

· 论 著 ·

## 抗 AEG-1 单链可变区抗体的原核表达及纯化\*

路 蔓, 刘昕阳, 王 琛, 刘 冲, 郜赵伟, 欧阳永日, 龙 敏, 张惠中  
(第四军医大学唐都医院检验科, 西安 710038)

**摘要:**目的 构建抗星形细胞上调基因 1(AEG-1)单链可变区抗体(V23)的原核表达载体,并对表达蛋白进行纯化及免疫活性检测。方法 应用 Primer5 软件设计针对抗 AEG-1 单链可变区抗体基因序列的引物,构建 PRsetC/V23 原核表达质粒,经限制性内切酶 Pst1 酶切以及 DNA 测序鉴定正确后,将原核表达质粒导入大肠杆菌 BL21 中,构建含 V23 基因的原核表达工程菌。经 IPTG 诱导后,用带 His 标签的磁珠纯化目的蛋白,SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白含量,Western blot 及 ELISA 检测抗 AEG-1 单链可变区抗体的免疫活性。结果 构建的原核表达质粒 PRsetC/V23 经单酶切和测序分析显示,构建的 V23 基因与设计序列 100%一致。IPTG 诱导后,SDS-PAGE 电泳显示在  $31 \times 10^3$  处出现一条明显蛋白条带,Western blot 检测在  $80 \times 10^3$  处出现 AEG-1 特异反应条带,ELISA 检测显示阳性结果。结论 成功构建了 PRsetC/V23 原核表达质粒及 V23 原核表达工程菌,该工程菌可表达抗 AEG-1 单链可变区抗体蛋白,且该蛋白具有良好的免疫活性。

**关键词:**星形细胞上调基因 1; 单链可变区抗体; 原核表达

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.01.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)01-0020-03

## Prokaryotic expression and purification of anti-AEG-1 single-chain variable antibody

Lu Man, Liu Xinyang, Wang Chen, Liu Chong, Gao Zhaowei, Ouyang Yongri, Long Min, Zhang Hui zhong

(Department of Clinical Laboratory, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China)

**Abstract:** Objective To construct anti-astrocyte elevated gene-1(AEG-1) single-chain variable antibody (V23) prokaryotic expression vector, and to conduct the protein purification and immunological activity detection. **Methods** The Primer5 software was applied to design the primers aiming at the gene sequence of the antibody anti-AEG-1 single-chain variable region for constructing the prokaryotic expression plasmid of PRsetC/V23. After the enzyme digestion by the restriction enzyme Pst1 and correct DNA sequencing, the prokaryotic expression plasmid was led to E. coli BL21, the prokaryotic expression engineering strain containing the V23 gene was constructed. After the induction with IPTG, the interest protein was purified by the magnetic beads with the HIS tag, and the content of interest protein was determined by the SDS-PAGE electrophoresis. Western blot and ELISA were adopted to detect the immune activity of the anti-AEG-1 single-chain variable region antibody. **Results** For the constructed prokaryotic expression plasmid PRsetC/V23, the single enzyme digestion and sequencing analysis displayed that the constructed V23 gene was completely consistent to the designing sequences. After IPTG induction, SDS-PAGE electrophoresis showed an apparent protein band at  $31 \times 10^3$ , the Western blot detection showed a specific AEG-1 response band at  $80 \times 10^3$ , the ELISA test showed the positive results. **Conclusion** The PRsetC/V23 prokaryotic expression plasmid and the V23 prokaryotic expression engineering strain are successfully constructed, this engineering strain can express anti-AEG-1 single-chain variable region antibody protein, and the protein has good immune activity.

