

# 不同连接肽的双价单链抗体基因的构建及表达

严丹丹<sup>1,2</sup> 方 瑾<sup>1\*</sup> 宋今丹<sup>1</sup>(中国医科大学细胞生物学教研室, 卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳110001; <sup>2</sup>沈阳医学院免疫教研室, 沈阳110034)

**摘要** 采用基因重组技术分别借助不同长度的连接肽[G<sub>4</sub>S和(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>], 将两个相同的抗人大肠癌单链抗体基因 ND-1scFv 共价连接, 构建表达载体 pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>, 并在大肠杆菌 BL21 中表达 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 的融合蛋白。应用 Ni<sup>2+</sup> 亲和层析方法对表达产物进行纯化, SDS-PAGE、免疫荧光法 (IFA) 和 ELISA 对纯化后的蛋白质进行纯度和免疫活性分析。结果表明成功构建了表达载体 pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>, 并在大肠杆菌中获得高效表达, 其表达产物以不溶性包涵体形式存在。纯化后 ND-1sc(Fv)<sub>2-5</sub>、ND-1sc(Fv)<sub>2-15</sub> 的蛋白质纯度分别为 90% 和 86%。IFA 及 ELISA 结果表明, 二者均保留了亲本抗体的免疫活性, 对表达在人大肠癌细胞上的肿瘤相关抗原 LEA 具有特异结合活性, 其免疫活性均明显高于 ND-1scFv, 其中 ND-1sc(Fv)<sub>2-15</sub> 的免疫活性更接近于亲本单抗 ND-1, 该抗体有望成为大肠癌临床导向诊断和治疗的理想载体。

**关键词** 双价单链抗体; ND-1; 连接肽; 大肠癌; 表达

利用单克隆抗体作为载体进行导向诊断和治疗是肿瘤研究的重要课题<sup>[1-2]</sup>。基因工程双价抗体作为一种新型的小分子抗体既具有 scFv (single-chain Fv) 分子量小、组织穿透能力强及免疫原性低等特点, 又具有类似于完整抗体 IgG 的双价结合位点, 与 scFv 相比其抗体的亲和性大大提高, 适中的分子量(55~80 kDa)既保证了抗体在肿瘤组织的良好穿透能力, 又大大改善了 scFv 在体内清除过快的缺点。因此近年来, 人们用 scFv 为元件构建出来的基因工程双价抗体分子在肿瘤的显像和治疗方面显示出良好的应用前景<sup>[3-4]</sup>。

ND-1 是本室以人大肠癌细胞 CCL-187 为免疫原制备的鼠抗人大肠癌单克隆抗体, 其与 CCL-187 细胞表面表达的肿瘤相关抗原 LEA 能够特异性结合<sup>[5]</sup>, 体内外一系列实验显示, 该单抗特异性强, 亲和力高, 并优于目前广泛采用的美国商业产品抗 CEA 单抗<sup>[6]</sup>。以该单抗构建的基因工程抗体 ND-1scFv 亦显示了良好的体内外特异结合活性<sup>[7-8]</sup>。本研究在此基础上, 分别借助 G<sub>4</sub>S 和 (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> 连接肽序列, 将两个 ND-1scFv 基因片段共价连接, 构建抗人大肠癌双价单链抗体 ND-1sc(Fv)<sub>2-5</sub> 和 ND-1sc(Fv)<sub>2-15</sub>, 在大肠杆菌中进行表达, 并对其免疫活性进行了检测。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌种和质粒 CCL-187 人大肠癌细胞株由美国哈佛大学医学院肿瘤所惠赠; HeLa 人宫

