

原核表达系统 pET28a(+) 中抗 CD20 微抗体的构建和表达

李东霞 杨 振 潘少坤 周楠楠 宋 菲 曹祥荣

(南京师范大学生命科学学院 江苏省分子医学生物技术重点实验室 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的: 改造 Rituximab 构建包含 VL、VH 和 CH3 的抗 CD20 微抗体 minibody ,并探索诱导其可溶性表达的最佳方法. 方法: 首先通过 overlap PCR 将 Rituximab 的 VL 和 VH 通过 Linker 连接在一起 ,成为单链抗体 ScFv ,再将 ScFv 和人源 IgG1 CH3 通过人源 IgG1 铰链区连成 minibody 的 cDNA. 将其克隆至表达载体 pET28a(+) 中 ,并在大肠杆菌中用 IPTG 诱导表达. 结果: SDS-PAGE 和 Western blot 结果表明 ,抗 CD20 的微抗体基因表达产物分子量约 41.88 kDa ,在 20℃、1.0 mmol/L IPTG 诱导 24 h 时 minibody 的可溶性表达量最大 ,同时还有包涵体形式的蛋白. 可溶性抗体蛋白通过镍柱纯化 ,纯度达到 90.25% ,包涵体经过变、复性获得了高纯度的抗体蛋白. 重组蛋白 minibody 可特异性地被兔抗人 IgG1 单克隆抗体识别 ,并且可特异性结合靶抗原 CD20. 结论: 抗 CD20 微抗体 minibody 基因在此原核表达系统中成功表达 ,为其生物学功能和更好地针对 B 淋巴系统恶性肿瘤的靶向治疗奠定了基础.

[关键词] CD20 minibody 原核表达 大肠杆菌

[中图分类号] R394.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2012)03-0074-07

Construction and Expression of Anti-CD20 Minibody in pET28a(+) of Prokaryotic Expression System

Li Dongxia ,Yang Zhen ,Pan Shaokun ,Zhou Nannan ,Song Fei ,Cao Xiangrong

(Jiangsu Key Laboratory of Molecular and Medical Biotechnology , School of Life Sciences ,
Nanjing Normal University , Nanjing 210046 , China)

Abstract: Objective The research aimed to construct anti-CD20 minibody containing VL ,VH and CH3 ,and to explore the best inducing condition of its soluble protein expression. Method The recombinant minibody cDNA was produced by overlap PCR. A short peptide linker was used to join VL and VH. The human IgG1 hinge region was used to join VH and CH3. The recombinant minibody gene was subcloned into the expression vector of pET28a and expressed in *E. coli* BL21. Result SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the recombinant protein was about 41.88 kDa and the optimized soluble protein expression condition of minibody was 1.0 mmol/L IPTG for 24 h at 20℃ ,the inclusion bodies were found in the precipitation after sonication. The soluble protein minibody was further purified Ni-NTA affinity chromatography ,the yield up to 90.25% ,the highly purity recombinant protein was obtained after a series of steps including inclusion bodies cell lysis ,denaturation ,purification and renaturation. Western blot proved that the recombinant protein anti-CD20 minibody had immunological reactive ability against rabbit anti-human IgG ,and can specific binding CD20 antigen. The successful expressed of minibody in the prokaryotic expression system was helpful for the future study of its biological function and target therapy to the B lymphoid leukemia and B lymphoma.

Key words: CD20 minibody prokaryotic expression *E. coli*

非霍奇金淋巴瘤(Non-hodgkin's lymphoma ,NHL) 绝大多数来源于 B 细胞 ,是最常见的血液系统恶性肿瘤 ,也是威胁人类生命的十大恶性肿瘤之一. NHL 还是我国目前发病率增长速度最快的血液系统恶性

收稿日期: 2012-04-11.

基金项目: 江苏舜唐生物工程有限公司资助项目 ,国家基础科学人才培养基金(J1103507) .

通讯联系人: 曹祥荣 教授 ,博士生导师 ,研究方向: 肿瘤发生与基因治疗分子机制、动物染色体进化与基因组学. E-mail: caoxiangrong@ninu.edu.cn

肿瘤^[1],每年约有 3~4 万人死于该病疾.NHL 患者中,约 85%~90% 是 B 细胞淋巴瘤^[2].CD20 是一种 B 细胞及 B 淋巴瘤细胞上广泛表达的抗原,它的作用尚未完全阐明,可能在 B 细胞生长、激活及钙通道形成和调节^[3-4]中发挥某种功能,干细胞及髓系细胞表面无此抗原表达,故使用抗 CD20 抗体后不会出现明显的造血抑制现象^[5].因此研制抗 CD20 的单克隆抗体就可能专一性地杀伤 B 淋巴瘤细胞,达到更好的治疗效果.

