

of LEA was 68.7% in the serum of patients with colorectal carcinoma, the normal people was 3.1%; The CEA was 56.6% and 6.25%, respectively. The results indicated that the sensitivity and specificity of LEA was higher than that of CEA. In the diagnosis of the localized colorectal cancer, The LEA was significantly increased in the positive rate as compared with CEA ($P < 0.05$). The LEA was 66.7%; the CEA was 36.1%. In the report, the findings showed that the LEA level wasn't elevated with Dukes' stage and was markedly elevated with the degree of the differentiation. In the localized stage and the advance stage, the positive rate of the LEA in serum of patients with colorectal cancer was 66.7% and 70.2%; CEA was 36.1% and 72.3%. In the well, moderated and poor differentiated colorectal cancer, the positive rate of LEA was 86.8%, 78.6% and 11.8%; CEA was 71.1%, 60.7% and 17.6%. So we could obtain the conclusion that LEA had well sensitivity and specificity in the serological diagnosis of patient with colorectal cancer, especially detected the localized colorectal cancer with well differentiation than that of CEA. LEA is a new tumor marker and has a potentially valuable marker for the serological diagnosis of colorectal carcinoma.

Key words: Colorectal cancer Monoclonal antibody Serological diagnosis Colorectal carcinoma-associated antigen ELISA

抗人大肠癌重组单链抗体的研制*

陈立 宋今丹

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室 沈阳 110001)

大肠癌在我国的发病率呈不断上升趋势。本室研制成功的抗人大肠癌单抗 ND-1, 在特异性上优于国外同类单抗^[1,2], 由于该单抗是鼠源抗体, 为降低其异种免疫原性, 对其进行基因改造, 制备不含重链和轻链恒定区的单抗, 将在大肠癌体内诊断、靶区治疗和导向手术上具有高的应用价值。本文利用重组噬菌体抗体系统通过合成 ND-1 单抗的 ScFv 片段(单链可变区基因片段), 将重链和轻链可变区基因连成单链 DNA 片段, 并克隆到载体中在大肠杆菌内表达, 获得了可溶性单链抗体。

材料与方 法

1. 试剂及试剂盒

重组噬菌体抗体系统的三个试剂盒均购自 Pharmacia 公司, 鼠 ScFv 试剂盒、表达试剂盒、检测试剂盒, 含有各步引物; 其余酶等试剂购自 Pharmacia, Promega, Sigma 等公司。

2. 实验过程

(1) 杂交瘤细胞的培养 将冻存的分泌 ND-1 单抗的杂交瘤细胞复苏后, 培养于含 10% 小牛血清的 1640 培养基中, 100% 湿度, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。

(2) 杂交瘤细胞 mRNA 的提取 取培养的杂交瘤细胞, 1000rpm 离心 5 分钟, 弃去上清液, 按照快速 mRNA 纯化试剂盒(购自 Pharmacia, 27-9254-01)的

设计, 提取 mRNA, mRNA 浓度 = $A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$ 。

(3) 重链可变区基因 cDNA 的合成 利用 RT-PCR 技术, 重链基因通用 5' 及 3' 端引物混合物购自 Pharmacia 公司。cDNA 第一链合成反应体系为 20 μl , 含 mRNA 0.8 μg , dNTP 混合物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 2.5 μl , oligo(dT) (100 $\mu\text{g/ml}$) 1 μl , AMV 逆转录酶 (Promega 产品) 24u, RNA 酶抑制剂 25u, 37℃ 1 小时, 95℃ 5 分钟。PCR 反应体系为 100 μl , 含反转录产物 20 μl , 混合引物 4 μl , Tag 酶 (Promega 产品) 2u, 参数为 94℃ 1 分钟, 55℃ 2 分钟, 72℃ 2 分钟, 30 个循环。

(4) 轻链可变区基因 cDNA 的合成 方法同上, 轻链混合引物购自 Pharmacia 公司。

(5) ScFv 片段的合成 50 μl 体系, 含重链和轻链可变区 cDNA 各 50ng, 连接 DNA 与引物混合物 4 μl , Tag 酶 2.5, dNTP 混合物 (20mmol/L) 2.5 μl , 7 个循环 (94℃ 1 分钟, 63℃ 4 分钟), 然后加入重链 5' 端与轻链 3' 端引物混合物 (购自 Pharmacia) 4 μl , Tag 酶 2.5, dNTP 混合物 1 μl , 并使终体积为 100 μl , 30 个循环 (94℃ 1 分钟, 55℃ 2 分钟, 72℃ 2 分钟)。

(6) DNA 的纯化 上述各步均采用电泳法结合 MicroSpin Column (Pharmacia) 方法纯化, DNA 浓度 = $A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$ 。