**Key words:** astrocyte elevated gene-1; single-chain antibody variable region; prokaryotic expression

星形细胞上调基因 1(AEG-1)基因最初是在人类免疫缺陷病毒(HIV-1)感染的人胚胎初级星形细胞(PHFA)中发现的<sup>[1]</sup>。Su 等<sup>[2]</sup>于 2002 年采用快速减数杂交法证实 HIV-1 感染后,人胚胎初级星形细胞中有 15 个基因表达上调,命名为 AEG,其中包括 AEG-1。近些年针对 AEG-1 的研究发现,AEG-1 在乳腺癌、食管癌、肺癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中高表达,并且与恶性肿瘤的发生、发展、转移、耐药、血管形成及患者预后等密切相关<sup>[3-9]</sup>,因此,AEG-1 是一个潜在的肿瘤治疗靶点。

单链可变区抗体(ScFv)由抗体可变区重链和可变区轻链通过 15~20 个氨基酸的短肽连接而成,其相对分子质量约为  $25 \times 10^3$ ,仅为完整抗体的 1/6。相对全抗体单链抗体在生物治疗方面的优点体现在:(1)相对分子质量小,容易通过血管壁,容易穿透实体瘤,是导向药物首选的载体;(2)免疫原性弱,

不易引起超敏反应和排斥反应;(3)无 Fc 段,不与非靶细胞的 Fc 受体结合,在影像分析中非特异性少;(4)在体内清除快,造影时对周围组织损伤小;(5)易于构建和表达,易于大批量制备等优点。单链抗体是小分子抗体中的一种,是目前研究最活跃的基因工程抗体之一。

本试验室前期通过杂交瘤技术获得 1 株能稳定分泌抗 AEG-1 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。本研究从抗 AEG-1 单克隆抗体的杂交瘤细胞株中分别克隆抗体轻链、重链编码序列,并通过短肽连接,旨在构建 AEG-1 单链可变区抗体编码序列,并通过原核表达得到具有良好免疫活性的 AEG-1 单链可变区抗体。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 包括原核表达质粒 PRsetC、大肠杆菌 BL21 和 TOP10 菌株。

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81201525)。 作者简介:路蔓,女,检验技师,主要从事临床检验工作。

**1.2 仪器与试剂** 2720 型 PCR 仪由美国基因公司提供, DYY-8C 双稳定时电泳仪由北京六一公司提供, 凝胶图像分析仪由美国 ALPHA 公司提供, UBR4 型干浴器由 Grant 公司提供, THZ-D 台式恒温振荡器由华美生化仪器厂提供, BCD-628WACW 冰箱由海尔公司提供, 超净工作台由富康公司提供, 生化培养箱由永生 YSEI 公司提供, DYCP-40C 半干式碳板转移槽由北京六一公司提供。胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒由 Omega 公司提供, 限制性内切酶 EcoR1 由 Takara 公司提供, DNA Marker 由西安润德公司生物技术有限公司提供, Protein Marker 由 Thermo scientific 公司提供, 山羊抗小鼠二抗及山羊抗兔二抗由中山生物技术有限公司提供。

**1.3 方法**

**1.3.1 AEG-1 单链可变区抗体编码序列的克隆** 上游 5' 端引入内切酶 EcoR1, 下游 3' 端引入内切酶 EcoR1。Prime STAR 体系 PCR 出 V23 目的片段, 全基因序列为 837 pb。

**1.3.2 V23 原核表达工程菌的构建和鉴定** 参照分子克隆试验指南, 将 V23 基因接入原核表达载体 PRsetC 中, 转化 TOP10 菌株, 挑取克隆提取质粒, Pst1 单酶切鉴定阳性克隆并测序正确的 PRsetC/V23 质粒转化到大肠杆菌 BL21 中。鉴定阳性克隆, 命名为 V23-BL21。

**1.3.3 V23 的诱导表达及纯化** 将 V23-BL21 单克隆接种至 3 mL 的氨苄加氯霉素抗性(LB)中, 培养 12~16 h(37 °C 离心 220 r/min)。取 100 μL 转接至 5 mL 的抗性 LB 中, 摇至 OD600 为 0.6 时, 加入 5 μL 的 1 M IPTG, 培养 12 h(28 °C 离心 200 r/min), 离心收集菌体, 200 μL PBS 重悬菌体并进行超声破碎, 离心分离上清液, 沉淀 SDS-PAGE 及 Westernblot 检测蛋白表达。采用 Ni 柱纯化目的蛋白。

