

含末端半胱氨酸人类表皮生长因子受体 2 亲和体的 重组表达与亲和纯化

蔡 炯, 郑 堃, 党永红, 李 方

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院核医学科, 北京 100730

通信作者: 李 方 电话: 010-69155502, 电子邮件: lifang5502@sohu.com

摘要: **目的** 通过基因重组表达制备一种氨基端带有 HEHEHE 序列, 羧基端带有 GGGC 序列的 $Z_{\text{HER2}, \text{V2}}$ 亲和体, 为无创的人类表皮生长因子受体 2 (HER2) 显像创造条件。**方法** 采用基因设计软件, 将 HER2 亲和体编码基因的密码子进行优化, 使之适合于大肠杆菌重组表达。在 HER2 亲和体的氨基端增加 HEHEHE 氨基酸序列, 羧基端增加 GGGC 氨基酸序列。采用 *Hind* III 酶切鉴定合成基因长度, 基因测序证实合成的基因序列。将 HER2 亲和体基因克隆入 pET22b (+) 质粒, 转化感受态 BL21 (DE3) 大肠杆菌。IPTG 诱导重组表达菌后用 SDS-PAGE 分析鉴定表达产物的相对分子质量。镍柱亲和和结合、咪唑洗脱纯化蛋白质。同位素 ^{68}Ga 标记亲和体后通过饱和分析测定 HER2 阳性细胞 MDA-MB-361 的亲和力。**结果** *Hind* III 酶切和基因测序证实, 合成的 HER2 亲和体基因序列 5' 端含有 HEHEHE 的基因编码序列, 3' 端含有 GGGC 的基因编码序列。经过基因克隆、转化和 IPTG 诱导, 发现重组大肠杆菌新表达相对分子质量约 8×10^3 的蛋白质。重组表达蛋白质经镍柱亲和和结合后, 经 60 mmol/L 咪唑洗脱得以纯化。亲和体经 ^{68}Ga 标记后和 HER2 阳性细胞 MDA-MB-361 的亲和力 K_d 值为 1.5 nmol/L。**结论** 获得一种氨基端带有 HEHEHE 序列, 羧基端带有 GGGC 序列的 $Z_{\text{HER2}, \text{V2}}$ 亲和体。

关键词: 人类表皮生长因子受体 2; 亲和体; 表达; 纯化

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2013)03-0281-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.03.008

Expression and Affinity Purification of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Affibody with C-terminal Cystein

CAI Jiong, ZHENG Kun, DANG Yong-hong, LI Fang

Department of Nuclear Medicine, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: LI Fang Tel: 010-69155502, E-mail: lifang5502@sohu.com

ABSTRACT: Objective To prepare the modified $Z_{\text{HER2}, \text{V2}}$ affibody with amino-terminal HEHEHE sequence and carboxyl-terminal GGGC sequence by gene recombinant expression, which is the basis for invasive HER2 imaging with affibody. **Methods** The encoded affibody gene was optimized by codon preference of *E. coli* with gene designer software. The N-terminal of affibody was fused with HEHEHE sequence, while the C-terminal was fused with GGGC sequence. The synthetic gene was confirmed by *Hind* III endonuclease restriction and gene sequencing. The human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) affibody gene was subcloned into pET22b (+) plasmid and transformed into competent BL21 (DE3) bacteria. The expression of modified affibody was induced with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and identified by SDS-PAGE. The affibody was purified by nickel affinity binding and imidazole elution. The purified affibody was labeled with ^{68}Ga and its affinity was determined by saturation analysis with HER2-positive cells MDA-MB-361.

Results The affibody gene containing N-terminal HEHEHE and C-terminal GGCC sequences were confirmed by *Hind* III endonuclease restriction and gene sequencing. A newly expressed 8×10^3 protein was expressed from the induced recombinant bacteria identified by SDS-PAGE after sub-cloning HER2 affibody gene into pET22b (+) plasmid, transforming recombinant plasmid into competent BL21 (DE3) bacteria and inducing the recombinant bacteria with IPTG. The expressed protein was purified from nickel agarose by 60 mmol/L imidazole eluting. The affinity Kd value of ^{68}Ga labeled affibody to HER2 positive MDA-MB-361 cells was 1.5 nmol/L. **Conclusion** The affibody $Z_{\text{HER2};V2}$ containing N-terminal HEHEHE and C-terminal GGCC was successfully prepared by gene optimization, recombinant expression and affinity purification.