(7) 电泳检测 琼脂糖凝胶, 0.5 cm, PhiX174DNA/Hae III 为参照, EB 染色。

(8) Sfi I 和 Not I 酶切 纯化 ScFv 片段 1 μg ,

* 国家“八五”科技攻关项目, 85-722-18-02。

SfiI20U, 总体积 85, 50℃ 4 小时, 降至室温, 加 3mol/L NaCl 3.6 μ l, NotI40U, 总体积 100, 37℃ 4 小时, 酚/氯仿/异戊醇抽提, 纯化。

(9) ScFv 基因导入 pCANTAB5E 噬菌粒中
ScFv 片段 150ng, 10XOPA+缓冲液 5 μ l, 双酶切过的 pCANTAB5E 250ng, 10mmol/L ATP5 μ l, T4DNA 连接酶 7U, 总体积 50 μ l, 16℃ 1 小时, 70℃ 10 分钟, 冰冷 5 分钟。

(10) 转化 加 1ml 新制备的 E. coli TG1 细胞悬液, 42℃ 2 分钟, 取 900 μ l, 加 9.1ml 2xYT-G 培养液, 摇床 37℃, 250rpm, 1 小时, 加 1 氨苄青霉素及适量 M13K07 噬菌体液, 继续振摇 1 小时, 离心收集菌体细胞, 加 10ml 2xYT-AK 培养液, 摇床 37℃, 250rpm 过夜, 离心收集细胞, 移取 10ml 上清液, 加 2ml PEG/NaCl, 混匀后冰浴 1 小时, 离心收集重组噬菌体后加 16ml 12xYT 培养液。将 5ml 10 μ g/ml 大肠癌细胞移入培养皿, 室温 2 小时, 洗几次, 再用阻断缓冲液温育 1 小时, 洗净, 将上一步 16ml 重组噬菌体用 14ml 阻断液稀释, 室温 15 分钟, 移取 20ml 到培养皿中, 37℃ 2 小时, 冲洗彻底。取一培养皿加 10ml 对数期 TG1 细胞, 37℃ 1 小时, 各移取 0.1ml 与 2xYT 培养基制成 1:10, 1:100, 1:1000 混悬液, 与 0.1ml 未稀释细胞分别加到 SOBAG 培养基平板上, 30℃ 过夜, 将菌落接种到 96 孔板 (每孔含 0.4ml 2xYT-AG 培养液) MP 中, 30℃, 250rpm 过夜。向一新 96 孔板 (P1) 每孔加 400 μ l M13K07 噬菌体悬液, 37℃, 2 小时, 150rpm; 离心弃上清, 每孔加 400 μ l 2xYT-AK 培养液, 37℃, 250rpm, 过夜, 离心, 移取 322 μ l 至另一新 96 孔板 (P2) 对应位置, 从 P2 移取 2 μ l 于培养有对数期 E. coli HB2151 细胞的 96 孔板 (P3) 中。

(11) ELISA 检测噬菌体融合抗体 向 P2 每孔加 80 μ l 阻断液, 室温 10 分钟, 移入固定有抗原细胞经阻断的 96 孔板, 洗脱后加辣根过氧化物酶标记的羊抗 M13 抗体, 洗后加底物 ABTS, 待绿色显现后, 410nm 测量。

(12) 单链抗体的生成与检测 MP 每孔 40 μ l 对应移入 96 孔板 S1 中 (每孔含 400 μ l 2xTY-AG 培养液), 30℃ 2 小时, 250rpm; 离心后每孔加 400 μ l 12xYT-AI 培养液, 30℃, 250rpm, 3 小时, 离心, 移 320 μ l 上清于 96 孔板 S2, 加 80 μ l 阻断液, 室温 10 分钟, ELISA 检测 (抗 E Tag 抗体, 辣根过氧化物酶-羊抗小鼠 IgG, ABTS 底物)。将 P3 板 ELISA 阳性菌落分别划线接种于 SOBAG-N 培养基平板上, 30℃, 过夜, 转移菌落于

5ml SB-AG 培养液中, 30℃, 250rpm, 过夜, 加到 50ml SB-AG 中, 30℃, 250rpm, 1 小时, 离心弃上清, 加 50ml SB-AI 培养液, 30℃, 250rpm, 3 小时, 离心, 按试剂盒提取外周质部分含可溶性单链抗体。

结 果

1. 图 1 为重链可变区及轻链可变区 cDNA 琼脂糖凝胶电泳照片, 两种 cDNA 均位于 340bp 附近

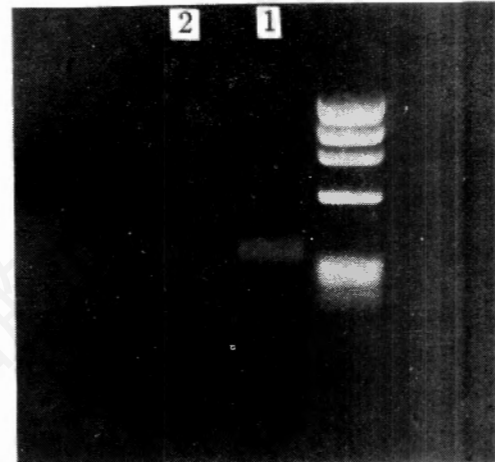


图 1 V_H 和 V_L cDNA 琼脂糖凝胶电泳结果
Marker: PhiX174DNA/Hae III; 1. V_H cDNA; 2. V_L cDNA.

