

癌胚抗原单链抗体在细菌表面的展示及其应用

蒋依俐¹⁾, 罗砚曦²⁾, 翟利娟¹⁾, 谢恬¹⁾*, 阎辉²⁾*

(¹⁾杭州师范大学整合药学院, 杭州 311100; ²⁾浙江省医学科学院药物研究所, 杭州 310013)

摘要 癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)作为肿瘤标志物,在临床肿瘤诊断及肿瘤靶向治疗等方面具有重要应用价值。癌胚抗原单链抗体(CEA-specific single chain antibody fragments, CEA-scFv)能够特异性结合癌胚抗原。本研究将癌胚抗原单链抗体展示于大肠杆菌细胞表面,分析其作为癌胚抗原检测平台和细菌靶向载体的可行性。首先将CEA-scFv基因克隆到表面展示载体pBAD-OmpA-mCherry中,经酶切和测序证实,成功构建了重组质粒pBAD-OmpA-mCherry-CEA。重组菌经阿拉伯糖诱导后可检测到红色荧光,荧光强度在胰酶的作用下降低,全菌ELISA检测呈阳性反应,提示融合蛋白和目的蛋白质在重组菌表面展示成功。由Western印迹分析可知,融合蛋白质的相对分子质量约为85 kD,符合预期设计。进一步的研究提示,重组菌在大肠杆菌表面展示的癌胚抗原单链抗体具有生物活性,能够有效结合A549细胞裂解液的癌胚抗原。在细菌感染细胞实验中,与对照组相比,重组菌孵育A549细胞后细胞内可明显观察到点状红色荧光,证明重组菌能够靶向侵入癌胚抗原阳性肿瘤细胞。本研究为癌胚抗原相关的快速诊断和基于细菌载体的肿瘤靶向治疗奠定了实验基础。

关键词 大肠杆菌; 癌胚抗原单链抗体; 细菌表面展示; 肿瘤靶向治疗
中图分类号

Display of the Carcinoembryonic Antigen scFv on the Bacterial Surface and Its Application

JIANG Yi-Li¹⁾, LUO Yan-Xi²⁾, ZHAI Li-Juan¹⁾, XIE Tian¹⁾*, YAN Hui²⁾*

(¹⁾Holistic Integrative Pharmacy Institutes (HIPI), Hangzhou Normal University, Hangzhou 311100, China;

²⁾Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract As a tumor marker, the carcinoembryonic antigen (CEA) has important clinical application values in tumor diagnosis and tumor-targeting therapy. CEA-specific single chain antibody fragments (CEA-scFv) specifically bind to CEA. In the present study, CEA-scFv was displayed on the surface of *Escherichia coli* (*E. coli*), and its feasibility as a detection platform for CEA and bacterial targeting vectors was analyzed. Firstly the CEA-scFv gene was cloned into the surface display vector pBAD-OmpA-mCherry, and the recombinant plasmid pBAD-OmpA-mCherry-CEA was successfully constructed, which was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. Red fluorescence of the recombinant bacteria induced by arabinose can be detected, and the fluorescence intensity was decreased by trypsin digestion. Moreover, the whole-cell ELISA test showed a positive reaction, suggesting that the fusion protein and protein of interest was successfully displayed on the surface of the recombinant bacteria. Western blotting analysis showed that the relative molecular mass of the fusion protein was about 85 kD,

收稿日期: 2018-04-02; 修回日期: 2018-04-26; 接受日期: 2018-05-21

国家自然科学基金重点项目(No. 81730108); 杭州市科技局攀登工程“二期学科建设项目(No. PD2015303)

* 通讯作者 ¹⁾ Tel: 0571-28865458; E-mail: xbs@dljg.sina.net; ²⁾ Tel: 0571-88215439; E-mail: yanhui@zjams.com.cn

Received: April 2, 2018; Revised: April 26, 2018; Accepted: May 21, 2018

Supported by Key Projects of National Natural Science Foundation of China (No. 81730108) and “Climbing Projects of Hangzhou Science and Technology Bureau” (No. PD2015303)

* Corresponding author ¹⁾ Tel: 0571-28865458; E-mail: xbs@dljg.sina.net; ²⁾ Tel: 0571-88215439; E-mail: yanhui@zjams.com.cn

which was in line with the expectation. Further research suggested that CEA-scFv displayed on the surface of the recombinant bacteria had biological activity, and bound the CEA of A549 cell lysates effectively. Compared with the control group, the punctate red fluorescence was clearly observed in recombinant bacteria-infected A549 cells, indicating that the recombinant bacteria can target and invade CEA-positive tumor cells. This study provides an experimental basis for CEA-related rapid diagnosis and tumor targeted therapy based on bacterial carriers.

Key words *E. coli*; CEA-scFv; bacterial surface display; tumor-targeting therapy

肿瘤标志物是肿瘤早期诊断、转移监测及预后判断的临床重要参考指标^[1]。血清肿瘤标志物以其简便、无创和费用低等优点,成为肿瘤研究领域的热点。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是一种人类胚胎抗原特性的酸性糖蛋白,其表达水平与肿瘤的大小及转移等密切相关,是目前研究最广泛的肿瘤标志物之一。

癌胚抗原单链抗体(CEA-scFv)是通过噬菌体展示(phage display)技术筛选出来的能够与癌胚抗原结合的抗体片段,其分子结构相比于完整抗体更简单,但仍然具备与相应抗原结合的特异性。此外,其较简单的分子结构极大程度地降低了机体的免疫排斥反应。癌胚抗原单链抗体在癌胚抗原相关的肿瘤诊断、预后评估及肿瘤靶向治疗载体构建中具有重要应用价值。但癌胚抗原单链抗体主要采用原核系统表达和纯化,此过程不仅需要破菌处理和蛋白质的提取纯化,还涉及到繁琐的蛋白质变性-复性,耗时费力,成本昂贵。

