

前列腺干细胞抗原及其单链抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的表达与检测

尚国富^{1,2}, 刘江丽¹, 于欢¹, 唐开义^{1,2}, 曾柱^{1,2,3}, 胡祖权^{1,2,3}, 王赞^{1,2}

摘要 扩增前列腺干细胞抗原(PSCA)及其特异单链抗体PaFv的编码基因,分别克隆到pET-32a和pDAP2/S载体中,转化大肠杆菌感受态细胞。融合蛋白TrxA-PSCA和PaFv-AP诱导表达后,SDS-PAGE和Western blot分析其表达情况,碱性磷酸酶(AP)显色反应和ELISA检测蛋白的活性。结果显示构建的原核表达体系成功实现TrxA-PSCA和PaFv-AP融合蛋白的可溶性表达,而且PaFv-AP具有与PSCA抗原结合的抗体活性以及AP活性。

关键词 前列腺干细胞抗原; 单链抗体; 碱性磷酸酶; 原核表达; 免疫学检测

中图分类号 R 392.11; Q 786

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)12-1968-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.030

前列腺癌是男性常见的癌症,也是男性癌症死亡三大原因之一^[1]。前列腺癌的患病率在我国呈现迅速上升的趋势,该癌症成为危害我国男性健康的重要疾病^[2]。因此,建立快速、有效的前列腺癌检测技术体系,对于临床诊断和治疗具有重要作用。前列腺干细胞抗原(prostate stem cell antigen, PSCA)是一种糖基磷脂酰肌醇锚定细胞表面蛋白,在前列腺组织中的表达有很高的特异性,其表达水平在前列腺癌组织中显著高于正常前列腺组织^[3]。因此,PSCA被认为是诊断和预后前列腺癌的生物标志物,也是治疗的理想靶点^[3-4]。该研究分别构

建PSCA以及抗PSCA单链抗体(single-chain variable fragment, scFv)与碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)融合蛋白的原核表达体系,大量表达并检测其活性,为后期发展基于融合蛋白的免疫检测技术提供实验支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料 大肠杆菌 BL21(DE3)、大肠杆菌 XL1-Blue、pET-32a 载体及 pDAP2/S 载体由华中农业大学分子生物技术实验室馈赠。pET-32a 载体含有 TrxA 基因, PSCA 基因构建到该载体中可诱导表达重组 TrxA-PSCA 融合蛋白, pDAP2/S 载体含有 AP 基因, PaFv 基因构建到该载体中可诱导表达重组 PaFv-AP 融合蛋白。T4 DNA 连接酶、Taq 聚合酶、RNAase、DNA Marker 购自日本 Takara 公司; Tryptone、Yeast extract 购自英国 Oxoid 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州爱思进生物技术有限公司; BCIP/NBT 显色试剂购自武汉博士德生物工程有限公司; 蛋白 Marker 购自美国 Thermo-Fisher 公司; 抗 His 单克隆抗体、AP 标记羊抗小鼠特异抗体、对硝基苯磷酸二钠(pNPP)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; BCA 蛋白质定量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 PCR 引物 根据 NCBI 数据库中的 PSCA 基因序列,利用 Primer Primer 5.0 软件设计扩增 PSCA 成熟肽序列的引物,引物(表1)由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表1 本研究引物序列表

引物名称	序列(5'-3')
PHisF	ATTAATTCGGATCCCTGCTGTGCTACTCCTG
PHisB	TGCTGCCGCTCGACTTACTGCTGCTGCTGCTGCT GGCATGGCCCCGCTGGCGT
TF	ACGACGACAAGGCCATGGC
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pDAP2-SpeI	TTTCAAGGAGACAGTCATAAT
pDAP2-Sap	GTAAACGGCGAGCA

1.3 PSCA 基因的扩增和 PaFv 基因的合成 培养

2020-06-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:31660258); 贵州省科学技术基金(编号:黔科合支撑[2019]2787号、黔科合基础[2018]1412、黔科合平台人才[2016]5676); 国家级大学生创新创业训练项目(编号:201810660020)

作者单位: 贵州医科大学¹ 生物与医学工程重点实验室/贵州省免疫细胞与抗体工程研究中心、² 基础医学院/生物与工程学院、³ 环境污染与疾病监控省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025

