

## *E. coli* L-天冬酰胺酶 B 细胞抗原表位氨基酸残基 Lys<sup>196</sup>对其抗原性的影响

陈建华<sup>1</sup>, 徐欣<sup>1</sup>, 吴梧桐<sup>1\*</sup>, 姚萍<sup>1\*\*</sup>, 刘广桢<sup>1\*\*\*</sup>, 张艳丽<sup>1\*\*\*</sup>, 王进<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国药科大学分子生物学教研室, 南京 210009; <sup>2</sup> 南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

**摘要** 目的: 研究重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶 B 细胞抗原表位中关键氨基酸残基对其抗原性的影响。方法: 以 Ala 为替代残基, 对抗原表位<sup>192</sup>TPARKHTS<sup>199</sup>中 Lys<sup>196</sup>进行 PCR 定点突变, 双向免疫扩散法和间接 ELISA 法分析新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶的抗原性。结果: 采用双向免疫扩散法和间接 ELISA 法检测, 与重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶相比, 新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶与重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶抗体结合率下降 64%。结论: 通过对重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶 B 细胞抗原表位关键残基的定点突变有效地降低了其抗原性。

**关键词** 重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶; 定点突变; 抗原表位; 间接 ELISA 法

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2006)03-0277-04

## Effects of the Lys<sup>196</sup> in antigenic epitopes of recombinant *E. coli* L-asparaginase on its antigenicity

CHEN Jian-hua<sup>1</sup>, XU Xin<sup>1</sup>, WU Wu-tong<sup>1</sup>, YAO Ping<sup>1</sup>, LIU Guang-zhen<sup>1</sup>, ZHANG Yan-li<sup>1</sup>, WANG Jin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

<sup>2</sup>National Key Laboratory of Medical Bio-technology, Nanjing University, Nanjing 210093, China

**Abstract** Aim: To study the effects of critical amino acid residue in an immunodominant epitope on antigenicity of recombinant *E. coli* L-asparaginase. **Methods:** Lys<sup>196</sup> in octapeptide <sup>192</sup>TPARKHTS<sup>199</sup> was changed by site-directed mutagenesis. The mutant enzyme was expressed in *E. coli* pKAM/JM105-22 and purified. Antigenicity of mutant recombinant *E. coli* L-asparaginase was analyzed by double immunological diffusion and indirect ELISA. **Results:** Changing Lys<sup>196</sup> to Ala<sup>196</sup> reduced the antigenicity of the enzyme by 64%, as shown in indirect ELISA using polyclonal antibodies raised against the wild-type enzyme. **Conclusion:** The antigenicity of recombinant *E. coli* L-asparaginase can be significantly reduced by alteration of single critical residues without destroying its biological activity.

**Key words** recombinant *E. coli* L-asparaginase; site-specific mutagenesis; antigenic epitope; indirect ELISA

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30371687) and Foundation of National Key Laboratory of Medical Bio-technology of Nanjing University (No.200103)

L-天冬酰胺酶(L-asparaginase E.C 3.5.1.1)是治疗急性淋巴细胞白血病、恶性淋巴瘤的重要药物,但其抗原性所引发的过敏反应是该药物主要不良反应之一。此外,产生的抗体不仅影响该药物的体内生物活性,而且明显改变药代动力学性质,影响药物疗效的发挥,因而限制了其临床使用<sup>[1]</sup>。由

于菊欧文氏菌和大肠杆菌来源的 L-天冬酰胺酶之间几乎没有免疫交叉反应,可采用菊欧文氏菌和大肠杆菌来源的酶替换治疗,避免治疗过程中所产生的过敏反应<sup>[1]</sup>。聚乙二醇(PEG)、右旋糖苷(dextran)、多聚-DL-丙氨酰多肽(poly-DL-alanyl peptides)、人血清白蛋白(human albumin)等聚合物

\* 收稿日期 2005-11-16 \* 通讯作者 Tel:025-83305360 Fax:025-83321714 E-mail:wutong@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.30371687);南京大学医药生物技术国家重点实验室开放基金资助项目(No. 200103)