颈癌上皮细胞株为本室保存; 大肠杆菌 *E.coli* JM109、*E.coli* BL21 及 pMD18-T 克隆载体为 TaKaRa 公司产品; pET-28a(+)-ND-1scFv 表达质粒由本室构建。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Sal*I、*Hind*III、*Eco*RI, Taq DNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品。胶回收试剂盒为上海华舜生物公司产品。T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。FITC 荧光标记羊抗鼠抗体为 Sigma 公司产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体为 Santa 公司产品。抗 His-Tag 单抗为 Invitrogen 公司产品。Ni-NTA 亲和层析填料购自 Qiagen 公司。HisProbe<sup>TM</sup>-HRP 抗体及 Western 印迹检测试剂盒 (HisProbe<sup>TM</sup> Western blotting Kit) 为 Pierce 公司产品。ND-1 是本室以人大肠癌细胞 CCL-187 为免疫原制备的鼠抗人大肠癌单克隆抗体。引物 P1: 5'-AATGTC-GACGGAGGCGGAGGCTCAGCCAGGTGCA-3' 含 *Sal*I 酶切位点(斜体部分)和编码 G<sub>4</sub>S 的连接肽序列(横线部分); 引物 P2: 5'-ATGTCGACGGCGGAGGCG-GATCAGGAGGCGGCGGCTCAGGAGGCGGAG-3' 含 *Sal*I 酶切位点(斜体部分)和编码 (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> 的连接肽序列(横线部分); 引物 P3: 5'-GCGAAGCTTTTATTTTC-CAGCTTGGTCCCCCTCCGAA-3' 含 *Hind*III 位点(斜体部分)和终止密码子 (TTA), 以上引物均由 TaKaRa

收稿日期: 2006-06-28 接受日期: 2006-11-15

国家自然科学基金(No.85-722-18-02, No.20375047)和辽宁省教育厅科学研究项目(No.202013135)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 024-23256666-5347, E-mail: Jfang61@netease.com

公司合成。其中 P1、P3 用于从质粒 pET-28a(+)-ND-1scFv 中扩增 ND-1scFv 基因, 并引入 G<sub>4</sub>S 连接肽序列和拼接用酶切位点, P2、P3 用于从质粒 pMD18-T-scFv-5 中扩增 scFv-5 基因, 并引入(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> 连接肽序列使连在 scFv 基因 5' 端的连接肽为(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>。

## 1.2 方法

**1.2.1 scFv-连接肽基因的 PCR 扩增及克隆** 以 ND-1scFv 表达质粒 pET-28(+)-ND-1scFv 为模板, 以引物 P1、P3 进行 PCR 扩增形成 5' 端带有 SalI 位点和编码 G<sub>4</sub>S 的连接肽序列, 3' 端带有终止密码子和 HindIII 位点的 scFv-5 片段, 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收试剂盒回收, 与 pMD18-T 克隆载体连接, 转化 *E. coli* JM109 感受态, 提取质粒 DNA, 经 SalI/HindIII 双酶切鉴定后, 采用 Sanger 末端终止法测序, 回报结果与设计序列 scFv-5 进行对比。用测序正确的质粒 pMD18-T-scFv-5 为模板, 以引物 P2、P3 进行 PCR 扩增 scFv-5 基因, 在 scFv-5 基因 5' 端引入 SalI 位点和编码(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> 的连接肽序列, 3' 端引入终止密码子 TAA 和 HindIII 位点, 使连接肽序列的长度增长至 15 个氨基酸[(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>], 形成 scFv-15 片段, 构建克隆质粒 pMD18-T-scFv-15 并测序鉴定(基本方法同上, 略)。

**1.2.2 pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 表达载体的构建** 取鉴定正确的质粒 pMD18-T-scFv-5、pMD18-T-scFv-15 分别用 SalI/HindIII 双酶切, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收试剂盒回收 scFv-5 和 scFv-15 片段, 以 T4 DNA 连接酶接入经同样双酶切的 pET-28a(+)-ND-1scFv 表达载体, 转化 *E. coli* BL21 感受态, 提取质粒 DNA, 用 EcoRI/HindIII 双酶切鉴定正确重组克隆。

