type 2-Simian virus 40 hybrid population which differ in their efficiency in yielding Simian virus 40. *J Virol*, 1970, 5(4): 413-420.
- [21] Molinier-Frenkel V, Lengagne R, Gaden F, et al. Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. *J Virol*, 2002, 76(1): 127-135.
- [22] Malmström PU, Loskog ASI, Lindqvist CA, et al. AdCD40L immunogene therapy for bladder carcinoma—the first phase I/II a trial. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(12): 3279-3287.
- [23] Freedman JD, Hagel J, Scott EM, et al. Oncolytic adenovirus expressing bispecific antibody targets T-cell cytotoxicity in cancer biopsies. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(8): 1067-1087.

(本文责编 陈宏宇)