

双酶修饰制备纳米抗体靶向成像蛋白簇

田瑶, 武田田, 刘扬中

(中国科学技术大学化学与材料科学学院, 安徽合肥 230026)

摘要: 通过分选酶和谷氨酰胺转氨酶催化反应制备了一种由纳米抗体和绿色荧光蛋白 sfGFP 组成的靶向成像探针。通过设计一类具有两种酶识别结构的树枝状聚氨基酸底物来制备偶联了纳米抗体和 sfGFP 的蛋白簇。该靶向蛋白簇能够特异性结合靶细胞并呈现绿色荧光信号。在肿瘤异种移植的小鼠模型中, 该靶向蛋白簇能够快速富集到肿瘤部位, 并在 9 h 内逐渐被代谢排出。

关键词: 分选酶; 谷氨酰胺转氨酶; 纳米抗体; 定点修饰; 靶向成像

中图分类号: R979.1 **文献标识码:** A doi: 10.3969/j.issn.0253-2778.2019.04.006

引用格式: 田瑶, 武田田, 刘扬中. 双酶修饰制备纳米抗体靶向成像蛋白簇[J]. 中国科学技术大学学报, 2019, 49(12):297-301.

TIAN Yao, WU Tiantian, LIU Yangzhong. Nanobody cluster imaging probe based on sortase and transglutaminase[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2019, 49(12):297-301.

Nanobody cluster imaging probe based on sortase and transglutaminase

TIAN Yao, WU Tiantian, LIU Yangzhong

(School of Chemistry and Materials Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: Sortase and transglutaminase was rendered for preparing a targeted protein cluster probe, which is composed nanobody and green fluorescence protein (sfGFP). A unique substrate, which can be recognized by both sortase and transglutaminase, was designed for nanobody and sfGFP conjunction by solid phase synthesis. The targeted protein cluster probe, namely KK-sfGFP(Nb), can specifically bind to the EGFR overexpressed cells and shows green fluorescence as signal. The KK-sfGFP(Nb) exhibits fast accumulation in mouse xenograft tumor and the fluorescence signal gradually metabolizes within 9 h.

Key words: sortase; transglutaminase; nanobody; site-specific modification; target imaging

0 引言

蛋白质定点修饰能够赋予蛋白质多种优良性能, 因此受到科学家们广泛关注^[1]. 蛋白质的空间结构是蛋白质功能的基础, 因此在对蛋白质进行修饰时, 避免对蛋白质结构的破坏显得尤为重要^[2]. 常规的化学修饰手段是以蛋白质氨基酸侧链活性基团

(例如氨基、巯基等)为目标, 由于这类基团在蛋白质中丰度高, 且很难针对某一特定氨基酸上的侧链残基反应, 因此常规的化学修饰方法常导致产物均一性差甚至使蛋白质失活. 研究表明, 生物酶催化蛋白质的修饰能够识别特定的氨基酸序列, 是高特异性的蛋白质修饰手段^[3]. 通过基因工程的方法在目的蛋白上融合能够被生物酶识别的片段, 用被酶催化

收稿日期: 2018-04-12; 修回日期: 2018-09-14

基金项目: 国家自然科学基金(21573213), 大科学装置联合基金(U1332210)资助.

作者简介: 田瑶, 男, 1993年生, 硕士. 研究方向: 生物无机化学. E-mail: tianyao@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 刘扬中, 博士/教授. E-mail: liuzy@ustc.edu.cn

