

## 人源抗 Trop-2 抗体 Fab 的制备及条件优化

王小英<sup>1</sup>, 林红<sup>1,2\*</sup>, 张慧林<sup>3</sup>, 仇金荣<sup>1</sup>, 丁贵鹏<sup>1</sup>, 唐小军<sup>1</sup>, 陈汐敏<sup>1</sup>, 唐甜<sup>1</sup>, 刘琼琼<sup>1</sup>, 冯振卿<sup>1</sup>, 朱进<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>江苏省血液中心, 江苏 南京 210042; <sup>3</sup>南京医科大学附属南京妇幼保健院, 江苏 南京 210029; <sup>4</sup>南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002)

**[摘要]** 目的: 探讨人源抗 Trop-2 抗体片段 Fab 在大肠杆菌中的诱导表达, 优化蛋白表达及纯化的条件。方法: 将含有抗 Trop-2 Fab 抗体基因的质粒转化宿主菌 *E.coli TOP10F'* 大肠杆菌, 比较诱导前培养液更换对抗 Trop-2 Fab 片段表达量的影响; 比较不同诱导温度、诱导时间及诱导前加入葡萄糖对蛋白表达的影响; 大量表达的抗 Trop-2 Fab 经亲和层析纯化后, 用免疫荧光和流式细胞术检测其免疫学特性。结果: 在培养液中加入 5 g/L 的葡萄糖, 人源抗 Trop-2 抗体 Fab 片段的表达产量明显增加; 16°C 的诱导温度比其它温度能表达更多的 Fab 分子; 加诱导剂 12 h, 目的蛋白的表达量至峰值。结论: 本实验结果为在原核系统中大量制备抗 Trop-2 抗体片段及后续的肿瘤靶向治疗提供了基础。

**[关键词]** 人源抗 Trop-2 抗体片段; 原核表达; 免疫学检测

**[中图分类号]** Q789

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)01-035-05

## Preparation and optimization of human anti-Trop-2 antibody fragment Fab

WANG Xiao-ying<sup>1</sup>, LIN Hong<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Hui-lin<sup>3</sup>, QIU Jing-rong<sup>1</sup>, DING Gui-peng<sup>1</sup>, TANG Xiao-jun<sup>1</sup>, CHEN Xi-min<sup>1</sup>, TANG Tian<sup>1</sup>, LIU Qiong-qiong<sup>1</sup>, FENG Zhen-Qing<sup>1</sup>, ZHU Jin<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Blood Center of Jiangsu Province, Nanjing 210042; <sup>3</sup>Nanjing Maternal and Child Health Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029; <sup>4</sup>Medical Research Institute of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the induced expression of human anti-Trop-2 antibody fragment Fab in *E.coli TOP10F'* and to optimize the expression and purification conditions of protein. **Methods:** The plasmid containing anti-Trop-2 Fab antibody gene was transformed into *E.coli TOP10F'*. It was tested to replace the culture medium before induction of anti-Trop-2 Fab expression. The effects were compared in different induction temperatures, induction times and glucose added before induction on protein expression. Anti-Trop-2 Fab was purified by affinity chromatography and its immunological characteristics were evaluated by immunofluorescence and flow cytometry. **Results:** In the culture medium by adding 5 g/L of glucose, the expression of anti-Trop-2 Fab significantly increased. The temperature of 16°C can induce more expression of Fab than other temperatures. The expression of anti-Trop-2 Fab reached peak after adding inducer for 12 hours. **Conclusion:** This study provides the basis of large-scale preparations of anti-Trop-2 Fab in prokaryotic expression system and subsequent utilization of anti-Trop-2 Fab in tumor targeted therapy.

**[Key words]** human anti-Trop-2 antibody fragment; prokaryotic expression; immunology detection

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 035-039]

人滋养层细胞表面抗原 2 (human trophoblast cell surface antigen 2, Trop-2) 是一种细胞表面糖蛋白, 属于 TACSTD 基因家族, 它在正常组织低表达

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81101704); 南京市医学科技发展重点项目(ZKX09015)

