

Screening the Candidates of Tumor Suppressor Genes in Human Carcinoma by cDNA Representational Difference Analysis. ZHAN Feng-Huang, JIANG Ning, CAO Li, DENG Long-Wen, ZHOU Ming, XIE Yi, ZENG Zhao-Yang, LI Gui-Yuan (*Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078, China*).

Abstract Using cDNA from normal human primary cultures of nasopharyngeal epithelial cells as tester amplicon and cDNA from nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line HNE1 as driver amplicon, four differential cDNA fragments were isolated by cDNA representational difference analysis (RDA). While these differential cDNA fragments were hybridized to

amplicons by DNA blot, it was found that they really came from the tester amplicon. In addition, RNA blot also revealed that the differentially expressed fragments were not expressed or down-regulated in the NPC HNE1 cells; and sequence analysis also indicated that those differentially expressed fragments may include tumor suppressor gene relative to NPC. Therefore, it shows that the cDNA RDA is an effective, sensitive and specific method for screening the candidates of tumor suppressor gene.

Key words nasopharyngeal carcinoma, tumor suppressor gene, cDNA representational difference analysis (RDA)

大肠杆菌表达的单链抗体柱复性的研究*

朱迎春 王 琰 高荣凯 刘群英 化 冰 陈宇萍

(海军总医院中心实验科, 北京 100037)

摘要 对包含体表达的抗乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 的单链抗体 (ScFv) 纯化复性进行了探索. 尝试了利用金属螯合亲和层析和凝胶层析柱进行柱上在位复性的可行性. 对包含体表达的 ScFv 进行透析复性与柱复性, 比较其相对复性率及蛋白质回收率, 发现柱上复性效果优于传统的透析复性. 抗 HBsAg ScFv 经凝胶色谱 Sephacyl S-200 柱复性的相对复性率为 98%, 蛋白质回收率为 81%. 由于将纯化复性同步进行, 简化了操作程序, 提高了产品的回收率.

关键词 单链抗体 ScFv, 包含体, 纯化, 复性

学科分类号 R392

单链抗体 (single chain Fv, ScFv) 是由抗体重链可变区 V_H 和轻链可变区 V_L 通过一段连接肽连接而成的重组蛋白质. 由于其分子质量小, 穿透力强, 免疫原性低, 利于基因工程操作等特点, 具有良好的应用前景. 近年来国内外学者对单链抗体进行了大量研究. 本室构建了抗乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 的 ScFv, 并在大肠杆菌表达体系中以包含体形式获得高效表达^[1, 2], 由于包含体为没有活性的变性蛋白质, 其纯化和复性是大量制备 ScFv 的重要环节. 传统的稀释透析复性方法对包含体蛋白质的复性效率较低, 操作复杂, 限制了生物技术的开发应用. 为此我们对包含体表达的抗 HBsAg ScFv 的柱上在位复性进行了探索. 变性溶解的包含体 (抗 HBsAg ScFv) 可直接经凝胶色谱 Sepha-

cyl S-200 进行柱上在位复性, 其相对复性率为 98%, 蛋白质回收率为 81%. 这种将纯化和复性结合在一起的柱上复性方法简化了操作程序, 提高了蛋白质的回收率, 具有很好的应用前景.

1 材料和方法

1.1 仪器

快速蛋白质液相色谱仪 (FPLC) (Pharmacia 公司).

1.2 实验材料

菌株质粒, 大肠杆菌 BL21 (DE3) 为本室保

* 国家 863 计划 (863-102-09-02-01) 和全军医药卫生重点项目 (96Z004) 资助.