**1.2.3 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 基因的表达** 将含有重组质粒 pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5、pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15 的 BL21 单菌落分别接种于 2 ml LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 并以 1% 接种量分别转种到 100 ml 相同的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养至 A<sub>600</sub> 为 0.6 左右, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 继续培养 3 h, 离心收集菌体, 获得诱导培养物, 表达产物以 SDS-PAGE 鉴定, 并用凝胶灰度扫描测定蛋白质表达量。

**1.2.4 包涵体的纯化及复性** 分别将大量诱导的菌体用裂解缓冲液冰上裂解 30 min, 并于冰浴上超声破碎, 4 °C, 10 000 g 离心 20 min 得到包涵体。将包涵体重悬于原培养物 0.1 倍体积的变性液(0.1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 mol/L Tris, 6 mol/L 盐酸胍, pH 8.0), 待包涵体全部溶解后, 17 000 g 离心 20 min, 取上清液

加至 Ni-NTA 树脂亲和层析柱中, 按顺序分别用 10 倍柱体积的 6 mol/L 盐酸胍(pH 8.0)→ 8 mol/L 尿素(pH 8.0)→ 8 mol/L 尿素(pH 6.5)→ 8 mol/L 尿素(pH 4.2)洗脱镍柱, 收集 8 mol/L 尿素(pH 4.2)流出液。用变性液调整蛋白质浓度至 100 μg/ml, 加入 4 倍体积复性液(20 mmol/L Tris, 0.25 mol/L NaCl, 0.5% NP-40, 0.4 mmol/L PMSF, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 100 mmol/L EDTA)4 °C 复性 24 h, 然后将复性样品转移至截留分子质量为 8~10 kDa 的透析袋中用透析液(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 10% 甘油)透析 48 h, 超滤浓缩样品至适当体积, Bradford 法检测蛋白质浓度后, -20 °C 分装保存。

**1.2.5 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 的 Western 印迹** 取含有重组质粒 pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 的 BL21 诱导表达菌液和诱导前的 BL21 菌体裂解物, 分别加入等量 2× 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 各取 15 μl 经 12% SDS-PAGE 后, 湿转印至 PVDF 膜上, 用 25 mg/mL BSA/TBST 室温封闭 1 h, TBST 洗膜 2 次, 每次 10 min, 再与 1:2 000 稀释的 HisProbe™-HRP 抗体室温温育 1 h, TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min, 然后加底物工作液覆盖 PVDF 膜室温 5 min, 置 X 光胶片上曝光 1 min, 分析结果。

**1.2.6 间接免疫荧光法检测 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 免疫活性** 取对数生长期的人大肠癌细胞 CCL-187 和人类宫颈癌上皮细胞 HeLa 分别传代于盖玻片上, 于 37 °C 培养 48 h 后, 以 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5、ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15 为一抗, 抗 His-Tag 单抗为二抗, FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为三抗, 于 37 °C 各温育 1 h, PBS 冲洗后, 于荧光显微镜下观察。

**1.2.7 非竞争性 ELISA 检测 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 免疫活性** 取处于对数生长期的人大肠癌细胞 CCL-187, 以 5×10<sup>4</sup> 个/ml 接种于 96 孔培养板中, 100 μl/孔, 于 37 °C 培养 24 h, 弃去培养液, PBS 涮洗 3 次, 2.5% 戊二醛 37 °C 固定 5 min, PBS 涮洗 3 次后, 每孔加入等摩尔的 ND-1mAb、ND-1scFv、ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5 和 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15 作为一抗, 阴性对照孔加 PBS, ND-1scFv 孔和 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 孔均以抗 His-Tag 抗体作为二抗, HRP-羊抗鼠抗体作为三抗; ND-1mAb 孔以 HRP-羊抗鼠抗体作为二抗, 每孔分别加抗体 100 μl, 于 37 °C 分别温育 2 h, PBS 涮洗后以底物 TMB 显色, 37 °C 暗处反应 30 min, 100 μl/孔 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应后, 于酶标仪上波长 450 nm 测定吸收值。