细菌表面展示技术是利用锚定蛋白质将异源蛋白质以融合蛋白质的形式展示于宿主细胞外膜的一种微生物表面展示技术。由于被展示的蛋白质能够保持原有的生物活性,其产物的提取纯化过程也得到了简化,因此该技术被广泛应用于多个领域^[2,3]。本研究设计将癌胚抗原单链抗体以融合蛋白质形式展示于细菌表面。蛋白质在细菌表面展示的策略,可克服上述常规蛋白质原核表达中涉及的繁琐问题,该方法系将靶蛋白与某些特定蛋白质载体融合而“锚定”于细菌表面,从而有利于通过简单的重组菌培养获得靶蛋白。更重要的是,靶蛋白在细菌表面展示,可直接省略免疫检测和蛋白质相互作用实验中的固相化步骤,省时省力。

Lpp-OmpA 表面展示系统,是由大肠杆菌脂蛋白(lipoprotein, Lpp)和外膜蛋白 A(outer membrane protein A, OmpA)两部分构成,二者相辅相成^[4]。大肠杆菌脂蛋白的功能是将靶蛋白锚定于细菌外膜,而外膜蛋白 A 区域是转运靶蛋白跨越外膜的关键区域。研究证明,靶蛋白与 Lpp-OmpA 的 C 端融合

后可有效展示于宿主菌的表面^[5,6]。因此, Lpp-OmpA 系统是细菌展示外源蛋白质的优良载体^[7,8]。本研究以大肠杆菌 BL21(DE3)为宿主菌,利用 Lpp-OmpA 表面展示系统,将癌胚抗原单链抗体以融合蛋白方式展示于细菌表面,为基于癌胚抗原的癌症快速诊断和肿瘤靶向治疗的研究奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和细胞

大肠杆菌感受态 BL21(DE3)为本实验室保存,阿拉伯糖诱导表达载体 pBAD-OmpA-mCherry(表面展示红色荧光蛋白质)、pBAD-Z(空载体)和 pCB-MCZ(胞内表达红色荧光蛋白质)为本实验室构建(未发表,将另文报道),含 CEA-scFv 基因序列的质粒 pMD-CEA 为德国洪堡大学 Gabriel Pecher 教授惠赠。人肺癌 A549 细胞和人胚肾 293 细胞为本实验室保存。

1.2 培养基

大肠杆菌 LB 培养基购于上海生工公司。

1.3 试剂和仪器

Trans2K Plus DNA marker 购自北京全式金生物技术有限公司;T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶购自 NEB 公司;PCR 试剂盒、切胶回收试剂盒、ABTS (2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)显色试剂盒均购自上海生工公司;小鼠 anti-His-tag 抗体、小鼠抗人癌胚抗原抗体、羊抗小鼠 IgG-FITC、羊抗小鼠 IgG-HRP 购自武汉博士德公司;PCR 引物由上海生工公司合成;胰酶、胎牛血清和 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培养基购自 Gibco 公司;其他化学试剂均为国产或进口分析纯;倒置荧光显微镜为上海光学仪器六厂产品;核酸电泳装置为上海天能科技有限公司产品;荧光检测仪器为 cytation3,美国伯腾仪器有限公司产品。

1.4 重组质粒的构建

以质粒 pMD-CEA 为模板,bg-CEA 和 Eco-CEA 为上下游引物(Table 1),PCR 扩增获得 CEA-scFv 片段。纯化后以 Spe I 和 EcoR I 双酶切并回收酶切产

物,与同样双酶切的 pBAD-OmpA-mCherry 载体 (Fig. 1) 相连接,得到重组质粒 pBAD-OmpA-mCherry-CEA (Fig. 1)。构建的重组质粒经酶切和测序验证,以保证编码框正确。

Table 1 Primers

| Primers | Sequences (5'-3') |
|---------|-----------------------------------------------------------------|
| bg-CEA | GGAATTCATATCGATATCGGATCCATGGCTCTCGACAAGGCGT |
| Eco-CEA | CCGCTCGAGATTAGAAATTCAGTAGATCTCGGGCCTTTGCTGCCGTGATTGTGCCACTCAACG |

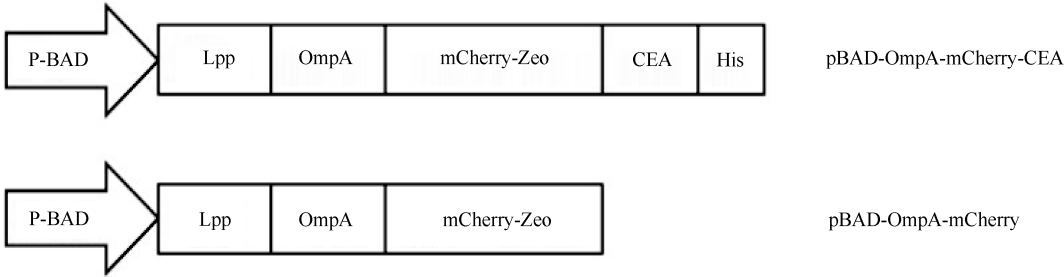


Fig. 1 Structure of recombinant plasmids and the relative position of key elements *P-BAD*: Arabinose-inducible promoter. *Lpp-OmpA*: The gene encoding fusion of the major lipoprotein signal sequence fragment and a portion of the outer membrane protein A. *mCherry*: The gene encoding red fluorescent protein. *Zeo*: Resistance gene of Zeocin. *CEA*: The gene coding *CEA-specific* single chain antibody fragments (CEA-scFv). *His*: The gene encoding 6X Histidine-tag (His tag)

