

抗淀粉样蛋白寡聚体单链抗体融合蛋白 在真核细胞中表达的初步研究

周维维¹, 汪维云^{1*}, 刘瑞田², 于晓琳^{2*}

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 中国科学院过程工程研究所, 生化工程国家重点实验室, 北京 100190)

摘要: 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种由脑内淀粉样蛋白 (A β) 聚集引起的, 以老年人记忆和认知功能丧失为临床表征的神经退行性疾病。研究表明, A β 寡聚体是 AD 发生发展的主要因素。应用自行筛选出的能够特异识别淀粉样蛋白寡聚体的单链抗体 W20 基因, 构建了以绿色荧光蛋白为报告基因的真核表达载体 pSNAV2.0-W20-EGFP, 并应用流式细胞分选、蛋白免疫印迹以及荧光显微镜等技术对该单链抗体融合蛋白在真核细胞中的表达进行了初步研究, 为针对 AD 的抗体基因治疗奠定了基础。

关键词: 淀粉样蛋白; 单链抗体 (scFv); 阿尔茨海默病

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0685-05

Expression of single-chain variable fragment antibody specifically recognizing beta-amyloid oligomers in 293T cells

ZHOU Wei-wei¹, WANG Wei-yun¹, LIU Rui-tian², YU Xiao-lin²

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, China Academy of Sciences, Beijing 100190)

Abstract: Alzheimer's disease is the most common form of neurodegenerative disease that leads to a progressive loss of memory and cognitive functions. Increasing evidence indicates that beta-amyloid oligomers are pivotal toxins in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In this study, W20, a single-chain variable fragment antibody specifically recognizing beta-amyloid oligomers was cloned to pSNAV2.0-EGFP vector and its expression in 293T cells was examined by flow cytometry, western blot and fluorescence microscope. Such scFv antibody eukaryotic expression vectors may have valuable application in the further investigation of AD gene therapy *in vivo*.

Key words: beta-amyloid; single-chain variable fragment antibody; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病是老年痴呆最常见的形式, 典型的病理特征包括神经细胞外由 β 淀粉样蛋白沉积形成的老年斑 (senile plaque, SP), 细胞内由超磷酸化的 Tau 蛋白形成的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT) 以及神经元变性、丢失所引起的脑萎缩^[1-2]。在疾病的发生过程中, A β 聚集形成的寡聚体是最主要的致病因素^[3-4]。

单链抗体 (single chain variable fragment, scFv) 是基因工程抗体中的一种小分子抗体, 由重链可变

区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 通过 10~15 个氨基酸的弹性多肽 (linker) 首尾连接而成, 无需糖基化修饰即可形成有功能的抗体分子^[5], 该种抗体仍然具有完整抗体的特异、单一性结合抗原的亲合力^[6]。缺乏 IgG Fc 片段的 scFv 不能诱导由 Fc 受体介导的炎症反应。研究显示多种细胞系以及宿主都能成功表达 scFv^[7]。并且, scFv 基因较短, 易于操作, 容易穿透致密的组织屏障而到达靶组织发挥作用, 在基因治疗方面具有独特的优势。

收稿日期: 2013-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81171014) 资助。

作者简介: 周维维, 女, 硕士研究生。E-mail: zweiwei2006@126.com

* 通信作者: 汪维云, 男, 教授。E-mail: weiyunw@126.com 于晓琳, 女, 助理研究员。E-mail: yuxiaolin@home.ipe.ac.cn