Key words: human epidermal growth factor receptor-2; affibody; expression; purification

Acta Acad Med Sin, 2013,35(3):281-285

人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 的过量表达是肿瘤细胞特有的, 赋予了细胞恶化的特征, 如增殖失控、细胞凋亡抗性和运动性增加^[1]。乳腺癌患者 HER2 的过量表达能预测靶向药物曲妥珠单抗的治疗效果^[2-3]。因此, HER2 的检测对靶向治疗患者的筛选非常重要。亲和体是一类相对分子质量只有 $(7 \sim 8) \times 10^3$ 、结构紧密的分子^[4-5], 其中 HER2 的亲和体 $Z_{\text{HER2};V2}$ 对 HER2 的亲和力高, 适合于 HER2 的核医学显像检测^[6-7]。本研究试图通过基因工程表达的方法, 获得一种氨基端带有 HEHEHE 序列, 羧基端带有 GGCC 序列的 $Z_{\text{HER2};V2}$ 亲和体, 以期为无创的 HER2 显像创造条件。

材料和方法

亲和体基因设计与合成 亲和体羧基端设计 GGCC 序列便于同位素标记, 氨基端设计 HEHEHE 序列便于亲和柱纯化。按照三联密码, 采用 DNASTAR 软件设计出大肠杆菌表达偏好的 HER2 亲和体基因。通过寡核苷酸合成, 重叠 PCR 的方法合成 HER2 亲和体基因, *Hind* III 酶切鉴定合成基因长度, 基因测序确定合成基因的序列。

亲和体重组表达 将 HER2 亲和体基因用 *Nco* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 插入经过同样方式酶切的 pET22b (+) 载体, 转化入 DH5 α 感受态大肠杆菌中, 经抗生素筛选后送菌液进行基因测序鉴定, 提取质粒转化 BL21 (DE3) 感受态大肠杆菌。用 IPTG 诱导表达。经过 SDS-PAGE 鉴定表达新生蛋白的细菌克隆。

亲和体纯化 表达 HER2 亲和体大肠杆菌经过离心, 菌体用洗涤缓冲液 (50 mmol/L Na_2HPO_4 ,

300 mmol/L NaCl, pH 7.0) 洗涤。重悬于纯化缓冲液 (20 mmol/L Tris · HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.9) 中超声破碎。通过离心去除细胞碎片, 上清液 60 °C 处理 10 min, 然后离心, 上清液经过滤膜过滤后上先用破碎缓冲液平衡的镍柱。经含 5 mmol/L 咪唑的纯化缓冲液洗涤后, 用含 60 mmol/L 咪唑的纯化缓冲液洗脱纯化。

亲和体的前处理 经过 60 mmol/L 咪唑洗脱的亲和体先用 PBS 透析过夜。取透析后的 0.5 ml 亲和体加入终浓度为 30 mmol/L 的 DTT, 37 °C 还原 2 h, 用超声脱气的 PBS 透析 2 次除去还原亲和体中的 DTT。将还原的亲和体和 MMA-DOTA (10 mmol/L) 按照摩尔比 1:20 混合, 通过振荡反应 2 h, 再经过超声脱气的 PBS 透析 2 次除去未反应的 MMA-DOTA, 标记待用。

亲和体的 ^{68}Ga 标记和活性鉴定 标记体系中先加入 40 μg 亲和体和 40 μl 醋酸钠 (1.25 mol/L), 然后加入 0.05 mol/L HCl 淋洗的 1 ml ^{68}Ga , 调节 pH 到 3.5 ~ 4.0 间。90 °C 反应 15 min 后冷却, 然后用 C18 柱纯化, 无水乙醇洗脱纯化。活性测定前 1d 将 MDA-MB-361 细胞按照 5×10^5 个/ml 接种 6 孔板, 每孔 2 ml。第 2 天加入不同浓度 (0.0004、0.0021、0.0100、0.054、0.2600、1.3100、6.7000、33.0000 nmol/L) 的 ^{68}Ga 标记亲和体。4 °C 放置 2 h 后用冰冷的 PBS 洗涤, 胰酶消化后用 γ 计数器测量细胞结合的放射性。通过 GraphPad Prism 5 软件测定 Kd 值。阻断实验前 1d 将 MDA-MB-361 细胞按照 5×10^5 个/ml 接种 6 孔板, 每孔 2 ml。第 2 天先加入 50 倍摩尔浓度的非标记亲和体, 然后加入 1.31 nmol/L 的 ^{68}Ga 标记亲和体。4 °C 放置 2 h 后用冰冷的 PBS 洗涤, 胰酶消化后用 γ 计数器测量细胞结合的放射性, 计算阻断非标记亲和体的阻断效率。

