

4 讨 论

a. 从图 2 可以看出: 在无线电频率范围内, 发酵液存在着一个明显的电容率分布. 如果酵母浓度不变, 当测量频率由高到低逐渐减小时, 发酵液的电容率逐渐增加; 另一方面, 如果测量信号频率不变, 则发酵液中酵母的数目越多, 电容率越大.

b. 实验表明, 发酵液在无线电频率下的电容率增量确实是酵母浓度的单值函数, 我们可以通过测量发酵液电容率的变化来确定酵母浓度.

c. 实验表明, 用本文的装置对酵母浓度进行在线实时测量, 所得结果与用离线法 (干重法和光密度法) 测得的结果是比较接近的.

d. 从图 3 可以看出, 发酵进行大约 52 h 后进入平衡期, 在此阶段用本文的方法测得的结果要比用干重法和光密度法所得的结果低一些. 这一现象与我们所说的“用本方法测得的是活的酵母浓度”相吻合, 这是本仪器的一个优点. 这一现象的出现与酵母生理状态密切相关. 在平衡期由于营养物的缺乏, 酵母繁殖变得缓慢, 有些细胞开始衰老或死亡, 致使其体积收缩, 细胞膜的绝缘程度下降或丧失, 导致了所束缚的电荷的减少. 所以本仪器还可用来研究酵母生理状态的变化.

致谢 本实验是在丹麦技术大学工业微生物研究中心完成的. 该实验中心的高级实验师 Tina 小姐给予很多帮助, 对此作者表示深深地感谢.

参 考 文 献

- 1 Olsson L, Nielsen J. On-line and *in-situ* monitoring of biomass in submerged cultivations. Trends Biotech, 1997, 15 (11): 517~522
 - 2 Pethig R, Kell D B. The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology. Phys Med Biol, 1987, 32 (8): 933~970
 - 3 Schwan H P. Electrical properties of tissue and cell suspensions. Adv Biol Med Phys, 1957, (5): 147~209
 - 4 Schulze U. Anaerobic Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Copenhagen: Denmark Technical University Press, 1995. 242~243
- Studies of On-line and In-situ Measuring Method for Biomass Concentration.** WANG Yǔ-Jun, FAN Yu (Department of Electrical Engineering, Shandong College of Light Industry, Jinan 250100, China); L. OLSSON, J. NIELSEN (Department of Biotechnology, Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, Denmark).
- Abstract** A method and a device were developed to monitor biomass concentrations on-line and *in-situ* in a fermentation process. The presence of microbial cells would affect the dielectrical properties of microbial suspensions. At radio-frequencies the dielectric permittivity of cell suspensions are monotonic function of the measuring frequency and cell density. Based on this understanding a new method for measuring biomass concentration is proposed. Using this method the biomass concentrations are measured on-line and *in-situ* without taking samples from the bioreactor, and only viable cells are detected. The electrode could be directly inserted into the fermentor and could be sterilized in place. The method has a wide use in the industrial field of pharmacy, brewery, sewage disposal.
- Key words** cell suspension, biomass concentration, on-line and *in-situ* measuring, permittivity dispersion, sterilizing in place

抗 CEA 单链抗体与链亲和素融合基因的表达*

任 军¹⁾

(第四军医大学西京医院肿瘤中心, 西安 710032)

季万胜 周绍娟 陈 峥 张学庸 樊代明

(第四军医大学西京医院消化内科, 西安 710032)

摘要 克隆分泌 CEA 杂交瘤细胞重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L), 以 Linker 连接 V_H 及 V_L 构建抗 CEA 单链抗体. 同时以 Spacer 连接单链抗体和链亲和素, 构建成功单链抗体和链亲和素融合基因, 克隆该融合基因

* 国家自然科学基金资助 (39400159, 39870787) 和国家“九五”攻关课题资助项目 (96C02-01-17). ¹⁾ 通讯联系人.

至原核表达载体, pET21a(+), 经 IPTG 诱导表达出该双特异性融合蛋白. 活性鉴定表明该融合蛋白具有结合 CEA 及生物素的双特异性. 该融合蛋白在生物领域中有较广阔的应用前景.