本实验室利用噬菌体展示技术从人源单链抗体库筛选出的特异识别淀粉样蛋白寡聚体的单链抗体 W20 能够抑制淀粉样蛋白的聚集,有效降低 A β 引起的细胞毒性,改善 AD 转基因小鼠的记忆力,降低脑内的病理变化^[8-9],对阿尔茨海默病治疗和诊断具有潜在的价值。本研究将应用基因重组技术构建 W20 与增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 融合的真核表达载体 pSNAV2.0-W20-EGFP,对其在真核细胞中的表达以及定位进行初步研究,为此种新型抗体进一步的研发以及 AD 的基因治疗奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 限制性内切酶 *Kpn* I、*Eco*R I、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、*Taq* DNA 聚合酶等为 TaKaRa 公司产品;高纯度质粒小提中量试剂盒、凝胶回收试剂盒、加强化学发光(ECL)试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;硝酸纤维素膜 (nitrocellulose filter membrane, NC 膜)为 GE 公司产品;兔源抗 GFP 多克隆抗体购自 MBL(598);HRP 标记的山羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物科技有限公司;高效真核转染试剂 *Vigo*Fect 购自北京威格拉斯生物技术有限公司;细胞培养所需小牛血清、高糖 DMEM、胰酶以及抗生素购自 Hyclone 公司,其他常规试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.1.2 菌株、细胞以及载体 *E.coli* DH5 α 感受态细胞为北京全世金生物技术有限公司产品;pMD18-T Simple Vector 为 TaKaRa 公司产品;含有 *Kpn* I、*Eco*R I 多克隆位点的真核表达载体 pSNAV2.0-EGFP 由本实验室构建,其中空载体 pSNAV2.0 购于本元正阳基因技术有限公司;人胚肾 293T 细胞以及 W20 表达菌株 *E.coli* [HB2151] 为本实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 W20 基因的扩增 以 W20 基因序列 (726 bp) 设计引物,在上游引物的 5' 端设计 *Kpn* I 的酶切位点,下游引物 5' 端设计 *Eco*R I 的酶切位点。P1:5'-GGGGTACCATGGCCGAGGTGCAGCTGTT-3' P2:5'-CGGAATTCCTCCGTTTIGATTTCACCCCTTGGTCC-3' 所需引物由上海生工生物公司合成。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后开始循环,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,53 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶鉴定、回收、纯化后,经 T4 连接酶连入 pMD18-T Simple Vector 载体,PCR 鉴定后阳性克隆由上海生工生物

公司测序。

1.2.2 真核表达质粒 pSNAV2.0-W20-EGFP 的构建 用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 分别酶切 pSNAV2.0-EGFP 载体和插入 W20 片段的 pMD18-T Simple Vector 载体,1% 琼脂糖凝胶电泳后回收酶切的载体和 W20 片段,T4 连接酶连接,转化 DH5 α 感受态细胞,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,提质粒酶切、PCR 鉴定。

1.2.3 293T 细胞的培养以及质粒转染 293T 细胞在含 10% FBS、1% 双抗 (青霉素 100 u·mL⁻¹,链霉素 100 u·mL⁻¹) 的高糖 DMEM 培养液中,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件培养箱中培养,每 2~3 d 传代 1 次。转染前将 293T 细胞以 3 \times 10⁵ 个·孔⁻¹ 接种于 12 孔板,待细胞融合至 80% 左右时,采用高效真核转染试剂 *Vigo*Fect 转染质粒 pSNAV2.0-W20-EGFP 和 pSNAV2.0-EGFP,转染 4 h 后更换培养基继续培养 10 h、24 h 与 48 h。

1.2.4 流式细胞仪检测质粒转染效率 质粒 pSNAV2.0-W20-EGFP 和 pSNAV2.0-EGFP 转染 293T 细胞培养 10 h、24 h 与 48 h 后,弃去培养基,细胞经 PBS 清洗、0.25% 胰蛋白酶消化后,制备细胞悬液,以未经转染的 293T 细胞作为阴性对照,通过流式细胞分选仪 (FACS) 分析质粒转染效率。

1.2.5 蛋白免疫印迹检测 W20 蛋白表达水平 收集转染后培养 48 h 的细胞裂解液与细胞培养液,经加热蛋白变性后,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后将蛋白质转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上,5% 的脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,兔源抗 GFP 多克隆抗体 (1:2 000 稀释,一抗) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG (二抗) 室温孵育 1 h,加入加强化学发光 (ECL) 试剂于暗室自显影,曝片。

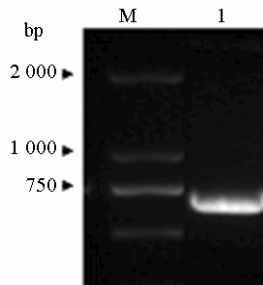
1.2.6 倒置荧光显微镜观察 W20 融合蛋白表达以及定位 将质粒 pSNAV2.0-W20-EGFP 和 pSNAV2.0-EGFP 转染 293T 细胞培养 48 h 后,在倒置的荧光显微镜下观察 W20-EGFP 融合蛋白的表达及定位,激发波长为 488 nm,发射波长为 507 nm。