1.5 融合蛋白的诱导表达和 Western 印迹鉴定

参考文献[9,10] 方法。重组质粒转化于大肠杆菌 BL21 (DE3) 中用于表达分析,大肠杆菌感受态的制备和转化按照分子克隆实验指南(第三版)中方法进行。前 1 d 将鉴定正确的重组菌摇菌过夜,第 2 天按 1:100 接种到新鲜的含 50 mg/L 氨苄青霉素和 50 mg/L 博来霉素的 LB 液体培养基中,振荡培养至 A 值为 0.4 ~ 0.6 时,加入阿拉伯糖使其终浓度分别为 0.0002%、0.002%、0.02%、0.2%、2%。摇床温度设为 30℃,200 r/min,诱导过夜后取 1 mL 菌液离心,用 PBS 洗 2 次,最后用 200 μL PBS 重悬菌体检测荧光强度。

按以上方法用阿拉伯糖诱导重组菌和 pBAD-Z 转化菌(对照),收集菌液离心,PBS 洗 3 次,最后用 PBS 溶液重悬。加入上样缓冲液,煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE,再将胶上蛋白质转移至硝酸纤维素膜上。用 TBS-T (0.1% Tween-20 的 TBS) 配制的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,再加入 anti-His tag 抗体,4℃ 孵育过夜。TBS-T 充分洗膜后,加入相应的二抗(羊抗小鼠 IgG-HRP)室温孵育 1 h。TBS-T 充分洗膜,显色并在暗室曝光。

1.6 胰酶消化实验

参考文献[3,11] 方法。将重组菌按照 1.5 中的方法诱导重组菌,振荡培养过夜后按 1:100 接种到新鲜的含 50 mg/L 氨苄青霉素和 50 mg/L 博来霉素的 LB 液体培养基中,振荡培养至 A 值为 0.4 ~ 0.6 时,加入阿拉伯糖使其终浓度为 0.2%,30℃,

200 r/min 诱导 6 h 取菌液 1 mL,8 000 r/min 离心 5 min 弃上清,用 PBS 洗涤 2 次,得到的菌体沉淀用 500 μL 胰酶重悬,37℃ 反应 0 ~ 7 min。反应后立即插入冰中,并加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化。再用 PBS 洗涤菌体 2 次,8 000 r/min 离心 3 min,沉淀用 200 μL 的 PBS 重悬,放入酶标板测荧光强度,无荧光表达的 pBAD-Z 转化菌和胞内表达红色荧光蛋白的 pCB-MCZ 转化菌用相同条件处理,作为对照。

1.7 全菌 ELISA 检测

参考文献[12,13] 方法。重组菌和 pBAD-Z 转化菌分别经阿拉伯糖诱导过夜,调整菌液 A₆₀₀ = 1.0,离心收集菌体,并用 PBS 洗涤 2 次。加入 1:200 稀释的一抗(小鼠 anti-His tag 抗体),混匀后室温下反应 2 h,反应完成后用 PBS 洗 3 次,8 000 r/min 离心 3 min 弃上清。加入 1:2 000 稀释的二抗(羊抗小鼠 IgG-HRP),混匀后室温下反应 1 h,反应完成后用 PBS 洗 5 次。最后用 ABTS 显色试剂盒显色,重悬菌体,避光反应 20 min,12 000 r/min 离心 2 min 后取上清至酶标板,于 405 nm 检测 A 值。重组菌和 pBAD-Z 转化菌再分别设置阴性对照组,即不加一抗只加二抗,其他处理同前面所述。

1.8 靶细胞表面癌胚抗原的检测

在细胞培养瓶(25 cm²)中培养 A549 和 293 细胞,待细胞生长至 80% ~ 90%,弃培养液,PBS 洗 2 次,EDTA 处理(不含胰酶,以避免对细胞表面蛋白质的破坏),消化完成后收集细胞。细胞用 4% 多聚

甲醛固定,室温下反应 30 min,再用 PBS 洗涤 2 次。加入 1:200 稀释的一抗(小鼠抗人癌胚抗原抗体),混匀后室温下反应 2 h,反应完成后用 PBS 洗 3 次,1 000 r/min 离心 5 min 弃上清。加入 1:200 稀释的二抗(羊抗小鼠 IgG-FITC),混匀后室温下反应 1 h,反应完成后用 PBS 洗 5 次,最后用 100 μ L PBS 重悬细胞,525 nm 处测荧光强度。A549 和 293 细胞再分别设置阴性对照组,即不加一抗只加二抗,其他处理同前面所述。

1.9 重组菌结合可溶癌胚抗原的 ELISA 检测

冻融裂解液的制备:培养 A549 细胞,待细胞培养瓶(25 cm^2)的细胞生长至 80% ~ 90% 时,弃上清,用 PBS 溶液洗 3 次,最后加入 800 μ L PBS 溶液,−70℃/37℃,冻融 3 次,最后收集细胞冻融裂解液,储存于−20℃备用。

参考文献[11,14]方法。重组菌和 pBAD-OmpA-mCherry 转化菌诱导后离心收集菌体,调整菌液 $A_{600} = 1.0$ 。PBS 洗涤 2 次,分别与癌胚抗原表达量高的 A549 细胞冻融裂解液混合均匀,室温下反应 2 h。PBS 洗涤 3 次,加入 1:200 稀释的一抗(小鼠抗人癌胚抗原抗体),室温放置 2 h。PBS 洗涤 3 次,加入 1:200 稀释的二抗(羊抗小鼠 IgG-FITC),室温下反应 1 h。反应完成后用 PBS 洗涤 5 次,最后用 200 μ L PBS 重悬菌体,525 nm 处测细菌表面结合的绿色荧光强度,即检测癌胚抗原单抗抗体与可溶性癌胚抗原的特异性结合能力。重组菌和 pBAD-OmpA-mCherry 转化菌再分别设置阴性对照组,即不加一抗只加二抗,其他处理同前面所述。