收稿日期: 1997-12-15, 修回日期: 1998-04-24

存, 抗 HBsAg ScFv 表达质粒 pT7SCM 为本室构建^[2], 本载体所表达的 ScFv 羧基端带有一个可被 9E10 单抗识别的 c-Myc 十肽。9E10 单抗: 本室自制。Sephacryl S-200: Pharmacia 公司。金属螯合亲和层析介质由本室自制^[3]。缓冲液 A: 50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 0.5% Triton, pH 8.3; 缓冲液 B: 100 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.3; 缓冲液 C: 10 mmol/L 咪唑, 100 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.3; 缓冲液 D: 50 mmol/L 咪唑, 100 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.3; 缓冲液 E: 0.1 mmol/L 尿素, 100 mmol/L Tris-HCl, 0.25 mol/L NaCl, pH 8.3。

1.3 实验方法

1.3.1 抗 HBsAg ScFv 的表达及包含体变性: 将转化了重组质粒 pT7SCM 的 BL21 (DE3) 细菌于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37℃ 过夜培养, 然后以 1:20 的比例接种于相同的培养基中, 于 37℃ 生长至 $A_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 。加入 IPTG 至 1 mmol/L, 37℃ 继续培养 4~5 h 后, 离心收集上清 (含有功能性 ScFv) 备用。细菌沉淀以 10 ml/g 菌的比例悬浮于 A 溶液中, 冰浴超声破碎 10 s, 间隔 30 s 共 6 次, 离心收集沉淀 (14 000 r/min, 20 min)。将沉淀用 A 溶液洗涤三次后, 以 10 ml/g (湿重) 的比例分别溶于含 2 mol/L 尿素、4 mol/L 尿素、6 mol/L 尿素、8 mol/L 尿素、8 mol/L 尿素 + 0.01 mol/L NaOH 以及 6 mol/L 盐酸胍的 B 溶液变性剂溶解此包含体。经 SDS-PAGE 电泳观察其变性效果。

1.3.2 抗 HBsAg ScFv 的纯化复性:

a. 透析复性: 包含体经超声破碎后用变性液溶解过夜, 离心后取上清经铜金属螯合亲和层析柱进行纯化, 柱子先用含 6 mol/L 尿素的 B 溶液平衡, 样品用含 6 mol/L 尿素的 B 溶液稀释后上柱, 用 10 倍柱体积的相同缓冲液清洗, 再用 10 倍柱体积含 6 mol/L 尿素的 C 液清洗后, 用含 6 mol/L 尿素的 D 液洗脱样品。所得样品对含 3 mol/L 尿素 0.5 mol/L 精氨酸的 B 液透析过夜, 再对 E 液透析 1 d。

b. 金属铜螯合亲和层析柱在位复性: 金属铜螯合亲和层析柱用含 6 mol/L 尿素的 B 液平衡, 将样品用同样缓冲液 4 倍稀释后上柱, 用 10 倍柱体积的 B 液清洗, 再用 10 倍柱体积含 6 mol/L 尿素的 C 液清洗, 然后逐步降低尿素的浓度流过柱子, 最后用含 0.1 mol/L 尿素的 D 液洗脱。

c. 凝胶色谱柱复性: 装好 Sephacryl S-200 柱后, 先用标准分子质量蛋白质 (Pharmacia 公司产品) 确定不同分子质量蛋白质的流洗峰位置, 然后用 E 液平衡 Sephacryl S-200 柱, 按柱床体积 5% 上载变性的样品, 用快速蛋白质液相色谱仪 (FPLC) 控制流速 0.2 ml/min, 用 E 液洗脱, 按 1 ml/管自动收集洗脱液, 对各洗脱峰进行活性及纯度检测。

1.3.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 将收集的洗脱液用 10% 三氯醋酸沉淀浓缩后, 在 12% 的凝胶中进行电泳, 考马氏亮蓝染色观察结果。

1.3.4 ELISA 测活: 用 HBsAg 包被酶标板, 1% 的 BSA 封闭后, 加入 50 μ l 待测样品, 37℃ 孵育 1 h, 加入 9E10 单抗, 37℃ 孵育 1 h, 加入 HRP-抗鼠 IgG, 最后用 OPD 底物显色, 酶标仪测 A 值。

1.3.5 相对复性率的计算: 为比较几种复性方法的复性率, 我们用大肠杆菌分泌表达的功能性 ScFv 作为参照品, 将 1.3.1 所收获的含功能性 ScFv 培养上清用硫酸氨沉淀后经铜金属螯合亲和层析法纯化^[3]。纯化后的样品经 SDS-PAGE 定量 (用系列已知量人血清白蛋白为标准进行定量), 然后分装冻干保存。在 ELISA 时以其作为标准品, 计算其相对比活 (A 值每微克蛋白), 同时测出复性样品的相对比活, 则可推算出样品的相对复性率: 相对复性率 = 样品相对比活 / 标准品相对比活 $\times 100\%$ 。