修饰的蛋白质与所需配体偶联,既能保证被修饰蛋白的主体结构不被破坏,又能使反应能够在温和的条件下高效进行。

分选酶(sortase)是一种能够识别-LPXTG(X=Leu,Pro,Thr,Gly)与多聚甘氨酸($G_n, n=3\sim 5$)复合结构,并催化甘氨酸氨基团与-LPXTG的苏氨酸羧基团形成酰胺键的一种酶。分选酶因其高特异性的性质被广泛用作蛋白质的修饰工具,在纳米药物运输体系的设计中也有广泛的应用^[4-7]。谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase, TGase)能够识别并催化谷氨酰胺与氨基形成异肽键,在蛋白质修饰中扮演重要角色^[8-10]。研究表明,谷氨酰胺转氨酶在单克隆抗体的修饰中,能够在单抗没有被基因改造的情况下,实现精确比例的修饰并对抗体功能没有明显影响^[11]。可见,生物酶作为功能性蛋白的修饰工具,具有独特的优点和广泛的应用前景。纳米抗体(nanobody, Nb)来自于骆驼科动物体内天然缺失轻链的抗体,目前它被认为是具备完整抗体功能的最小抗体^[12]。纳米抗体能够原核表达,不需要糖基化,并且易于改造。除此之外,纳米抗体还具有亲和力强、稳定性高、溶解性好以及免疫原性低等多种优势,在肿瘤诊断和治疗方面得到广泛应用^[13]。

本文中我们以特异性靶向细胞表皮生长因子受体(EGFR)的纳米抗体为靶向分子,综合利用分选酶和谷氨酰胺转氨酶的催化活性以及绿色荧光蛋白(sfGFP)的荧光特性,通过简便、高效的方法制备靶向多蛋白簇。通过固相合成的方法,一步制备同时能够被分选酶和谷氨酰胺转氨酶识别的树枝状底物 $K[(GGG)(NH_2)](KG), KK[(GGG)_2(NH_2)_2](KKG), KKK[(GGG)(NH_2)](KKKG)$ 。在分选酶和谷氨酰胺转氨酶两种酶的作用下将 sfGFP 与纳米抗体偶联到树枝状底物上。细胞实验表明,靶向成像蛋白簇对细胞有明显的选择性。动物模型实验表明,靶向成像蛋白簇能够快速富集到肿瘤部位,并在注射后 9 h 左右逐渐被代谢清除。

1 实验部分

1.1 树枝状聚氨基酸底物的合成与表征

通过固相合成的方法,制备末端带有氨基和-GGG-聚甘氨酸两种基团的树枝状聚赖氨酸。根据制备的代数不同,分别命名为: $K[(GGG)(NH_2)](KG, 一代), KK[(GGG)_2(NH_2)_2](KKG, 二代)$ 和 $KKK[(GGG)_3(NH_2)_3](KKKG, 三代)$ 。先加入

5 mL DMF(N,N-二甲基甲酰胺)溶胀树脂,随后按照“氨基酸偶联—洗涤树脂—脱保护基—洗涤树脂—下一个氨基酸偶联”的流程制备不同代数的树枝状聚赖氨酸底物。合成好的树枝状聚赖氨酸底物使用 0.1% 的三氟乙酸/二氯甲烷切割。旋转蒸发浓缩后,加入乙醚沉淀,得到略显黄色固体。产物通过高效液相色谱(HPLC)(以 0.1% 三氟乙酸为 B 相,梯度为 30min 由 0% 到 60%)表征。

1.2 纳米抗体的改造、表达和纯化

Nb-Q 的制备是通过基因工程技术在 anti-EGFR nanobody 7D12 的 C 端引入 TGase 识别段,即 Q tag (-LLQS-)。蛋白与 tag 标签之间插入-GGGGS-Linker。将基因片段插入表达载体 pET 22b 质粒中。将带有蛋白序列的质粒转入 *E. coli* 表达菌株 Rosetta-gami 中。Nb-Q 的纯化按照文献报道的步骤进行^[9]。菌液培养至 OD_{600} 为 0.8~1.0 时加入 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷)诱导 Nb-Q 表达。培养结束后,收获的菌体按照文献报道的步骤进行纯化^[9]。通过 Ni-NTA 亲和层析除去杂蛋白(50 mmol·L⁻¹ 咪唑洗杂,500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱)。