\*通讯作者, E-mail: linhong712003@yahoo.com.cn; zjsimmons@yahoo.com.cn

或不表达, 而在多种上皮癌过表达, 如乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌等。临床资料表明, Trop-2 的表达水平和肿瘤的侵袭性和转移性呈正相关, 而与患者的预后呈负相关<sup>[1-5]</sup>。Trop-2 不仅与细胞内钙离子浓度和细胞周期蛋白 D1(cyclin D1) 以及磷酸激酶 C 的(PKC)调控有关<sup>[6]</sup>, 同时还可能激活 ERK 途径, 从而调节肿瘤细胞的生长、侵袭和转移<sup>[7,12]</sup>。最新研

究表明, Trop-2 还具有肿瘤干细胞特性<sup>[8,9]</sup>。因此, Trop-2 可能作为许多恶性肿瘤早期诊断及靶向治疗的候选分子<sup>[10]</sup>。全分子抗体组织穿透能力较差, 在血液和非瘤组织的清除速度较慢, 从而导致相对较低的 T/NT 比值, 而 Fab 由于没有 Fc 段, 分子量为 50 000, 是完整 IgG 的 1/3, 具有较好的穿透性和药代动力学特征, 且能较好地保持结合抗原的活性, 因此成为应用较多的一种基因工程抗体类型。Fab 不能与细胞的 Fc 受体结合, 从理论上减少了发生非特异性结合、产生排斥反应的机会; 由于没有 Fc, 在体内半衰期短, 周转快, 有利于放射免疫成像检查肿瘤。和完整抗体相比, Fab 没有抗体依赖的细胞毒作用 (antibody dependent cellular cytotoxicity, AD-CC) 和补体依赖的细胞毒作用 (complement-dependent cytotoxicity, CDC), 可以作为载体分子用于疾病的影像诊断和靶向治疗。本研究利用实验室前期噬菌体抗体库中筛选出的抗 Trop-2 Fab 抗体基因的载体转化大肠杆菌, 逐步优化表达和纯化条件, 制备纯度较高的特异性的抗 Trop-2 Fab 抗体片段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

抗 Trop-2 Fab 抗体基因的原核表达载体由南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室构建并保存。E.coli TOPI0 F' 为美国 Stratagene 公司产品。胰腺癌细胞 BxPc3 为南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室保存<sup>[13]</sup>。细胞培养液为 DMEM 加入 10% FBS, 培养条件为 37℃、5%CO<sub>2</sub>。LB、SB 培养基和抗生素氨苄青霉素及诱导剂 IPTG 均是常规配方。HRP 标记的兔抗羊的抗体和羊抗人 Fab 特异性抗体购自美国 Sigma 公司, Protein L 柱购自美国 Pierce 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组质粒抗 Trop-2 Fab 的转化

将含有抗 Trop-2 Fab 抗体基因的质粒转化 E.coli TOPI0 F' 大肠杆菌, 将转化细菌涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37℃ 孵育过夜。挑单菌落置 2 ml LB 培养液 (含 100 mg/L) 37℃、220 r/min 振荡培养过夜。

#### 1.2.2 宿主细菌生长条件的优化

用 2 ml LB 培养液 (含有 100 mg/L 氨苄青霉素) 1:100 稀释过夜培养物, 平均分成 A、B 2 份, A 含有 5g/L 的葡萄糖, 同时在 37℃、220 r/min 培养,

每 2 h 测光密度 OD<sub>600</sub> 值, 至 OD<sub>600</sub>=1.0 时加入相同浓度 IPTG, 诱导过夜后检测蛋白表达量。

#### 1.2.3 诱导前更换培养基对蛋白表达量的影响

用 2 ml LB 培养液 (含有 100 mg/L 氨苄青霉素) 1:100 稀释过夜培养物, 平均分成 A、B 2 份, 37℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 值=1.0, 对 A 培养物进行 3 500 r/min 离心 5 min, 然后用同等体积的新鲜 LB 培养液 (含有 100 mg/L 氨苄青霉素) 重悬; B 培养物作为对照, 不做处理。在 A、B 培养物中同时分别加入相同终浓度的 IPTG, 37℃ 诱导 6 h, 将诱导菌液分别离心, 沉淀用 PBS 重悬, 分别用 30 s 间歇超声波破碎, 离心, 取超声上清, 进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 做 Western blot 检测, 比较表达量。

#### 1.2.4 温度对蛋白功能性表达的影响

将重组菌接种于 LB 液体培养基, 37℃ 220 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub>=1.0, 加入相同浓度的 IPTG, 分别于 16℃、20℃、25℃、30℃ 振荡培养, 诱导目的蛋白的表达。培养结束, Western blot 检测比较融合蛋白的表达情况。

