

抗胃癌单抗 3H11 可变区氨基端序列 对抗体活性的影响*

李 竞¹⁾ 王 琰²⁾ 王卓智¹⁾ 刘群英 化 冰 陈宇萍 朱迎春 董志伟³⁾

(海军总医院中心实验科, 北京 100037)

摘要 采用 RT-PCR 方法, 利用第一骨架区通用引物扩增重链 Fd 段和 κ 链的基因, 克隆到 Fab 表达载体中, 在大肠杆菌中获得了表达但未检测到抗原结合活性。根据已克隆的 3H11 VL、VH 的真实序列, 重新设计 κ 链及 Fd 段 5' 端引物, 分别将骨架区引物在 κ 链及 Fd 段 5' 端所造成的氨基酸残基改变纠正为原始序列, 构建分别含有矫正后 κ 链或矫正后 Fd 以及二个链均得到矫正的 Fab 表达载体, 这些载体在大肠杆菌中均获得类似水平的表达。对任何一个链的矫正均可部分恢复 Fab 段胃癌细胞的结合活性。结果说明在构建小分子抗体时, PCR 引物引入的轻、重链可变区氨基端氨基酸残基的改变可严重影响所表达抗体的抗原结合活性。

关键词 抗胃癌鼠单抗, 免疫球蛋白可变区基因, Fab

学科分类号 Q78

抗体技术的发展经历了多克隆抗血清、单克隆抗体, 现已发展到基因工程抗体阶段, 而 PCR 技术的进展又使免疫球蛋白基因的克隆变得简单易行。利用可变区第一骨架区序列的相对保守性设计通用 PCR 引物, 可简便有效地扩增出各种不同抗体的基因。但通用引物以及为便于克隆所引入的限制性内切酶位点, 可在 V 区氨基端造成氨基酸残基的改变。这些变化是否会影响所构建抗体的活性, 有不同的报道^[1,2]。我们在构建抗胃癌单抗 3H11 的单链抗体 (ScFv) 过程中曾发现 V 区氨基端序列对抗体活性有较大影响^[3], 为研究该效应是影响了表达量还是影响了抗体抗原的结合, 以及轻、重链可变区在其中分别所起作用, 本文通过构建 3H11 Fab 进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

抗胃癌鼠单抗杂交瘤细胞株 3H11 由北京市肿瘤研究所生化室研制^[4], 为 IgG2b 亚类; Fab 表达载体 pMHS 由本室改建自噬粒载体 pCOMB3H; 大肠杆菌菌株 TG1、XL1-blue 为本室保存; Taq 酶购自 Finnzymes 公司; 限制性内切酶购自 Promega 公司; 羊抗鼠 IgG Fab 购自 Sigma 公司; HRP-羊抗鼠 IgG Fab 购自 Pierce 公司。

1.2 PCR 引物

通用引物: 参考文献 [5], 加以适当合并, 见

表 1. κ 链 5' 端引物 MK5 1~3 引入内切酶 *Sac* I 位点, 3' 端引物 MK3 引入 *Xba* I 位点; Fd 段 5' 端引物 MH5A 引入 *Xho* I 位点, 3' 端引物 MH3 引入 *Spe* I 位点 (W = T/A, R = A/G, S = C/G, Y = C/T, M = C/A)。

表 1 构建鼠 Fab 的 PCR 引物

鼠 Fab 5' 引物	
κ :	MK51 CCAGTTCGAGCTCGTGMTSACMCAGTCTCCA MK52 CCAGTTCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA MK53 CCAGATGTGAGCTCGTSATGACCCAGWCTCCA
Fd:	MH5A AGGTSMARCTKCTCGAGTCWGG
鼠 Fab 3' 引物	
κ :	MK3 GCGCCGTCTAGATTAACTCATTCTGTTGAA
Fd:	MH3 GCATGGACTAGTGGGTTGATTGTTGAAAT

定点突变 PCR 引物: 为了修正 3H11 κ 链及 Fd 段扩增时 PCR 引物所引入的序列改变, 根据 3H11 VL 氨基端的原始序列^[6] 设计了重新扩增 κ 链及 Fd 段的定点突变 PCR 引物 (图 1):