Rituximab(C2B8)是美国基因科技公司研发的,它是以人 CD20 分子为靶点的人-鼠嵌合型 IgG1 免疫球蛋白,通过转染相关基因到中国仓鼠卵巢细胞(CHO)后表达得到的产物^[6].1997 年,它被 FDA 批准用于治疗复发低度恶性或滤泡型淋巴瘤,也是第一个用于肿瘤治疗的抗体.由于其在非霍奇金淋巴瘤及一些自身免疫疾病的治疗中表现出较好的疗效和较低的毒副作用,C2B8 已经成为美国销售额最大的抗肿瘤药物.然而,药物来源和治疗费用问题给患者带来了严重的负担,因此限制了其推广应用,针对此情况有必要探索新的抗体表达系统,并对抗体做适当的改造.Minibody 是一个比较新的抗体改造形式,即抗体 IgG 轻链可变区(VL)、重链可变区(VH)和重链保守区(CH3)通过连接肽(Linker)和重链铰链区连接起来的单链抗体(VL-VH-CH3),其具有中等分子量、且保留了抗体 Fc 受体,既能够有效地与抗原结合、介导 ADCC,在体内的半衰期又相对于 ScFv 较长^[7],为此我们用基因工程的方法将 Rituximab 改造成抗 CD20 的 minibody,并成功地在大肠杆菌中进行了构建和表达,这为更好地针对 B 淋巴系统恶性肿瘤的靶向治疗奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、质粒 pUC19、携带抗 CD20 抗体重链和轻链 cDNA 片段的质粒 pDC316-ATF 均为本实验室保存;大肠菌 BL21、质粒 pET28a(+) 由张双全老师馈赠;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Pyrobest DNA Polymerase、DNA marker、Taq 酶为 TaKaRa 公司产品;割胶纯化试剂盒及质粒提取试剂盒购自 BioMIGA;His 纯化柱为 GE Healthcare 产物;兔抗人 IgG1 单克隆抗体购自博士德公司;氨苄青霉素、卡那霉素购自南京生兴生物科技公司;引物由上海生工合成.

1.2 方法

1.2.1 微抗体(minibody) cDNA 的合成

根据轻、重链可变区基因的酶切图谱及表达载体 pET28a 的酶切位点,设计并合成了用于 VL、VH 和 CH3 基因拼接的引物(表 1).提取重组质粒 pDC316-ATF,用 *Sal*I + *Eco*R I 双酶切消化,得到 717 bp 和 5028 bp 2 个片段,以 717 bp 片段为模板、AT001/AT004 为引物对,高保真酶扩增抗 CD20 抗体轻链可变区 cDNA,即 VL;以 5 028 bp 大片段为模板,分别以 AT002/AT005、AT003/AT006 为引物对,扩增出抗 CD20 抗体重链可变区 cDNA 和抗 CD20 抗体重链恒定区 cDNA,即 VH 和 CH3;分别纯化 VL、VH 和 CH3 3 个片段.以 VL 和 VH 为模板、AT001/AT005 为引物对,高保真酶扩增 ScFv 片段,回收 ScFv 片段;以 ScFv 片段和 CH3 片段为模板、AT010/AT011 为引物对,用高保真酶扩增出 1 147 bp 特异性条带,即为 Rituximab 改造的 minibody 的 cDNA(也即 CDMN).

1.2.2 表达载体的构建

用 *Xba*I + *Hind* III 分别对纯化的 PCR 产物(CDMN)和测序质粒 pUC19 进行双酶切,割胶回收酶切产物,在 T4 DNA 连接酶作用下连接,连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,在 LB(Amp⁺)培养基中筛选培养,利用菌液电泳和 PCR 的方法鉴定,将重组阳性质粒送上海生工测序,并命名为 pUC19-CDMN.用 *Nde*I 和 *Hind* III 分别对表达载体 pET28a(+) 和携带抗 CD20 微抗体的测序质粒 pUC19-CDMN 进行双酶切,割胶回收酶切产物,在 T4 DNA 连接酶作用下连接.经 Kan⁺ 抗性筛选,提取质粒,酶切鉴定,确定其为阳性重组质粒,命名为 pET28a(+) - CDMN.