#### 1.2.5 诱导时间对融合蛋白表达的影响

取对数生长期的重组菌, 以 1:100 的比例接种于 LB 培养基, 37℃ 220 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub>=1.0, 向培养物中加入相同终浓度的 IPTG, 16℃ 220 r/min 振荡培养, 分别于 4、8、12、16 h 取样, 收集菌体, Western blot 检测融合蛋白的表达情况。

#### 1.2.6 抗 Trop-2 Fab 的纯化

将优化条件下诱导的 1 L 菌液离心后取沉淀反复冻融, 用 150 ml PBS 重悬后超声破碎、离心, 取上清, 过滤, 选择 Protein L 柱做亲和层析。

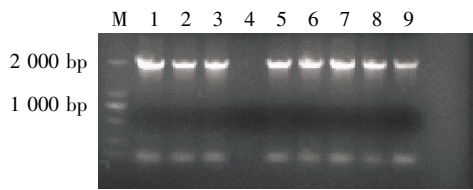
#### 1.2.7 抗 Trop-2 Fab 活性鉴定

FACS (Flow cytometry) 检测抗 Trop-2 Fab 与表达 Trop-2 蛋白的胰腺癌细胞 BxPc3 的结合能力。将 BxPc3 细胞和 NIH3T3 细胞培养、固定后, 用封闭液室温封闭, 同时加入抗 Trop-2 Fab、鼠抗人 Trop-2 IgG, 室温孵育 1 h; 同时加入 Rhodamine 标记的抗人 Fab 抗体和 FITC 标记的抗鼠 IgG 抗体, 室温孵育 1 h, PBST 洗涤后用 DAPI 染色, 用 Leica TCS NT 激光共聚焦显微镜拍照、分析。

## 2 结果

### 2.1 抗 Trop-2 Fab 重组质粒的转化结果

取过夜培养物经菌液 PCR 鉴定, 筛选阳性转化子, 所挑取的 8 个克隆在 1 700 bp 处均可见与抗 Trop-2 Fab 基因片段大小相近的条带 (图 1)。



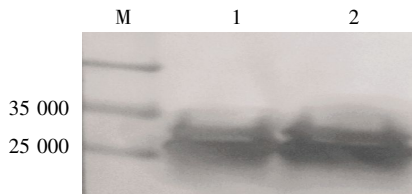
M: Marker; 1-3, 5-9 阳性克隆; 4: 阴参。

图 1 表达载体转化细菌的 PCR 检测

Figure 1 Expression vector transformation of bacteria by PCR detection

### 2.2 诱导前添加葡萄糖对蛋白表达量的影响

在宿主菌的培养物中加入终浓度为 5 g/L 的葡萄糖可明显促进细菌的生长速度,增加目的蛋白的分泌性表达,分别于 28 000 和 32 000 处呈现两条与预期大小相近的蛋白条带(图 2)。



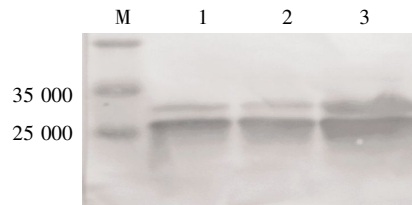
M: Marker; 1: 诱导前不添加葡萄糖; 2: 诱导前添加葡萄糖。

图 2 诱导前在培养基中不添加和添加葡萄糖对 Fab 表达量的影响

Figure 2 The impact of additional glucose before induction on protein expression

### 2.3 诱导前更换培养基对蛋白表达量的影响

经 Western blot 检测,如图 3 所示,诱导前更换培养基使目的蛋白的表达明显增加。



M: Marker 1: 阳参; 2: 未更换培养基; 3: 更换培养基。

图 3 诱导前是否更换培养基对 Fab 表达量的影响

Figure 3 The impact on protein expression by replacement of the medium before induction

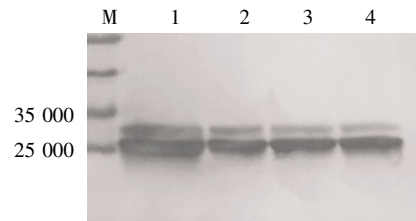
### 2.4 温度对蛋白功能性表达的影响

文献报道,温度对 Fab 的折叠和可溶性表达影响较大<sup>[13]</sup>,分别于 16℃、20℃、25℃、30℃诱导过夜,比较各个温度蛋白表达量的差异。如图 4 所示,在 16℃时抗 Trop-2 Fab 抗体片段有较多的分泌性表达。