* 北京市肿瘤分子生物学实验室项目。

¹⁾ 北京医科大学临床肿瘤学院博士研究生, 北京 100034。

²⁾ 通讯联系人。

³⁾ 中国医学科学院肿瘤研究所, 北京 100020。

收稿日期: 1998-04-27, 修回日期: 1998-08-17

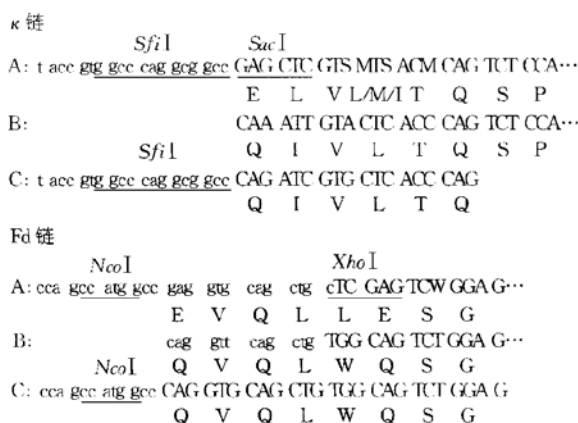


图 1 定点突变 PCR 引物的设计

A: 以第一骨架区的 PCR 引物扩增得到的 3H11κ 链和 Fd 段 N 端序列 (大写字母) 以及 5' 侧翼的载体序列 (小写字母); B: 3H11κ 链和 Fd 段 N 端的原始序列; C: 为矫正 3H11κ 链和 Fd 段 N 端序列所设计的 PCR 引物。

1.3 RT-PCR 法扩增 κ 链、Fd 段

应用美国 Gibco BRL 公司的 Trizol 试剂, 按照说明书从 10⁷ 3H11 杂交瘤细胞中提取总 RNA, 以 RT-PCR 法扩增。

1.4 3H11 Fab 表达载体的构建

PCR 产物经琼脂糖电泳分离纯化后, 以 *Sac* I + *Xba* I (κ 链) 或 *Sfi* I + *Xba* I (突变后 κ 链)、*Xho* I + *Spe* I (Fd 段) 或 *Nco* I + *Spe* I (突变后 Fd 段) 消化, 先后重组到载体 pMHS 相应的内切酶位置中, 以相应酶切鉴定正确的重组子。

1.5 Fab 段的表达

将重组质粒转化大肠杆菌 XL1-blue 或 TG1, 挑取单集落接种于 2 ml 含 100 mg/L 氨苄青霉素的 SB 中, 37℃ 培养 6 h 后加入 IPTG 至 1 mmol/L, 诱导表达可溶性 Fab 分子, 30℃ 培养过夜, 离心收集上清。

1.6 可溶性 3H11 Fab 表达的检测

采用双抗体夹心法, 以羊抗鼠 IgG Fab (2.3 mg/L) 包被 ELISA 板, 1% BSA/PBS 封闭, 样品为 50 μl/孔的细菌培养上清, XL1-blue 或 TG1 上清及不同浓度的鼠 IgG 为阴、阳性对照。加入 HRP-羊抗鼠 IgG Fab 后以邻苯二胺 (OPD) 为底物显色。每次孵育后均以 0.05% Tween20/PBS 充分洗涤。

1.7 3H11 Fab 抗原结合活性的检测

以 10⁴/孔的密度将人胃癌细胞 MGC803 接种于 96 孔板中, 37℃ 培养过夜。弃上清后以 0.125% 戊二醛固定细胞, 1% BSA/PBS 封闭后加

入待测细菌培养上清, 孵育洗涤后加入 HRP-羊抗鼠 IgG Fab, 以 OPD 为底物显色。

1.8 蛋白质印迹实验 (Western blot)

10 μl 细菌培养上清液经还原、非还原处理备样, 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 100 V 2 h 电转移到硝酸纤维膜上, 5% 脱脂奶粉/PBS 4℃ 封闭过夜。用适当稀释的 Biotin-羊抗鼠 IgG 孵育 2 h, 经 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris · HCl (pH 7.5) 洗涤后, 加入 HRP-Avidin 继续孵育 2 h, 再次洗涤后 DAB 显色。

2 结 果

2.1 3H11 κ 链和 Fd 段的扩增及表达载体的构建

用通用引物以 RT-PCR 法从杂交瘤细胞中扩增出约 700 bp 的 3H11 κ 链和 Fd 段, 纯化后以相应酶切重组入 pMHS 中。酶切鉴定得到正确的重组子 pMHS3H11 (图 2)。