作者简介: 尚国富,男,硕士研究生;

王赞,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: wan-gyun@gmc.edu.cn

胡祖权,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: huzu-quan@gmc.edu.cn

前列腺癌细胞,采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,采用 Oligo(dT) 12-18 引物反转录合成 cDNA,再利用特异引物 PHisF/PHisB 进行 PCR 扩增获得 PSCA 基因。在 50 μ l 反应体系中,分别加入 2 μ l cDNA、PHisF、PHisB 和 dNTPs,5 μ l 10 $\times$ PCR Buffer,0.5 μ l Taq 酶;PCR 扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预处理 5 min;94 $^{\circ}$ C、1 min,55 $^{\circ}$ C、1 min,72 $^{\circ}$ C、80 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C、10 min。取 2 μ l PCR 产物通过 1.2% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测。

为了提高抗 PSCA 单链抗体 PaFv 的原核表达效率,根据大肠杆菌的遗传密码偏爱性,利用 GenSmart Codon Optimization 工具优化 PaFv 的密码子,由金斯瑞生物科技公司合成,同时在基因的 5' 端添加 SfiI 限制酶酶切位点,在 3' 端同时添加 218 连接肽和 NotI 限制酶酶切位点。

1.4 基因克隆与阳性克隆鉴定 用 BamHI 和 XhoI 分别酶切 PSCA 目的基因和 pET-32a 载体,通过琼脂糖凝胶电泳后回收纯化,再在 T4 DNA 连接酶的作用下将目的基因连入载体中,获得可用于原核表达的 pET-32a-PSCA 重组载体。经热激法转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中,涂布于含有 Amp (100 μ g/ml) 的 LB 培养板上,37 $^{\circ}$ C 培养 15 h。挑取单克隆培养并利用载体特异引物 TF/T7t 进行 PCR 扩增检测,根据 DNA 条带大小鉴定阳性克隆,送公司测序验证。

用 SfiI 和 NotI 内切酶分别切割 pDAP2/S 载体的质粒 DNA 和 PaFv 目的基因,通过琼脂糖凝胶电泳回收纯化后,再在 T4 DNA 连接酶的作用下将目的基因连入载体中,获得可用于原核表达的 pDAP2/S-PaFv 重组载体。经热激法转化至 XL1-Blue 大肠杆菌感受态细胞中,涂布于含有 Amp (100 μ g/ml) 的 LB 培养板上,37 $^{\circ}$ C 培养 16 h。挑取单克隆培养并利用载体特异引物 pDAP2-SpeI/pDAP2-Sap 进行 PCR 扩增鉴定,阳性克隆送公司测序验证。

1.5 TrxA-PSCA 融合蛋白的原核表达与纯化 取 20 μ l 甘油保存的重组菌株 BL21(DE3)/pET-32a-PSCA 接种于 20 ml 含 100 μ g/ml Amp 的 2TY 液体培养基^[8] 中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡过夜培养后,取 16 ml 菌液接种至 800 ml 含 100 μ g/ml Amp 的 2TY 培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养使其 OD_{600 nm} 达到 0.4~0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG),继续诱导表达 5 h。超声波破碎提取 TrxA-PSCA 融合蛋白,在 4 $^{\circ}$ C 条件下 8 000 r/min 离心 5

min,取菌液上清液利用 Ni-NTA 基质纯化。纯化后的 TrxA-PSCA 融合蛋白经 BCA 定量试剂盒定量后,取 4 μ g 上样进行 SDS-PAGE 检测。

1.6 PaFv-AP 融合蛋白的原核表达 取 20 μ l 甘油保存的 XL1-Blue/pDAP2/S-PaFv 重组菌液,接种于 20 ml 含有 100 μ g/ml Amp 的 2TY 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床 200 r/min 培养 12 h。取 10 ml 菌液转接到 200 ml 新鲜的含有 100 μ g/ml Amp 的 2TY 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床 200 r/min 培养使其 OD_{600 nm} 达到 0.5~0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导蛋白表达。在 20 $^{\circ}$ C 条件下 200 r/min 诱导培养 14 h。4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,加入 15 ml PBS 缓冲液重悬菌体^[9],经超声波破碎处理后,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液。