1.10 免疫荧光检测

参考文献[14]方法。重组菌诱导过夜后离心收集菌体,并将菌体重悬于含 10 g/L 牛血清白蛋白的 PBS 中,调整 $A_{600} = 1.0$,将菌体与含癌胚抗原的冻融裂解液(方法 2.6)混合均匀,室温放置 2 h。PBS 洗涤后加入 1:200 稀释的一抗(小鼠抗人癌胚抗原抗体),室温放置 2 h。PBS 洗涤 3 次,加入 1:200 稀释的二抗(羊抗小鼠 IgG-FITC),室温下放置 1 h,最后将菌体用 PBS 洗涤 5 次,在荧光倒置显微镜下观察。

1.11 重组菌感染细胞实验

参考文献[15,16]方法。前 1 d 将 A549 细胞接种于 6 孔板中,37℃,5% CO_2 培养过夜,弃上清,用无血清的 DMEM 洗 2 次。重组菌和 pBAD-OmpA-mCherry 转化菌分别经阿拉伯糖诱导过夜,离心收集菌体,调整菌液 $A_{600} = 1.0$ 。用无血清的 DMEM 洗

涤 2 次,再用 500 μ L 无血清 DMEM 细胞培养液重悬细菌沉淀。将重悬液加入 6 孔板中,轻轻摇晃使之均匀分布,在 37℃,5% CO_2 条件下放置 3 h,无菌 PBS 洗 3 次以除去未结合的细菌。最后加入庆大霉素,使其终浓度为 100 mg/L,在 37℃ 条件下作用 2 h,以杀死未进入肿瘤细胞内的细菌;无菌 PBS 冲洗 5 ~ 8 次,倒置荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 重组质粒构建成功

将 *CEA-scFv* 基因片段通过 PCR 扩增和双酶切(*Spe* I 和 *Eco*R I)插入到同样双酶切的 pBAD-OmpA-mCherry 载体中,获得重组质粒 pBAD-OmpA-mCherry-CEA。经酶切鉴定(Fig. 2)和测序证实,重组质粒构建成功。

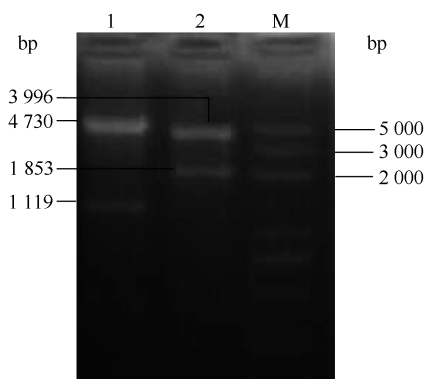


Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of the recombinant plasmid pBAD-OmpA-mCherry-CEA

1: pBAD-OmpA-mCherry-CEA digested with *Pst* I. The bands are in line with expectations; 2: pBAD-OmpA-mCherry-CEA digested with *Mlu* I and *Xho* I. The bands are in line with expectations; M: DNA ladder

2.2 重组菌的融合蛋白诱导表达成功

在重组菌菌液中加入阿拉伯糖,使其终浓度分别为 0.0002%、0.002%、0.02%、0.2%、2%,在 30℃ 摇菌 200 r/min 诱导过夜。取 1 mL 菌液洗涤后用 200 μ L PBS 重悬测荧光强度,结果如 Fig. 3A 所示。由于融合基因中的标志物是红色荧光蛋白质(mCherry),因此通过融合蛋白质的荧光检测可证明融合蛋白质的表达,且在阿拉伯糖浓度为 0.2% 时重组菌荧光强度达到最高。重组菌表面展示的融合蛋白质中含有 His-tag 标签,故通过 anti-His tag 抗体可鉴定融合蛋白的表达。Western 印迹检测结果如 Fig. 3B 所示,融合蛋白在 85 kD 处出现特征带,符合预期条带大小。

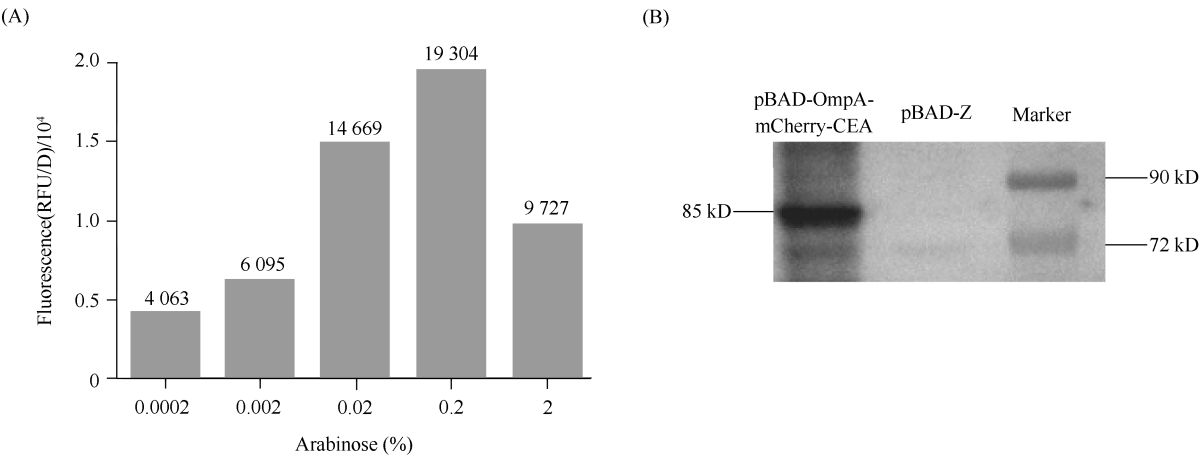


Fig. 3 Expression of the fusion protein in *E. coli* BL21 (DE3) cells transformed with pBAD-OmpA-mCherry-CEA
(A) The expression of the fusion protein after induction with different concentrations of arabinose. The fluorescent intensity of the recombinant bacteria changed with different concentrations of arabinose, and the fluorescence intensity of recombinant bacteria reached the highest when the concentration of arabinose was 0.2%. (B) Western blotting analysis of the expression of the fusion protein in whole cell lysates after induction with arabinose. The expected 85-kD fusion protein was identified using the anti-His antibody (left panel). Right panel: Marker. pBAD-Z was used as a control (middle panel)