2. 图 2 为 ScFv 片段的琼脂糖凝胶电泳照片, 位于 740bp 附近

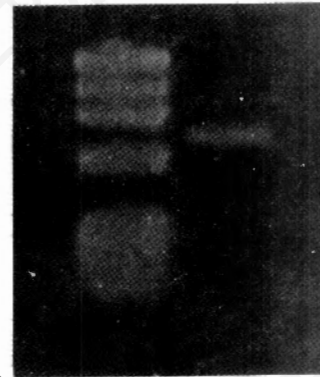


图 2 ScFv 片段琼脂糖凝胶电泳结果
Marker: PhiX174DNA/Hae III.

3. 单链抗体的活性与特异性

表 1 显示噬菌体抗体及单链抗体与不同人大肠癌细胞株 CL187、CX-1 及人宫颈癌细胞株

HeLa 细胞的相同条件下 ELISA 结果,由表中可知,两种抗体均显示了良好的对大肠癌细胞的结合性,且具有较高的活性,与 HeLa 细胞相比又具有很强的特异性结合力($P < 0.01$)。

表 1 重组抗体对不同癌细胞的结合性

	噬菌体抗体	单链抗体
CX-1	0.405	0.473
CL187	0.326	0.350
HeLa	0.094	0.085

注:表中值为 OD 值。

讨 论

临床应用理想的单抗应是人源的,但人-人杂交瘤制备困难,体外传代不稳,产生的抗体亲和力和产量不高,故目前较好的解决办法是利用基因工程手段对鼠源性单抗进行改造。现在已将免疫球蛋白结构和功能的研究成果与 DNA 重组技术相结合,成功地重组表达出嵌合抗体、重构抗体、单链抗体、单区抗体等一系列基因工程抗体^[3]。这些抗体具有异种免疫源性低,体内半衰期长,组织穿透力强等优点,在人体应用上显示出独到的优越性^[4,5]。载体 pCANTAB5E 含 SfiI 和 NotI 切点,且 ScFv 片段插入后紧邻编码 E-Tag 多肽的序列,表达的可溶性单链抗体含 E-Tag 多肽,故可利用抗 E-Tag 抗体进行检测。连接 DNA 表达出的一段(Gly,Ser),柔性多肽链既不影响抗体抗原结合构象,又可偶联同位素和药物等。ELISA 实验表明,噬菌体抗体及可溶性单链抗体均保持了

原 ND-1 单抗对大肠癌细胞的特异性结合,并且具有较强的结合活性,噬菌体抗体可用于体外诊断。可溶性单链抗体由于体积小,且不含 Fc 片段,而人体对异源抗体的排斥主要针对 Fc 片段,故用于体内显像时背景低,组织穿透力强,对于大肠癌体内诊断与靶区治疗有显著优越性,与同位素偶联后也可用于导向手术这些特点均优于原 ND-1 单抗。

摘 要

应用重组噬菌体抗体系统制备了重组单链抗体。首先从抗人结肠癌 ND-1 单抗杂交瘤细胞中提取 mRNA,利用反转录多聚酶链反应(RT-PCR)扩增出单抗重链可变区(V_H)及轻链可变区(V_L)片段,再通过连接 DNA 合成单链抗体可变区片段(ScFv),然后经双酶切后克隆到 pCANTAB5E 载体中,在 E. coli TGI 细胞中表达出噬菌体融合蛋白,用抗原阳性噬菌体感染 E. coli HB2151 细胞,产生单链抗体,该单链抗体既保持了原单抗的特异性,应用上又优于原单抗。

关键词: 大肠癌 杂交瘤 单链抗体

参 考 文 献

- [1] Bleday, R, Song J, et al., 1986, *Cancer*, 57 (3): 433-440.
- [2] Song J, et al., 1988, *Int Cell Biology*, 255.
- [3] Rodwell, JD, 1989, *Nature*, 342: 99-102.
- [4] Greg W, et al., 1991, *Nature*, 349: 293-299.
- [5] Orlandi R, et al., 1989, *PNAS*, 86: 3833-3840.