**1.3.4 抗 AEG-1 单链可变区抗体免疫活性检测**

**1.3.4.1 ELISA 检测纯化后抗体的免疫活性** 用 AEG-1 蛋白包被 ELISA 板, 4 °C 过夜。A1、A2、A3 为 100 mmol/L 咪唑中纯化出的抗体(1 : 500 稀释); B1、B2、B3 为 PRSETC 空载体菌超声后的上清液; C1、C2、C3 为空白对照。A、B、C 先加入抗 κ 链抗体(1:500 稀释), 再用山羊抗小鼠作为二抗(1 : 5 000 稀释)。D1、D2、D3 为商品化 AEG-1 多克隆兔抗(1 : 500 稀释), 用山羊抗兔作为二抗(1 : 5 000 稀释)。

**1.3.4.2 Western blot 检测纯化后抗体的免疫活性** 收集 A549、HepG2、Hep2、Hela 细胞, 用 D-Hank's 清洗 1 遍; 每管细胞中加入 200 μL 的细胞裂解液和 2 μL PMSF, 4 °C 摇床摇 30 min; 14 000 r/min 离心 15 min 取上清液。将细胞裂解蛋白 A549、HepG2、Hep2、Hela 上样, 用纯化后的 AEG-1 单链可变区抗体作为一抗(1 : 500 稀释), 先加入抗 κ 链抗体(1 : 500 稀释), 再用山羊抗小鼠作为二抗(1 : 5 000 稀释)。

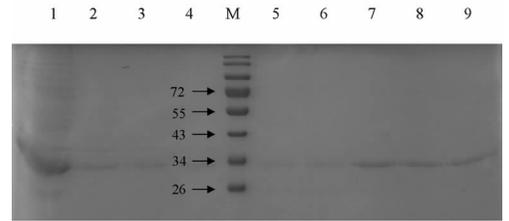
**2 结 果**

**2.1 合成引物及 PCR** VL-EcoR1; 5' CGG AAT TCA TGG ATG TTT TGA TGA CCC AAA CTC C3' VH-EcoR1; 5'CGG AAT TCC TAC CAG GGG CCA GGG GAT AAA CGG GTG CT3' Prime STAR 体系 PCR 出 V23 目的片段, 全基因序列为 837 pb。

**2.2 V23 原核表达工程菌的鉴定** 将 V23 基因插入到原核表达载体 PRsetC 中, 经 Pst1 单酶切和测序分析显示, 构建的 V23 基因与设计序列 100% 一致。

**2.3 V23 的诱导表达及纯化** V23 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达(28 °C 保持 12 h), 菌体超声破碎后, 采用 Ni 柱对目的蛋白进行纯化, 结果显示纯化效果良好, 100 mmol/L 及 200

mmol/L 咪唑可将目的蛋白洗脱, 且目的蛋白纯度高, 纯化的蛋白经过透析除盐后用于后续鉴定, 见图 1。



1: V23 原核表达工程菌超声后上清液; 2: V23 原核表达工程菌超声后上清液过 His 柱流出液; 3: PBS 洗涤; 4: PBS 洗涤; 5: 20 mmol/L 咪唑; 6: 20 mmol/L 咪唑; 7: 100 mmol/L 咪唑; 8: 100 mmol/L 咪唑; 9: 200 mmol/L 咪唑。

