

重组入 pET15b-Etag 载体的 *Nco* I 和 *Not* I 酶切位点之间, 构建重组表达载体 pETE6ScFv. 转化 *E. coli* DH 5 α . *Eco*R I 单酶切筛选含 830/260 bp 左右片段的 ScFv 重组阳性克隆, 作限制性内切酶谱进一步鉴定阳性克隆.

1.2.2 E6ScFv 诱导表达: 阳性重组表达载体 pETE6ScFv 用氯化钙法转化 *E. coli* BL 21 (DE3). 挑取阳性克隆, 按 1% 转接 2 ml 含 Amp 的 LB 液中, 经 0.1 mmol/L IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导.

1.2.3 SDS-PAGE: 浓缩胶浓度 3%, 分离胶浓度 12%. 取 1.5 ml 菌液离心收集菌体, 将菌体作分级分离^[5]或灭菌水重悬后, 加等体积的蛋白质电泳上样缓冲液, 煮沸 10 min. 样品经还原性 SDS-PAGE 后, 考马斯亮蓝 R250 染色 1~2 h, 20% 乙醇-7% 冰醋酸脱色液脱色并观察. CS-9000 薄层扫描仪扫描 SDS-PAGE 蛋白质条带.

1.2.4 蛋白质印迹: 将 SDS-PAGE 凝胶电转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 一抗为抗 E-tag 抗体, 二抗为 Ap 标记的羊抗鼠 IgG, 作蛋白质印迹, 室温 30 min 内呈色, 观察特异性抗原抗体结合条带.

1.2.5 表达产物的形式分析: 方法参照文献 [5].

1.2.6 表达产物的活性测定: 采用双抗体夹心法和斑点印迹, 参照文献 [6] 方法进行.

2 结 果

2.1 pETE6ScFv 的构建、筛选和鉴定

换接头 PCR 从 pUCE6ScFv 中扩增出 E6ScFv

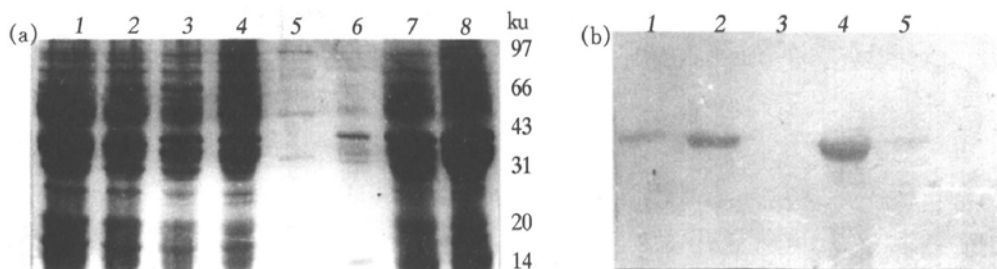


图 2 pETE6ScFv 在 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达

(a) 12% SDS-PAGE 的结果. 1, 2: 分别为未诱导和经 IPTG 诱导的 pETE6ScFv 在 *E. coli* DH5 α 中的表达, 两者无差异; 3, 4: 未经诱导和经 IPTG 诱导的 pETE6ScFv (BL21), 4 比未经诱导者 3 在 28 ku 处有一新生染色条带; 5: 低分子质量标准蛋白; 6~8: pETE6ScFv (BL21) 的表达形式; 6: 外周质部分; 7: 细胞质部分; 8: 沉淀部分. (b) pETE6ScFv (BL21) 蛋白质印迹的结果. 1, 5: 外周质部分; 2: 细胞质部分; 3: 未经诱导者; 4: 沉淀部分.

2.3 E6ScFv-Etag 表达产物的形式和蛋白质印迹分析

pETE6ScFv (BL21) 诱导菌进行分级分离后分别取外周质、胞质和沉淀各部分, 进行 12% SDS-PAGE 分析, 结果可见 E6ScFv-Etag 在外周质、胞质和沉淀各部分均有表达, CS-9000 薄层扫

描仪扫描定量证实, 外周质部分占 6%、胞质部分占 9%, 沉淀部分占 22% (图 2). 将 SDS-PAGE 凝胶电转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 一抗为抗 E-tag 抗体, 二抗为 Ap 标记的羊抗鼠 IgG, 作蛋白质印迹, 室温 30 min 内在相应分子质量处有特异

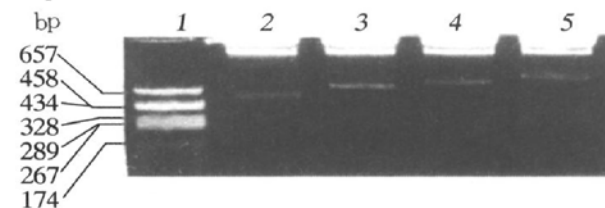


图 1 pETE6ScFv 限制性内切酶位点分析

1: 分子质量标准; 2~5: pETE6ScFv 分别经 *Nco* I + *Kpn* I、*Bam*H I + *Xho* I、*Nco* I + *Not* I 双酶切及 *Eco*R I 单酶切, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见分别切出 530 bp、630 bp、750 bp 和 840/260 bp 的小片段.