2 结 果

2.1 抗 HBsAg ScFv 的变性

对不同变性条件进行了比较观察, 将包含体以 10 ml/g (湿重) 分别悬浮于含 2 mol/L 尿素、4 mol/L 尿素、6 mol/L 尿素、8 mol/L 尿素、8 mol/L 尿素 + 0.01 mol/L NaOH 或 6 mol/L 盐酸胍的 B 液中溶解过夜, 离心后将上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析其变性效果 (图 1)。结果显示, 2 mol/L、4 mol/L 尿素不能溶解此包含体, 6 mol/L 尿素只能溶解 40%, 8 mol/L 尿素可溶解 75%, 而 8 mol/L 尿素加 0.01 mol/L NaOH 可溶解 90% 包含体。6 mol/L 盐酸胍组虽未成功进行 SDS-PAGE, 但在实验操作中发现 6 mol/L 盐酸胍变性效果很好。

2.2 抗 HBsAg ScFv 的纯化及复性

2.2.1 透析复性和金属螯合亲和层析柱复性:

透析复性: 变性溶解后的抗 HBsAg ScFv 经铜金属螯合亲和层析柱纯化一次后进行分段透析复

性. 测其 ELISA 活性及 SDS-PAGE 电泳定量, 所获得复性抗 HBsAg ScFv 蛋白质的相对复性率 19%, 蛋白质回收率 16% (表 1). 采用 6 mol/L 盐酸胍变性的蛋白质样品透析复性效果不好, 透析样品易聚集形成不溶物, 造成产品的大量丢失.

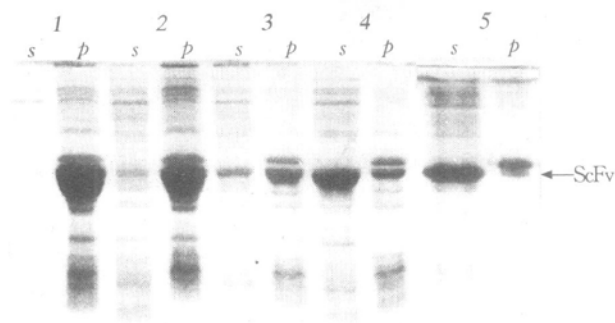


图 1 用不同浓度尿素溶解 ScFv 包含体的 SDS PAGE 分析
1: 2 mol/L 尿素; 2: 4 mol/L 尿素; 3: 6 mol/L 尿素;
4: 8 mol/L 尿素; 5: 8 mol/L 尿素加 0.01 mol/L NaOH.
s: 离心后上清; p: 离心后的沉淀.

铜金属螯合亲和层析柱在位复性: 样品上柱后以浓度逐渐降低的尿素清洗, 发现铜金属螯合亲和层析柱可进行在位复性, 其相对复性率为 22%, 蛋白质回收率为 8%, 蛋白质纯度大于 95% (图 2 和表 1). 与透析法相比无明显优势.

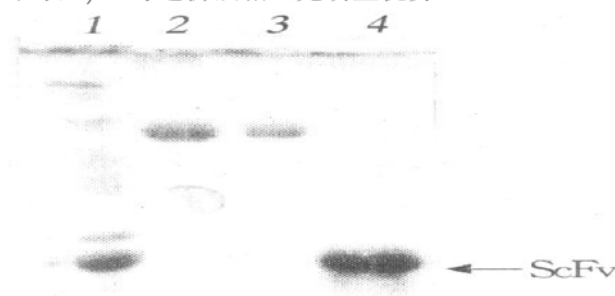


图 2 在 6 mol/L 盐酸胍中变性样品经 Sephacryl S 200 纯化复性的 SDS PAGE 分析
1: 上柱前样品 (上样总量的 1/20); 2: 4 μg 人血清白蛋白;
3: 2 μg 人血清白蛋白; 4: 柱复性后有活性的蛋白质峰 (回收样品量的 1/6).