2.3 融合蛋白质在大肠杆菌表面展示成功

本文癌胚抗原单链抗体与红色荧光蛋白质 (mCherry) 串联融合表达,其外膜带有红色荧光,故重组菌在阿拉伯糖诱导后呈现红色荧光 (Fig. 4)。重组菌外膜展示的融合蛋白质经胰酶处理后结构破坏,导致菌体荧光强度随之变化。而胞内表达红色荧光蛋白 (pCB-MCZ) 和无荧光标记基因的菌体 (pBAD-Z) 不受胰酶的影响,从而证明融合蛋白质在大肠杆菌表面展示成功。

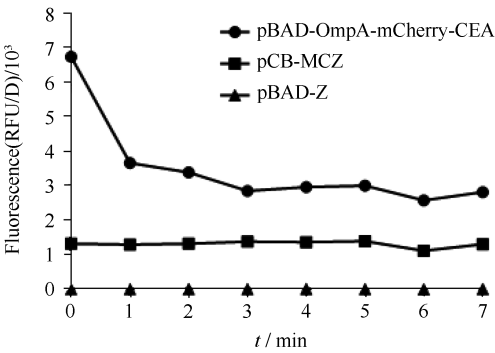


Fig. 4 Identification of the fusion proteins on the surface of *E. coli* by trypsin digestion The fluorescence intensity of the recombinant bacteria (pBAD-OmpA-mCherry-CEA) displaying red fluorescent protein on the surface decreased over time after trypsin digestion. For pCB-MCZ expressing red fluorescent protein intracellularly, the fluorescence intensity was not affected by trypsin. pBAD-Z is considered negative controls not expressing red fluorescent protein

2.4 目的蛋白质在大肠杆菌表面展示成功

全菌 ELISA 用于鉴定细菌表面展示的蛋白质。本研究将 6 × His-tag 序列导入 *CEA-scFv* 目的基因末端,有利于重组融合蛋白质和目的蛋白质的免疫检测。将 pBAD-Z 转化菌和重组菌诱导表达后收集菌体。用一抗 (小鼠 anti-His tag 抗体) 和二抗 (羊抗小鼠 IgG-HRP) 相继孵育,显色后检测。结果显示 (Fig. 5),重组菌加一抗的实验组 A 值是不加一抗重组菌的 5 倍多,而 pBAD-Z 转化菌实验组和不加一抗的阴性对照组 A 值无变化,且重组菌加一抗的实验组 A 值远高于 pBAD-Z 转化菌。本次实验采用的是未经破碎的完整细菌,只有表面展示 His-tag 的重组菌才能被 His-tag 抗体识别,进而与二抗结合,从而证明重组菌的融合蛋白质和目的蛋白质成功展示于宿主菌表面。

2.5 A549 细胞表面癌胚抗原的检测

细胞表面的癌胚抗原可通过 ELISA 进行鉴定。细胞固定后直接用一抗 (小鼠抗人癌胚抗原抗体) 和二抗 (羊抗小鼠 IgG-FITC) 孵育,于 525 nm 处测荧光强度。结果显示 (Fig. 6),A549 细胞经一抗二抗孵育后荧光强度明显增强,是 293 细胞的 3 倍以上,且 A549 细胞加一抗二抗的荧光强度是不加一抗的 2 倍以上,说明 A549 细胞表面含有癌胚抗原,故选用 A549 细胞作为癌胚抗原阳性细胞使用。

2.6 重组菌表面展示的癌胚抗原单链抗体具有生物活性

A549 细胞表面表达癌胚抗原,故其冻融裂解液

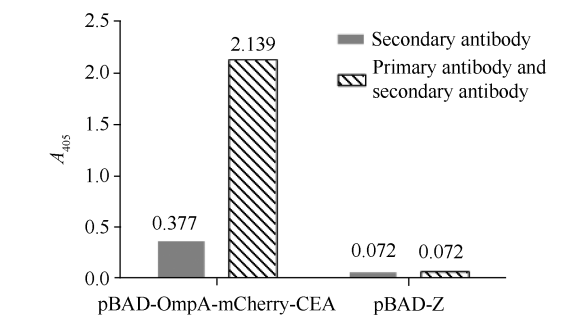


Fig. 5 Analysis of proteins of interest on the surface of *E. coli* by whole-cell ELISA The expression of the protein of interest on the surface was analyzed by the primary mouse anti-His antibody and secondary goat anti-mouse IgG-HRP antibody, as well as chromogenic substrates ABTS. The absorbance values of the recombinant bacteria containing the *His-tag* gene incubated with the primary and secondary antibodies were more than five times higher than that of the secondary antibodies only. However, the absorbance value of experimental data of pBAD-Z-transformed bacteria without the *His-tag* gene did not change, whether or not the primary antibody was added

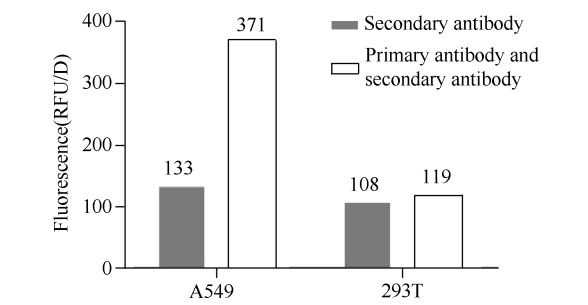


Fig. 6 Analysis of CEA on the surface of A549 and 293 cells by ELISA A549 and 293 cells were directly incubated with the primary mouse anti-human CEA antibody and secondary goat anti-mouse IgG-FITC antibody after being fixed by para-formaldehyde. The fluorescence intensity of A549 cells incubated with the primary antibody and secondary antibody was more than three times higher than that of 293 cells