### 2.5 诱导时间对融合蛋白表达的影响

一般细菌约 20 min 分裂 1 次,达到峰值之后增殖速度锐减,诱导表达后,代谢有害物质逐渐积累而目的蛋白的表达不再增加。在加入 IPTG 后 12 h

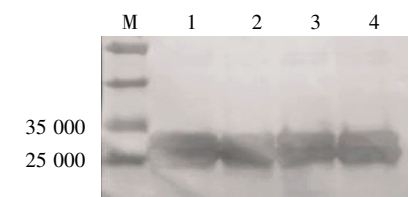
蛋白表达量达到峰值,继续延长诱导时间蛋白表达量无明显增加(图 5)。



M: Marker; 1: 16℃; 2: 20℃; 3: 25℃; 4: 30℃。

图 4 不同诱导温度对 Fab 表达量的影响

Figure 4 The influence of different induction temperatures on the expression of Fab



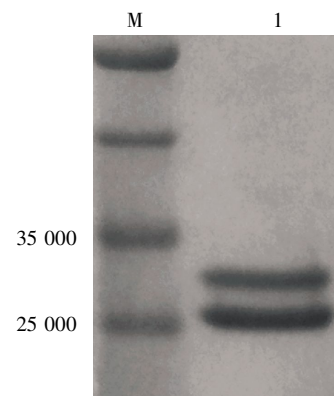
1: 16 h; 2: 12 h; 3: 8 h; 4: 4 h; M: Marker。

图 5 不同诱导时间对 Fab 表达量的影响

Figure 5 The influence of different induction time on expression of Fab

### 2.6 抗 Trop2 Fab 的纯化

纯化产物和流穿 SDS-PAGE 检测结果显示, Protein L 柱亲和层析后得到浓度和纯度均较高的抗 Trop-2 Fab, 产量为 7.6 mg/L(图 6)。



M: Marker; 1: 纯化产物

图 6 抗 Trop-2 Fab Protein L 柱纯化后 SDS-PAGE 检测

Figure 6 Anti-Trop-2 Fab was purified by Protein L affinity chromatography and detected by SDS-PAGE

### 2.7 抗 Trop-2 Fab 的免疫学特性分析

FACS 检测结果显示, 抗 Trop-2 Fab 与表达 Trop-2 的胰腺癌细胞 BxPc3 的结合信号较强, 而与不表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞的结合信号较弱, 提示该抗体能够特异性结合细胞表面天然构象的 Trop-2 蛋白(图 7)。

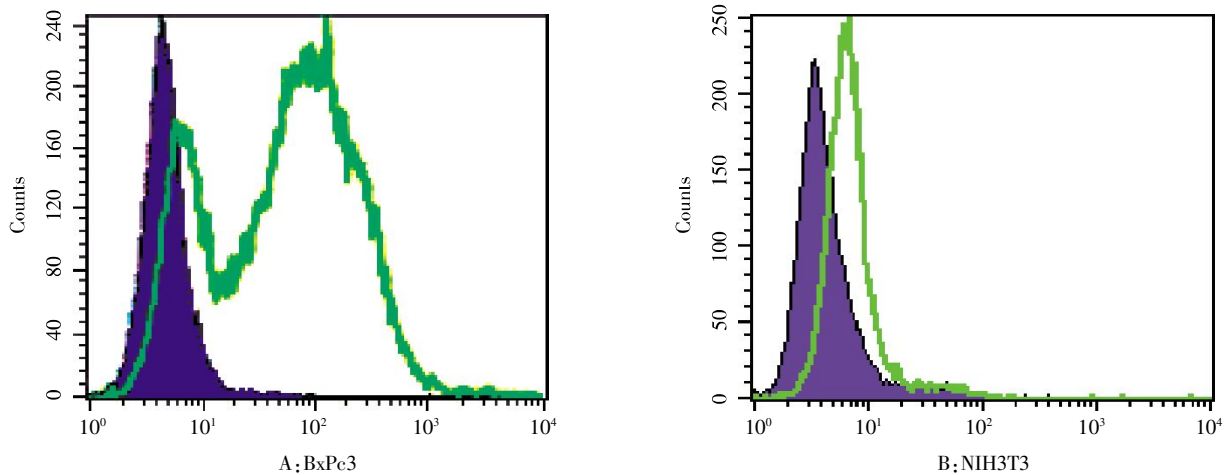


图 7 FACS 检测抗 Trop-2 抗体片段 Fab 与 NIH3T3 细胞、BxPc3 细胞的结合

Figure 7 FACS detection the combination of anti-Trop-2 antibody Fab fragments with NIH3T3 cells and BxPc3 cells