MAKING SINGLE-CHAIN ANTIBODY AGAINST HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELLS

CHEN Li SONG Jin Dan

(Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang, 110001)

ABSTRACT

A single-chain antibody against human colorectal carcinoma was synthesized using the Recombinant Phage Antibody System. First, we used RT-PCR to amplify the V_H and V_L genes from the mouse hybridoma mRNA. The V_H and V_L genes were then cloned into the phagemid vector pCANTAB5E and expressed as a fusion with a phage protein. Antigen-positive phage was used to infect E. coli HB2151 cells. A colony was then picked and grown up to provide a seed culture for production of soluble single-chain antibody. The recombinant antibody retains its antigen-binding

specificity.

Key words, Colorectal carcinoma Hybridoma Single-chain antibody

淋巴抑瘤素对五株肿瘤细胞株的体外抑瘤效应的分析研究

陈佩丽 王洪海 周金良* 乔 雯

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

1981年Brown^[1]曾报道T淋巴细胞经刺激能分泌一种抑制瘤生长的多肽类物质,并把它称为抑瘤素“M”。1986年Zarling^[2]等人已分离纯化到这种细胞因子。本实验室用ConA刺激外周血淋巴细胞,温育后从培养上清液中获得粗制的淋巴抑瘤素。用它在体外对五株肿瘤细胞株进行体外抑瘤效应的测定,并用显微照像技术对经淋巴抑瘤素作用过的肿瘤细胞进行活体显微观察照像,以此对淋巴抑瘤素的体外抑瘤效应进行分析研究。

材料和方法

1. 细胞株

卵巢癌细胞株3ao;宫颈癌细胞株HeLa;白血病细胞株K562;黑色素瘤细胞株MM960;羊膜上皮细胞株Wish。上述细胞株购于上海细胞所。

2. 淋巴抑瘤素制备和验证

5ml正常人的外周血,用淋巴细胞分离液分离获淋巴细胞经培养液洗两次后,以 1×10^5 /ml细胞密度培养在20ml含20%小牛血清,0.025% ConA的1640培养液中,37℃温育72小时,无菌条件下离心取上清液即为粗制淋巴抑瘤素,存放4℃冰箱备用。同时取4ml上清液用硫酸铵沉淀离心,脱盐后进行常规的15%SDS-PAGE电泳验证淋巴抑瘤素。

3. 抑制率的测定^[3,4]

无菌条件下取含淋巴抑瘤素的上清液20ml加入等量的含20%小牛血清的1640培养液,调pH为7.2,以每培养瓶(小号)3ml量培养肿瘤细胞。细胞接种量在 10^4 — 10^5 /瓶,37℃培养48小时传代一次,同时进行细胞计数。五株细胞用同一个浓度的淋巴抑瘤素,每次以同样条件重复接种三瓶,并以不含淋巴抑瘤素的同样培养作无药对照培养。

计算抑制率的公式:

$$\left(1 - \frac{\text{实验组平均每瓶细胞总数}}{\text{对照组平均每瓶细胞总数}}\right) \times 100\%$$

4. 显微观察和照像

每次传代前,在倒置显微镜下对活体肿瘤细胞进

行形态、胞质和细胞核的结构变化的观察,并进行显微照像以便分析。

结 果

1. 淋巴抑瘤素验证结果

在SDS-PAGE电泳分析图(图1)中,分子量26000位置上呈现出一条明显的蛋白带,而不含ConA刺激物的对照培养上清液沉淀后的电泳条带中无这条明显蛋白带。

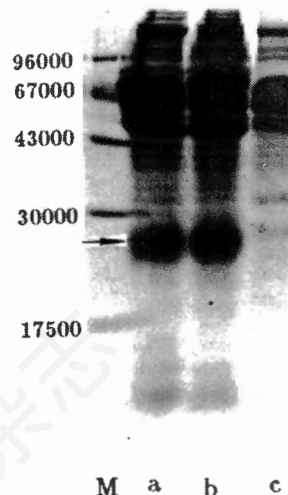


图1 淋巴抑瘤素SDS-PAGE电泳分析图

M. 标准分子量 a. 培养上清液 b. 培养上清液 c. 无药对照培养上清液。

2. 淋巴抑瘤素体外抑瘤效应的测定结果

从图2看出,3ao和Wish细胞株对淋巴抑瘤素的反应强烈,传至第五代抑制率在95%以上,HeLa细胞株表现为中等抑瘤效应,抑制率达76%。K562和MM960两株细胞刚一接触淋巴抑瘤素时出现了一个短暂的抑瘤效应,第一代K562细胞株抑制率为25%;MM960细胞株为59%。但第二代就很快适应了并出现了反效应,淋巴抑瘤素不但不能抑制细胞生长,反而

* 上海市静安区中心医院病理科。