关键词 单链抗体, 融合蛋白, 基因表达

学科分类号 Q786

抗体的可变区部分是具有完整的抗原结合位点的最小抗体片段, 以一段通常为 15 肽的片段将重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 连接起来形成的单链抗体 (ScFv) 比单域抗体有更好的稳定性和抗原结合能力, 且免疫原性低, 组织穿透力强, 因此在生物学、医学尤其是肿瘤的靶向诊断和治疗方面有潜在的应用价值. 抗癌相关的酶、外毒素等与 ScFv 组成的嵌合分子用于治疗肿瘤已有报道^[1-3]. Dubel^[4]和 Sano^[5]等分别表达出了 ScFv 与蛋白 A 或链亲和素的融合蛋白. 但单链抗体基因表达突出的问题是活性低、效率差, 并且原核表达系统的选择是影响表达产物的关键因素之一. 本文利用原核表达系统 pET21a(+) 表达出了 CEA ScFv 和链亲和素的双特异性融合蛋白. 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 CEA 单链抗体的构建与融合基因的构建

选择分泌抗 CEA 分子的杂交瘤^[6,7], 经以 TriReagent Kit (Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, OH) 分离总 RNA, 合成 cDNA 第一链 (Boehringer Mannheim), 重链可变区正向引物 5' GTG AAT TCG AGG T (A/G) CAG CTG CAG (G/C) AGTC (A/G) GG3', 反向引物 5' GCC TCC GCC GGT GAC CA (G/T) (G/T) GT (C/T) CC (C/T) TGGCCCCA3'. 轻链可变区引物序列, 正向: 5' GGA GGA TCA GA (A/C/T) AT (C/T) (G/C) (A/T) G (A/T) TGAC (A/G/C/T) CAGT-CT3', 反向: 5'-CAAAGCTTCTTT (G/T) ATCTCCA(G/C)CTT(G/T)GT(C/G)CC3'. 其中为了定向单克隆在重链的正向引物及轻链的反向引物中引入了 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切位点. Linker 序列为 5' GGC GGA GGC GGA TCA GGA GGA GGA GGA TCA GGC GGAGGAGGATCA3'. 将单链抗体和链亲和素连接的 Spacer 序列为 GCGGTGCT-GCTGAAG. 图 1 示意融合基因的构建. 将该融合基因克隆至原核表达载体系统 pET21a(+) 进行表达.

1.2 融合蛋白的诱导表达

将所构建的表达载体转化大肠杆菌 HMS174

(DE3) plysS, 应用异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG, 终浓度为 1 mmol/L) 分别诱导 0~5 h, 离心收集细菌, 将经 SDS 裂解的细菌收集物上样至 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 进行融合蛋白诱导表达的初步观察. 此外, 将相应的凝胶进行转移电泳, 将转移的滤膜用 PBS 漂洗干净, 加入 1% BSA 封闭 30 min, 加入生物素标记的辣根过氧化物酶, 37℃ 反应 1 h. PBS 漂洗 3 次, 加二氨基联苯胺 (DAB) 底物显色液, 观察结果.

1.3 蛋白质印迹分析

胃癌细胞系 SGC-9718 可分泌 CEA 抗原分子, 放射免疫法测定其上清 CEA 浓度为 80.1 μ g/L. 取 1 ml 细胞上清, 用 60% 饱和硫酸铵盐析, 沉淀以 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 50 μ l 重悬, 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4℃ 过夜转移至硝酸纤维素膜. 转移后的硝酸纤维素膜裁剪成两半, 一半用抗 CEA 单克隆抗体 (购自 Sigma 公司), 一半用表达的该融合蛋白粗提物, 孵育反应条件相同, 加入生物素标记的辣根过氧化物酶, DAB 底物显色, 观察结果.

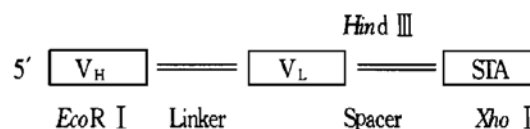


图 1 融合基因构建示意图

2 结果

融合表达载体经 DNA 序列分析证实所插入的单链抗体及链亲和素序列正确. 且以 *Eco*R I + *Hind* III、*Hind* III+ *Xho* I、*Eco*R I + *Xho* I 分别双酶切鉴定, 均可获得预期分子质量的 DNA 片段. 融合表达载体转化大肠杆菌 HMS 174 (DE3) plysS, 经 IPTG 诱导后, 融合基因得到表达, 最高表达产量出现在诱导后 3 h, 此时融合蛋白约占菌体总蛋白的 15%. 融合蛋白同时以包涵体和可溶性两种形式出现, 对照组则无目的带出现 (图 2). 融合蛋白分子质量约 57 ku, 与理论值相符. 将融合蛋白粗提物行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转移至硝酸纤维素膜, 蛋白质亲和印迹结果表