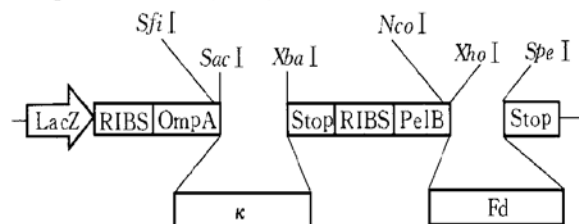


图 2 Fab 表达载体 pMHS 图谱

LacZ: LacZ 启动子; OmpA 和 PelB: 用于分泌表达的细菌前导肽; RIBS: 核糖体结合序列; Stop: 终止密码子。

2.2 3H11 κ 链及 Fd 段的改造

根据 3H11 VL 原始序列^[6]设计引物 (表 1), 通过 PCR 介导的定位突变, 利用载体 κ 链 5' 端侧翼的 *Sfi* I 位点, 将 κ 链氨基端第 1、2 及 4 位氨基酸残基矫正为 3H11 原始序列, 所获表达载体 pMHS3H11rK 经限制性内切酶谱分析核实; 利用载体 Fd 段 5' 端侧翼的 *Nco* I 位点, 将 Fd 氨基端第 1、5 及 6 位氨基酸残基矫正为 3H11 原始序列, 获得表达载体 pMHS3H11rH; 将 κ 链及 Fd 段中改变的氨基酸残基都矫正为 3H11 原始序列, 获得表达载体 pMHS3H11rKH。

2.3 3H11 Fab 的表达量的检测

各取 3 个正确重组的 pMHS3H11、pMHS3H11rK、pMHS3H11rH、pMHS3H11rKH 克隆, IPTG 诱导表达后取细菌培养上清做 Fab 段表达的 ELISA 检测, 结果如表 2, 12 个克隆均有 Fab 的表达, 且表达量基本相同, 约为 50 ~ 100 μg/L。

表 2 矫正前后 3H11 Fab 表达的 ELISA 分析

克隆	1	2	3
pMHS3H11	0.968 ± 0.038	0.848 ± 0.022	0.860 ± 0.038
pMHS3H11rH	0.884 ± 0.044	1.042 ± 0.066	0.828 ± 0.049
pMHS3H11rK	0.816 ± 0.036	0.804 ± 0.018	0.974 ± 0.021
pMHS3H11rKH	0.807 ± 0.029	0.904 ± 0.016	0.880 ± 0.053
鼠免疫球蛋白 (10 μg/L)	0.220 ± 0.024		
鼠免疫球蛋白 (20 μg/L)	0.566 ± 0.015		
鼠免疫球蛋白 (50 μg/L)	0.782 ± 0.029		
鼠免疫球蛋白 (100 μg/L)	1.138 ± 0.015		
鼠免疫球蛋白 (200 μg/L)	1.762 ± 0.026		
TG1 上清	0.043 ± 0.006		

2.4 3H11 Fab 活性的检测

取以上 12 个克隆诱导表达后的细菌培养上清做 Fab 段抗原结合活性的检测, 结果如表 3. pMHS3H11 的 3 个克隆均无与胃癌细胞系 MGC803 的结合活性, pMHS3H11rK、pMHS3H11rH、pMHS3H11rKH 的各克

隆均可与胃癌细胞系 MGC803 结合, 但结合活性不同, 其顺序为 pMH3H11rKH > pMH3H11rK > pMH3H11rH. 统计学分析结果见表 3 注解. 可见轻、重链可变区氨基端序列的变化均对抗体的结合活性有影响, 而且轻链的作用要大于重链.

表 3 矫正前后 3H11 Fab 抗原结合活性的 ELISA 分析

克隆	1	2	3
pMHS3H11	0.054 ± 0.001	0.056 ± 0.002	0.049 ± 0.004
pMHS3H11rH ¹	0.257 ± 0.010	0.253 ± 0.011	0.257 ± 0.018
pMHS3H11rK ²	0.339 ± 0.007	0.300 ± 0.004	0.280 ± 0.008
pMHS3H11rKH ³	0.436 ± 0.002	0.478 ± 0.020	0.342 ± 0.028
3H11 McAb (5 μg/L)	0.273 ± 0.015		
3H11 McAb (10 μg/L)	0.393 ± 0.007		
3H11 McAb (20 μg/L)	0.661 ± 0.012		
3H11 McAb (50 μg/L)	1.496 ± 0.091		
TG1 上清	0.049 ± 0.007		

注: 1 和 2、1 和 3 之间 $P < 0.05$; 2 和 3 之间 $P < 0.10$.