含有大量可溶性癌胚抗原,可作为癌胚抗原母液使用。A549 细胞裂解液分别与 pBAD-OmpA-mCherry 转化菌(表面展示红色荧光蛋白质但不展示癌胚抗原单链抗体)和重组菌(表面展示红色荧光蛋白和癌胚抗原单链抗体)室温孵育后,用癌胚抗原一抗(其与癌胚抗原单链抗体识别位点不同)和二抗(羊抗小鼠 IgG-FITC)孵育,检测荧光强度(Fig. 7)。重组菌经一抗二抗孵育后绿色荧光强度明显增强,是 pBAD-OmpA-mCherry 转化菌和不加一抗的重组菌的 3 倍以上。此结果证明,表面展示癌胚抗原单链抗体的重组菌具有生物活性,能够特异性结合可溶

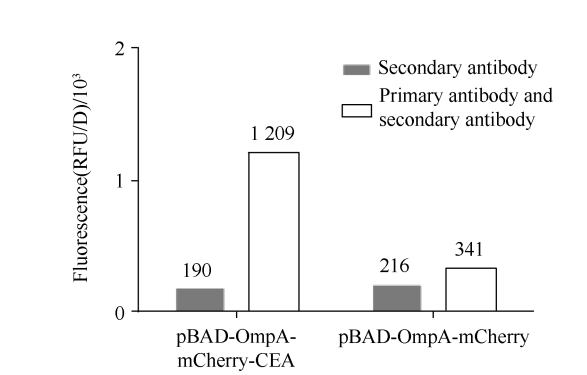


Fig. 7 Analysis of the recombinant bacteria binding to soluble CEA of A549 cell lysates by whole-cell ELISA The recombinant bacteria treated with the primary mouse anti-human CEA antibody and secondary goat anti-mouse IgG-FITC antibody after incubating with soluble CEA of A549 cell lysates. The fluorescence intensity of the recombinant bacteria containing the *CEA-scFv* gene with primary and secondary antibodies were more than three times higher than that of the transformed bacteria (pBAD-OmpA-mCherry) without *CEA-scFv*

性癌胚抗原。

2.7 表面展示癌胚抗原单链抗体的重组菌能够有效结合可溶性癌胚抗原

表面展示癌胚抗原单链抗体的重组菌与可溶性癌胚抗原孵育后,再利用重组菌结合的可溶性癌胚抗原与癌胚抗原抗体发生特异性反应,从而使得重组菌与二抗(羊抗小鼠 IgG-FITC)有效结合。荧光倒置显微镜观察结果显示(Fig. 8),自带红色荧光的重组菌与可溶性癌胚抗原及抗体反应后,菌体表面呈现绿色荧光(FITC 标记二抗为绿色荧光)。此实验结果进一步证明,大肠杆菌表面展示的癌胚抗原单链抗体能够特异性结合可溶性癌胚抗原。

2.8 重组菌靶向侵入 A549 细胞

如上所述,重组菌表面展示的癌胚抗原单链抗体能够特异性结合癌胚抗原,故推测重组菌可以靶向结合癌胚抗原阳性的肿瘤细胞(如 A549 细胞),从而使重组菌靶向侵入肿瘤细胞。细菌与 A549 细胞孵育 3 h 后经庆大霉素杀死细胞外细菌。荧光显微镜观察结果显示(Fig. 9),重组菌孵育 A549 细胞后,A549 细胞内出现明显的点状红色荧光,说明带有荧光标记的重组菌已经侵入到 A549 细胞内,而 pBAD-OmpA-mCherry 转化菌(表面展示红色荧光蛋白质但无癌胚抗原单链抗体展示)孵育细胞后,未检测到红色荧光,从而证明了表面展示癌胚抗原单链抗体的重组菌能够特异性侵入癌胚抗原阳性的癌细胞。

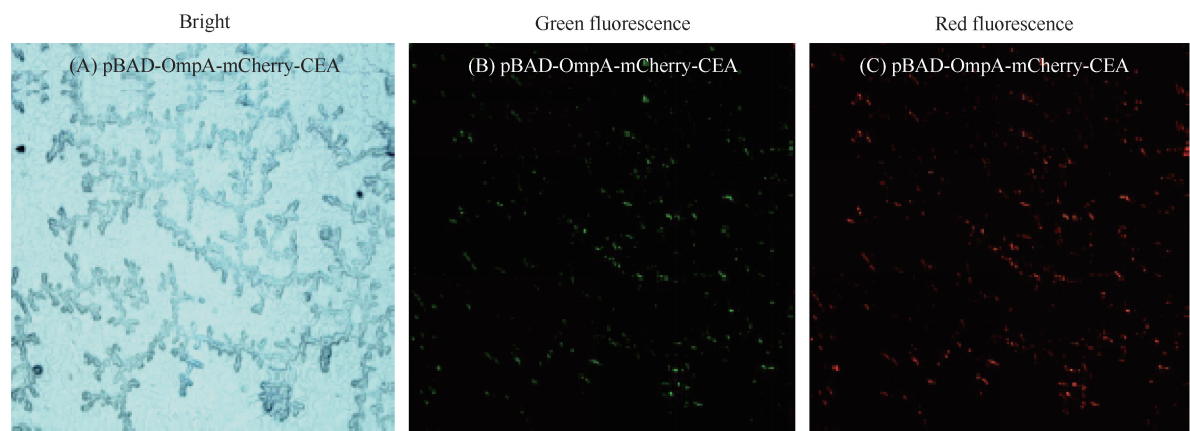


Fig. 8 Recombinant bacteria can bind to soluble CEA effectively The recombinant bacteria treated with the primary mouse anti-human CEA antibody and the secondary goat anti-mouse IgG-FITC antibody successively after incubating with soluble CEA. (A) Bright field images of the recombinant bacteria surface-displaying CEA-scFv after a series of reactions. (B) Green fluorescence images of the recombinant bacteria surface-displaying CEA-scFv. Green fluorescence was observed in the recombinant bacteria after a series of reactions. (C) Red fluorescence images of the recombinant bacteria surface-displaying CEA-scFv. The recombinant bacteria displayed red fluorescent proteins on the surface