1.2.3 重组基因的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将重组质粒 pET28a(+) - CDMN 转入感受态细胞 BL21 中,涂在 Kan⁺ 平板上,37℃ 过夜培养,挑取单克隆摇菌,按 1% 接菌,培养至 OD = 0.6~1.0,加入 IPTG 诱导.分别进行 3 组条件实验,先确定 2 个条件不变,探索重组蛋白的最优表达条件.设置 IPTG 浓度梯度为:0 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、1.5 mmol/L,时间梯度为 12 h、24 h、36 h,温度梯度分别为:16℃、20℃、25℃,分别收集菌体,超声破碎,离心,上

清和沉淀分别煮样 进行 SDS-PAGE 电泳. 选取最适的温度、最佳时间点和 IPTG 浓度条件进行大量表达.

表 1 PCR 扩增所用引物

Table1 Primers for the PCR

引物名称	碱基序列
AT001	5'-CTAGTCTAGAAGATCTCAAATTGTTCTCTCCCAGTCT-3'
AT002	5'-GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTTCTCAGGTACAACAGCAGCA-3'
AT003	5'-GCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGAGGGCAGCCCCAGAACCA-3'
AT004	5'-GGAGCCGCCCGCCAGAACCACCACCAGTACGTTTGATTTCAGCTT-3'
AT005	5'-GGTGTGGGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTGTGCGAGGTCGAGAGACGG-3'
AT006	5'-CCCAAGCTTGCATGCTTACTATTACCCGGAGACAGGGAGA-3'
AT010	5'-CTAGTCTAGACATATGCAAATTGTTCTCTCCCAGTCT-3'
AT011	5'-CCCAAGCTTAGATCTTTACTATTACCCGGAGACAGGGAGA-3'

1. 2. 4 蛋白的纯化和变复性

将表达的 200 mL 菌体重悬于 20 mmol/L Tris-cl(pH = 8. 0)、174 μg/mL PMSF 中 ,超声破碎 ,13 000 rpm、4℃、6 min 离心 ,制备上清和沉淀 ,上清用镍柱进行纯化(步骤按说明书) 纯化后的蛋白于 - 20℃ 备用; 沉淀用 PBS 进行重悬 ,超声破碎 6 000 rpm、20℃、20 min 离心 ,弃去上清 ,用 10 mL、2 mol/L 尿素重悬沉淀 ,同时加 15 μL TritonX - 100 ,重悬 8 min ~ 10 min ,6 000 rpm、4℃、20 min ,如此重复 5 次 ,然后分别用 4 mol/L、6 mol/L 尿素重悬沉淀 ,离心、弃上清 ,再用 8 mol/L 尿素重悬沉淀 ,同时加 15 μL TritonX - 100 和 DTT(二硫苏糖醇、1 mmol/L) 于 4℃、30 h; 6 000 rpm、4℃、20 min 离心 ,取上清 ,再加等体积的 8 mmol/L 尿素于透析袋中 ,将透析袋放入复性液 I 中复性 4℃透析复性 30 h; 6 000 rpm、4℃、20 min 离心 ,取上清 ,将透析袋放入复性液 II 中复性 4℃透析复性 30 h; 6 000 rpm、4℃、20 min 离心 ,取上清 ,将透析袋放入复性液 III 中复性 4℃透析复性 3. 5 h; 6 000 rpm、4℃、20 min 离心 ,取上清 ,将透析袋放入复性液 IV 中复性 4℃透析复性过夜; 6 000 rpm、4℃、20 min 离心 ,取上清 ,将透析袋放入复性液 V 中复性 4℃透析复性 3 h ,将透析袋中的液体进行浓缩 ,浓缩后取少量 ,测定蛋白的浓度 ,分装于合适的管中 ,置于 - 20℃ 中保存备用.

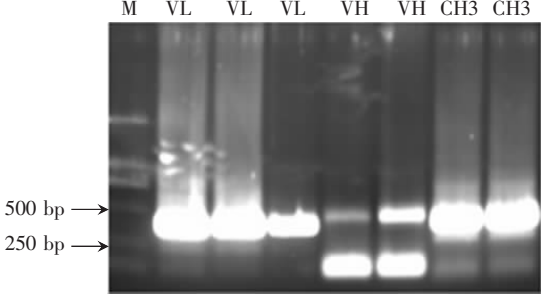
1. 2. 5 Western blotting 鉴定重组蛋白 minibody 的抗原性

将纯化和变复性的蛋白样品于 99℃ 煮 5 min ,使蛋白变性 ,经 SDS-PAGE 电泳后 ,电转膜 220 V、90 min 转移至 PVDF 膜上 ,封闭液封闭 1 h ,TBST 洗涤 3 次 ,每次 10 min . 与兔抗人 IgG1 单克隆抗体共同孵育 2 h ,TBST 洗涤 3 次 ,每次 10 min ,加入显色液 TMB 避光显色 ,观察并拍照.