明该融合蛋白能特异性地结合生物素分子 (图 3). 蛋白质印迹实验进一步证实该表达的融合蛋白可以特异性地结合 CEA 分子及生物素分子, 表明该融合蛋白具有结合抗原及生物素分子的双功能双特异性 (图 4). 此外利用 CEASCFV-链亲和素融合蛋白对能表达分泌 CEA 分子的胃癌细胞系 SGC-9718 进行免疫细胞化学分析, 结果显示, 该融合蛋白可与细胞结合, 阳性染色部位主要位于细胞膜上, 而对照组中未见阳性颗粒 (图 5).

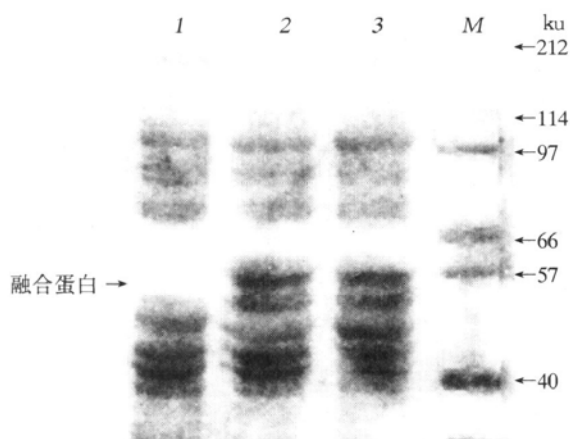


图 2 融合蛋白的诱导表达

1: 大肠杆菌菌株 HMS174 的粗提物, 作为阴性表达对照; 2: 融合蛋白基因转化大肠杆菌 HMS174 (DE3) plysS, 经 IPTG 诱导表达的细菌上清; 3: 融合蛋白基因转化大肠杆菌 HMS174 (DE3) plysS, 经 IPTG 诱导表达的细菌沉淀物; M: 蛋白质分子质量标准.

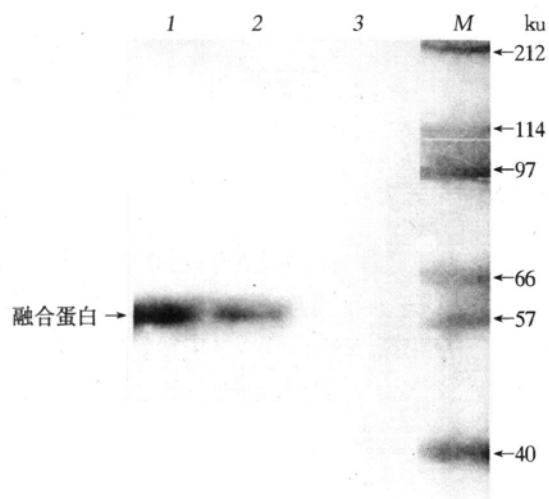


图 3 融合蛋白的蛋白质亲和印迹检测

1, 2: 融合蛋白基因转化大肠杆菌 HMS174 (DE3) plysS, 经 IPTG 诱导表达后的细菌沉淀粗提物; 3: 大肠杆菌菌株 HMS174 的粗提物, 作为阴性表达对照; M: 蛋白质分子质量标准.