细胞免疫荧光检测结果表明, 抗 Trop-2 抗体 Fab 能够与 BxPc3 结合(红色), 阳性信号主要显示在细胞膜上, 该阳性信号与抗 Trop-2 的商业化的抗体信号(绿色)的位置相互重叠, 而阴性对照细

胞 NIH3T3 基本没有信号。结果表明抗 Trop-2 的 Fab 抗体能够特异性结合于胰腺癌细胞 BxPc3 的细胞膜上的天然构象 Trop-2 蛋白(图 8)。

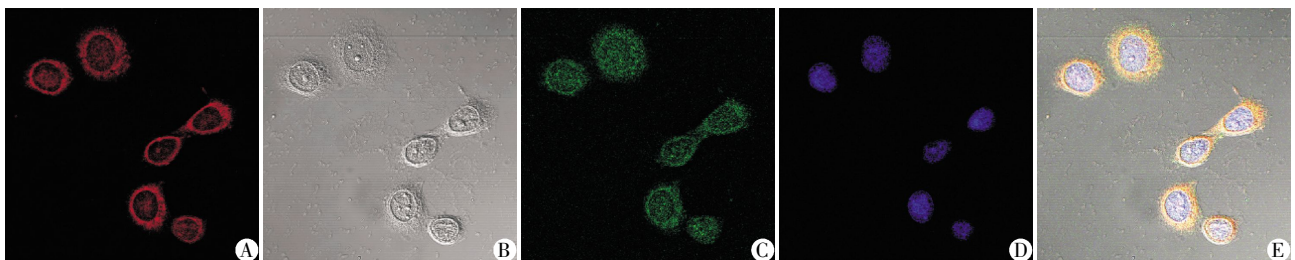


图 8 免疫荧光检测抗 Trop-2 抗体片段 Fab(红色)、商业化的抗 Trop-2 抗体(R&D,绿色)与 BxPc3 细胞的结合

Figure 8 Immunofluorescence detection of anti-Trop-2 antibody fragment Fab(red), commercial anti-Trop-2 antibody(R & D, green) combination with BxPc3

### 3 讨论

人滋养层细胞表面抗原 Trop-2 由 323 个氨基酸构成, 其中信号肽 26 个氨基酸, 胞外区 248 个氨基酸, 跨膜区 23 个氨基酸, 胞质区 26 个氨基酸, 分子量大约为 35 000, 由 Tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD2) 基因编码, 最初发现在人的滋养层细胞表达。Trop-2 在 65%~90% 肿瘤中都有大量表达, 其中包括胰腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫颈癌、卵巢癌和胰腺癌等, 正常人体组织不表达或很少表达, 已有多项研究证明它在肿瘤的发生发展中发挥重要作用<sup>[1-5]</sup>。与前列腺癌和肝脏卵圆细胞的关系及其表现出的干细胞特征, 提示 Trop-2 可能作为肿瘤干细胞的潜在标记, 这一点已在人的前列腺癌中得到证实<sup>[8,9]</sup>。最近研究发现, Trop-2 还可能通过激活 ERK 途径促进肿瘤细胞

的增殖及转移<sup>[7,12]</sup>。临床资料表明, Trop-2 的表达水平和肿瘤的侵袭性和转移性呈正相关而与患者的预后呈负相关<sup>[1]</sup>, 可能作为恶性肿瘤早期诊断的候选分子和分子靶向治疗的靶点<sup>[10]</sup>。

本实验室前期构建的包含抗 Trop-2 Fab 抗体基因其分子特点客观上满足了生物靶向治疗的要求, 但表达和纯化条件对抗体产量和质量的明显影响是其广泛而有效应用于靶向治疗的瓶颈<sup>[14]</sup>。