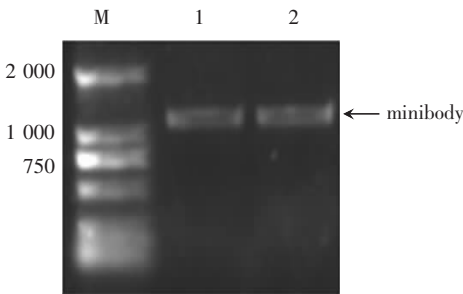
2 结果与分析

2. 1 Minibody 的 Overlap PCR 扩增

酶切质粒 pDC316-ATF ,获得大小分别为 717 bp、5 028 bp 的 cDNA 片段 ,以 717 bp 片段为模板、AT001/AT004 为引物对 ,用高保真酶扩增出抗体的轻链 cDNA 片段 ,即 VL; 以 5 028 bp 片段为模板 ,分别以 AT002/AT005、AT003/AT006 为引物对扩增出抗体的重链可变区和恒定区的 cDNA 片段 ,即 VH、CH3 ,纯化 VL、VH、CH3 3 个片段(如图 1) ,然后以 VL、VH 为模板、AT001/AT005 为引物对 ,高保真酶扩增 ScFv 片段 ,回收此片段; 再以 ScFv 片段、CH3 为模板 ,以 AT010/AT011 为引物对 ,用高保真酶扩增出 1 147 bp 特异性条带 ,为 Rituximab 的 cDNA(CDMN) ,即 minibody(如图 2) .



Minibody 3 个功能区的 PCR 结果
图 1 VL、VH 和 CH3 基因扩增



M. DNA marker DL2000; 1. minibody1#; 2. minibody2#
图 2 Overlap PCR 扩增 minibody

Fig.1 The products of VL、VH and CH3 by PCR amplification Fig.2 The products of minibody by overlap PCR amplification

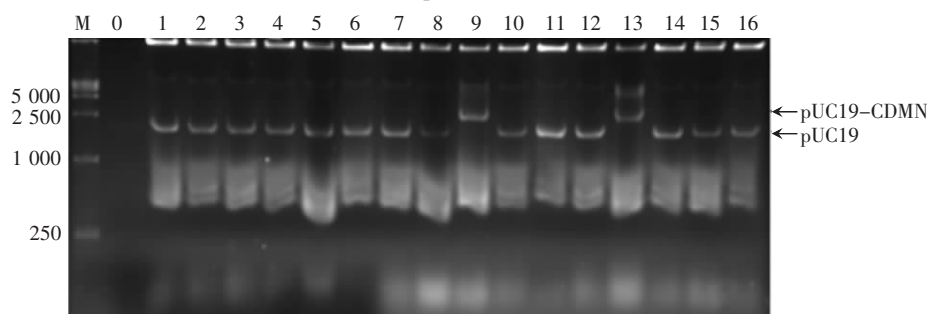


图3 Minibody 结构图

Fig.3 Construction of minibody

2.2 表达载体的构建与鉴定

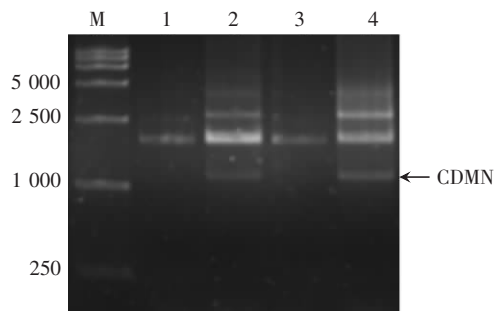
纯化 CDMN PCR 产物和测序载体 pUC19 进行双酶切, T4 连接酶进行连接, 经菌液电泳初筛, 确定 9# 和 13# 为阳性克隆(如图4), 提取 9# 和 13# 重组质粒进行酶切鉴定, 在 1 128 bp 处均有 1 个释放条带, 可以确定为阳性质粒(如图5)。将 9# 重组质粒送上海生工测序, 并命名为 pUC19-CDMN 9#, 将 pUC19-CDMN 9# 和表达载体 pET28a(+) 分别进行双酶切消化, 割胶回收产物, 用 T4 连接酶连接, 经 Kan⁺ 抗性筛选, 提取质粒, 酶切鉴定, 确定其为阳性重组质粒, 命名为 pET28a(+) - CDMN(如图6、7)。



M. DNA marker DL15000; 0. pUC19; 1-16. pUC19-CDMN 1-16#

图4 菌液电泳初筛 pUC19-CDMN 重组质粒

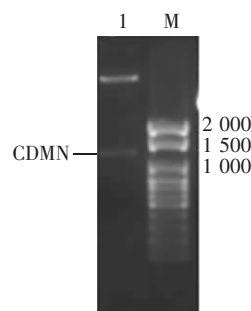
Fig.4 Identification of the recombinant pUC19-CDMN by DNA fragments electrophoresis