\*\*中国药科大学 2001 届毕业生,\*\*\*中国药科大学 2002 届毕业生

化学修饰 *L*-天冬酰胺酶;以红细胞作为载体,包封 *L*-天冬酰胺酶或制备 *L*-天冬酰胺酶脂质体,可封闭 *L*-天冬酰胺酶的抗原表位,降低其抗原性。其中以 PEG 修饰的产品抗原性去除效果较好,但在 PEG 修饰过程中,其酶活力损失严重<sup>[2-4]</sup>。

本文在对重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶 B 细胞抗原表位的预测以及 ELISA 竞争抑制法和光学干涉生物传感器法对合成的预测表位多肽片段进行抗原性体外检测的基础上<sup>[5]</sup>,应用蛋白质工程技术首次对其 B 细胞抗原表位的关键氨基酸残基进行定点突变。结果表明,定点突变前后重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶蛋白表达量和酶活性几乎没有变化,与重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶比较,新型重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶与重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶抗体结合率下降 64%。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

*E. coli* JM105, *E. coli* CPU210009 均为中国药科大学分子生物学教研室保存。pKA *L*-天冬酰胺酶 II 表达质粒系 *ansB* 基因插入 pKK233-2 构建而成。*E. coli* pKA/CPU210009 为 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶工程菌株。*Taq* DNA 聚合酶, DNA 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶(MBI Fermentas); DNA 胶回收试剂盒(上海博彩生物科技有限公司);重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶(山东新华制药有限公司);羊抗兔 IgG-HRP(华美生物工程公司);中分子量标准蛋白(上海普洛麦格生物),重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶兔抗体(中国药科大学分子生物学教研室制备)。

### 1.2 发酵培养基

玉米浆 3.5%, 牛肉膏 1.5%, 谷氨酸钠 1.0%, pH 7。

### 1.3 *ansB* 定点突变引物设计

根据实验方案、*ansB* 单一酶切位点和所选择的定点突变位点,设计加端引物 P<sub>1</sub>, MP<sub>1</sub>; P<sub>2</sub>, MP<sub>2</sub>。

P<sub>1</sub>: 5'-CTC GAC CTG ACG GTG AAA TGCG-3';

P<sub>2</sub>: 5'-CTG ATT GAA GAT CTG CTG GAT CTGC-3';

MP<sub>1</sub>: 5'-GTG TGT GCA CGT GCC GGG GTA-3';

MP<sub>2</sub>: 5'-GCA CGT GCA CAC ACC AGC GAT ACGC-3'。

### 1.4 突变质粒 pKAM 构建<sup>[6]17-23</sup>

选取 *E. coli* pKA/CPU210009-3 作为实验出发菌

株,采用碱裂解法提取 *E. coli* pKA/210009-3 的质粒 DNA。pKA 质粒 DNA 用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Bgl* II 双酶切,回收大片段。分别加入引物 P<sub>1</sub> 和 MP<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> 和 MP<sub>2</sub>, 以 pKA 质粒 DNA 为模板,应用定点突变 PCR 技术扩增得 PCR 产物 I 和 II。将 PCR 产物 I 用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Aku*44I 双酶切,PCR 产物 II 用限制性内切酶 *Aku*44I 和 *Bgl* II 双酶切,电泳后回收所需 DNA 片段并连接,连接片段与 pKA 质粒双酶切后的大片相连,构建突变质粒 pKAM,用于受体菌 *E. coli* CPU21009、JM105 转化。

### 1.5 转化子快速筛选和酶活力检测

在 96 孔微量反应板各孔中,加入硼酸缓冲液,依次逐个挑入氨苄抗性转化子,再加入底物,反应后,加入奈氏试剂,观察颜色深浅。经初筛后选取颜色深的转化子进行酶活力测定。酶活力测定采用奈氏试剂法<sup>[7]</sup>。