结 果

基因设计结果 设计出一种新型结构的HER2亲和体，氨基端增加了HEHEHE，羧基端增加了GGGC，序列为MAHEHEHEAENKFNKEMRNAYWEIALLPN-LTNQKRAFIRSLYDDPSQSANLLAEAKKLND AQGGGC。再采用基因软件，对编码密码子进行优化，使之适合于大肠杆菌重组表达，基因编码序列为CCATGGC-CCATGAACACGAGCACGAGGCGGAAAAACAAATTCAACAAAGAAATGCGCAACGCGTACTGGGAAATTGCCCTGCTGCCGAACCTGACCAACCAACAGAAACGCGCCTTCATCCGCTCCCTGTACGACGACCCATCCAATCTGCAAACCTGCTGGCGGAAGCGAAGAACTGAACGATGCACAGGCTG

GTGCTTGCTAAGAATTC。

基因合成与检测 先合成多条寡核苷酸，再采用重叠PCR的合成HER2亲和体基因，*Hind* III酶切得到约300 bp的片段(图1A)，基因测序证实合成的基因序列和设计的完全一致(图1B)。

重组表达与纯化结果 将HER2亲和体基因克隆入pET22b(+)质粒，转化感受态BL21(DE3)大肠杆菌。用IPTG诱导，SDS-PAGE分析发现重组大肠杆菌表达相对分子质量约 8×10^3 的蛋白质(图2A)，经过蛋白凝胶扫描，HER2亲和体重组表达量占到菌体蛋白的30%。重组表达蛋白质经镍柱亲和结合后，用60 mmol/L咪唑洗脱下来(图2B)。进一步对咪唑梯度进行划分，发现重组蛋白约在30~60 mmol/L的咪唑浓度范围被洗脱(图2C)。

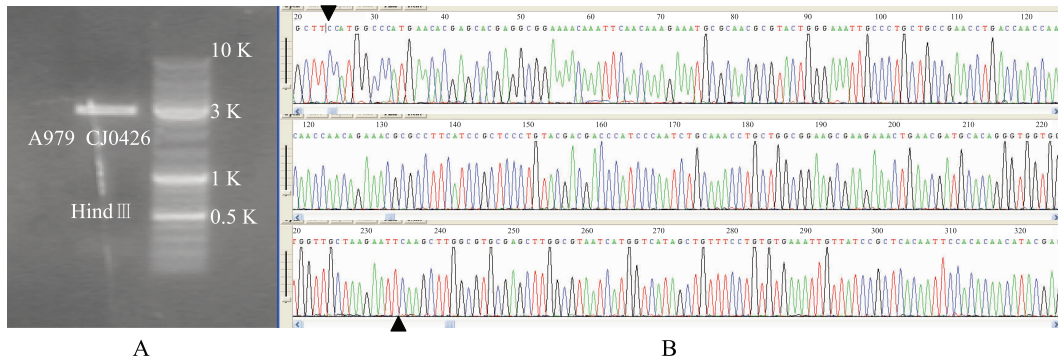
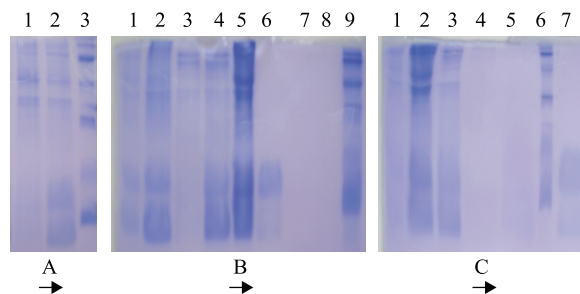