M. DNA marker DL15000; 1. pUC19-CDMN 9#; 2. pUC19-CDMN 9#/Nde I + Bgl II; 3. pUC19-CDMN 13#; 4. pUC19-CDMN 13#/Nde I + Bgl II

图5 pUC19-CDMN 酶切鉴定

Fig.5 Enzyme digestion of the pUC19-CDMN



M. DNA marker DL2000; 1. pET28a(+)-CDMN 4#/Xba I + Hind III

图6 pET28a(+)-CDMN 酶切鉴定

Fig.6 Enzyme digestion of the pET28a(+)-CDMN

2.3 重组基因的诱导表达

重组质粒 pET28a(+) - CDMN 在 IPTG 诱导后在 42 kDa 处有一重组蛋白条带。在不同浓度的 IPTG 诱导下发现, 1.0 mmol/L 时可溶性蛋白的表达量是较大的, 然后分别在 1.0 mmol/L 条件下探索最适的温度和时间点。通过设置不同的温度梯度、时间梯度、IPTG 浓度梯度, 发现在温度为 20℃、IPTG 浓度为 1.0 mmol/L、时间为 24h 时可溶性蛋白的表达量最高, 同时还有包涵体蛋白的表达(如图8、9)。

2.4 蛋白的纯化和变复性

在温度为 20℃、IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 的条件下进

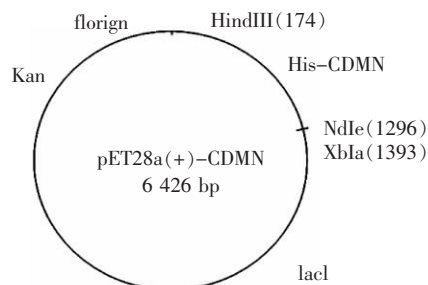
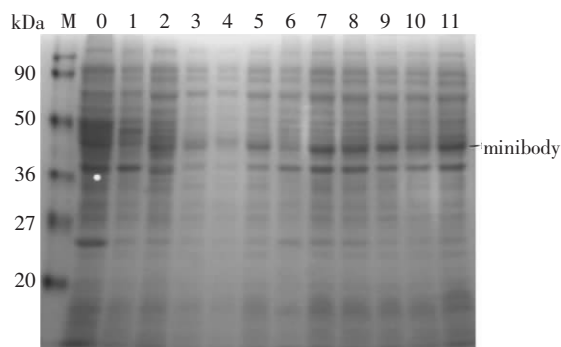


图7 携带微抗体基因的表达式载体

Fig.7 The expression vector harboring gene of minibody

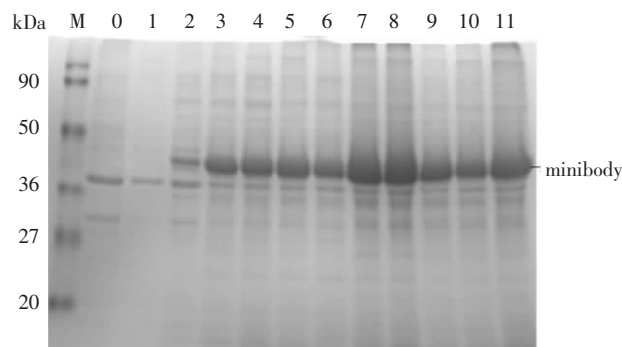
行大量诱导 24 h 收集 200 mL 菌体, 超声破碎, 制备上清和沉淀, 分别进行镍柱纯化和蛋白的变复性, SDS-PAGE 电泳. 将上清中的可溶性蛋白进行镍柱纯化, 取出 200 μ L 纯化后的蛋白、煮样, 进行 SDS-PAGE 电泳. 用软件分析蛋白胶测得 6#、7#蛋白最终纯度分别为 90.25%、63.33% (如图 10); 沉淀中的包涵体形式蛋白进行变复性, 复性后取出 200 μ L 煮样、进行 SDS-PAGE, 条带非常的单一, 最终纯度达到 96% (如图 11).