1.3 纳米抗体的改造、表达和纯化

sfGFP-LPETG-His 的构建表达与 Nb-Q 类似。通过基因工程技术在 sfGFP 的 C 端引入能被 sortase 识别的 LPETG tag。蛋白与 tag 之间插入-GGGGS-Linker。将基因片段插入表达载体 pET 22b 质粒中。将带有蛋白序列的质粒转入 *E. coli* 表达菌株 BL21 中。菌液培养至 OD_{600} 为 0.8~1.0 时加入 IPTG 诱导 SfGFP-LPETG 表达。培养结束后,收获的菌体按照文献报道的步骤进行纯化^[14]。通过 Ni-NTA 亲和层析除去杂蛋白(50 mmol·L⁻¹ 咪唑洗杂,500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱)。

1.4 分选酶的制备和纯化

本文采用的分选酶由原核蛋白表达体系制备。制备方法严格按照文献报道的操作进行^[15]。携带有分选酶基因序列的表达菌 BL21 培养至 OD_{600} 为 0.8~1.0 时加入 IPTG 诱导表达。培养结束后收获菌体,于冰上重悬、破碎。菌液通过 Ni-NTA 亲和层析除去杂蛋白(50 mmol·L⁻¹ 咪唑洗杂,500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱)。

1.5 靶向成像蛋白簇的制备

受分选酶反应活性的限制,靶向成像蛋白簇的制备采取底物过量以增加转化率的策略。首先进行分选酶催化反应。分选酶主要识别底物中的

-LPETG 和 GGG-结构. 按照 sfGFP-LPETG:(GGG)为 1:5 的比例投料,在分选酶反应缓冲液($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH=7.5)体系中反应 3 h. 反应产物反穿镍柱,除去未反应完全的 sfGFP-LPETG、 K_nG 底物和分选酶. 获得的产物通过 OD_{280} 对 sfGFP 进行定量,以确定 K_nG -sfGFP 的量. 按照 K_nG -sfGFP:Nb-Q 为 1($n=1$)、2($n=2$)、4($n=3$)的比例将上一步反应产物与 Nb-Q 混合. 加入 1 U/mL 的 TGase,室温反应 1 h. 反应情况用 SDS-PAGE 检测. 反应结束后,通过 AKTA 蛋白纯化仪(HiLoad 10/60 Superdex 200 column)进行纯化.

1.6 靶向成像蛋白簇的细胞选择性验证

将 EGFR⁺ A431 细胞与 EGFR⁻ A2780 细胞种板按照 1×10^6 个/每孔的密度接种于 24 孔板,在 5%CO₂、37 °C 的条件下培养过夜. 每孔加入含有 2 mg KKG-sfGFP(Nb)的 1 mL 新鲜培养基,37 °C 培养 4 h 后吸去培养基. 细胞用冷的 PBS 溶液洗涤 3 次,加入 4 %多聚甲醛固定 10 min,细胞核用 DAPI 染色. 制片后使用共焦激光扫描显微镜(LSM 710 CLSM, Carl Zeiss, Jena, Germany)观测.

1.7 靶向成像蛋白簇在动物模型上的功能验证

实验小鼠通过皮下植瘤植入 EGFR⁺ A431 移植瘤,待肿瘤长至长径约 0.6~1.0 cm 时进行实验. 通过尾静脉向小鼠静脉内注射 1 mg KKG-sfGFP(Nb). 在 15 min、30 min、1 h、3 h、6 h、9 h 后将裸鼠处死,摘取主要器官进行荧光扫描.

2 结果与讨论

2.1 树枝状聚氨基酸底物的合成与表征

固相合成技术因易操作、成本低、反应速度快、产物纯度高在多肽合成领域得到广泛的应用^[16]. 我们通过固相合成技术将分选酶识别结构聚甘氨酸 GGG-接到树枝状聚赖氨酸的末端,而赖氨酸侧链上的氨基与 GGG-部位末端氨基均能够被谷氨酰胺转氨酶识别. 制备代数不同的树枝状聚氨基酸底物,结构图与表征数据见图 1. 其中, $K[(GGG)(NH_2)]$ 具有 1 个 sortase 识别结构和 2 个 TGase 识别结构. $KK[(GGG)_2(NH_2)_2]$ 具有 2 个 sortase 识别结构和 4 个 TGase 识别结构. $KKK[(GGG)_4(NH_2)_4]$ 具有 4 个 sortase 识别结构和 8 个 TGase 识别结构.