### 1.6 阳性克隆 pKAM 质粒 DNA 的酶切分析和测序

采用碱裂解法提取 *E. coli* pKAM/JM105-22 的质粒 DNA。加入引物 P<sub>1</sub>: 5'-CTC GAC CTG ACG GTG AAA TGCG-3' 和 P<sub>3</sub>: 5'-CIT CAG CAT CCT GAG TGG TAG CAC-3', 以 *E. coli* pKAM/JM105-22 的质粒 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。利用 *Aku*44 I 对重组质粒的 PCR 产物酶切鉴定。

采用 ABI PRISM 377 DNA Sequencer 测定 pKAM/JM105-22 质粒 DNA 序列。

### 1.7 pKAM/JM105 表达产物分析

*E. coli* pKA/CPU210009, pKAM/CPU210009, CPU210009; pKA/JM105, pKAM/JM105, JM105 分别接种于发酵培养基,37℃ 振荡培养 18 h。取样进行菌体蛋白 SDS-PAGE 和菌体蛋白扫描分析。

### 1.8 新型重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶的提取分离

具体方法按文献<sup>[7]</sup>进行。蛋白质含量测定采用 Lorry 法。

### 1.9 新型重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶抗原性检测<sup>[6]411-423, [8]</sup>

采用双向免疫扩散法比较新型重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶和重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶抗原性。在中心孔加入重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶抗体,周围孔分别加入等倍稀释的新型重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶和重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶,浓度分别为 26, 13, 6.5, 3.25, 1.63, 0.82 U/mL。37℃ 湿盒中温育 6~10 h,观察抗原抗体复合物沉淀线,洗涤、干

干燥、染色、脱色。

精密称取新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶和重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶, 用包被缓冲液分别溶解, 等比梯度稀释, 分别加入 80  $\mu$ L 于 96 孔微量滴定板各孔中, 浓度分别为 1.318, 0.659, 0.330, 0.165, 0.082, 0.041, 0.020 U/mL, 并以不加酶的碳酸盐缓冲液为阴性对照, 各浓度分别包被 3 孔, 洗涤、封闭后加入 100 mg/L 重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶抗体 80  $\mu$ L, 温育后洗涤。加入按 1:1 000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 80  $\mu$ L, 温育后洗涤。加入反应底物邻联甲苯胺和过氧化氢各 50  $\mu$ L, 室温放置 10~30 min, 最后加入 2 mol/L 硫酸 50  $\mu$ L 终止反应, 在 450 nm 波长处测定各孔吸收度。

2 结 果

2.1 阳性克隆 pKAM/JM105-22 质粒 DNA 的酶切分析和测序

在 Lys<sup>196</sup> 定点突变为 Ala 的过程中, 由于巧妙地引入了限制性内切酶 *Aku*44 I 单一酶切位点, 因此, PCR 产物能被限制性内切酶 *Aku*44 I 切开为两个片段(图 1), 表明 *E. coli* pKAM/JM105-22 为定点突变阳性克隆。

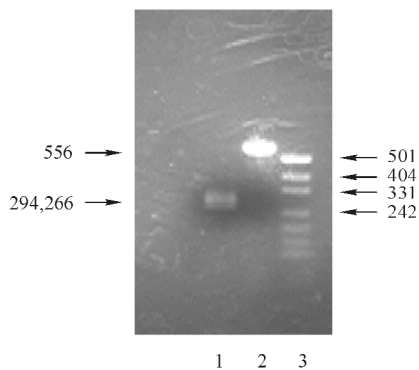


Fig.1 Profile of agarose gel electrophoresis of PCR product digested with *Aku*44 I

1:PCR product digested with *Aku*44 I ; 2:PCR product; 3:pUC19DNA/*Msp* I Markers(501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 26 bp)

采用 ABI PRISM 377 DNA Sequencer 测定 pKAM 质粒 DNA 序列, 结果表明 Lys<sup>196</sup> 的密码子 AAG 已定点突变为 Ala 的密码子 GCA。

2.2 *E. coli* pKAM/CPU210009、pKAM/JM105 表达产物分析

分别以 pKA/CPU210009、pKA/JM105 为阳性对

照, CPU210009、JM105 为阴性对照, 进行 pKAM/CPU210009、pKAM/JM105 表达产物 SDS-PAGE 和产酶活性比较分析, 结果见表 1。