2.5 3H11 Fab 的蛋白质印迹结果

各取 1 个上面 pMHS3H11、pMHS3H11rK、pMHS3H11rH、pMHS3H11rKH 克隆诱导表达后

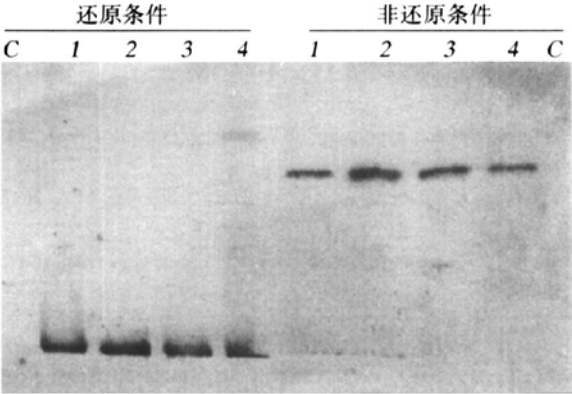


图 3 矫正前后 3H11 Fab 的蛋白质印迹试验

1: pMHS3H11 细菌培养上清; 2: pMHS3H11rH 细菌培养上清; 3: pMHS3H11rK 细菌培养上清; 4: pMHS3H11rKH 细菌培养上清; C: TG1 细菌培养上清为阴性对照.

的细菌培养上清做蛋白质印迹检测. 结果如图 3, 四克隆均有 Fab 的表达, 且表达量基本相同.

3 讨 论

利用基因工程技术对鼠杂交瘤抗体进行改造是现今工程抗体制备、新型抗体开发的热点, RT-PCR 技术因其简便有效性已成为克隆单抗可变区基因的主要手段. 目前文献报道主要利用位于第一骨架区的通用引物进行抗体可变区基因的克隆, 由于通用引物的设计及内切酶位点的引入, 不可避免地要造成可变区两端氨基酸序列的改变, 这将必然使扩增出的可变区基因不能完全忠实于原序列, 这些变动有可能影响抗体分子的结合活性^[7]. 尤其是 N 端氨基酸的改变, 尽管该部位在第一骨架区, 但它们与 CDR 平面靠近, 有可能影响抗原结合部位的构象.

Johnson 和 Bird^[8]曾报道 PCR 引物引入的氨基端序列变化可影响抗体片段的表达及活性, Lavoie 等^[9]也指出可变区氨基端几个氨基酸的改变即可影响抗体与抗原的结合活性. Kipriyanov 等^[10]报道, 在抗人 CD3 ScFv 的构建中, VH 第一骨架区中第六位的谷氨酸 (由 PCR 引物引入) 换成谷氨酰胺, 则可使可溶性的 ScFv 表达量增高 30 倍. 因此在设计小分子抗体时应尽可能保持亲本抗体可变区序列的完整性^[11].

我们在构建 3H11 ScFv 过程中亦曾发现 3H11 V 区氨基端序列对 ScFv 活性表达的关键性作用^[3], 但未能确定是因影响了大肠杆菌的分泌型表达还是影响了抗体和抗原的结合, 也未能阐明轻、重链在其中各自所起的作用. 本工作发现 3H11 轻链和重链可变区氨基端序列发生变化后所形成的 Fab 段完全不能检测到抗原结合活性, 单独矫正轻链或重链的序列后均可部分恢复抗原结合活性, 而无论矫正与否, Fab 的分泌量均基本相同, 提示本研究中 V 基因氨基端的改变并非影响细菌的分泌性表达而是影响了抗体和抗原的结合 (很可能是影响了 CDR 的构象).

根据 15 个已知小鼠 Fab 段的立体构象数据, VL 氨基端的氨基酸残基 14/15 个第 1 位, 15/15 个第 2 位, 12/15 个第 3 位及 15/15 个第 4 位与 CDR 平面有密切接触, 可影响抗体-抗原的结合^[12]. 我们所克隆的 3H11 κ 链恰好改变了第 1、2、4 位氨基酸残基 (分别由原始序列中的谷氨酰胺、异亮氨酸、亮氨酸变为谷氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或蛋氨酸). 而我们所克隆的 3H11 Fd 段改变了第 1、5、6 位氨基酸残基 (分别由原始序列中的谷氨酰胺、色氨酸、谷氨酰胺变为谷氨酸、亮氨酸、谷氨酸), 根据上述的 15 个 Fab 立体构象资料只有 3 个 VH 第 1 位氨基酸残基与 CDR 平面有密切接触, 第 5、第 6 位氨基酸残基对 CDR 平面似无明显影响^[12]. 我们的结果显示矫正 V κ 的效果更明显, 与文献报道的数据吻合, 但 VH 所矫正的部位根据所报道的数据与 CDR 的并无密切接触, 在本工作中也对抗体抗原的结合有明显的作用. 表明在抗体基因克隆和小分子抗体的构建中对 V 区氨基端序列的变化应引起足够的重视.