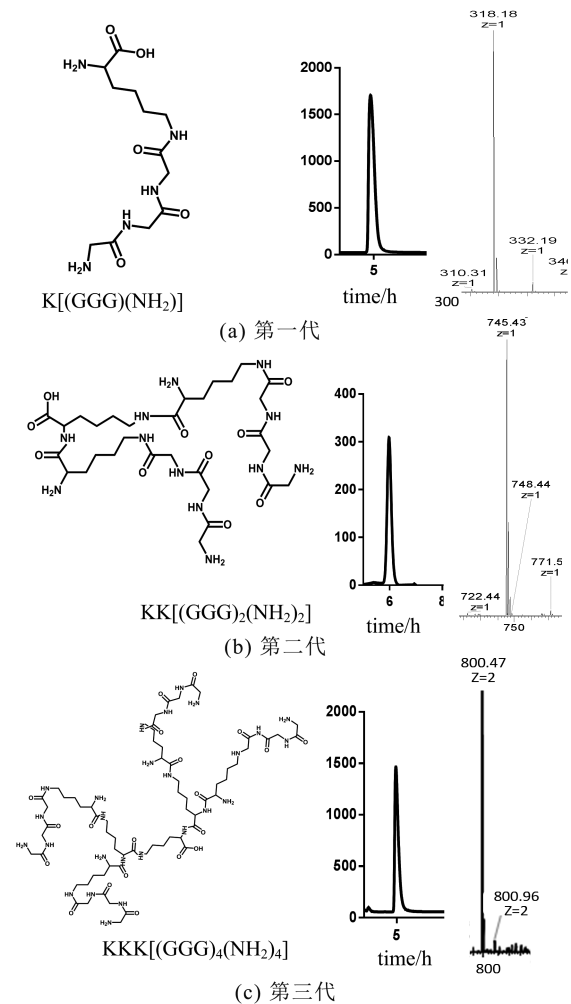


图1 树枝状聚氨基酸的分子结构、HPLC分析和ESI-MS分析
Fig.1 Molecular structure and characterization of dendritic poly(amino acid)s

2.2 靶向成像蛋白簇的制备

以分选酶介导的蛋白质定点修饰具有极高的特异性,然而在实际操作中,需要底物过量才能使蛋白有较高的修饰率. 因而,本实验中使用带有多个活性位点的树枝状底物使反应效率增加. GFP 与 nanobody 的共价连接已被分子排阻色谱证明(图 2). 随后,将修饰后的一代、二代和三代树枝状底物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),实验结果如图 3 所示. 可以看到,以 KKKG(三代)为底物制备的蛋白簇产物分布较为杂乱,难于分离纯化(图 3(b)). 以 KKG(二代)为底物制备的蛋白簇在分子筛纯化后,能够得到较为均一的产物(图 3(b)). 因此综合反应效率和产物均一性的结果,我们选择二代 KKG 底物制备的产物 KKG -sfGFP(Nb)_n 进行后续实验.

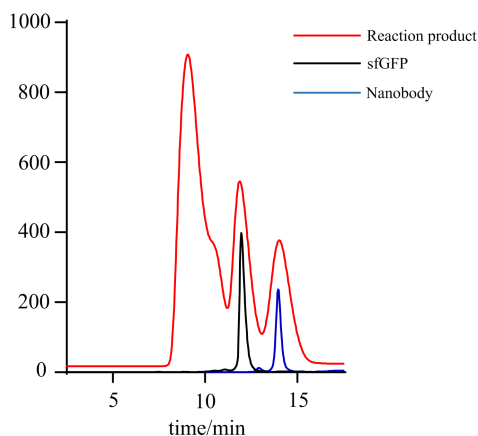
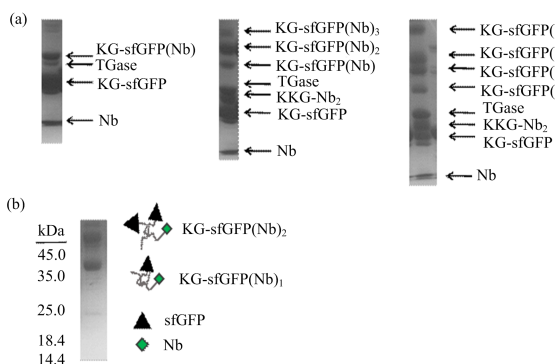