图 1 SDS-PAGE 检测目的蛋白纯化效果

**2.4 抗 AEG-1 单链可变区抗体免疫活性检测**

**2.4.1 ELISA 检测纯化后抗体的免疫活性** 采用 ELISA 检测纯化后抗体的免疫活性, 结果显示纯化后抗体具有较好的免疫亲和力, 但是与阳性对照相比, 亲和力还具有一定的差距, 见图 2。

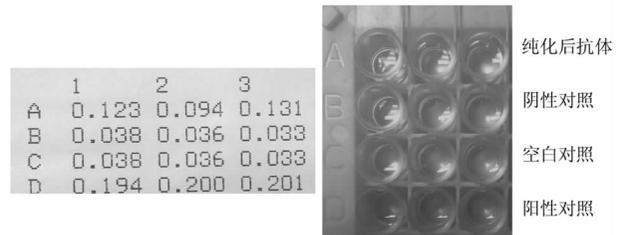
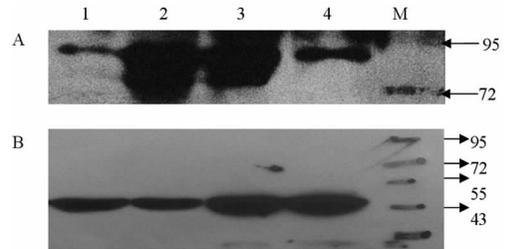


图 2 纯化后抗体 ELISA 结果(490 nm 比色结果)

**2.4.2 Western blot 检测纯化后抗体的免疫活性** 收集 4 种肿瘤细胞蛋白, 以纯化后的抗体作为一抗, Western-blot 结果显示条带单一, 表明纯化后的抗体具有良好的特异性, 可特异性的识别细胞蛋白中的 AEG-1 蛋白, 见图 3。



A 图: AEG-1 蛋白大小在 80 左右。1: A549 细胞裂解蛋白; 2: HepG2 细胞裂解蛋白; 3: Hep2 细胞裂解蛋白; 4: Hela 细胞裂解蛋白; B 图: A549、HepG2、Hep2、Hela 为 4 种细胞 β-actin 结果。

图 3 肿瘤细胞蛋白 Western blot 结果

**3 讨 论**

AEG-1 在乳腺癌、食管癌、肺癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中高表达, 并且与恶性肿瘤的发生、发展、转移、耐药、血管形成及患者预后等密切相关。AEG-1 通过 NF-κB 途径增加黏附分子的表达, 从而增强肿瘤细胞的侵袭性<sup>[10]</sup>。因此, AEG-1 可以作为潜在的肿瘤治疗靶点。

近些年来, 抗体治疗逐渐成为肿瘤治疗研究的热点, 然而完整抗体的相对分子质量较大, 体内应用时难以穿越血管进入靶部位。单链可变区抗体则不存在这些问题, 具有良好的应用前景。本研究成功制备了高纯度的 AEG-1 单链可变区抗体, 经过 ELISA、Western blot 检测, 此单链可变(下转第 24 页)

独使用 CA125 或 SMRP,敏感性、特异性进一步得到提高。

综上所述,为了提高卵巢癌诊断的敏感性和特异性,可以联合检测组织和血清中的 CA125 及 SMRP,其对于卵巢癌病情的监测、患者的早期诊断及治疗效果的评估具有重要意义。

参考文献

[1] Chase DM, Wenzel L. Health-related quality of Life in ovarian Cancer patients and its impact on clinical management[J]. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, 2011, 11(4): 421-431.

[2] Abdel-Azeez H, Labib H, Sharaf SM et al HE4 and mesothelin: novel biomarkers of ovarian carcinoma in patients with pelvic masses[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11(3): 111-116.

[3] Chang K, Pastan I, Willingham M. Frequent expression of the tumor antigen CAK1 in squamous-cell carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2011, 51(6): 548-554.

[4] Scholler N, Fu N, Yang Y, et al. Soluble member(s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 96(2): 11531-11536.

[5] Schneider J, Hoffmann H, Dienemann H, et al. Diagnostic and prognostic value of soluble Mesothelin-Related proteins in patients with malignant pleural mesothelioma in comparison with benign asbestosis and lung Cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(11): 1317-1324.

[6] Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(2): 402-

408.

[7] Zheng SJ, Li YN. Toxicariocide a inhibits SGC7901 proliferation, migration and invasion via NFkB signaling[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(14): 1602-1609.

[8] 刘日旭,刘希龙,刘明开. 血清糖类抗原 125、糖类抗原 72-4 和糖类抗原 19-9 联合检测对卵巢癌的诊断价值[J]. *中国医疗前沿:上半月*, 2010, 5(15): 64-65.

[9] 徐凤亮,吴鹏,徐日. 血清肿瘤标记物与卵巢良恶性肿瘤的相关性分析[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013(6): 2407-2410.