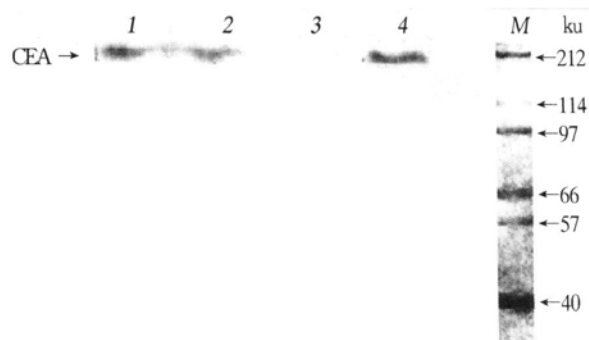


图 4 融合蛋白的蛋白质印迹检测结果

1, 2, 4: 分泌 CEA 抗原分子的胃癌细胞系 SGC-9718 上清, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转移至硝酸纤维素膜; 3: 不分泌 CEA 抗原分子的胃癌细胞系 SGC-7901 上清为阴性对照. 1, 2, 3 的一抗为表达的融合蛋白; 4 的一抗为标准单克隆抗体 (Sigma 公司); M: 蛋白质分子质量标准.

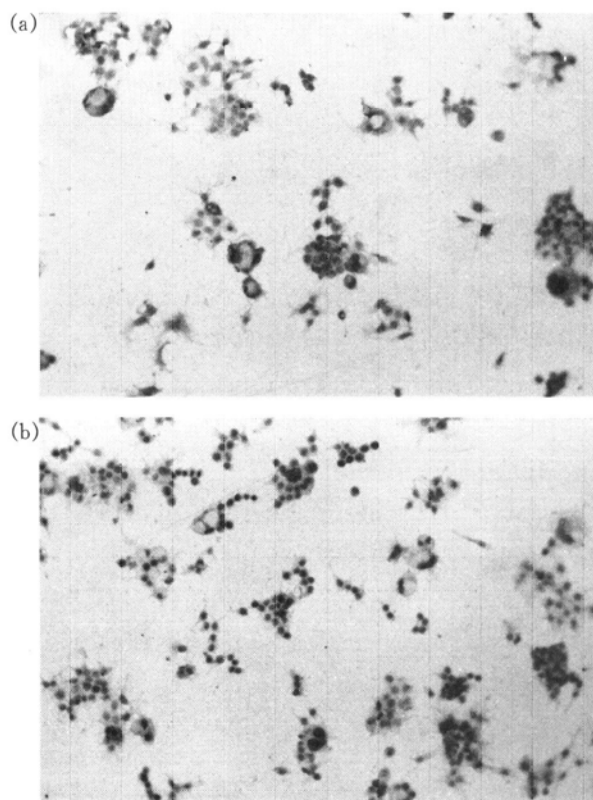


图 5 融合蛋白的免疫细胞学检测

(a) 分泌 CEA 抗原分子的胃癌细胞系 SGC-9718; (b) 不分泌 CEA 抗原分子的胃癌细胞系 SGC-7901, 作为阴性对照.

放大倍数: $\times 10$.

3 讨 论

表达系统的研究和改进是基因工程技术发展的重要基础. 与真核表达系统相比, 原核表达系统有许多优点, 如克隆操作简便, 扩增繁殖迅速, 易于产业化等. 但表达产量偏低及活性差限制了其应用. 近年来, 原核表达系统在如下方面取得了进

展: a. 载体更加便于克隆; b. 表达产量增加; c. 生物活性和水溶性有所提高; d. 产物更易于纯化; e. 有利于快速鉴定分析; f. 可调性表达. 因此, 利用原核表达系统制备以基因工程抗体为基础的多功能融合蛋白是当前生物学、医学尤其是肿瘤研究与应用的一个方向^[8,9]. ScFv 是基因工程抗体家族的一个重要成员, 具有良好的稳定性和抗原结合能力, 且免疫原性低, 组织穿透力强, 既适合体内研究, 又易于构建多功能的融合蛋白^[10,11]. Altenschmidt 等^[12] 构建的 erbB2 ScFv 与假单胞菌外毒素 A 的融合蛋白, Eshhar 等^[13] 构建了 ScFv 与干扰素的融合蛋白, 这些研究体现了以 ScFv 为基础的融合蛋白在治疗方面的研究进展. 在诊断方面, 已有学者构建 ScFv 与亲和素碱性磷酸酶的融合蛋白^[14,15], 试图提高目前免疫诊断的效率, 但这些研究离实际应用尚有一定的距离, 其中表达载体的选择至关重要.