2 结果与分析

2.1 W20 目的片段的扩增以及重组 W20-EGFP 融合表达质粒的鉴定

W20 的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见大约 730 bp 的特异性条带 (图 1),回收纯化该核酸条带克隆于 pMD18-T Simple Vector 载体,测序证实所获得 W20 的 DNA 序列与先前实验室的测序结果完全一致。将测序正确的 W20 序列亚克隆于真核表

达质粒 pSNAV2.0-EGFP 中, 经 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶切、W20 上下游引物 PCR 扩增后得到 730 bp 大小的片段; 以 W20 上游引物和 EGFP 下游引物 PCR 扩增得到 1.45 kb 大小的片段(图 2), 说明 W20-EGFP 融合蛋白真核表达载体构建成功。



M: DNA Marker; 1.W20 基因片段

M: DNA Marker; 1.W20 fragment

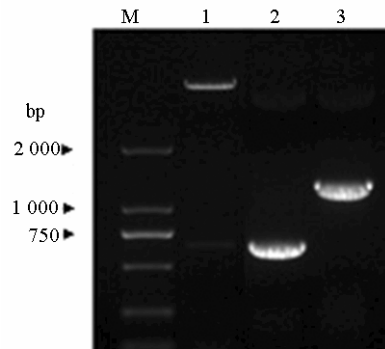
图 1 W20 片段的 PCR 扩增

Figure 1 PCR amplification of the W20 gene

2.2 流式细胞仪检测融合表达质粒 W20-EGFP 的转染效率

W20-EGFP 质粒带有报告基因 EGFP, 因此可以通过流式细胞仪检测质粒转染 293T 细胞的转染效率。结果显示, 转染细胞培养 10 h 后质粒 pSNAV2.0-W20-EGFP 和 pSNAV2.0-EGFP 的转染率分别为 41.4% 和 66.3%; 培养 24 h 后, 质粒 pSNAV2.0-W20-