M. Marker; 0. *E.coli* 上清; 1. pET28 α (+) 上清; 2. 未诱导 pET28 α (+) - CDMN 上清; 3-5. 16 $^{\circ}$ C、1.0 mmol/L IPTG 诱导 12 h、24 h、36 h 上清; 6-8. 20 $^{\circ}$ C、1.0 mmol/L IPTG 诱导 12 h、24 h、36 h 上清; 9-11. 25 $^{\circ}$ C、1.0 mmol/L IPTG 诱导 12 h、24 h、36 h 上清

图 8 不同温度、1.0 mmol/L IPTG 诱导不同时间的可溶性蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳

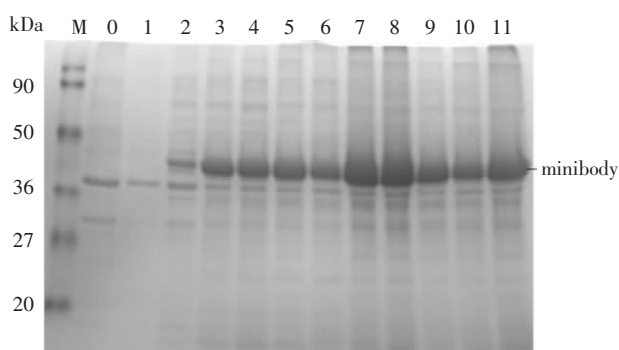
Fig.8 12% SDS-PAGE analysis of soluble protein induced at 1.0 mmol/L IPTG, different temperature and different time



M. Marker; 0. *E.coli* 沉淀; 1. pET28 α (+) 沉淀; 2. 未诱导 pET28 α (+) - CDMN 沉淀; 3-5. 16 $^{\circ}$ C、1.0 mmol/L IPTG 诱导 12 h、24 h、36 h 沉淀; 6-8. 20 $^{\circ}$ C、1.0 mmol/L IPTG 诱导 12 h、24 h、36 h 沉淀; 9-11. 25 $^{\circ}$ C、1.0 mmol/L IPTG 诱导 12 h、24 h、36 h 沉淀

图 9 不同温度、1.0 mmol/L IPTG 诱导不同时间的包涵体进行 12% SDS-PAGE 电泳

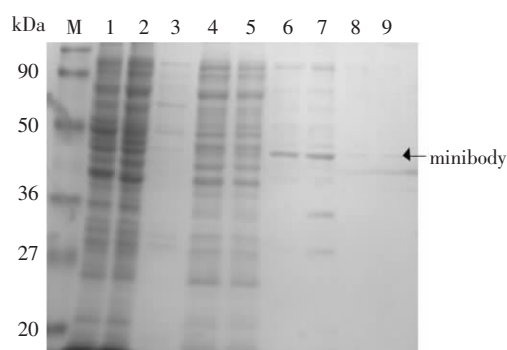
Fig.9 12% SDS-PAGE analysis of inclusion bodies at 1.0 mmol/L IPTG, different temperature and different time



M. Marker; 1: pET28 α (+) 上清; 2-3. 1.0 mmol/L IPTG 诱导 24 h 上清①、③; 4. Binding Buffer 洗脱液洗脱①号管; 5-9. Elution Buffer 洗脱液洗脱①、②、③、④、⑤

图 10 镍柱纯化 12% SDS-PAGE

Fig.10 12% SDS-PAGE analysis of the purified minibody through Ni $^{2+}$ column



M. Marker; 1-3. 2 mol/L 尿素洗涤溶解 3 次上清; 4-5. 4 mol/L 尿素洗涤溶解 2 次上清; 6. 6 mol/L 尿素洗涤溶解上清; 7. 8 mol/L 尿素重悬溶解 24 h 上清; 8. 透析液 1 透析复性上清; 9. 透析液 2 透析复性上清; 10. 透析液 3 透析复性上清; 11. 透析液 4 透析复性上清; 12. 透析液 5 透析复性, 蛋白浓缩上清