1.7 Western blot 分析 取 20 μ l XL1-Blue/pDAP2/S-PaFv 重组大肠杆菌大量表达的总蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳后,利用半干转印仪将凝胶中的蛋白转印到 NC 膜上,放入 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 2 h 后,再用 1:5 000 稀释的抗 His 单克隆抗体室温孵育 2 h,AP 标记的二抗室温孵育 2 h,最后用 BCIP/NBT 显色试剂显色。

1.8 AP 显色反应及 ELISA 检测 PaFv-AP 融合蛋白的活性 原核表达的 PaFv-AP 融合蛋白通过 AP 显色反应快速检测融合蛋白的 AP 活性^[9],再通过 ELISA 反应检测融合蛋白的抗原结合特性。用 PBS 稀释 TrxA-PSCA 蛋白至 20 ng/ μ l,取 100 μ l 加入 ELISA 板孔中,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,PBS 作为空白对照。加入 200 μ l PBS 洗板 3 次后,每孔加入 200 μ l 2% (W/V) BSA 溶液,37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。甩干 ELISA 板中的封闭液,每孔加入 200 μ l PBS 洗板 3 次。随后,每孔加入 100 μ l 表达的 PaFv-AP 融合蛋白(20 ng/ μ l),37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h。用 200 μ l PBST 和 PBS 分别洗涤 3 次后,加入 100 μ l 0.2% (W/V) pNPP 显色液,黑暗条件下反应后用酶标仪在 405 nm 波长下测定 OD 值。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间比较运用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 目的基因的获取 以 cDNA 为模板,利用特异引物通过 PCR 扩增获得 PSCA 目的基因,凝胶电泳检测显示目的片段约 250 bp (图 1A),与预期的大

小一致。另外,根据大肠杆菌的遗传密码子的使用频率,优化抗 PSCA 单链抗体的编码基因,并添加内切酶酶切位点和 218 连接肽,合成 *PaFv* 基因片段,凝胶电泳检测结果如图 1B 所示,目的基因片段与预期的约 850 bp 相一致。

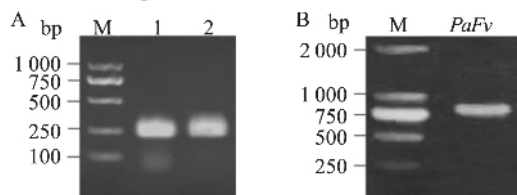


图1 PSCA 基因及 *PaFv* 基因的电泳图

A: PSCA 基因; B: 单链抗体编码基因 *PaFv*; M: DNA Marker; 1、2: PSCA 的 PCR 产物

2.2 原核表达载体的构建 重组载体 pET-32a-PSCA 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 后,随机挑取 5 个单克隆转化子,PCR 扩增结果显示 5 号克隆扩增出的 DNA 条带大小与预期一致(图 2A)。公司测序结果确证 PSCA 基因成功构建到 pET-32a 载体中。重组载体 pDAP2/S-*PaFv* 转化大肠杆菌 XL1-Blue 后,PCR 扩增结果显示 1-3 号克隆扩增出的 DNA 条带清晰明亮(图 2B)。测序结果确证成功获得含有 pDAP2/S-*PaFv* 重组质粒的阳性转化子。

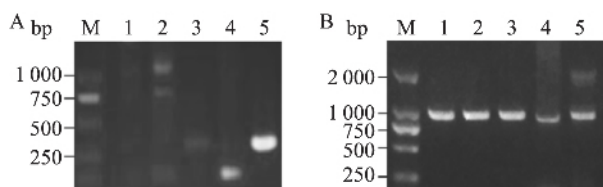


图2 PCR 鉴定阳性转化子

A: pET-32a-PSCA 转化子的鉴定; B: pDAP2/S-*PaFv* 转化子的鉴定; M: DNA Marker; 1-5: 5 个转化子的 PCR 产物

2.3 蛋白的原核表达与检测 重组菌株 BL21(DE3) /pET-32a-PSCA 在 37 °C、200 r/min 条件下,0.5 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h,纯化后获得的 TrxA-PSCA 融合蛋白浓度为 0.40 mg/ml。SDS-PAGE 电泳检测结果如图 3A 所示,在约 28 ku 处出现单一的目的条带,获得了纯度约 85% 的可溶性 TrxA-PSCA 融合蛋白。含有 pDAP2/S-*PaFv* 重组质粒的大肠杆菌通过 IPTG 诱导表达,超声波破碎处理提取总蛋白,经 SDS-PAGE 电泳和 Western 杂交检测。结果显示有单一的约 90 ku 大小的蛋白条带(图 3B),与 *PaFv*-AP 融合蛋白的分子量相一致。