Tab.1 Comparison of the enzyme activities and protein expression of plasmids pKAM and pKA in *E. coli* CPU210009 and JM105( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| Plasmid        | Activity (U/mL)   | Percentage in total soluble proteins( % ) |
|----------------|-------------------|-------------------------------------------|
| CPU210009      | 1.36 $\pm$ 0.005  | 13.00                                     |
| pKA/CPU210009  | 77.55 $\pm$ 1.14  | 31.90                                     |
| pKAM/CPU210009 | 84.34 $\pm$ 4.00  | 31.43                                     |
| JM105          | 0 $\pm$ 0         | 6.72                                      |
| pKA/JM105      | 58.37 $\pm$ 12.67 | 30.04                                     |
| pKAM/JM105     | 65.76 $\pm$ 1.00  | 27.92                                     |

表 1 结果表明, 重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶 Lys<sup>196</sup> 经定点突变为 Ala 后, 并不影响酶蛋白的表达和酶的活性。

2.3 新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶与重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶抗原性的比较

由于受体菌 *E. coli* CPU210009 存在 L-天冬酰胺酶本底表达, 因此选择 *E. coli* pKAM/JM105-22 用于突变后的新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶分离纯化和抗原性分析。*E. coli* pKAM/JM105-22 发酵液提取后的粗酶液, 经分离纯化后回收率为 27%, 比活为 223 U/mg, 与市售重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶产品的比活相当(数据未显示)。

2.3.1 双向免疫扩散法检测新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶抗原性

采用双向免疫扩散法比较新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶和重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶抗原性的差异, 结果见图 2。

双向免疫扩散法为半定量检测, 从第 3 孔到第 4 孔浓度分别为 6.5 U/mL 到 3.25 U/mL, 突变酶的沉淀线趋浅。原酶沉淀线仍能清楚地看到。

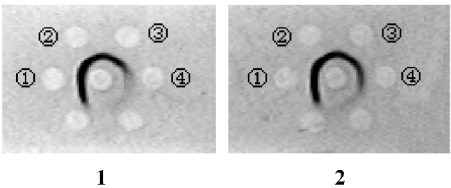


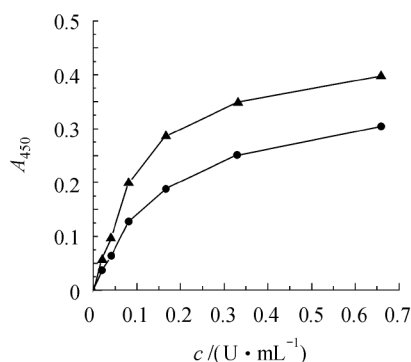
Fig.2 Double immunological diffusion of mutant recombinant *E. coli* L-asparaginase(1) and original enzyme (2)

①:26 U/mL; ②:13 U/mL; ③:6.5 U/mL; ④:3.25 U/mL

2.3.2 间接 ELISA 法检测新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶抗原性

采用间接 ELISA 法比较新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶和重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶

抗原性, 定量测定抗原浓度的结果见图 3。根据所检测的两种酶最大吸收度 ( $A_{450}$ ) 一半时所对应的酶浓度计算, 与重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶相比, 新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶与 *E. coli* L-天冬酰胺酶抗体的结合率下降了 64%。由此可知, 通过重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶优势抗原表位<sup>192</sup>TPARKHTS<sup>199</sup>中 Lys<sup>196</sup> Ala 的定点突变, 新型重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶抗原性明显降低。



—●—mutant; —▲—original

Fig.3 Comparison of antigenicity of mutant recombinant *E. coli* L-asparaginase and original enzyme analyzed by indirect ELISA

