

·学科进展·

免疫 PCR 技术在肿瘤学中的应用及融合蛋白的基因表达

任 军 樊代明

(第四军医大学西京医院肿瘤中心,西安 710032)

[摘要] 本研究建立了免疫 PCR 技术。并以此为基础检测了血清中的肿瘤抗原。肿瘤病人血清检测结果表明免疫 PCR 技术对肿瘤有较大诊断价值。将构建的单链抗体和链亲和素融合蛋白基因 pET21-scFv/CEA-STA 在大肠杆菌 HMS174(DE3)(plysS)中进行表达,免疫组化及蛋白印迹均提示获得了具备结合生物素和抗原分子活性的双特异融合蛋白。

[关键词] 融合蛋白,免疫 PCR,基因表达

免疫 PCR (Immune polymerase chain reaction) 技术的核心是单克隆抗体技术及 PCR 技术。其基本原理是:将抗原抗体反应的特异性同 PCR 技术的极高敏感性相结合,建立的一种用于检测微量分子及临床诊断的新方法。1992 年 Sano 等率先利用基因工程的方法表达了蛋白 A 与链亲和素的嵌合体分子获得成功^[1],以此嵌合体分子建立了免疫 PCR 技术。但是蛋白 A 可以与待检标本中任何残留的 Ig 分子结合导致假阳性反应,同时在血清标本中的 Ig 分子也不可能全部去除。本研究将单抗进行生物素化(biotinylation),再将一段核苷酸也生物素化,然后用亲和素(avidin)或链亲和素(streptavidin)将两者连接构成具有双功能的嵌合体分子^[2],其中抗体端可以与抗原结合,特异性地捕获待检抗原,以保证检测结果的特异性。核酸端可用引物对其进行扩增,使检测灵敏度提高近 10 000 倍(图 1)。这种方法与目前应用的普遍 PCR 技术不同,可用于检测蛋白等非核酸物质,改变了过去利用 PCR 只能检测核酸物质的状况,同时大大减少了常规 PCR 操作出现的假阳性结果^[3]。目前该种免疫 PCR 技术已开始在不同学科领域中得到了应用。如检测细菌脂多糖(LPS)对脑脊液中肿瘤坏死因子(TNF- α)的诱导作用^[4],检测血清 HBSAg,其敏感性达到 0.5pg^[5];检测血清循

环可溶性细胞粘附分子(SICAM-1),其敏感性是常规 ELISA 法的 10 000 倍^[6];检测小鼠 Th2 克隆 D10 细胞表面可溶性 T 细胞受体,其敏感性可达 0.8 pg/mL^[7]。此外,还有利用免疫 PCR 技术测定 MHC I 类抗原和血浆心房利钠肽^[8,9]等。免疫 PCR 技术在我国建立促进了该领域在国际上的竞争。在国家自然科学基金、原国家科委“九五”科技攻关及全军“九五”重点科技攻关课题的资助下,在国内系统地开展了本研究建立了免疫 PCR 技术并应用在肿瘤诊断中。同时,利用基因工程技术表达出了单链抗体和链亲和素的双特异性融合蛋白,进一步发展了免疫 PCR 技术。

抗原固定

↓ 洗涤,加入

生物素标记单抗

↓ 37℃ 孵育, PBS 洗涤, 加入

亲和素或链亲和素

↓ 37℃ 孵育, PBS 洗涤, 加入

生物素标记核酸

↓ 37℃ 孵育, PBS 洗涤

PCR

↓

电泳判定

图 1 免疫 PCR 操作规程

国家自然科学基金资助项目,批准号 39400159,39870787.

本文于 1999 年 3 月 26 日收到.