2.4 *PaFv*-AP 融合蛋白的活性分析 AP 显色反应显示原核表达的 *PaFv*-AP 融合蛋白能够快速催化 pNPP 底物显色,其显色值高于对照组,差异有统计学意义($t = -67.945, P < 0.001$) (图 4)。实验组

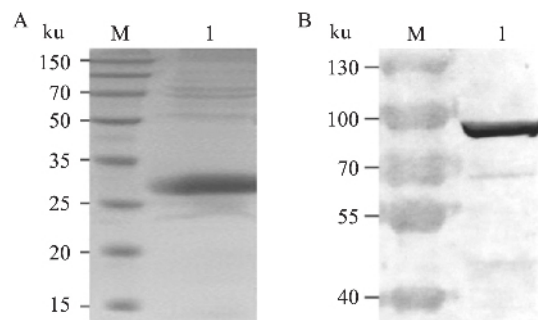


图3 TrxA-PSCA 和 *PaFv*-AP 融合蛋白的表达鉴定

M: 蛋白 Marker; A1: TrxA-PSCA 融合蛋白; B1: *PaFv*-AP 融合蛋白

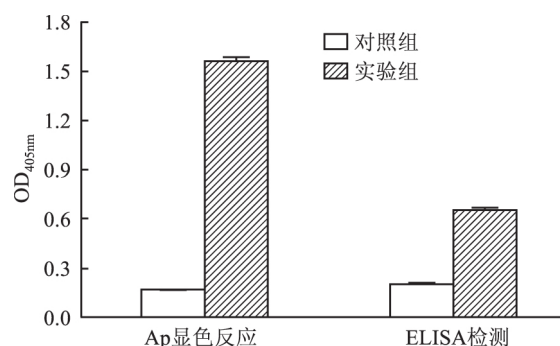


图4 AP 显色反应和 ELISA 检测 *PaFv*-AP 融合蛋白的活性

平均读值为对照组9.2倍,说明融合蛋白可溶性表达并具有很强的 AP 活性。在 ELISA 孔中包被 TrxA-PSCA 重组蛋白,加入原核表达的 *PaFv*-AP 融合蛋白进行 ELISA 检测(图 4),*PaFv*-AP 融合蛋白的 $OD_{405\text{nm}}$ 值与对照组相比,平均读值相差 3.2 倍,差异有统计学意义($t = -28.946, P < 0.001$),表明原核表达的 *PaFv*-AP 融合蛋白保留 scFv 和 AP 的活性,可用于 PSCA 蛋白的免疫学检测。

3 讨论

PSCA 是一种前列腺癌肿瘤相关抗原,由 Reiter et al^[3] 在 1998 年研究前列腺癌的基因表达过程中发现。近年来的研究^[3-4,6] 表明 PSCA 的表达与前列腺癌患者的预后密切相关,可作为前列腺癌预后的指标以及晚期患者的治疗靶标。本研究克隆了人 PSCA 成熟肽的编码基因序列(78~314 bp),通过与促溶蛋白标签 TrxA 融合表达 TrxA-PSCA 蛋白作为免疫检测的抗原。

免疫学检测方法具备特异性好、灵敏度高、价格低廉和操作简单等优势,现已被广泛应用于疾病诊断及毒素检测分析等^[7-9]。scFv 是通过基因工程技术制备的具有完全抗原结合位点的最小抗体片段,对靶抗原的结合活性与天然抗体十分接近^[10]。由于 scFv 的特殊小分子结构,蛋白糖基化修饰对其活

性功能影响较小,可在大肠杆菌等原核生物中高效表达,纯化过程和操作简单^[1]。更重要的是,scFv基因可根据表达的宿主细胞进行密码子优化来提高表达量、可溶性和活性等,也可在体外进行设计改造或与AP、细胞因子等蛋白质的编码基因通过基因工程操作融合表达,从而改变或增加scFv的特性^[12-13]。scFv-AP融合蛋白用于抗原检测时不需要添加酶标记二抗,从而使免疫学检测过程大大加速,检测成本显著下降,应用前景十分广泛^[8]。