图 11 Minibody 变复性 12% SDS-PAGE

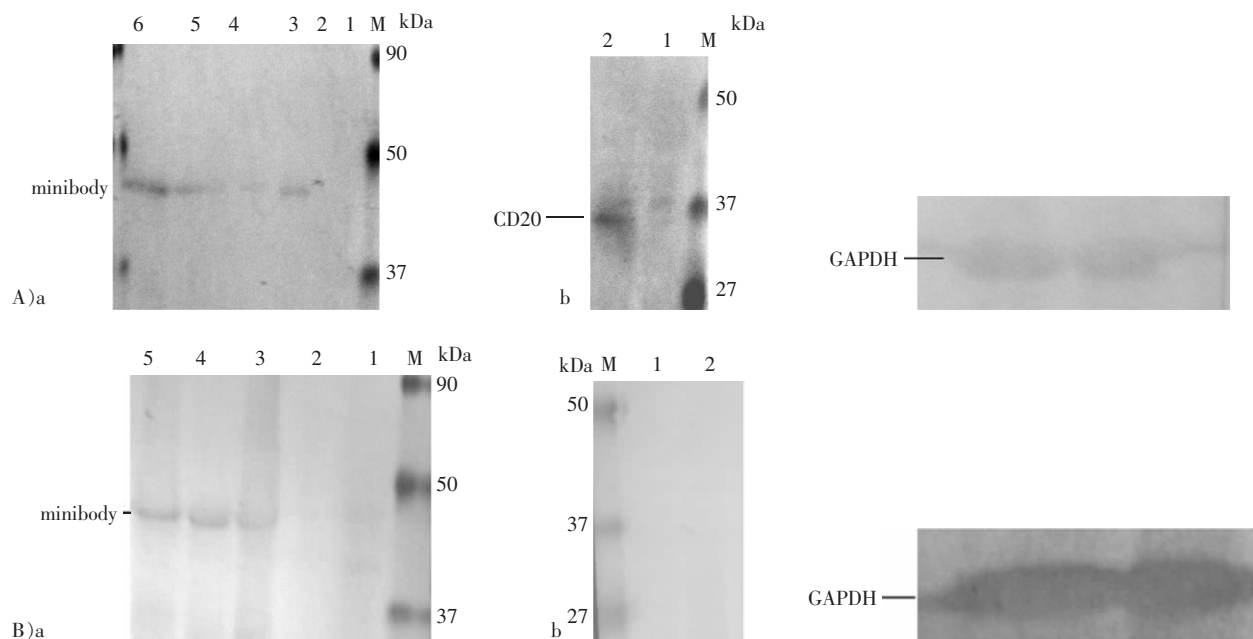
Fig.11 12% SDS-PAGE analysis of minibody after denaturation and renaturation

2.5 Western blotting 鉴定表达出的重组蛋白 minibody

将纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电转移至 PVDF 膜上, 与辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG1 单克隆抗体共同孵育, TMB 避光显色, 进行蛋白印记分析, 结果显示在 42 kDa 处有一明显的蛋白条带, 从而证明 minibody 重组蛋白在大肠杆菌中成功表达, 同时也说明 minibody 重组蛋白具有抗原性. 收集 Jurkat、NAMALWA 细胞蛋白样品, 进行 SDS-PAGE 电泳, 电转移至 PVDF 膜上, 将纯化的抗体做为二抗, 辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG1 单克隆抗体为二抗, 结果显示在 35 kDa 左右有一条明显的条带, 阴性对照无条带, 表明我们纯化的抗体有抗体的活性, 且可与靶抗原特异性结合.

3 讨论

随着分子生物学、免疫学等基础研究和试验技术的不断提高, 新型抗 CD20 单克隆抗体的出现将成为



A) 纯化的重组蛋白的抗原性和抗体活性检测. a.M. Marker; 1. pET28 α (+)上清、0 mmol/L IPTG 诱导 24 h; 2. pET28 α (+)-CDMN 上清 0 mmol/L IPTG 诱导 24 h; 3. pET28 α (+)-CDMN 上清、1.0 mmol/L IPTG 诱导 24 h; 4-6. 纯化重组蛋白①、②、③; b.M. Marker; 1. Jurkat cell (CD20-); 2. NAMALWA cell (CD20+)

B) 变复性重组蛋白的抗原性和抗体活性检测. a.M. Marker; 1. pET28 α (+)沉淀、0 mmol/L IPTG 诱导 24 h; 2. pET28 α (+)-CDMN 沉淀、0 mmol/L IPTG 诱导 24 h; 3. pET28 α (+)-CDMN 沉淀、1.0 mmol/L IPTG 诱导 24 h; 4-5. 变复性重组蛋白

图 12 Western blotting 检测重组蛋白的抗原性和抗体活性

Fig.12 Western blotting analysis to show the specific binding of the minibody protein