图1 *Hind* III酶切(A)和基因测序(B)鉴定新型结构的HER2亲和体

Fig 1 The gene identification of a novel HER2 affibody by endonuclease *Hind* III digestion (A) and gene sequencing (B)



A. 亲和体在大肠杆菌的重组表达(1: IPTG诱导前; 2: IPTG诱导后; 3: 蛋白质分子标尺, 从上而下依次为 97.4×10^3 、 66.4×10^3 、 43.0×10^3 、 31.0×10^3 、 21.0×10^3 、 14.4×10^3); B. 亲和体的镍柱纯化(1: IPTG诱导后; 2: 超声破碎沉淀; 3: 上清液过柱后; 4: 超声破碎上清液经过60℃加热处理10 min并离心后; 5: 超声破碎上清液; 6: 60 mmol/L咪唑洗脱; 7~8: 500 mmol/L咪唑洗脱; 9: 蛋白质分子标尺); C. 亲和体的镍柱纯化(1: IPTG诱导后; 2: 超声破碎上清液; 3: 超声破碎上清液经过60℃加热处理10 min并离心后; 4: 10 mmol/L咪唑洗脱; 5: 30 mmol/L咪唑洗脱; 6: 蛋白质分子标尺; 7: 60 mmol/L咪唑洗脱)

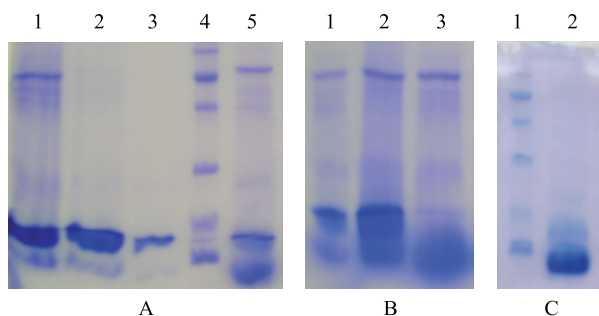
A. recombinant expression of HER2 affibody in bacteria *E. coli* (1: before IPTG induction; 2: after IPTG induction; 3: protein marker with 97.4×10^3 , 66.4×10^3 , 43.0×10^3 , 31.0×10^3 , 21.0×10^3 , and 14.4×10^3 molecules); B. purification of HER2 affibody with nickel column (1: after IPTG induction; 2: centrifuged pellet of the broken bacteria; 3: flow-through of the supernatant from nickel column; 4: centrifuged supernatant of broken bacteria after incubation at 60℃ for 10 min; 5: supernatant of the broken bacteria; 6: elution with 60 mmol/L imidazole; 7-8: elution with 500 mmol/L imidazole; 9: protein marker); C. refined purification of HER2 affibody with nickel column (1: after IPTG induction; 2: supernatant of the broken bacteria; 3: centrifuged supernatant of broken bacteria after incubation at 60℃ for 10 min; 4: elution with 10 mmol/L imidazole; 5: elution with 30 mmol/L imidazole; 6: protein marker; 7: elution with 60 mmol/L imidazole)

图2 一种新型结构的HER2亲和体的重组表达和纯化

Fig 2 The recombinant expression and purification of a novel HER2 affibody

亲和体的前处理 经过咪唑洗脱的亲和体自发形成的二聚体，用 1 mmol/L DTT 还原反应 10 min，部分二聚体被还原为单体（图 3A）。用 30 mmol/L DTT 还原反应 120 min，全部二聚体都被还原为单体（图 3B）。经过 MMA-DOTA 偶联和 PBS 透析，最后得到的 DOTA-亲和体主要为单体（图 3C）。

亲和体的⁶⁸Ga 标记和活性鉴定结果 ⁶⁸Ga 标记亲和体的标记率为 16%，经过 C18 柱纯化⁶⁸Ga 标记亲和体的纯度为 97%（图 4A）。⁶⁸Ga 标记亲和体和 HER2 阳性乳腺癌细胞 MDA-MB-361 的结合亲和力 Kd 值为 1.5 nmol/L（图 4B），因 0.0004、0.0021、0.0100、0.0540 nmol/L 都不是 1 nmol/L，在图 4B 重合成为 1 个点。加入 50 倍摩尔浓度的非标记亲和体，对 1.310 0 nmol/L⁶⁸Ga 标记亲和体结合 MDA-MB-361 细胞的阻断作用为 64%（图 4C）。