图 2 分子排阻色谱验证 GFP 与 nanobody 的共价连接

Fig. 2 The binding of GFP and nanobody was detected by size exclusion chromatography



(a) 3 种不同代数的树枝状聚氨基酸底物在酶催化下与 sfGFP 和纳米抗体反应的产物; (b) 纯化后的 KKG 反应产物

图 3 SDS-PAGE 验证 sortase 和 TGase 反应产物分布
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the product of sortase & TGase reaction

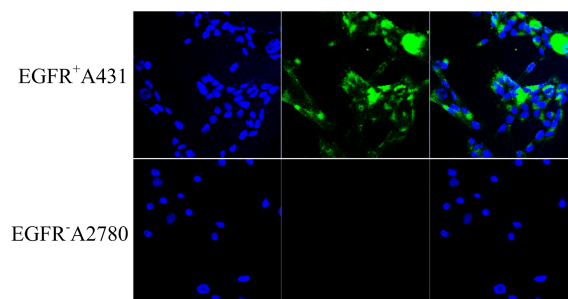
2.3 靶向成像蛋白簇的制备

特异性靶向细胞表面 EGFR 的纳米抗体被作为主动靶向分子来制备成像探针. 细胞实验表明, 蛋白簇 KKG-sfGFP(Nb) 具有明显的细胞选择性(图 4). 在 anti-EGFR 纳米抗体的作用下, KKG-sfGFP(Nb) 能够与 EGFR⁺ A431 细胞结合, sfGFP 的绿色荧光分布在细胞骨架范围处. 而阴性对照细胞则没有可检测到的绿色荧光信号.

2.4 动物模型验证靶向成像蛋白簇的功能

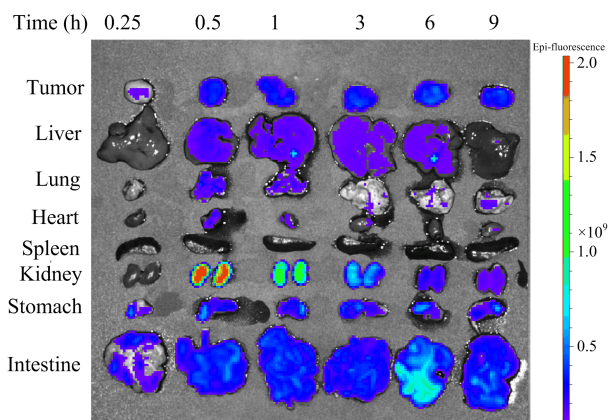
肿瘤成像探针不仅需要良好的特异性, 还应具备富集速度快、易清除等特性^[17]. 为了验证 KKG-sfGFP(Nb) 在动物水平的荧光成像效果, 我们对裸鼠植瘤后进行尾静脉注射 KKG-sfGFP(Nb) 探针. 如图 5 所示, 在注射约 0.5 h 时, 荧光信号便快速分布在肿瘤组织中. 注射 6 h 后, KKG-sfGFP(Nb) 逐渐在肝脏中代谢完全, 随着时间变化, 肾脏中 KKG-

sfGFP(Nb) 荧光信号也逐渐减弱, 表明该成像蛋白簇主要通过肝肾途径代谢, 并且 KKG-sfGFP(Nb) 在动物体内的滞留时间较短. 综上, KKG-sfGFP(Nb) 体系具备良好的肿瘤靶向成像功能.