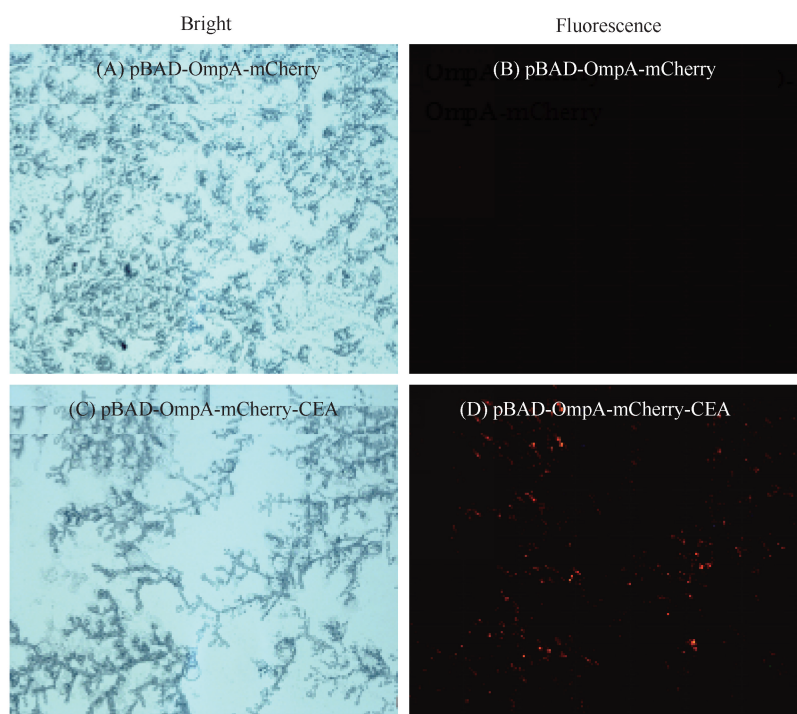


Fig. 9 The recombinant bacteria can target and invade A549 cells specifically (A) Bright field images and (B) Red fluorescence images of A549 cells infected with the transformed bacteria with pBAD-OmpA-mCherry. No fluorescence was observed in A549 cells after infection. (C) Bright field images and (D) red fluorescence images of A549 cells infected with the recombinant bacteria surface-displaying CEA-scFv. The punctate red fluorescence was clearly observed in A549 cells after infection

3 讨论

癌胚抗原是由 Gold 等于 1965 年在人结肠癌血清中被发现。随后的研究显示,癌胚抗原广泛表达于多种类型的肿瘤细胞,如胃癌^[17] 和非小细胞肺

癌^[18,19] 等。因此,癌胚抗原一直是临床上最常用的肿瘤标志物和检测指标之一^[20]。而针对癌胚抗原获得的单链抗体在肿瘤诊断中的作用不容忽视。癌胚抗原单链抗体 (CEA-scFv) 是通过噬菌体展示技术筛选出来的能够与癌胚抗原结合的抗体片

段,在肿瘤诊断方面可代替全抗体,而在肿瘤诊断和靶向治疗方面具备独特优势。

外膜蛋白 A (OmpA) 在革兰氏阴性菌高度保守。通过反向平行的 β -链穿过细菌膜,有利于靶蛋白质的表面展示。近年来,有研究者利用外膜蛋白 A 将链球菌的免疫原 GapC₁₋₁₅₀ 展示于细菌表面,从而增强了细胞免疫应答^[21]。Wendel 等将 OmpA 基因、绿色荧光标记基因和纳米抗体基因融合。实验证明,绿色荧光有利于筛选和优化表面展示系统,从而达到简化蛋白质生产等目的^[22]。因此,本研究将 CEA-scFv 基因融合到含有标志物荧光抗性融合基因 (*mCherry-Zeocin*) 的表面展示载体中,从而使癌胚抗原单链抗体展示于大肠杆菌表面,探讨基于细菌表面展示癌胚抗原单链抗体的肿瘤诊断和靶向治疗的新颖应用。

本文通过 PCR 使 CEA-scFv 末端带上组氨酸标签基因 (*His-tag*),纯化后插入到具有标志红色荧光抗性基因 (*mCherry-Zeocin*) 的细菌表面展示载体中。系列实验(全菌 ELISA、胰酶消化实验、免疫荧光实验等)证明,诱导表达后癌胚抗原单链抗体成功展示于大肠杆菌表面。既而本文探讨了表面展示癌胚抗原单链抗体重组菌的初步应用的可行性。

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 发明迄今已近半个世纪(1971 年发明)。由于其简便易行,无需昂贵仪器,避免同位素使用及适合于基层单位等优点,至今仍是最常用的免疫检测方法之一。但 ELISA 也有缺点,即制备特异性抗体并将抗体或待检抗原包被在固相支撑物上。抗体包被过程耗时(一般需过夜)费力,不易标准化和均一化,容易导致实验参数变异。在本研究中,将癌胚抗原单链抗体展示于细菌表面,一步完成抗体制备和抗体包被(固相化)步骤,使得重组菌成为 ELISA 检测平台系统。结果表明,该系统可用于检测细胞裂解液的可溶性癌胚抗原,而避免了常规 ELISA 检测中耗时费力的抗体制备包被过程,大大缩短了检测时间。