本研究结果表明, 利用 pET21 表达载体, 融合蛋白得到表达, 且最高表达产量出现在诱导后 3 h, 此时融合蛋白约占菌体总蛋白的 15%. 研究中发现 IPTG 诱导后 1 h 即有约 10% 的表达产量, 3 h 最高, 至诱导 5 h 后仍有 10% 的表达产物, 融合蛋白以包涵体和可溶性两种形式出现. 蛋白质亲和印迹结果表明, 该融合蛋白具有结合生物素的活性. 蛋白质印迹实验进一步证实所表达的融合蛋白具有结合生物素和 CEA 分子的双功能性, 有着潜在的应用价值. 利用该融合蛋白对胃癌细胞系 SGC-9718 所分泌的 CEA 进行检测, 体现出了一定的优点, 操作简单, 不需要二抗, 至少比常规免疫学方法节省 25% 的时间, 避开了从杂交瘤细胞提取, 纯化抗体的繁琐步骤. 应用 pET21 原核表达系统表达的双功能性融合蛋白为建立一套快速有效的抗原检测系统打下了一定的实验基础.

致谢 本研究得到美国波士顿大学生物技术中心 Cantor 教授的支持, 在此致谢.

参 考 文 献

- Schmidt M, Vakalopoulou E, Schneider D W, *et al.* Construction and functional characterization of ScFv (14E1)-ETA-a novel, highly potent antibody toxin specific for the EGF receptor. *Br J Cancer*, 1997, **75** (11): 1575~1584
- Spooner R A, Murray S, Rowlinson-Busza G, *et al.* Genetically engineered antibodies for diagnostic pathology. *Human Pathol*, 1994, **25** (6): 606~614
- Gruber M, Schodin B A, Wilson E R, *et al.* Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. *J Immunol*, 1994, **152** (11): 5368~5374
- Dubel S, Breitling F, Kontermann R, *et al.* Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (ScFv). *J Immuno Methods*, 1995, **178** (2): 201~209
- Sano T, Cantor R C. A streptavidin protein A chimera that allows one-step production of a variety of specific antibody conjugates. *Bio/Technology*, 1991, **9** (12): 1378~1381
- Chung J H, Kim I J, Choi I H, *et al.* Monovalent carcinoembryonic antigen 79 antibody conjugated with recombinant human angiogenin (CEA79/angiogenin) shows a cytotoxic effect against SNU-4 expressing CEA on its surface. *Mol Cells*, 1996, **6** (2): 125~132
- Chung H K, Lee J H, Kim S R, *et al.* Radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen employing monoclonal antibodies. *Korean J Biochem*, 1989, **21** (1): 21~27
- Kreber A, Bornhauser S, Burnester J, *et al.* Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immuno Methods*, 1997, **201** (1): 117~125
- Lafaye P, Choumet V, Demangel C, *et al.* Biologically active human anti-crotoxin ScFv isolated from a semi-synthetic phage library. *Immunotechnology*, 1997, **3** (2): 117~125
- Dubendorff J W, Studier F W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with Lac repressor. *J Mol Biol*, 1991, **219** (1): 45~49
- Studier F W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol*, 1991, **219** (1): 37~44
- Altenschmidt U, Schmidt M, Groner B, *et al.* Targeted therapy of schwannoma cells in immunocompetent rats with an erbB2-specific antibody-toxin. *Int J Cancer*, 1997, **73** (1): 117~124
- Eshhar Z. Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. *Cancer Immuno Immunother*, 1997, **45** (3~4): 131~136
- Stevenson F K, Zhu D, King C A, *et al.* Idiotype DNA vaccines against B-cell lymphoma. *Immuno Rev*, 1995, **145** (3): 211~218
- Carrier A, Ducancel F, Settiawan N B, *et al.* Recombinant antibody-alkaline phosphatase conjugates for diagnosis of human IgGs: application to anti-HbsAg detection. *J Immuno Methods*, 1995, **181** (2): 177~186

Expression and Identification of the Fusion Protein of CEA Single Chain Antibody and Streptavidin.

REN Jun, JI Wan-Sheng, ZHOU Shao-Juan, CHEN Zheng, ZHANG Xue-Yong, FAN Dai-Ming (Department of Clinical Oncology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China).

Abstract The expression vector, pET21-CEA-streptavidin was constructed which contains the gene of single chain antibody of CEA (ScFv) and the streptavidin. Constructed vector was expressed by

Escherichia coli. The results showed that such protein was successfully prepared and its bispecific activities were testified by affinity blot and Western blot. The biotin binding and immunocytochemistry assay indicated that the expressed fusion protein was

capable of binding biotin molecule and CEA antigen respectively. This protein has the potential application when combined with the corresponding tests.