### 3 讨 论

通过对重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶 B 细胞抗原表位的预测, 以及 ELISA 竞争抑制法和光学干涉生物传感器法对合成的预测表位多肽片段进行抗原性体外检测和验证, 多肽片段<sup>192</sup>TPARKHTS<sup>199</sup>为 B 细胞优势抗原表位<sup>[5]</sup>。由 *E. coli* L-天冬酰胺酶分子结构综合分析可知<sup>[9,10]</sup>, *E. coli* L-天冬酰胺酶由 4 个均一亚基组成, 每个亚基包括 2 个  $\alpha/\beta$  结构域和连接两个结构域的连接序列。多肽片段<sup>192</sup>TPARKHTS<sup>199</sup>位于两个结构域之间连接序列 191-212 上, 进一步的分析表明, 优势抗原表位<sup>192</sup>TPARKHTS<sup>199</sup>中, 存在连续的 3 个碱性氨基酸残基 Arg<sup>195</sup>, Lys<sup>196</sup>和 His<sup>197</sup>。这种在分子表面的不对称的电荷的分布, 可能形成与其他生物大分子相互作用的部位。就氨基酸残基对蛋白质三维结构和功能的影响而言, Lys 和 Arg 经常地涉及活性位置, 其中 Lys 常与分子的结合功能有关, Arg 则常与分子的催化功能有关<sup>[10]</sup>。因此, 实验方案优先对多

肽片段<sup>192</sup>TPARKHTS<sup>199</sup>中 Lys<sup>196</sup>进行定点突变。

Lys<sup>196</sup>的定点突变利用丙氨酸扫描突变技术 (Alanine-Scanning Mutagenesis) 原理<sup>[11]</sup>, 以丙氨酸为替代残基。丙氨酸作为蛋白质分子中最丰富的氨基酸, 可以出现在蛋白质分子内部和表面以及各种二级结构中。它消除了侧链对抗原抗体结合的影响, 但并不改变主链的结构、空间效应和电荷效应。

突变质粒 pKAM 和原质粒 pKA 分别转化 *E. coli* CPU210009 和 JM105, 从蛋白质表达和产酶活性分析, 重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶 Lys<sup>196</sup>经定点突变为 Ala<sup>196</sup>后, 对蛋白质表达和产酶量没有影响。

### 参 考 文 献

- [1] Holle LM. Pegasparginase; an alternative[J]. *Ann Pharmacother*, 1997, **31**(5):616-624.
- [2] Kravtsoff R, Desbois I, Lamagenere JP, et al. Improved Pharmacodynamics of L-asparaginase-loaded in human red blood cells[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1996, **49**(6):465-470.
- [3] Gaspar MM, Perez-Soler R, Cruz ME. Biological characterization of L-asparaginase liposomal formations[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1996, **38**(4):373-377.
- [4] Kurre HA, Ettinger AG, Veenstra DL, et al. A pharmacoeconomic analysis of pegaspargase versus native *E. coli* L-asparaginase for the treatment of children with standard-risk, acute lymphoblastic leukemia: the children's cancer group study (CCG-1962) [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2002, **24**(3):175-181.
- [5] 吴 敬(Wu J), 吴梧桐(Wu WT), 王德育(Wang DY), 等. L-门冬酰胺酶 B 细胞表位研究 [J]. 药物生物技术 (Pharm Biotechnol), 2002, **9**(4):196-199.
- [6] 奥斯特 F, 布伦特 R, 金斯顿 RE, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [7] 吴 敬(Wu J), 赖龙生(Lai LS), 刘景晶(Liu JJ), 等. 重组 L-天冬酰胺酶的提取纯化工艺[J]. 中国医药工业杂志 (Chin J Pharm), 2000, **31**(2):50-53.
- [8] 张龙翔(Zhang LX), 张庭芳(Zhang TF), 李令媛(Li LY). 生化实验方法与技术[M]. 第二版, 北京: 高等教育出版社, 1997: 348-371.
- [9] Swain AL, Jaskolski M, Housset D, et al. Crystal structure of *E. coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(4):1474-1478.
- [10] 刘次全(Liu CQ), 白春礼(Bai CL), 张 静(Zhang J). 结构分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997:201-204.
- [11] Cunningham BC, Wells JA. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interaction by alanine-scanning mutagenesis [J]. *Science*, 1989, **244**(4908):1081-1085.