本研究确定在IPTG终浓度为0.5 mmol/L时,37℃诱导培养5 h能够获得大量可溶性表达的TrxA-PSCA融合蛋白;在IPTG终浓度为0.5 mmol/L时,20℃诱导培养14 h能够高效可溶性表达PaFv-AP融合蛋白。AP显色反应和ELISA分析结果显示原核表达的PaFv-AP融合蛋白保留了scFv和AP的活性,但尚未达到检测应用的要求,后续将进一步优化表达条件后通过发酵大量生产融合蛋白,或通过分子建模和定点突变等技术提高融合蛋白的活性。本研究通过基因工程操作技术实现了PSCA抗原和PaFv-AP融合蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达,为后续前列腺癌免疫诊断的应用研究奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Zhao F, Shen J Y, Yuan Z G, et al. Trends in treatment for prostate cancer in China: preliminary patterns of care study in a single

- institution [J]. J Cancer, 2018, 9(10): 1797-803.
- [3] Reiter R E, Gu Z, Watabe T, et al. Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(4): 1735-40.
- [4] Kessler C, Pardo A, Tur M K, et al. Novel PSCA targeting scFv-fusion proteins for diagnosis and immunotherapy of prostate cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143(10): 2025-38.
- [5] 王 赞, 周 静, 刘丽娜, 等. 不同方式构建的单链抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的活性分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(8): 1798-803.
- [6] Heinrich M C, Göbel C, Kluth M, et al. PSCA expression is associated with favorable tumor features and reduced PSA recurrence in operated prostate cancer [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 612.
- [7] 李秀义, 高冬梅, 张守柱, 等. 风疹病毒E1抗原特异性片段在酵母系统中重组表达及应用 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(8): 1210-4.
- [8] Hu Z Q, Li H P, Wu P, et al. An affinity improved single-chain antibody from phage display of a library derived from monoclonal antibodies detects fumonisins by immunoassay [J]. Anal Chim Acta, 2015, 867: 74-82.
- [9] 王楠楠, 姚 湧, 汪学龙. 重组GRA5蛋白免疫诊断弓形虫病价值的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(4): 467-70.
- [10] Bemani P, Mohammadi M, Hakakian A. ScFv improvement approaches [J]. Protein Pept Lett, 2018, 25(3): 222-9.
- [11] Liu C, Kobashigawa Y, Yamauchi S, et al. Preparation of single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli by simplified and systematic chaperone optimization [J]. J Biochem, 2019, 166(6): 455-62.
- [12] Mishra A K, Mariuzza R A. Insights into the structural basis of antibody affinity maturation from next-generation sequencing [J]. Front Immunol, 2018, 9: 117.
- [13] Luca R D, Gouyou B, Ongaro T, et al. A novel fully-human potency-matched dual cytokine-antibody fusion protein targets carbonic anhydrase IX in renal cell carcinomas [J]. Front Oncol, 2019, 9: 1228.

Expression and detection of prostate stem cell antigen and fusion protein comprising a PSCA-specific single-chain antibody and alkaline phosphatase

Shang Guofu^{1,2}, Liu Jiangli¹, Yu Huan¹, et al

(¹Immune Cells and Antibody Engineering Research Center of Guizhou Province, Key Laboratory of Biology and Medical Engineering, School of Biology and Engineering, ²School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025)

Abstract The PSCA gene encoding prostate stem cell antigen (PSCA) and PaFv gene encoding PSCA-specific scFv antibody were amplified and cloned into pET-32a and pDAP2/S vectors, respectively. After induced for expression of TrxA-PSCA and PaFv-AP fusion proteins, SDS-PAGE and Western blot were conducted to analyze their expression levels and forms, whereas alkaline phosphatase (AP) color-reaction and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were applied to detect the activity of PaFv-AP fusion. The results suggested that TrxA-PSCA and PaFv-AP fusion proteins were successfully expressed in soluble form in the constructed prokaryotic expression systems. Moreover, the PaFv-AP fusion retained the antigen-binding capacity of antibody and AP activity.

Key words prostate stem cell antigen; single-chain variable fragment antibody; alkaline phosphatase; prokaryotic expression; immunological detection