## 2 结果

## 2.1 scFv-连接肽基因的PCR扩增

以 pET-28a(+)ND-1scFv 为模板, 加入引物 P1、P3 进行 PCR 扩增, 产生 scFv-5 片段; 以测序正确的质粒 pMD18-T-scFv-5 为模板, 用引物 P2、P3 进行 PCR 扩增, 产生 scFv-15 片段。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 均在 750 bp 附近得到一条带, 位置与所设计的序列理论值相符(图 1)。将带有“A”尾的 PCR 产物与 pMD18-T 克隆载体连接, 提取重组质粒 DNA, 经 *SalI/HindIII* 双酶切鉴定后, Sanger 末端终止法测序, 测得到的 DNA 序列与设计的理论序列比对结果完全一致。

## 2.2 pET-28a(+)ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 表达载体的构建

将测序正确的重组质粒通过 *SalI/HindIII* 双酶切, 将 scFv-连接肽片段与经相同双酶切的 pET-28a(+)ND-1scFv 载体连接, 连接产物转化 *E.coli* BL21 感受态细胞, 提取重组子质粒, 经 *EcoRI/HindIII* 双酶切, 电泳显示在约 1 500 bp 处呈现一明显条带, 提示 scFv-连接肽片段被克隆入 pET-28a(+)ND-1scFv 载体中, 且插入方向正确, 表明 pET-28a(+)ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 表达载体构建成功(图 2)。

## 2.3 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 在大肠杆菌中的表达

将构建正确的表达质粒 pET-28a(+)ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 转化宿主菌 BL21, 以 1 mmol/L IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 和 Western 印迹检测显示, 经诱导的菌体裂解物均在分子量约 55 kDa 处有一条特异性蛋白质带, pET-28a(+)载体在多克隆位点的上游有一编码 His-Tag 小肽的基因, 因此, 在 IPTG 诱导下表达的是 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 与 His-Tag 及其上游序列的融合蛋白, 分子量 55 kDa[ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 51 kDa, His-Tag + 上游序列 4 kDa], 电泳结果与该融合蛋白的理论推算值相符(图 3)。

## 2.4 表达产物的纯化和复性

SDS-PAGE 分析显示, 经 IPTG 诱导后的菌体裂解物上清液中未见可溶性蛋白质条带, 故推断 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 主要以包涵体形式存在。通过盐酸胍变性溶解后, 借助能与 His 序列特异结合的 Ni-NTA 亲和层析柱对包涵体进行纯化, 获得了高纯度的 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> (图 3), Bradford 法检测纯化后的蛋白质浓度 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5 和 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15 分别为 1.1 mg/ml 和 1.3 mg/ml, 凝胶灰度扫描显示蛋白质纯度分别为 90% 和 86%。复性后的蛋白质溶液澄清, 且凝胶电泳呈单一条带(结果未显示), 提示经复性处理后, ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 获得正确构象, 且保持有效浓度。

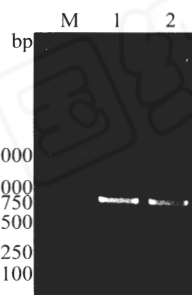


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

M: DNA marker; 1: P1、P3 扩增的 PCR 产物; 2: P2、P3 扩增的 PCR 产物。

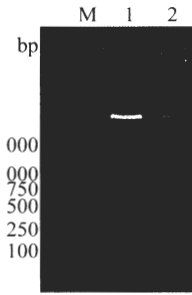


图 2 重组表达载体 pET-28a(+)ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 的双酶切鉴定

M: DNA marker; 1: pET-28a(+)ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5 经 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切; 2: pET-28a(+)ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15 经 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切。