表 1 三种复性方法的复性效果

	透析法	金属螯合 在位复性	凝胶色谱柱复性 (1.6 cm × 76 cm 柱)
相对复性率 / %	19	22	98
蛋白质回收率 / %	16	8	81

2.2.2 凝胶色谱柱在位复性:

由于金属螯合亲和层析柱在位复性效果不理想, 我们用凝胶色谱柱进行在位复性, 选用 Sephacryl S-200, 对 8 mol/L 尿素加 0.01 mol/L NaOH 和 6 mol/L 盐酸胍两种方式变性的包含体进行柱复性. 将样品直接上经 E 液平衡的 Sephacryl S-200 柱, 并直接用 E 液缓慢洗脱, 发现回收率较低, 并于分子质量大于 ScFv 的回收峰处 (约 60 ku, 相当 ScFv 的二聚体) 检测出无活性的 ScFv. 提示复性不充分, 形成了无活性多分子凝聚体. 我们尝试在上样前后各上柱 2% 柱体积的 6 mol/L 尿素缓冲液, 使上柱的 ScFv 复性在温和及缓慢的条件下进行. 结果经 8 mol/L 尿素加 0.01 mol/L NaOH 变性的样品在此条件下复性率及蛋白质回收率并无明显改善, 而 6 mol/L 盐酸胍变性的样品在此条件下复性率及蛋白质回收率均得到提高 (复性率由 61% 升至 81%, 蛋白质回收率由 16% 升至 34%), 蛋白质纯度大于 95%. 以上操作均应用 0.9 cm × 16 cm 的色谱柱, 换用大色谱柱 (1.6 cm × 76 cm) 进行复性, 发现其相对复性率达 98%, 蛋白质回收率达 81%, 明显高于小色谱柱, 提示大色谱柱有利于 ScFv 的复性.

3 讨 论

在大肠杆菌体系中, 表达的外源蛋白质可占菌体总蛋白质的 10% ~ 30%, 甚至高达 50%. 这样的高产量常使表达出的重组蛋白质相互交联在一起形成包含体. 以包含体形式存在的重组蛋白质的下游技术有很大的特殊性, 它需变性-复性过程成为有功能的可溶性蛋白质. 蛋白质的复性是一非常复杂的过程. 其最主要的问题是: 由于不正确二硫键的形成导致分子错误折叠, 产生不可溶的蛋白质沉淀凝聚物, 造成目的蛋白质及活性的丢失. 为减少分子之间的错误重排, 传统的复性方法是将变性蛋白质浓度降至 ≤10 μmol/L 后对复性缓冲液透析或稀释而达到复性^[6-8]. 透析复性的影响因素很多. 由于每个蛋白质的理化性质差异很大, 某一蛋白质的最佳复性条件, 对其他蛋白质却不适用. 传统的透析复性方法对包含体蛋白质的复性效率较低, 影响了目的蛋白的回收. 柱复性可使分子在复性前保持适当距离以避免分子之间的错误重排^[4,5], 且其所受影响因素少, 重复性好, 操作简便, 节省时间, 有其优越性.

我们对透析法, 金属螯合亲和层析柱和凝胶色

谱柱在位复性的效果进行了比较. 为定量比较几种复性方法的效果, 我们假定分泌型表达的可溶性 ScFv 在大肠杆菌中折叠后具有 100% 的活性, 以此为参照系 (见实验方法 1.3.5), 计算各种复性样品的相对复性率 (表 1). 通过对几种方法的相对复性率, 蛋白质回收率的比较发现; ScFv 在铜金属螯合亲和层析柱可进行在位复性, 但与透析法相比无明显优势. 其相对回收率低于透析法, 蛋白质丢失较多, 原因可能是在用不同浓度尿素的缓冲液长时间流洗过程中蛋白质也随之脱附. 其相对复性率略高于透析法, 远低于凝胶色谱法, 国外有人用铜金属螯合亲和层析柱柱透析的方法对 rh TIMP-2 复性取得了较好的结果^[5], 我们的结果不理想的原因可能是在我们的体系中 ScFv 分子中的聚组氨酸尾巴被固定于柱上限制了分子的自由折叠. 抗 HBsAg ScFv 经凝胶色谱 Sephacryl S-200 可进行柱复性 (相对复性率 98%, 蛋白质回收率 81%, 蛋白质纯度达 95% 以上), 复性效果明显优于前二者. 我们对抗胃癌鼠单抗 3H11 ScFv 包含体应用凝胶色谱法进行柱复性也取得了良好的结果. 凝胶色谱柱复性的成功可能是由于凝胶色谱可使分子在温和的条件下缓慢去除变性剂近似分子的自然重排, 另外凝胶色谱法在纯化复性过程中可使复性分子与错误重排的及多聚体分子分离. 由于其将纯化与复性结合在一起简化了操作程序, 提高了蛋白质回收率, 值得进一步推广应用.