A. 亲和体经过 1 mmol/L DTT 还原反应 10 min (1~3: 60 mmol/L 咪唑洗脱的亲和体; 4: 蛋白质分子标尺, 从上而下依次为 97.4×10^3 、 6.4×10^3 、 3.0×10^3 、 31.0×10^3 、 21.0×10^3 、 14.4×10^3 ; 5: 1 mmol/L DTT 还原反应 10 min 后的亲和体); B. 亲和体经过 30 mmol/L DTT 还原反应 120 min (1: 1 mmol/L DTT 还原反应 10 min 后的亲和体; 2: 经过超滤膜浓缩的 1 mmol/L DTT 还原反应 10 min 后的亲和体; 3: 经过 30 mmol/L DTT 还原反应 120 min 后的亲和体); C. 经过 MMA-DOTA 偶连后的亲和体 (1: 蛋白质分子标尺; 2: 经过 30 mmol/L DTT 还原反应 120 min, 又经 MMA-DOTA 偶连后的亲和体)

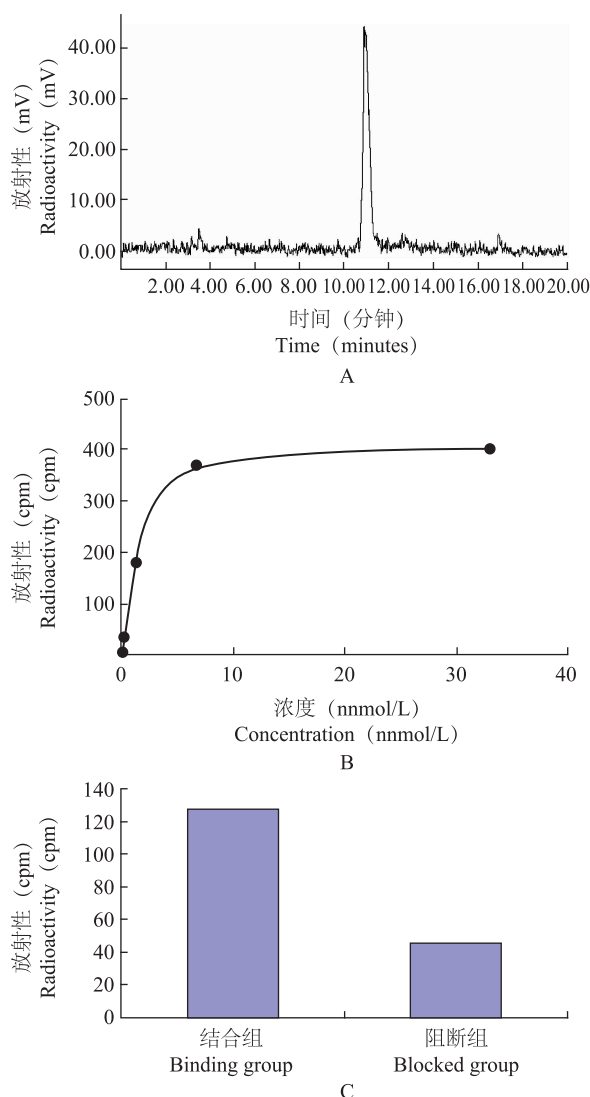
A. HER2 affibody reduced with 1 mmol/L DTT for 10 min (1-3: eluted affibody from nickle column with 60 mmol/L imidazole; 4: protein marker with 97.4×10^3 , 66.4×10^3 , 43.0×10^3 , 31.0×10^3 , 21.0×10^3 , and 14.4×10^3 molecules; 5: HER2 affibody reduced with 1 mmol/L DTT for 10 min); B. HER2 affibody reduced with 30 mmol/L DTT for 120 min (1: HER2 affibody reduced with 1 mmol/L DTT for 10 min; 2: reduced affibody concentrated by ultrafiltration; 3: HER2 affibody reduced with 30 mmol/L DTT for 120 min); C. MMA-DOTA conjugated HER2 affibody (1: protein marker; 2: MMA-DOTA conjugated HER2 affibody after reduction with 30 mmol/L DTT for 120 min)