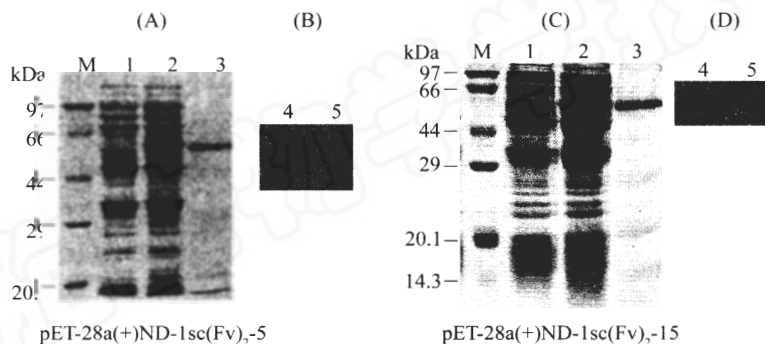


图 3 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 表达的 SDS-PAGE 和 Western 印迹检测

(A)、(C) SDS-PAGE 检测; (B)、(D) Western 印迹检测。M: marker; 1: 诱导前菌体蛋白; 2: 诱导后 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 表达; 3: 纯化后的 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>; 4: 诱导后 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 印迹; 5: 诱导前菌体蛋白印迹。

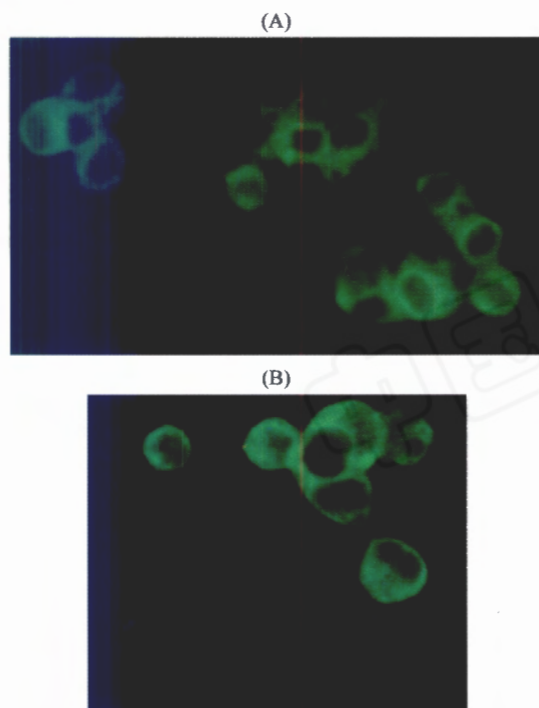


图4 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>与CCL-187细胞上LEA抗原结合的IFA照片(400×)

(A) ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5; (B) ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15。

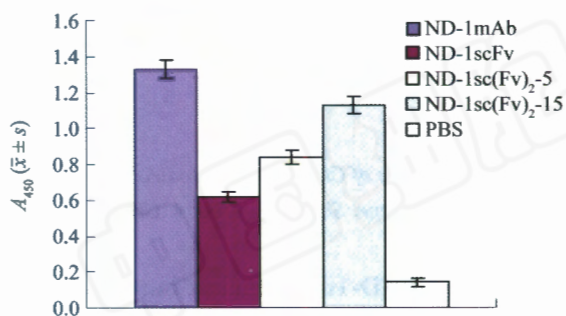


图5 ELISA测定ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>免疫活性

## 2.5 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>免疫活性

用复性的ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5和ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15分别进行的间接免疫荧光法(IFA)检测显示,经目的抗体温育后,表达有ND-1mAb相应抗原LEA的CCL-187细胞膜表面均呈现明显的荧光;而不表达LEA的HeLa细胞膜表面则未显示明显荧光;加PBS阴性对照无明显荧光(图4)。ELISA定量检测表明ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>保留了亲本抗体的免疫活性,对表达相应抗原的靶细胞CCL-187具有特异结合活性,其免疫活性均明显高于ND-1scFv,其中ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15的免疫活性更接近于亲本单抗ND-1(图5)。