参 考 文 献

- 1 王 琰, 刘群英, 高荣凯, 等 (Wang Y, Liu Q Y, Gao R K, *et al*). 单链抗体 (ScFv) 表达载体的构建及抗 HBsAg 的表达. 中华微生物学和免疫学杂志 (Chinese J Microbiol Immunol), 1997, 17 (1): 68~ 71
- 2 高荣凯, 王 琰, 刘群英, 等 (Gao R K, Wang Y, Liu Q Y, *et al*). 抗乙型肝炎病毒表面抗原单链抗体在大肠杆菌中的高效表达. 中国免疫学杂志 (Chinese J Immunol), 1999, 15 (2): 122~ 123
- 3 朱迎春, 王 琰, 刘群英, 等 (Zhu Y C, Wang Y, Liu Q Y,

- et al*). 重组人 Fab 金属螯合层析法纯化条件的研究. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1997, 24 (2): 136 ~ 139
- 4 Werner M H, Clore G M, Gronenborn A M, *et al*. Refolding proteins by gel filtration chromatography. FEBS letters, 1994, 345 (2): 125~ 130
 - 5 Negro A, Onisto M, Masiero L, *et al*. Synthesis and refolding of human TIMP-2 from *E. coli* with specific activity for MMP-2. FEBS letters, 1995, 360 (1): 52~ 56
 - 6 Zhang H, Lake D F, Barbuto J A M, *et al*. A human monoclonal antimelanoma single-chain Fv antibody derived from tumor-infiltrating lymphocytes. Cancer Research, 1995, 55 (12): 3584 ~ 3591
 - 7 Kurucz I, Titus J A, Jost C R, *et al*. Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv protein from bacterial inclusion bodies. Molecular Immunology, 1995, 32 (17): 1443~ 1452
 - 8 Kipriyanov S M, Dubel S, Breitling F, *et al*. Recombinant single-chain Fv fragments carrying C-Terminal cysteine residues: production of bivalent and biotinylated miniantibodies. Molecular Immunology, 1994, 31 (14): 1047~ 1058

In Situ Refolding of Bacterially Expressed ScFv on Column. ZHU Ying-Chun, WANG Yan, GAO Rong-Kai, LIU Qun-Ying, HUA Bing, CHEN Yu-Ping (Navy General Hospital, Beijing 100037, China).

Abstract Purification and refolding of bacterially expressed anti HBsAg ScFv by means of *in situ* refolding on column were investigated. Three refolding approaches were adopted: dialysis, *in situ* refolding via metal chelated chromatography and via gel filtration chromatography. The relative refolding index and relative recovery of the ScFv inclusion body were compared using the three procedures. The results showed that the refolding on gel filtration column (sephacryl S-200) was far more efficient than the other two approaches, with relative refolding index of 98% and relative recovery of 81%, illustrating the potential of this technique in production of recombinant ScFv.

Key words single-chain Fv (ScFv), inclusion bodies, purification, refolding

PCR 条件及程序改变对抗体库多样性的影响*

田学军 寿成超 孟 麟

(北京医科大学临床肿瘤医院, 北京 100034)

董志伟

(中国医学科学院肿瘤研究所, 北京 100021)

摘要 用家族特异性免疫球蛋白可变区基因引物两两组合分别对轻、重链进行 RT-PCR 扩增. 在不同退火温度下得到了全部轻链及大部分重链 (13/16) 可变区基因. 当先用免疫球蛋白信号肽序列 5'-端引物与未扩出基因 3'-

* 国家“863”高技术项目资助 (编号 86310209). 收稿日期: 1998-03-16, 修回日期: 1998-08-03