2.2 E6ScFv-Etag 的融合表达

取过夜培养的阳性克隆 pETE6ScFv (DH5 α)、pETE6ScFv (BL21), 经 0.1 mmol/L IPTG 诱导, SDS-PAGE 与未诱导组相比, 观察到 pETE6ScFv (BL21) 表达出约 28 ku 的新生蛋白质条带, 而 pETE6ScFv (DH5 α) 无新生蛋白质条带出现 (图 2).

描仪扫描定量证实, 外周质部分占 6%、胞质部分占 9%, 沉淀部分占 22% (图 2). 将 SDS-PAGE 凝胶电转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 一抗为抗 E-tag 抗体, 二抗为 Ap 标记的羊抗鼠 IgG, 作蛋白质印迹, 室温 30 min 内在相应分子质量处有特异

性抗原抗体结合条带呈现。

2.4 表达产物的活性分析

2.4.1 双抗体夹心法: pETE6ScFv 之外周质、细胞质和沉淀部分均用包被缓冲液 (0.05 mol/L NaCO₃-NaHCO₃; pH 9.6) 稀释后, 加入 ELISA 板中 100 μl/孔, 加入 rHuTNF-α 37 °C 温育 2 h, 各孔加 HRP 标记的 anti-TNF-α, ABTS 液呈色, 在酶联免疫检测仪上测每孔 410 nm 处 A 值 (略), 统计结果显示, 与对照组比较, 外周质、细胞质部分均具抗原结合活性, 沉淀部分无活性, 与 pETE6ScFv 表达形式的分析相符。

2.4.2 点印迹: 抗 TNF-α McAb 组直接加 A_P anti-mouse IgG, 底物溶液室温呈色见明显斑点, 在 TNF-α 为 0.05 ng 即出现斑点显色; E6ScFv-E-tag 外周质组加鼠抗 anti-E-tag IgG, 再加 A_P anti-mouse IgG, 加入底物溶液室温呈色 10 min, 均见明显抗原抗体结合斑点, 随 TNF-α 浓度提高, 斑点显色也加深; 而对照组没有斑点显色, 说明 E6ScFv-E-tag 含有与 rHuTNF-α 结合的抗体活性分子。

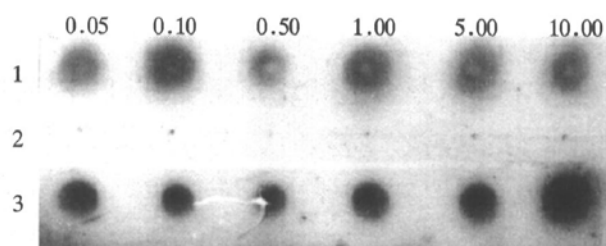


图3 E6ScFv 抗原结合活性的点印迹分析

1: E6ScFv-Etag 外周质组; 2: 阴性对照组; 3: 阳性对照组 (抗 TNF-α McAb 组)。TNF-α: 0.05~10.00 ng。

3 讨论

选择合适的载体-宿主系统是外源基因在原核体系内高效表达的关键之一。本文选用了含有 T7 噬菌体启动子的融合表达载体 pET15b-Etag, 构建了抗人 TNF-α 单链抗体表达载体 pETE6ScFv, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 经 IPTG 诱导成功地表达了抗 hTNF-α E6 杂交瘤的单链抗体基因, 并获得较高水平的表达, 其 E6ScFv-Etag 融合蛋白表达量占菌体总蛋白的 38%, 表达产物有 6% 出现于细菌外周质中, 是可溶性的。但 pETE6ScFv 在大肠杆菌 DH5α 中不表达, 这是由于 BL21 (DE3) 编码的 T7 噬菌体 RNA 聚合酶可特异性的识别 T7 噬菌体的一个高度保守的 23 bp 序列 (-17~+6) 的启动子, 并作为唯一的酶蛋白成分独自催化 T7

基因的转录过程, 其催化 RNA 合成的速度是大肠杆菌 RNA 聚合酶的 5 倍, 从而启动和利于高效表达克隆于载体 pET15b-Etag 中 T7 噬菌体启动子成分之后的 E6ScFv 基因; 而 DH5α 不能与 T7 噬菌体启动子之间建立特异性的识别关系, 使抗体基因无法表达。此表达系统除具有高效表达特性外, 还有良好的可控性, T7 噬菌体 RNA 聚合酶作为蛋白质在宿主细胞内不能自主复制, 一旦 T7 噬菌体 RNA 聚合酶降解将自动终止目的基因的表达。