## 3 讨论

肿瘤特异性单克隆抗体作为导向载体已经应用于肿瘤的放免诊断和治疗<sup>[9]</sup>,随着18种单克隆抗体产品的上市及100多种进入临床试验阶段,作为生物制药已经迎来了基因工程抗体时代<sup>[10]</sup>。

基因工程双价抗体是目前抗体应用研究的热点之一,它是将两条相同或不同来源的scFv组合成具有同种或两种不同抗原结合特征的新型抗体,通过其双结合位点提高在肿瘤诊断和治疗中的有效性。Pavlinkova等<sup>[11]</sup>构建的CC49单抗的单链抗体(27 kDa)在荷瘤裸鼠体内的半衰期是10 min,而其双价抗体(60 kDa)是60 min,由此看出双价抗体与单价小分子抗体相比有着更长的体内滞留时间,因而,有可能获得更好的显像和治疗效果。

采用共价方式构建双价单链抗体其优势在于共价结合的稳定性高,适当的连接肽可以为抗体的两个结合部位提供足够的柔韧性,从而有利于抗体分子同时交联双抗原位点。Beresford等<sup>[12]</sup>构建的CC49单抗的双价单链抗体,共价sc(Fv)<sub>2</sub>比非共价(scFv)<sub>2</sub>因具有更好的稳定性而显示出更高的肿瘤浓集和更长的肿瘤滞留时间。因此本研究采用共价方式构建了双价单链抗体,细胞免疫荧光和ELISA检测表明,该抗体保留了亲本抗体的免疫活性,表达复性后的目的抗体4℃放置1个月,仍具有良好的免疫活性(数据未显示),提示以共价方式构建的双价单链抗体具有较好的稳定性。

本研究以G<sub>4</sub>S作为连接肽的基本单元构建了抗人大肠癌双价单链抗体ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5和ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15,G<sub>4</sub>S是ND-1scFv中连接VL、VH片段的连接肽(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>中的一个重复单位,是目前众多scFv构建中普遍采用的连接肽序列组成。用于连接双价单链抗体的连接肽的长度和组成通常会对抗体的稳定性和功能产生影响,过短的连接肽可在分子内部造成空间位阻,影响抗体蛋白的正确折叠;而过长的连接肽则可能增加抗体的免疫原性,据有关文献报道,过长的连接肽还可能影响抗体的活性和功能<sup>[13]</sup>。目前用于构建共价双价单链抗体的连接肽长度范围是6~25个氨基酸,本研究分别应用5个和15个氨基酸的连接肽构建了双价单链抗体,间接免疫荧光法和ELISA检测表明,二者均保留了亲本抗体的免疫活性,对表达相应抗原的靶细胞CCL-187具有特异结合活性,其免疫活性均明显高于ND-1scFv,其中连接肽为15个氨基酸的ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15的免疫活性更接近于亲本单抗ND-1,表明构建的双价抗体已折叠为正确的构象,

说明 5 个和 15 个氨基酸均可作为构建双价单链抗体的连接肽。但是, 值得注意的是连接肽为 5 个氨基酸的 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5 的免疫活性未达到理想状态, 可能的原因是 5 个氨基酸的连接肽长度还不足以两个抗原结合位点提供有效的空间距离, 影响相互交联的稳定性。而连接肽为 15 个氨基酸更有利于抗体的正确折叠, 保证双价单链抗体的亲和能力。Kikuchi 等<sup>[4]</sup>以共价方式构建了抗 CD47 双价单链抗体 MABL sc(Fv)<sub>2</sub>, 亦采用了相同的 15 个氨基酸(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> 的连接肽, BIAcore 结合分析显示目的抗体与亲本抗体 MABL 有着几乎相同的亲合常数, 在人骨髓瘤异种移植模型中亦显示了良好的抗肿瘤活性, 该报道也证实了本研究结果。虽然 Goel 等<sup>[15]</sup>采用更长的 25 个氨基酸的连接肽成功构建了具有免疫活性的双价单链抗体, 但考虑到过长的外加序列会导致额外的免疫原性, 影响体内应用, 而且, 从 Goel 等的研究报告中看到, 即使连接肽长度增加至 25 个氨基酸, 也未使双价单链抗体获得与亲本抗体完全相当的免疫活性。故本研究以 5 个和 15 个氨基酸作为连接肽序列的基本设计长度。