图 3 HER2 亲和体的前处理

Fig 3 Pretreatment of HER2 affibody

讨论

亲和体可以通过多肽合成和基因重组表达两种方式获得，多肽合成的成本高，重组表达成本可以降低，而且，通过重组表达，可以对亲和体的氨基端和羧基端改造，使之更利于纯化和同位素标记。一般使用 His6 标签进行重组蛋白质的镍柱纯化，本研究采用的 HEHEHE 标签，有文献报道可以减少肝脏的非特异



A. 经过 C18 柱纯化的⁶⁸Ga 标记亲和体的放射 HPLC 分析; B. ⁶⁸Ga 标记亲和体的活性测定; C. 非标记亲和体对标记亲和体结合 HER2 阳性细胞的阻断作用

A. radio-HPLC analysis of purified ⁶⁸Ga-labeled affibody with C18 column; B. activity determination of ⁶⁸Ga-labeled HER2 affibody; C. the blocking effect of unlabeled affibody to binding of labeled affibody to HER2-positive cells

图 4 HER2 亲和体的⁶⁸Ga 标记和活性测定

Fig 4 ⁶⁸Ga labeling and activity determination of HER2 affibody

摄取,同样也可以使用镍柱纯化^[8]。重组表达和纯化的亲和体有二聚体的出现,用DTT可以打开二硫键成为单体。二聚体的形成和羧基端的半胱氨酸残基有关,而该残基可以用于同位素的定点标记,本研究表明,使用MMA-DOTA将⁶⁸Ga定点标记到亲和体上,完整地保持了亲和体的生物活性。⁶⁸Ga标记亲和体的亲和力和文献报道的相近,都在1.5 nmol/L左右^[9]。

HER2亲和体是一类噬菌体展示文库筛选获得的分子,和HER2的结合具有高亲和力,和抗体相比,它的分子小,而且结构稳定;和多肽相比,亲和力更好,因此在HER2的显像上具有重要应用前景。笔者曾经用^{99m}Tc标记抗体、亲和体,观察它们在荷瘤鼠的显像。虽然^{99m}Tc标记抗体对肿瘤有特异结合,但肝脏的蓄积也较高,难以从体内快速清除,不利于病灶在腹腔的检出。国外已有¹¹¹In标记、⁶⁸Ga标记亲和体应用于显像检测HER2表达转移灶的临床报道,研究提示,HER2的显像不仅可以用于患者的分类,也可以用于Herceptin治疗的监测。本研究使用适合于PET显像的同位素⁶⁸Ga标记HER2亲和体,为下一步的显像研究创造了条件。

参 考 文 献

- [1] Wällberg H, Orlova A, Altai M, et al. Molecular design and optimization of Tc-labeled recombinant affibody molecules improves their biodistribution and imaging properties [J]. J Nucl Med, 2011,52(3):461-469.
- [2] Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy [J]. Breast Cancer Res Treat, 1998,52(1-3):65-77.
- [3] Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology [J]. J Clin Oncol, 2001,19(6):1865-1878.
- [4] Gronwall C, Stahl S. Engineered affinity proteins—generation and applications [J]. J Biotechnol, 2009,140(3-4):254-269.
- [5] Orlova A, Feldwisch J, Abrahamsén L, et al. Update: affibody molecules for molecular imaging and therapy for cancer [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2007, 22(5):573-584.
- [6] Kramer-Marek G, Kiesewetter DO, Capala J. Changes in HER2 expression in breast cancer xenografts after therapy can be quantified using PET and 18F-labeled affibody molecules [J]. J Nucl Med, 2009, 50(75):1131-1139.
- [7] Baum RP, Prasad V, Müller D, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic 111In-or 68Ga-labeled affibody [J]. J Nucl Med, 2010, 51(6):892-897.
- [8] Tolmachev V, Hofström C, Malmberg J, et al. HEHEHE-tagged affibody molecule may be purified by IMAC, is conveniently labeled with [^{99m}(m)Tc(CO)₃](+), and shows improved biodistribution with reduced hepatic radioactivity accumulation [J]. Bioconjug Chem, 2010, 21(11):2013-2022.
- [9] Kramer-Marek G, Shenoy N, Seidel J, et al. 68Ga-DOTA-affibody molecule for *in vivo* assessment of HER2/neu expression with PET [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011, 38(11):1967-1976.

(收稿日期:2012-06-13)