本文将分子质量较小的 ScFv 以融合蛋白形式表达抗体蛋白, 表达的单链抗体虽然表达量较高, 但有着融合蛋白表达载体共有的缺点, 即表达产物溶解度低, 沉淀多为不溶性的包涵体, 包涵体的形成虽利于防止蛋白酶对目的抗体蛋白的破坏, 但是形成包涵体的表达产物没有生物学活性, 需要用一些物理和化学的手段对包涵体进行变性和复性, 以恢复有功能活性的蛋白质折叠构像, 其中如何提高复性率, 使蛋白质正确折叠是目前人们努力研究和力图解决的关键问题, 所以如果能保持表达产物为可溶性状态, 对抗体蛋白的保存和功能的实现大为有利。本文在外周质和细胞质部分出现可溶性的抗体蛋白, 但其表达量较低, 说明了表达产物的溶解度可能也与单链抗体基因的结构以及表达水平过高、表达条件等紧密相关, 也是其表达产物不易被降解的原因之一。抗人 TNF-α 单链抗体为 249 个氨基酸, 含 4 个半胱氨酸 (1.6%), 可形成两对二硫键, 其分子质量大小和半胱氨酸的含量也和包涵体的形成有关。

单链抗体由于仅保留了抗体的抗原结合区域, 无 Fc 段, 不能用常规的免疫化学方法检测它们的抗原结合活性。通过在抗体分子的构建过程中, 在抗体基因的前后融合一段小肽作为检测用标签, 用抗该标签蛋白的抗体, 可间接测定 ScFv 的抗原结合活性, 本文通过抗 E-tag 抗体, 经 ELISA 和点印迹初步得到抗人 TNF-α 单链抗体具有抗原结合特异性, 而且在 ScFv C 端融合 E-tag, 不影响其抗原结合活性。总之, 我们用这种基于 T7 噬菌体启动子和 T7 噬菌体 RNA 聚合酶间特异性识别而建立起来的高效偶联表达系统表达抗人 TNF-α E6 单链抗体取得了令人满意的结果, 进一步的纯化和活性研究正在进行之中。

(下转第 514 页, Continued on page 514)

well known that L-FC is attached to glycochains of tumor markers such as alpha fetoprotein (AFP) and CA-199. Increment of α -L-fucosidase was detected in patients with primary hepatic carcinoma. Fucolipid accumulation in human adenocarcinoma was abnormally increased and fucosyltransferase was highly active in lung cancer cells. In addition, it has been found that patients with liver cancer and cirrhosis excreted free L-fucose via urine to greater extent than normal individuals. The values of UFC were detected in the urine from 86 health people and 205 people with various tumors. The mean value of urinary L-FC in health people was $177.7 \mu\text{mol/g. cr}$ ($s = 56.6$, 95% confidence range was $63.8 \sim 290.2 \mu\text{mol/g. cr}$). The mean values of UFC in urine obtained from patients with hepatocellular carcinoma,

cirrhosis, acute and chronic hepatitis, pancreas carcinoma, gastric cancer, lung cancer, intestinal cancer, esophageal cancer were higher than $290.2 \mu\text{mol/g. cr}$, having significant difference from normal individuals. The mean values of UFC in urine obtained from patients with mastadenoma, cervical cancer and ovary cancer have significant difference from normal individuals. The value of L-fucose in urine can be regarded as one of the characteristic indexes for hepatocellular carcinoma and canceration of acute and chronic hepatitis. Detection for L-fucose is one of tumor marker tests for patients with tumor in digestive system.

Key words L-FC, L-fucose dehydrogenase, tumor, liver diseases

(上接第 504 页, Continued from page 504)

参 考 文 献

- 1 Weil D. What's new about tumor necrosis factor? Report on the Fourth TNF International Congress. *Eur Cytokine Netw*, 1992, **3** (3): 347~ 349
- 2 Maher V E, Drukman S J, Kinder R J, *et al.* Human antibody response to the intravenous and intraperitoneal administration of the F (ab')₂ fragment of OC125 murine monoclonal antibody. *J Immunother*, 1992, **11** (1): 56~ 66
- 3 陈 萍, 邓健蓓, 王字玲, 等 (Chen P, Deng J P, Wang Z L, *et al.*). 抗人 TNF- α 单链抗体基因的构建和序列测定. 第四军医大学学报 (*J Fourth Milit Med Univ*), 1998, **19** (4): 373~ 376
- 4 Huston J S, Levinson D, Mudgett-Hunter M. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (16): 5879~ 5883
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 841~ 848
- 6 Orfanoudakis G, Kahija B, Bourel D, *et al.* Bacterially expressed fabs of monoclonal antibodies neutralizing tumor necrosis factor alpha *in vitro* retain full binding and biological activity. *Mol Immunology*, 1993, **30** (16): 1519~ 1528

Expression in *Escherichia coli* of anti-Human Tumor Necrosis Factor alpha ScFv Under the Control of T7 Promoter. CHEN Ping, DENG Jian-Bei, CHEN Mei-Hong, Han Hua, Yao Li-Bo, Su Cheng-Zhi (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*).

Abstract An engineering anti-human TNF- α single-chain antibody (ScFv) gene was cloned into the expression vector pET15b-Etag, and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) under the control of T7 promoter. By using 0.1 mmol/L IPTG induction, the amount of the ScFv expression product was more than 38% of total bacterial proteins. Most of them existed in a form of inclusion body. More than 6% of total bacterial proteins were soluble and can be detected in the part of periplasm, which can bind with rhuTNF- α by ELISA and Dot-blotting technique.

Key words hTNF- α , ScFv, high-level expression