本研究采用基因工程技术, 借助不同长度的连接肽成功构建了抗人大肠癌双价单链抗体 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5 和 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15, 并在大肠杆菌中获得了高效表达, 经过纯化并复性的抗体蛋白均显示出优于 ND-1scFv 的免疫活性, 达到了预期的结果, 为进一步体内实验打下了良好的基础, 有望成为大肠癌放免显像和治疗的理想载体。

### 参考文献(References)

- [1] Behr TM *et al. Cancer*, 2002, **94**: 1373
- [2] Hajjar G *et al. Clin Colorectal Cancer*, 2002, **2**: 31
- [3] Kikuchi Y *et al. Leuk Res*, 2005, **29**: 445
- [4] Perez L *et al. Biotechnol Appl Biochem*, 2006, **43**: 39
- [5] Bleday R *et al. Cancer*, 1986, **57**: 433
- [6] 莫志成等。《中国肿瘤临床》, 1999, **26**: 485
- [7] Fang J *et al. World J Gastroenterol*, 2003, **9**: 726
- [8] 方瑾等。《癌症》, 2002, **21**: 740
- [9] Hudson PJ. *Curr Opin Immunol*, 1999, **11**: 548
- [10] Holliger P *et al. Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 1126
- [11] Pavlinkova G *et al. J Nucl Med*, 1999, **40**: 1536
- [12] Beresford GW *et al. Int J Cancer*, 1999, **81**: 911
- [13] Le Gall F *et al. Protein Eng Des Sel*, 2004, **17**: 357
- [14] Kikuchi Y *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **315**: 912
- [15] Goel A *et al. Cancer Res*, 2000, **60**: 6964

## Construction and Expression of Bivalent Single-chain Antibodies with Different Linker Sequence against Human Colorectal Carcinoma

Dan-Dan Yan<sup>1,2</sup>, Jin Fang<sup>1\*</sup>, Jin-Dan Song<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China; <sup>2</sup>Department of Immunology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

**Abstract** To engineer and express the bivalent covalent scFv of ND-1mAb against human colorectal carcinoma, the two same ND-1scFv gene were linked by different length linker with sequences encoding G<sub>4</sub>S and (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>. The expression vector pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> was constructed to express the ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> fusion protein in *E.coli* BL21. The expressed product was purified by metal affinity chromatography using Ni-NTA resin. The purity and immunoreactivity were analyzed by SDS-PAGE, Immunofluorescence assays (IFA) and ELISA. The results demonstrated that pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> gene was constructed and expressed successfully in *E.coli* BL21 in the form of an inclusion body. The purity of ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> proteins with 5 amino acid linker and 15 amino acid linker were 90% and 86% respectively. IFA and ELISA revealed that both of ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5 and ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15 had specific binding activity to the tumor-associated antigen LEA expressed in human colorectal carcinoma cells and obviously higher than that of ND-1scFv, and compared with ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-5, ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>-15 showed the activity closer to ND-1mAb. They may become potentially useful in clinical diagnosis and therapy as a carrier for human colorectal carcinoma.

**Key words** bivalent single-chain antibody; ND-1; linker; colorectal carcinoma; expression

Received: June 28, 2006 Accepted: November 15, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.85-722-18-02, No.20375047) and the Scientific Research Project of the Liaoning Department of Education (No.202013135)

\* Corresponding author. Tel: 86-24-23256666-5347, E-mail: Jfang61@netease.com