近年来,有研究者将 anti-HER2/neu 抗体展示于大肠杆菌外膜^[15]。结果表明,该重组菌可直接侵入相应受体阳性的癌细胞,其原因在于其表面展示的抗体对 HER2/neu 高度表达的细胞具有靶向性。因此,本文将重组菌直接与癌胚抗原阳性的癌细胞 (A549 细胞) 孵育。由 Fig. 9 可知,表面展示癌胚抗原单链抗体的重组菌可靶向结合癌胚抗原阳性的癌细胞,与上述研究结果相符。此侵染实验结果为基于细菌载体的肿瘤基因靶向治疗展示了广阔前景。

接下来,本室将对重组菌进行一系列改造,期望重组菌可以携带一种或多种抗癌药物,再利用重组菌的靶向性将抗癌药物转运到癌胚抗原高水平表达的肿瘤细胞中,以提高药物治疗的效果。

参考文献 (References)

- [1] Cedrés S, Nuñez I, Longo M, *et al.* Serum tumor markers CEA, CYFRA21-1, and CA-125 are associated with worse prognosis in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Clin Lung Cancer*, 2011, **12**(3): 172-179
- [2] Zhao Y, Liu Q, Wang X, *et al.* Surface display of *Aeromonas hydrophila* GAPDH in attenuated *Vibrio anguillarum* to develop a novel multivalent vector vaccine [J]. *Mar Biotechnol* (NY), 2011, **13**(5): 963-970
- [3] Binder U, Matschiner G, Theobald I, *et al.* High-throughput sorting of an Anticalin library via EspP-mediated functional display on the *Escherichia coli* cell surface [J]. *J Mol Biol*, 2010, **400**(4): 783-802
- [4] Earhart C F. Use of an Lpp-OmpA fusion vehicle for bacterial surface display [J]. *Methods Enzymol*, 2000, **326**: 506-516
- [5] Benhar I, Azriel R, Nahary L, *et al.* Highly efficient selection of phage antibodies mediated by display of antigen as Lpp-OmpA' fusions on live bacteria [J]. *J Mol Biol*, 2000, **301**(4): 893-904
- [6] Lee S Y, Choi J H, Xu Z. Microbial cell-surface display [J]. *Trends Biotechnol*, 2003, **21**(1): 45-52
- [7] Fernández L A. Prokaryotic expression of antibodies and affibodies [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**(4): 364-373
- [8] Jeiranikhameneh M, Razavi M R, Irani S, *et al.* Designing novel construction for cell surface display of protein E on *Escherichia coli* using non-classical pathway based on Lpp-OmpA [J]. *AMB Express*, 2017, **7**(1): 53
- [9] Mäkelä J, Kandhavelu M, Oliveira S M, *et al.* In vivo single-molecule kinetics of activation and subsequent activity of the arabinose promoter [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(13): 6544-6552
- [10] Qiu D, Damron F H, Mima T, *et al.* PBAD-based shuttle vectors for functional analysis of toxic and highly regulated genes in *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. and other bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(23): 7422-7426
- [11] Van G N, Sleutel M, Deboeck F, *et al.* Surface display of the receptor-binding domain of the F17a-G fimbrial adhesin through the autotransporter AIDA-I leads to permeability of bacterial cells [J]. *Microbiology*, 2009, **155**(Pt2): 468-476
- [12] van Bloois E, Winter R T, Janssen D B, *et al.* Export of functional *Streptomyces coelicolor* alditol oxidase to the periplasm or cell surface of *Escherichia coli* and its application in whole-cell biocatalysis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **83**(4): 679-687
- [13] 高国辉, 黄奇迪, 王金丹, *et al.* Anti-HER2ScFv-GFP 融合蛋白在大肠杆菌中的表达及其靶向结合乳腺癌细胞的初步分析 [J]. *温州医科大学学报* (Gao GH, Huang QD, Wang JD, *et al.* Expression of the fusion protein anti-HER2 ScFv-GFP in *E. coli* and the analysis of targeting binding function on the surface of the breast cancer cells [J]. *J Wenzhou Med Univ*), 2011, **41**(3): 209-213
- [14] Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'Hermitte M, *et al.* In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes [J]. *Toxicology*, 2008, **253**(1-3): 137-146
- [15] Chang C H, Cheng W J, Chen S Y, *et al.* Engineering of *Escherichia coli* for targeted delivery of transgenes to HER2/neu-positive tumor cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, **108**(7): 1662-1672
- [16] Chiang C J, Chang C H, Chao Y P, *et al.* Development of a targeted gene-delivery system using *Escherichia coli* [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, **1409**: 85-93

[17] Lai I R, Lee W J, Huang M T, *et al.* Comparison of serum CA72-4, CEA, TPA, CA19-9 and CA125 levels in gastric cancer patients and correlation with recurrence [J]. Hepatogastroenterology, 2002, **49**(46) : 1157-1160

[18] Tomita M, Shimizu T, Ayabe T, *et al.* Maximum SUV on positron emission tomography and serum CEA level as prognostic factors after curative resection for non-small cell lung cancer[J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2012, **8**(3) : 244-247

[19] Wang XB, Li J, Han Y. Prognostic significance of preoperative serum carcinoembryonic antigen in non-small cell lung cancer: a meta-analysis[J]. Tumour Biol, 2014, **35**(10) : 10105-10110

[20] Gameiro S R, Jammeh M L, Hodge J W. Cancer vaccines targeting carcinoembryonic antigen: state-of-the-art and future promise[J]. Expert Rev Vaccines, 2013, **12**(6) : 617-629

[21] Song B, Yang X, Sun H, *et al.* Immunogenicity of amino acids 1-150 of Streptococcus GapC displayed on the surface of Escherichia coli[J]. Microb Pathog, 2017, **105** : 288-297

[22] Wendel S, Fischer E C, Martínez V, *et al.* A nanobody: GFP bacterial platform that enables functional enzyme display and easy quantification of display capacity[J]. Microb Cell Fact, 2016, **15** : 71