培养基中添加葡萄糖可以维持原核表达系统中低水平本底表达。当培养细胞到达稳定期时, 葡萄糖会作为第一碳源首先被利用, 而后才是甘油等碳源<sup>[5]</sup>。替代碳源的代谢导致溶原菌中环 AMP (cAMP) 水平提高, 从而刺激转录导致蛋白表达水平的增加, 而且人源 Fab 分子对于宿主细菌来说为异源蛋白, 可能存在一定的毒性, Fab 的本底表达降低了其分裂的速度, 加入葡萄糖可明显提高其生长

状况。随着培养时间的延长,细菌生长会产生大量的酸性产物,使培养基的 pH 值降低,而氨苄青霉素在低 pH 值条件下极易水解<sup>[16]</sup>。这就意味着失去重组质粒的细菌由于没有氨苄青霉素的抑制会快速分裂,其密度逐渐超过重组菌体而最终使得重组蛋白的表达产量下降。而在加入 IPTG 进行诱导之前更换培养液,一方面可去除培养液中  $\beta$  内酰胺酶和调节 pH 值,另外可把氨苄青霉素的浓度恢复到可监控的水平,及时杀死突变的菌株,从而提高重组蛋白的表达产量。

本研究利用实验室前期合成的包含抗 Trop-2 Fab 抗体基因的载体转化大肠杆菌,经过多轮实验,优化了抗 Trop-2 Fab 抗体的原核表达和纯化条件。通过诱导前添加葡萄糖,抑制宿主菌的本底表达,提高了其分裂速度;同时更换培养液使得抗生素浓度始终稳定在一定水平,从而抑制突变菌株的生长,提高了目的蛋白的表达产量。通过对不同诱导温度和时间的比较发现,低温诱导更有利于 Fab 分子的正确折叠和分泌,使轻链和重链的表达趋向于相对平衡。由于抗 Trop-2 Fab 抗体的 L 链为 Kappa 型,能够与 Protein L 特异性结合,Protein L 柱纯化后检测结果显示抗 Trop-2 Fab 抗体的纯度和产量都明显提高,且 FACS 检测结果显示它能够特异性结合细胞表面天然构象的 Trop-2 蛋白,表明该抗体较好的保持了其免疫学活性。抗 Trop-2 人源抗体 Fab 片段原核表达的优化不仅对于进一步探讨 Trop-2 在肿瘤发生发展中的作用有重要意义,同时也为抗 Trop-2 早期诊断抗体的研发和后续的肿瘤靶向治疗提供了技术储备。

#### [参考文献]

- [1] D Fong, P Moser, C Krammel, et al. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(8): 1290-1295
- [2] Fong D, Spizzo G, Gostner JM, et al. TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(2): 186-191
- [3] Mühlmann G, Spizzo G, Gostner J, et al. TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2009, 62(2): 152-158
- [4] Nakashima K, Shimada H, Ochiai T, et al. Serological identification of TROP2 by recombinant cDNA expression cloning using sera of patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int Cancer*, 2004, 112(6): 1029-1035
- [5] Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, et al. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(10): 3057-3063
- [6] El Sewedy T, Fornaro M, Alberti S, et al. Cloning of the murine TROP2 gene; conservation of a PIP2-binding sequence in the cytoplasmic domain of TROP-2 [J]. *Int J Cancer*, 1998, 75(2): 324-330
- [7] Cubas R, Zhang S, Li M, et al. Trop2 expression contributes to tumor pathogenesis by activating the ERK MAPK pathway[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 253
- [8] Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, et al. Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(52): 20882-20887
- [9] Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver[J]. *Development*, 2009, 36(11): 1951-1960
- [10] Wang J, Day R, Dong Y, et al. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(2): 280-285
- [11] Flanagan RJ, Jones AL. Fab antibody fragments; some applications in clinical toxicology [J]. *Drug Saf*, 2004, 27(14): 1115-1133
- [12] Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(4): 396-405
- [13] 林红, 梁洁, 张慧林, 等. 人源抗滋养层细胞表面抗原基因工程抗体 Fab 的制备及特性分析[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(10): 1101-1111
- [14] Humphreys DP, Glover DJ. Therapeutic antibody production technologies: molecules, applications, expression and purification [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2001, 4(2): 172-185
- [15] Grossman TH, Kawasaki ES, Punreddy SR, et al. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability[J]. *Gene*, 1998, 209(1-2): 95-103
- [16] Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures [J]. *Protein Expr Purif.*, 2005, 41(1): 207-234

[收稿日期] 2011-10-24