[10] Beyer HL, Geschwindt RD, Glover CL, et al. MESOMARK (TM): A potential test for malignant pleural mesothelioma[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(4): 666-672.

[11] McIntosh MW, Drescher C, Karlan B, et al. Combining CA125 and SMR sera markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 95(1): 9-15.

[12] Rump, Geschwindt RD, Glover CL, et al. MESOMARK: a potential test for malignant pleural mesothelioma[J]. *Clin Chem*, 2012, 53(4): 666-672.

[13] Tajima K, Hiram M, Shiomi K, et al. ERC/mesothelin as a marker for chemotherapeutic response in patients with mesothelioma [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(6B): 3933-3936.

[14] Hassan KA, Sampson ML. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 12(2): 447-453.

(收稿日期:2014-11-18)

(上接第 21 页)

区抗体具有免疫活性,已经申请专利。由于 AEG-1 蛋白在多种恶性肿瘤细胞中高表达,因此 AEG-1 单链可变区抗体不仅具备了单链可变区抗体的相对分子质量小、易透过血管壁、清除快等优点,还具备可与大多数肿瘤细胞结合的特性。以 AEG-1 单链可变区抗体作为载体,连接放射性核素、生物毒素、药物等就可以靶向性的杀伤肿瘤细胞<sup>[11]</sup>,并且在 AEG-1 SCFV 上标记上 FITC 就能准确定位肿瘤细胞的位置,因此本研究为 AEG-1 单链可变区抗体在肿瘤早期诊断、示踪及治疗的应用提供了一定的理论基础。

当然,本研究中制备的 AEG-1 单链可变区抗体的敏感性相比全链抗体还有一定的差距。因此,笔者将在后续的研究中继续筛选具有更高特异性和敏感性的 AEG-1 单链可变区抗体。

参考文献

[1] Brack-W ER. Astrocytes: HIV cellular reser voirs and important participants in neuropathogene-sis[J]. *AIDS*, 1999, 13(1): 122.

[2] Su ZZ, Kang DC, Chen Y, et al. Identification and cloning of human astrocyte genes displaying elevated expression after infection with HIV-1 or exposure to HIV-1 envelope glycoprotein by rapid subtraction hybridization, RaSH [J]. *Oncogene*, 2002, 21(22): 3592-3602.

[3] Li J, Zhang N, Song LB, et al. Astrocyte elevated gene-1 is a novel prognostic marker for breast Cancer progression and overall patient survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(11): 3319-3326.

[4] Yu CP, Chen K, Zheng HQ, et al. Overexpression of astrocyte ele-

vated gene-1 (AEG-1) is associated with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) progression and pathogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(5): 894-901.

[5] Song I, Wu J, Zhang H, et al. Over-expression of AEG-1 significantly associates with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small celllung Cancer[J]. *J Pathol*, 2009, 219(3): 317-326.

[6] Liu LP, Wu JE, Ying Z, et al. Astrocyte elevated gene-1 upregulates matrix metalloproteinase-9 and induces human glioma invasion[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9): 3750-3759.

[7] Xia Z, Zhang N, Jin H, et al. Clinical significance of astrocyte elevated gene-1 expression in human oligodendrogliomas [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2010, 112(5): 413-419.

[8] Chen W, Ke Z, Shi H, et al. Overexpression of AEG-1 in rena cell carcin0Ma and its correlation with tumor nuckar grade and progression[J]. *Neoplasma*, 2010, 57(6): 522-529.

[9] Emdad I, Lee SG. Astrocyte elevated gene-1(AEG-1): A multifunctional regulator of normal and abnormal physiology[J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 130(1): 1-8.

[10] Lee SG, Su ZZ, Emdad L, et al. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is a target gene of oncogenic Ha-ras requiring phosphatidylinositol 3-kinase and c-Myc[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(46): 17390-17395.

[11] 徐黎明,任桂萍,尹杰超,等. 基于流式细胞术的 scFv 抗体库筛选技术的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(1): 65-68.

(收稿日期:2014-08-20)