EGFP 和 pSNAV2.0-EGFP 的转染率分别为 74.8% 和 81.9%; 培养 48 h 后, 两质粒转染率都达到 90% 以上 (图 3)。

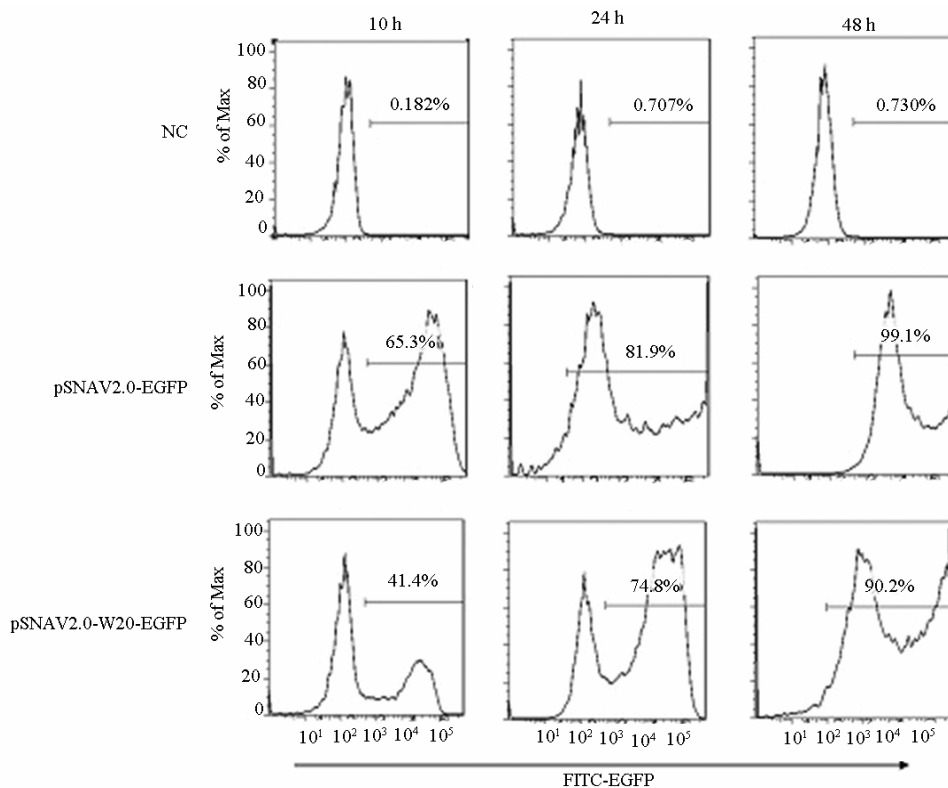


M: DNA Marker; 1.质粒 pSNAV2.0-W20-EGFP 经 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶切的结果; 2.质粒 pSNAV2.0-W20-EGFP 经 W20 的上游和下游引物 PCR 扩增结果; 3.质粒 pSNAV2.0-W20-EGFP 经 W20 上游引物和 EGFP 下游引物 PCR 扩增结果

M: DNA Marker; 1. pSNAV2.0-W20-EGFP enzyme digestion result by *Kpn* I and *Eco*R I ; 2. pSNAV2.0-W20-EGFP PCR result by W20 upper primer and W20 lower primer; 3. pSNAV2.0-W20-EGFP PCR result by W20 upper primer and EGFP lower primer

图 2 pSNAV2.0-W20-EGFP 酶切以及 PCR 鉴定结果

Figure 2 Enzyme digestion and PCR analysis of pSNAV2.0-W20-EGFP



NC: 阴性对照, NC: Negative control

图 3 流式细胞仪检测质粒 pSNAV2.0-W20-EGFP 和 pSNAV2.0-EGFP 的转染效率

Figure 3 Analysis of transfection efficiency of pSNAV2.0-W20-EGFP and pSNAV2.0-EGFP by FACS

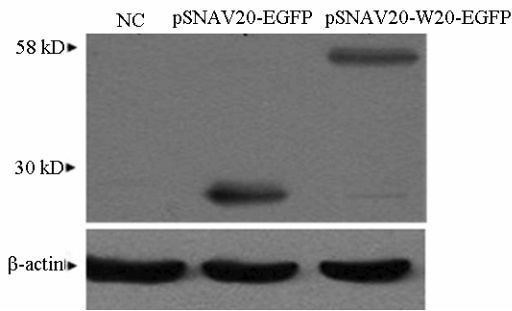


图4 蛋白免疫印迹分析 W20-EGFP 融合蛋白的表达
Figure 4 Western blot analysis of W20—EGFP fusion protein in 293T cells transfected with plasmid pSNAV2.0-EGFP and pSNAV2.0-W20-EGFP

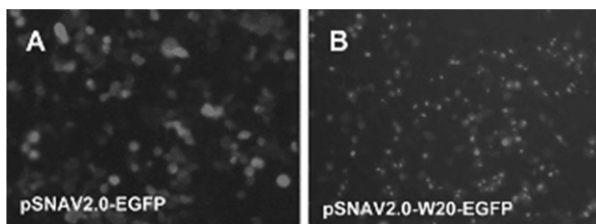


图5 蛋白 EGFP 和融合蛋白 W20-EGFP 的亚细胞定位
Figure 5 Subcellular localization of the W20-EGFP fusion protein or EGFP protein. 293T cells were transfected with pSNAV2.0-EGFP (A) or pSNAV2.0-W20-EGFP (B)

2.3 蛋白免疫印迹检测融合蛋白在 293T 细胞中的表达

免疫印迹结果显示,转染 pSNAV2.0-W20-EGFP 的细胞裂解液中可以检测到 56 kD W20—EGFP 融合蛋白的表达,而转染 pSNAV2.0-EGFP 质粒的 293T 细胞裂解液中则可以检测到 27 kD 的 EGFP 的表达(图 4),进一步说明 W20 融合蛋白在转染的 293T 细胞中得到了表达。然而,细胞培养液中并没有检测到 W20—EGFP 特异性的条带。