将 KKG-sfGFP(Nb) 与细胞孵育后通过激光共聚焦显微镜成像
图 4 靶向蛋白簇 KKG-sfGFP(Nb) 的细胞选择性验证

Fig. 4 Specific binding and internalization of KKG-sfGFP(Nb)



从上到下依次为肿瘤、肝、肺、心脏、脾脏、肾脏、胃和肠

图 5 荷瘤小鼠在注射 KKG-sfGFP(Nb) 探针后不同时间点主要器官荧光图

Fig. 5 The fluorescence image of main organs of mice injected with KKG-sfGFP(Nb) at different time points

3 结论

本文充分利用分选酶和谷氨酰胺转氨酶对蛋白特异性位点识别并催化偶联的特性, 开发了一种能够简易高效地制备靶向荧光探针的方法. 通过化学合成制备末端带有酶识别底物的树枝状聚氨基酸载体, 在酶的催化下将带有靶向功能的纳米抗体和绿色荧光蛋白偶联到树枝状聚氨基酸载体上, 制备出多价纳米簇. 细胞实验表明, 该体系具有良好的细胞选择性, sfGFP 绿色荧光填充在 EGFR⁺ A431 细胞处. 实验结果表明, 定点修饰对于纳米抗体和 sfGFP 的功能没有产生显著影响. 小鼠实验表明, 该纳米簇能够在肿瘤部分快速高效富集, 并且随着时间增加

逐渐被代谢,清除速率较高.

参考文献(References)

- [1] VERONESE F M. Peptide and protein PEGylation: A review of problems and solutions[J]. *Biomaterials*, 2001, 22 (5): 405-417.
- [2] FILPULA D. Antibody engineering and modification technologies[J]. *Biomolecular Engineering*, 2007, 24 (2): 201-215.
- [3] SCHMIDT M, TOPLAK A, QUAEDFLIEG P J L M, et al. Enzyme-mediated ligation technologies for peptides and proteins[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 38: 1-7.
- [4] GLASGOW J E, SALIT M L, COCHRAN J R. In vivo site-specific protein tagging with diverse amines using an engineered sortase variant[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138 (24): 7496-7499.
- [5] MAO H Y, HART S A, SCHINK A, et al. Sortase-mediated protein ligation: A new method for protein engineering [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126 (9): 2670-2671.
- [6] THERIEN A, BEDARD M, CARIGNAN D, et al. A versatile papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform based on sortase-mediated antigen coupling [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2017, 15:54.
- [7] CHEN Q, SUN Q, MOLINO N M, et al. Sortase A-mediated multi-functionalization of protein nanoparticles [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51 (60): 12107-12110.
- [8] TAKI M, SHIOTA M, TAIRA K. Transglutaminase-mediated N- and C-terminal fluorescein labeling of a protein can support the native activity of the modified protein[J]. *Protein Engineering Design & Selection*, 2004, 17 (2): 119-126.
- [9] WU T T, HUANG H, SHENG Y, et al. Transglutaminase mediated PEGylation of nanobodies for targeted nano-drug delivery [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6 (7): 1011-1017.
- [10] JEGER S, ZIMMERMANN K, BLANC A, et al. Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49 (51): 9995-9997.
- [11] DENNLER P, CHIOTELLIS A, FISCHER E, et al. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2014, 25 (3): 569-578.
- [12] HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCHE T, MUYLDERMANS S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363 (6428): 446-448.
- [13] VAN AUDENHOVE I, GETTEMANS J. Nanobodies as versatile tools to understand, diagnose, visualize and treat cancer[J]. *Ebiomedicine*, 2016, 8: 40-48.
- [14] AL-HOMSI L, AL-ASSAD J M, KWEIDER M, et al. Construction of pRSET-sfGFP plasmid for fusion-protein expression [J]. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2012, 5: 279-288.
- [15] WITTE M D, WU T F, GUIMARAES C P, et al. Site-specific protein modification using immobilized sortase in batch and continuous-flow systems [J]. *Nature Protocols*, 2015, 10 (3):508-516.
- [16] MERRIFIELD B. Solid phase synthesis [J]. *Science*, 1985, 5 (5): 353-376.
- [17] ROTHBAUER U, ZOLGHADR K, TILLIB S, et al. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies[J]. *Nature Methods*, 2006, 3 (11): 887-889.