今后治疗 NHL 最有效的药物^[8]. 应用基因工程抗体进行肿瘤免疫治疗是当前的研究热点之一, 生物工程类抗体美罗华的临床应用为肿瘤的生物免疫治疗开创了新的局面, 研究表明联合应用美罗华及化疗对于提高 B-ALL 和 B 细胞淋巴瘤 (B-NHL) 患者的临床预后效果明显^[9]. 对 NHL 单药治疗或联合化疗目前在世界范围被认为是最成功的生物治疗方式之一. 然而由于药物来源和治疗费用问题, 给患者带来严重的负担, 因而也会限制其推广应用. 针对此情况有必要探索新的抗体表达系统, 并对抗体做适当的改造. 原核表达系统早已成为成熟的表达系统, 其操作简单、成本低廉, 在抗体片段的表达中已经得到了广泛的使用^[10]. 然而原核表达系统也存在一些缺陷, 大肠杆菌不能对外源蛋白进行糖基化修饰, 同时表达的蛋白也多以包涵体的形式存在. 本实验在 Rituximab 的基础上改造构建了 minibody 微抗体, 它是包括鼠源的 VL、VH, 人的 CH3 及 Linker 和人源 IgG1 铰链区 (如图 3), 它比单链抗体多了 CH3, 因而 minibody 能介导 ADCC (抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用). Linker 序列是由重复的 4 个甘氨酸和 1 个丝氨酸构成的 15 个氨基酸序列的短肽, 其中甘氨酸是分子量最小、侧链最短的氨基酸, 可增加侧链的柔性; 丝氨酸是亲水性最强的氨基酸, 可增加其亲水性^[9]; 铰链区包括 H 链间二硫键, 该区富含脯氨酸、不形成 α -螺旋、易发生伸展及一定程度的转动, 当 VL、VH 与抗原结合时此处发生扭曲, 使抗体上的抗原结合位点更好地与抗原决定簇互补, 由于 CH3 构型发生变化, 活化补体结合组织细胞, 介导 ADCC. 本研究采用了 (GlySer4)₃ 作为弹性连接短肽, 包涵体经复性及透析后所得的 minibody 微抗体表现出良好的稳定性.

本文采用了 pET28a 表达载体进行诱导表达, 其多克隆位点的上游有一个能编码 6 \times His-Tag 序列, 可与下游的表达序列形成融合蛋白, 它通常不影响表达产物的生物学活性, 因此不必通过酶水解来获得目的蛋白. 同时该序列可作为蛋白标签用于目的蛋白的纯化和检测^[9]. 由于蛋白的变复性较麻烦, 且变复性后蛋白的活性有可能受到影响, 所以我们设置温度梯度、时间梯度和 IPTG 浓度梯度摸索表达可溶性蛋白的最适条件. 通过研究发现, 在温度为 20 $^{\circ}$ C、IPTG 为 1.0 mmol/L、时间为 24 h 时 minibody 的可溶性蛋白表达量最大, 同时也有包涵体形式的蛋白. 上清中的可溶性蛋白足以做蛋白纯化, 经过镍柱纯化后获得高纯度的 minibody 微抗体, 纯化后蛋白浓度为 643 μ g/mL. 包涵体蛋白进行变复性处理后蛋白浓度为 150 μ g/mL, 相比上清中的可溶性蛋白浓度要小, 所以诱导蛋白可溶性表达是一个可行的办法. Western blot 结果进

一步表明,重组蛋白在大肠杆菌中被成功诱导可溶性表达,并且纯化的重组蛋白具有抗体的活性,能与靶抗原特异性结合,而变复性的重组蛋白没有抗体活性。综上所述,我们成功构建和诱导可溶性表达了抗CD20微抗体 minibody,为下一步进行 minibody 生物学功能的研究提供了前提,进而为B淋巴瘤和自身免疫疾病的免疫诊断、治疗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] 师明磊, 胡显文, 陈惠鹏, 等. 抗CD20嵌合抗体的表达与活性鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(7): 34-39.
- [3] Riley J K, Sliwkowski M X. CD20: a gene in search of a function[J]. Semin Oncol, 2000, 27(6 Suppl 12): 17-24.
- [4] Du J, Wang H, Zhong C, et al. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab[J]. J Biol Chem, 2007, 282(20): 15 073-45 080.
- [5] 赵江宁, 朱雅丽. 抗CD20单克隆抗体-Rituximab[J]. 白血病. 淋巴瘤, 2004, 13(2): 123-125.
- [6] John R G, Steven S H, Jeffrey T R, et al. An afucosylated anti-CD20 monoclonal antibody with greater antibody-dependent cellular cytotoxicity and B-cell depletion and lower complement-dependent cytotoxicity than rituximab[J]. Molecular Immunology, 2012, 50(3): 134-141.
- [7] Hu S Z, Lousise S, Andrew R, et al. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts[J]. Cancer Res, 1996, 56(13): 3 055-3 061.
- [8] 温宁笑, 袁红梅. 非霍奇金淋巴瘤单克隆抗体治疗的研究进展[J]. 现代诊断与治疗, 2010, 21(4): 221-223.
- [9] 陈森, 饶青, 王健祥, 等. 抗人CD19单链抗体基因的构建、表达及功能测定[J]. 生物工程学报, 2005, 21(5): 686-691.
- [10] Verma R, Boleti E, George A J. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems[J]. J Immunol Methods, 1998, 216(1/2): 165-181.

[责任编辑: 黄 敏]