2.4 融合蛋白在细胞中的表达和定位

为了更直观地证实构建的融合蛋白在细胞中的表达和亚细胞定位情况,作者应用倒置荧光显微镜对转染后培养 48 h 的转染细胞进行了观察,结果显示,在转染 pSNAV2.0-EGFP 质粒的 293T 细胞中,绿色荧光广泛分布于胞质和胞核(图 5A),而转染 pSNAV2.0-W20-EGFP 质粒的 293T 细胞,绿色荧光主要呈颗粒状分布于细胞核,少部分分布于胞质中(图 5B)。

3 讨论

阿尔茨海默病(AD)是由 A β (β -amyloid) 聚集引起的以老年人记忆力下降、脑内形成老年斑

为特点神经退行性疾病^[10]。目前对 AD 的临床治疗只能应用胆碱酯酶抑制剂、神经营养和消炎类药物延缓或者减轻临床症状,尚没有任何特异性治疗的药物面世^[11]。应用常用的主动和被动免疫方法治疗 AD 一直是 AD 研究领域的热点之一,但一直存在着副作用以及成本昂贵等问题。研究表明,基因治疗介导的单链抗体可以在宿主体内稳定持久地表达,可以克服在被动免疫中需要重复注射昂贵抗体的弊端^[6]。本实验室从人源单链抗体库筛选出了对 AD 治疗具有较好应用前景的单链抗体 W20。为克服 W20 在血液中半衰期短的缺点,加快其在临床上的应用,我们构建了具有示踪作用的 W20-EGFP 融合蛋白真核细胞表达载体,并对其在 293T 细胞中的表达和分泌进行了研究。

EGFP 在紫外或蓝光激发下发出绿色荧光,且荧光性质稳定,对细胞无毒性,可进行活细胞检测^[11]。因此,本研究选用 EGFP 作为报告基因,采用基因工程技术构建了能特异识别淀粉样蛋白寡聚体的单链抗体 W20-EGFP 融合蛋白真核表达载体,转染 293T 细胞后,流式细胞仪分析显示构建的载体有较高的转染效率;免疫印迹实验进一步证明,构建的 W20-EGFP 融合蛋白可在细胞中成功表达。应用倒置荧光显微镜技术研究了融合蛋白 W20-EGFP 在 293T 细胞中的表达和定位,与单独的绿色荧光蛋白同时存在于细胞质和细胞核不同,融合蛋白主要以点状颗粒的形式分布在细胞核。通过生物信息学比对,构建的融合蛋白并没有明确的核定位信号,推测其可能和细胞核中的某些物质发生相互作用而被滞留在细胞核内。单链抗体 W20 是基于人源抗体库筛选得到的特异针对 A β 寡聚体的一种抗体,体内外的研究表明 W20 具有较大的临床应用潜力。本实验成功构建了单链抗体 W20-EGFP 真核表达载体,W20 基因在细胞内的成功表达,为今后应用此抗体对于 AD 的体内基因治疗研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Blennow K, de Leon M J, Zetterberg H. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2006, 368(9533): 387-403.
- [2] Lesne S, Koh M T, Kotilinek L, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory [J]. Nature, 2006, 440(7082): 352-357.
- [3] Haass C, Selkoe D J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(2): 101-112.
- [4] Resende R, Ferreira E, Pereira C, et al. Neurotoxic effect

- of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death [J]. *Neuroscience*, 2008, 155(3): 725-737.
- [5] Bird R E, Hardman K D, Jacobson J W, et al. Single-chain antigen-binding proteins [J]. *Science*, 1988, 242(4877): 423-426.
- [6] Holliger P, Hudson P J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9): 1126-1136.
- [7] 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.
- [8] Zhang X, Sun X X, Xue D, et al. Conformation-dependent scFv antibodies specifically recognize the oligomers assembled from various amyloids and show colocalization of amyloid fibrils with oligomers in patients with amyloidosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1814(12): 1703-1712.
- [9] Wang X P, Zhang J H, Wang Y J, et al. Conformation-dependent single-chain variable fragment antibodies specifically recognize beta-amyloid oligomers [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(3): 579-584.
- [10] Cummings J L. Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(1):56-67.
- [11] Wiedenmann J, Nienhaus G U. Live-cell imaging with EosFP and other photoactivatable marker proteins of the GFP family [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2006, 3(3): 361-374.