1 提高了肿瘤相关抗原分子(以胃癌为例)检测的敏感性

近几十年来科技人员已经在肝癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌及乳腺癌等组织中发现了相应的抗原,且在诊断中发挥了重要作用。以往建立的 ELISA 及免疫放射法检测血清中肿瘤抗原,阳性率偏低。因而常规采用的方法难以达到检测微量肿瘤抗原的目的。1994 年我们建立了免疫 PCR 技术,并用该方法检测了胃癌抗原 MG7Ag 在胃癌细胞株 KATOIII 中的表达,并同时用 ELISA 法进行平行对照,以判定该技术的敏感性。结果发现,ELISA 法需要每毫升含 20 万个细胞分泌的抗原才能检出阳性结果,而用免疫 PCR 法只要每毫升 20 个细胞便可得到阳性结果^[10]。为了解免疫 PCR 技术在血清诊断中的价值及特异性,我们检测了胃癌、慢性胃炎及献血员血清标本中的 MG7Ag,结果发现:胃癌 198 例,阳性 164 例,阳性率 82.8%;献血员 236 例,仅 2 例阳性,阳性率 0.8%;良性胃病为溃疡病 178 例,慢性胃炎 118 例,分别仅有 6 例及 7 例阳性,假阳性率分别为 7.7% 和 5.9%^[11]。为了观察免疫 PCR 技术对人体其他肿瘤的诊断价值,研究中选取了 398 例常见肿瘤进行检测,检测结果为:胃癌(164/198, 82.8%)食管癌(15/86, 17.4%),结肠癌(40/90, 44.4%),肝癌(0/84, 0%),卵巢癌(1/45, 2.2%),子宫癌(0/27, 0%),肺癌(4/66, 6.1%)。结果提示免疫 PCR 技术检测 MG7Ag,除对胃癌有很大的诊断价值外,还对结肠癌及食管癌具有一定的价值。对肝癌、卵巢癌、子宫癌、肺癌等无显著交叉反应,阳性率仍以胃癌最高 82.8%,具有统计学的显著差异^[11]。为了观察免疫 PCR 检测 MG7Ag 的特异性和敏感性,我们对经组织学确诊的 86 例胃癌和 83 例良性胃病变组织同时用常规 ELISA 和放射免疫法方法进行肿瘤抗原的检测并与免疫 PCR 检测结果相比较。结果发现,常规方法检测 CEA, CA50, CA19-9, TAG-72 等抗原在良性胃病变的假阳性率为 7.2%—12.0%,胃癌为 27.9%—45.3%,而用免疫 PCR 方法则良性胃病变的假阳性率为 8.4%,与常规方法无显著差异,但对胃癌检测的阳性率达 81.4%,比其他方法明显提高。

2 免疫 PCR 检测结肠癌及肝癌的肿瘤标志物

利用所建立的免疫 PCR 技术,课题组将其应用

于结肠癌及肝癌肿瘤检测中。46 例结肠癌,阳性达 34 例(73.9%),而常规 CEA 测定,含量超过正常标准时,46 例结肠癌患者中只占 18 例(39.1%),表明免疫 PCR 技术的敏感性明显高于常规的 CEA 测量^[12]。此外还测定了原发性肝癌中的血清 AFP 的表达。原发性肝癌 29 例,肝硬化 34 例,慢性活动性肝炎 12 例,同时完成免疫 PCR 及常规的 AFP 测定。结果:利用免疫 PCR 技术在上述 3 组中的阳性反应分别为 23 例(79.3%),3 例和 1 例。而常规 AFP 测定超过正常范围的例数分别为 14 例(48.3%),6 例和 2 例。由此表明,该技术可用于检测血清中肿瘤相关抗原,具有高特异性,高敏感性,而且检测率明显高于常规 AFP 测定法^[13]。

3 融合基因的表达、纯化及活性鉴定

为了进一步发展所建立的免疫 PCR 技术,本课题组选择了抗 CEA 和抗 AFP 杂交瘤株,分离克隆其重链和轻链可变区基因,利用一段 15 肽序列(Gly4ser)₃ 联连 2 个可变区基因构成单链抗体,再以一段 5 肽的接头分子同链亲和素基因连接,构建了抗 CEA 和抗 AFP 和链亲和素的融合基因表达载体,使之具有双特异、双功能性。我们将构建的 pET21-scFvCEA-STA 在大肠杆菌 HMS174(DE3)(plysS)中进行了表达。目的基因在 IPTG 诱导下得到表达,SDS-PAGE 检测目的蛋白在诱导 3 小时后表达最高,分子量 Mr 为 5.7×10^3 ,而在未诱导状态下未见表达产物蛋白带,薄层扫描显示诱导 3 小时的融合蛋白约占细菌总蛋白的 15%。将细菌粗提物行 8% SDS-PAGE,所得凝胶在 4℃ 行转移电泳过夜,将硝酸纤维素膜经 1% 牛血清白蛋白封闭,依次加入生物素标记辣根过氧化物酶(BIO-HRP),经联苯二氨(DAB)显色,对照为未转化的菌株粗提物,证明该融合蛋白具备结合生物素的功能。此外,为了证实该融合蛋白是否具有抗体的功能(即与 CEA 分子结合),我们选择了能分泌 CEA 抗原的胃癌细胞株 SGC-9718,将培养上清进行 Western-Blot,研究结果表明该融合蛋白可结合 SGC-9718 细胞株分泌的 CEA 抗原分子,且与标准抗 CEA 抗体对照无明显差异^[14]。对 40 例胃癌石蜡切片进行了免疫组化和生物素免疫斑点实验以验证表达产物是否具有单链抗体和链亲和素的活性。研究结果发现,高分化腺癌 16 例,阳性 4 例(25%),中分化腺癌 10 例,1 例阳性(10%),低分化腺癌 14 例,3 例阳性(21.4%),上述 40 例胃癌组织切片中,阳性为 8 例,总阳性染色率 20%。以表达