另外, 在构建 3H11 Fab 的过程中我们还偶然发现, 仅仅单独 κ 链的表达即有抗原结合活性, 但矫正前的 κ 链却只有表达而无抗原结合活性, 与完整 Fab 段所得到的实验结果相同. 在一般的文献报

道中认为, VH 对抗原的结合起主要作用, 并被称为单区抗体, 可单独结合抗原, 而单独轻链则几乎不能与抗原结合^[13]. 我们的结果证明单独轻链有时也可与抗原结合.

参 考 文 献

- 1 McCartney J E, Tai M S, Hudziak R H, *et al.* Engineering disulfide-linked single-chain Fv dimers with improved solution and targeting properties: anti-digoxin 26-10 (sFv')₂ and anti-c-erbB-2 741F8 (sFv')₂ made by protein folding and folded through c-terminal cysteinyl peptides. *Protein Engineering*, 1994, **8** (3): 301~314
- 2 Froyen G, Ronsse I, Billiau A. Bacterial expression of a single-chain antibody fragment (ScFv) that neutralizes the biological activity of human interferon γ . *Mol Immunol*, 1993, **30** (9): 805~812
- 3 李 竞, 王 琰, 李全喜, 等 (Li J, Wang Y, Li Q X, *et al.*). 抗胃癌单抗 3H11 的 ScFv 表达载体的构建和表达. *中华肿瘤杂志* (Chin J Oncol), 1998, **20** (2): 85~87
- 4 董志伟, 魏淑敏, 张梅颖, 等 (Dong Z W, Wei S M, Zhang M Y, *et al.*). 胃癌单克隆抗体 3H11 的应用. *中国肿瘤生物治疗杂志* (Chin J Cancer Biotherapy), 1995, **2** (2): 84~87
- 5 Kabat E A, Wu T T, Perry H M, *et al.* Sequences of proteins of immunological interest, 5th. Bethesda: Department of Health and Human Service, 1991. 1250~1454
- 6 李 竞, 王 琰, 李全喜, 等 (Li J, Wang Y, Li Q X, *et al.*). 抗胃癌单抗 3H11 V 区基因的克隆及人-鼠嵌合轻链的初步表达. *中华微生物和免疫学杂志* (Chin J Microbiol Immunol), 1997, **17** (3): 227~230
- 7 Panka D J, Mudgett-Hunter M, Parks D R, *et al.* Variable region framework difference results in decreased or increased affinity of variant anti-digoxin antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (8): 3080~3084
- 8 Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *E. coli*. *Meth Enzym*, 1991, **203**: 88~92
- 9 Lavoie T B, Drohan W N, Smith-Gill S J. Experimental analysis by site-directed mutagenesis of somatic mutation effects on affinity and fine specificity in antibodies specific for lysozyme. *J Immunol*, 1992, **148** (1): 503~511
- 10 Kipriyanov S M, Moldenhauer G, Martin A C, *et al.* Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single-chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. *Protein Eng*, 1997, **10** (4): 445~453
- 11 Foote J, Winter G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol*, 1992, **224** (1): 487~499
- 12 Padlan E A. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*, 1994, **31** (3): 169~217
- 13 Davies J, Richmann L. Antibody VH domains as small recognition units. *Biotechnology*, 1995, **13** (5): 475~479

Construction and Expression of Anti-human Gastric Cancer mAb 3H11 Fab. LI Jing, WANG Yan, WANG Zhuo-Zhi, LIU Qun-Ying, HUA Bing, CHEN Yu-Ping, ZHU Ying-Chun, DONG Zhi-Wei (Navy General Hospital, Beijing 100037, China).