Key words single chain antibody, fusion protein, gene expression

肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体的流式细胞分析

李文新 张荣军 谭 成 陶永辉 金 坚

(江苏省原子医学研究所, 核医学国家重点实验室, 无锡 214063)

摘要 建立肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 的流式细胞分析方法 (FCM), 对正常及损伤鼠肝细胞、肝癌细胞 (BEL-7402) 表面的 ASGPR 作同步比较分析. 以异硫氰酸荧光素标记的新半乳糖白蛋白 (FITC-NGA) 为 ASGPR 的特异性配体, 以培养的正常肝细胞 (L-02) 为靶细胞, 建立肝细胞表面 ASGPR 的 FCM. 测定并计算正常及损伤鼠肝细胞, BEL-7402 细胞与同一浓度的 FITC-NGA 同步反应后的平均荧光强度 (MIF) 值. FITC-NGA 与 L-02 细胞表面 ASGPR 趋近饱和结合的浓度为 0.4 mg/L, 该浓度下正常及损伤鼠肝细胞, BEL-7402 细胞的 MIF 值分别为 228.7、5.81、1.13. 该结合可以被至少 50 倍于 FITC-NGA 的 NGA 或 10 mmol/L 的 EDTA 完全抑制. FCM 能够良好地揭示 FITC-NGA 同 ASGPR 之间的受配体结合特性. 该方法证实 BEL-7402 细胞表面几乎没有 ASGPR, 损伤鼠肝细胞表面 ASGPR 的数量较正常鼠肝细胞显著减少.

关键词 肝细胞, 新半乳糖白蛋白, 去唾液酸糖蛋白受体, 流式细胞分析, 荧光强度

学科分类号 Q24

去唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 是一种完全由肝细胞表达的膜表面蛋白. 它能够识别带有半乳糖残基的糖蛋白并将这些循环系统中潜在的毒性物质经受体介导的胞吞作用加以清除. 作为肝细胞特有的, 且在肝细胞表面大量存在的膜受体, 其数量的多寡、功能的好坏直接反映出肝细胞的正常与否^[1]. 体内受体显像及体外放射配体结合实验均证实, 经半乳糖修饰的人血清白蛋白——新半乳糖白蛋白 (NGA) 能够被 ASGPR 识别并为之特异性结合, 是理想的 ASGPR 配体^[2,3]. 流式细胞技术 (FCM) 是一种简单、快速的细胞分析技术, 它最大程度地保证了细胞的完整性, 为细胞膜受体的分析提供了适宜的条件^[4]. 本文用异硫氰酸荧光素标记的 NGA (FITC-NGA) 作为标记配体, 以 L-02 为靶细胞, 建立了肝细胞表面 ASGPR 的 FCM; 并利用 FCM 能够对大量细胞进行逐个监测, 对不同细胞进行同步分析的特性, 对正常鼠肝细胞, 损伤鼠肝细胞及肝癌细胞 (BEL-7402) 表面的 ASGPR 进行了同步比较分析.

1 材料与方法

1.1 材料

肝细胞 (L-02) 和肝癌细胞 (BEL-7402) 由中国科学院上海细胞生物研究所提供; RPMI1640 培养液为 GIBCO 产品; SD 大鼠由本所实验动物中心提供 [动物环境及质量合格证号为苏动 (环) 97020、苏动 (质) 97028]; Ficoll 分离液由中国医学科学院天津血液病研究所提供; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 为 Sigma 公司产品; PD-10 柱为 Pharmacia 公司产品; NGA 冻干品由本室合成^[5]; 人血清白蛋白 (HSA) 由无锡市血站提供; 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 NGA 和 HSA 的荧光标记

以 100 mmol/L 的碳酸盐缓冲液 (pH 9.0) 分别溶解 FITC 和 NGA (或 HSA), 按摩尔比 3:1 混合, 37℃ 振荡反应 50 min, PD-10 分离,

Tel: (0510) 5514482-3532, E-mail: jsnm@public1.wx.js.cn

收稿日期: 1999-07-02, 修回日期: 1999-11-03