的融合蛋白和标准 CEA 抗体对 15 例相同切片进行免疫组化染色,其阳性率分别为 26.7% 和 55.3%。显然两者之间阳性率有差别,但阳性颗粒的着色部位、形态及程度基本相同。同时该融合基因的表达产物与生物素同样是有结合能力。在此初步实验基础上,对表达产物进行了纯化。本研究用硫酸镍使 HisBind 树脂荷电,以金属螯合层析法纯化了抗 CEA 单链抗体和链亲和素的融合蛋白。结果取了纯度在 95% 以上的特异性融合蛋白,免疫斑点和 Western Blot 法检测证明纯化后的抗体是有较强的抗原及生物素结合活性。

参 考 文 献

- [1] Sano T, Smith C, Cantor C. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 1992, **258** (5079):120—122.
- [2] 陈峥,任军,樊代明等. 光敏生物素标记胃癌单克隆抗体 MG7 的制备标记. *免疫分析与临床*, 1995, **2**(1):36—37.
- [3] Ren J, Fan D M, Zhou S J et al. Establishment of Immuno-PCR technique for the detection of tumor associated antigen MG7-Ag on the gastric cancer line. *Chin. J. Cancer. Res.*, 1995, **7**(4):247—250.
- [4] Sanna P P, Weiss F, Samson M E et al. Rapid induction of tumor necrosis factor alpha in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide revealed by a sensitive capture immuno-PCR assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**(1):272—275.
- [5] Maa M, Takahashi H, Adler K et al. Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen. *J. Virol. Methods.*, 1995, **52**(3):273—286.
- [6] Suzuki A, Itoh F, Hinoda Y et al. Double determinant immuno-polymerase chain reaction: a sensitive method for detecting circulating antigens in human sera. *Jpn. J. Can. Res.*, 1995, **86**(9):885—889.
- [7] Sperl J, Paliwal V, Ramabhadran R et al. Soluble T cell receptors: detection and quantitative assay in fluid phase via ELISA or immuno-PCR. *J. Immunol Methods.*, 1995, **186**(2):181—194.
- [8] McElhinny A S, Warner C M. Detection of major histocompatibility complex class I antigens on the surface of a single murine blastocyst by immuno-PCR. *Biotechniques.*, 1997, **23**(4):660—662.
- [9] Numato Y, Matsumoto Y. Rapid detection of alpha-human atrial natriuretic peptide in plasma by a sensitive immuno-PCR sandwich assay. *Clin. Chimica. Acta.*, 1997, **259**(1—2):169—176.
- [10] 任军,樊代明,周绍娟等. 免疫聚合酶链反应技术的建立及其对 KATOIII 胃癌细胞上 MG7-Ag 的检测. *中华肿瘤杂志*, 1994, **16** (4):247—250.
- [11] 任军,樊代明,张学庸等. 免疫聚合酶链反应新技术在胃癌血清诊断中的作用. *中华消化杂志*, 1996, **16**(增刊):14—16.
- [12] 任军,周绍娟,樊代明等. 免疫聚合酶链反应在结肠血清学诊断中的应用. *中华内科杂志*, 1996, **35**(2):824—825.
- [13] 苗继延,任军,樊代明等. 免疫-PCR 新技术在原发性肝癌血清学诊断中的应用. *中华肝病杂志*, 1996, **4**(2):101—102.
- [14] 季万胜,任军,周绍娟等. 癌胚抗原单链抗链亲和素融合蛋白的功能鉴定. *第四军医大学学报*, 1999, **20**(4):297—299.

APPLICATION OF IMMUNE-PCR TECHNIQUE IN THE DETECTION OF SEROLOGICAL TUMOR ASSOCIATED ANTIGEN AND GENETICAL PREPARATION OF FUSION PROTEIN OF SINGLE CHAIN ANTIBODY AND STREPTAVIDIN

Ren Jun Fan Daiming

(Center of Medical Oncology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract This paper describes the application of an established technique termed Immune-PCR in the detection of serological tumor-associated antigen among various kinds of carcinomas. The expression of the fusion protein of single chain antibody of anti-carcinoembryonic and streptavidin was concurrently reported. The results show that this new technique has a very high sensitivity of the detection of the circulating tumor associated antigen than other existing assays such as immunoradiometric assay and radioimmunoassay. It was also proven by immunoblotting and Western blot that the purified fusion protein still had the activity capability of binding the antigen and biotin molecule.

Key words fusion protein, immuno-PCR, gene expression