Abstract The cDNAs of κ chain and Fd fragment of anti-gastric cancer mAb 3H11 were amplified by RT-PCR using degenerate primers for framework region 1 (FR1) and cloned into an Fab expression vector. Expression of Fab could be detected but with no antigen binding activity. Then the V_{κ} and Fd genes were corrected to its genuine sequence by PCR mediated mutagenesis. The reconstructed Fab containing either

corrected κ chain or Fd or both were expressed in *E. coli* at similar level. Correction of any one of the V region genes could partially resume the antigen binding activity. This result indicated that PCR primers introduced V_{κ} and Fd N terminal changes may seriously affect the antigen binding activity.

Key words anti-human gastric cancer mAb, Ig variable gene, Fab

蛋白激酶对 τ 蛋白阿尔茨海默样磷酸化的调节作用*

王建枝 王 群 吴琼莉 I. GRUNDKE-IQBAL K. IQBAL

(同济医科大学病理生理教研室, 武汉 430030)

摘要 微管相关蛋白 τ 的异常磷酸化是阿尔茨海默病 (AD) 神经原纤维退变的重要机制之一。研究发现: 酪蛋白激酶-1 (CK-1), cAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA) 和糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 均可不同程度催化重组 τ 蛋白发生磷酸化, 从而不同程度抑制 τ 蛋白促微管组装的生物学功能。如果先将 τ 蛋白与 PKA 预温 2 h 后再和 GSK-3 温育, 则发现 τ 蛋白磷酸化程度比单纯用 GSK-3 处理显著增高, 生物学活性则显著降低, 电镜检测几乎看不见微管形成。结果提示: PKA 和 GSK-3 在 τ 蛋白的 AD 样磷酸化及其功能抑制中具有正性协同作用。

关键词 蛋白激酶, 阿尔茨海默病, τ 蛋白, 异常磷酸化

学科分类号 R745.7, Q513

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是由慢性进行性脑退变引起的最常见的成人痴呆症, 其发病率随年龄增长而急剧上升。研究证明: 神经细胞内的神经原纤维缠结的形成是 AD 患者微管结构崩溃, 神经原纤维退化, 神经元死亡的基础^[1]。神经原纤维缠结的主要组成成分是异常过度磷酸化和异常糖基化的 τ 蛋白^[2,3]。

AD 脑中 τ 蛋白的异常磷酸化与蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶调节失衡有关。对蛋白磷酸酯酶在 τ 蛋白异常磷酸化中的作用已有深入研究^[1], 而对蛋白激酶的有关作用却知之甚少, 其主要原因是蛋白激酶在体外催化 τ 磷酸化的反应具有非常缓慢的动力学^[4]。根据丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的催化序列是否依赖脯氨酸, 可将其分为脯氨酸指导的蛋白激酶 (PDPK) 和非脯氨酸指导的蛋白激酶 (non-PDPK)。在 AD τ 蛋白已经发现的 21 个异常磷酸化位点中, 有 10 个 PDPK 和 11 个 non-PDPK 位点。可见, PDPK 和 non-PDPK 可能均参与了 AD 的发病过程。因此, 本研究分别选用 GSK-3 (PDPK) 和 CK-1 及 PKA (non-PDPK), 探讨 PDPK

和 non-PDPK 对 τ 蛋白磷酸化的调节作用, 以期部分阐明蛋白激酶与 AD 神经原纤维退化的联系。

1 材料与方法

1.1 蛋白质样品的制备

含 C 端四个串联重复序列和 N 端一个插入子的重组人类 τ (τ 3L, 图 1) cDNA 由 Goedert 博士提供。大肠杆菌中表达的 τ 3L 的制备根据 Goedert 法^[5]进行如下改良: 将收获的含重组 τ 3L 的细胞于 80 mmol/L Mes (pH 6.8) 含 5 mmol/L DTT 的溶液中进行超声破碎, 120 000 g 离心后, 取上清液用磷酸纤维素柱层析分离, 用免疫印迹法确定 τ 的洗脱峰, 收集富含 τ 的级分于沸水浴中煮沸 5 min 后用过氯酸进行抽提。所纯化的 τ 蛋白达凝胶电泳蛋白染色单点纯, 其得率平均为 5 mg/L 培养基。CK-1 和 GSK-3 由 Singh^[6]提供。GSK-3 制剂含 α 和 β 同工异构体的比例为 1:3。1 单位 CK-1 或 GSK-3 分别定义为在 30℃ 每分钟催化 1 nmol

* 国家自然科学基金资助项目 (39770175)。

收稿日期: 1998-06-19, 修回日期: 1998-12-29