

研究报告

## 基于多肽亲和介导定点偶联策略的抗体元素标签的合成及 单细胞分析应用

王蕾<sup>#1</sup> 易立<sup>#1</sup> 李华敏<sup>1</sup> 陈石<sup>1</sup> 杨利民<sup>1</sup> 严晓文<sup>\*1,2</sup> 王秋泉<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>(厦门大学化学化工学院, 化学系, 谱学分析与仪器教育部重点实验室, 厦门 361005)

<sup>2</sup>(福建省能源材料科学与技术创新实验室(IKKEM), 厦门 361005)

**摘要** 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)因具有灵敏度高、准确度高、抗干扰能力强和多元素检测等优点,近年来在生物分子定量分析中显示出巨大的应用潜力。元素标签通过靶向基团与元素报告基团组装,实现对目标生物分子的特异性标记和信号报告,对基于 ICP-MS 的生物定量分析的性能具有至关重要的作用。抗体可与细胞表面的抗原高度特异性结合,是最常用的靶向递送载体之一。传统的随机化学偶联方法难以控制抗体的偶联位点和载荷数量,会增加抗体偶联物的异质性,影响抗体与抗原的特异性识别和结合能力,降低元素标签的靶向能力、定量分析的准确性和标签稳定性。针对这些问题,本研究对抗体的定点偶联策略进行了研究,采用多肽亲和标记技术,将一段短链 DNA 定点偶联到免疫球蛋白 G(IgG)抗体 K248 位,通过 DNA 碱基互补配对,实现了单克隆抗体与稀土元素 Eu 修饰的噬菌体 MS2 衣壳蛋白的精准组装,并基于此制备了高灵敏度和高选择性的元素标签。本方法克服了随机偶联造成的元素标签的异质性问题,确保了元素标签的靶向特异性、亲和力和信号放大能力。研究表明,此元素标签与癌细胞表面的表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)特异性结合,利用单细胞 ICP-MS 技术成功实现了癌细胞表面抗原的单细胞分析检测。

**关键词** 多肽亲和标记; 定点偶联; 抗体; 元素标签; 单细胞-电感耦合等离子体质谱

近年来,基于电感耦合等离子体质谱(Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)的生物分析方法在生物医学研究领域得到了广泛应用<sup>[1-11]</sup>。ICP-MS 可在痕量和超痕量浓度水平实现高灵敏的元素分析,具有多元素/同位素分析以及元素信号强度与化学形态无关等优势<sup>[12-13]</sup>。元素标签的信号响应强度与每个元素标签所携带的金属原子数量成正比,而纳米颗粒可一次性负载成千上万的金属原子,因此,纳米颗粒是提高 ICP-MS 生物测定灵敏度的有效载体之一,可实现对低丰度细胞标记物的高灵敏度定量分析检测<sup>[14-18]</sup>。

抗体(Antibody),又称免疫球蛋白 G(Immunoglobulin, IgG),是一种由 B 细胞产生的 Y 形蛋白,能够特异性识别并结合目标分子,是最常用的靶向递送载体之一。IgG 由两条重链(Heavy chain)和两条轻链(Light chain)构成,表面含有多种溶剂可及性的反应性氨基酸,例如赖氨酸和半胱氨酸等可用于化学修饰,是一种常用的制备元素标签的靶向分子<sup>[19-21]</sup>。

目前,已经发展了多种基于金属螯合物、金属聚合物和金属纳米粒子的抗体元素标签,并被应用于生物分子特异性识别和高灵敏定量分析<sup>[22-23]</sup>。2001 年,张新荣研究组<sup>[24]</sup>首次报道了金属稳定同位素(Eu 同位素)抗体元素标签,并实现了对促甲状腺激素(TSH)的 ICP-MS 定量分析。2011 年, Bendall 等<sup>[25]</sup>使用抗体聚合物元素标签,结合单细胞-质谱流式细胞技术,成功实现了对免疫细胞高达 34 个参数的高通

2024-06-07 收稿; 2024-07-24 接受

国家重点研发计划项目(No. 2022YFF0710200)、国家自然科学基金项目(Nos. 22074127, 22193053)、福建省能源材料科学与技术创新实验室项目(No. H RTP-[2022]-13)和厦门大学校长基金项目(No. 20720200073)资助。

\*共同第一作者

\* E-mail: xwyan@xmu.edu.cn; qqwang@xmu.edu.cn

量分析。金属稳定同位素标记和绝对定量分析策略在高灵敏度检测和多通道多参数生物分析等方面展现了巨大的应用潜力,为生物分子研究和临床诊断带来了技术革新<sup>[26]</sup>。

目前,抗体元素标签多采用随机偶联的方式制备,即通过抗体表面广泛的游离氨基或者巯基,与目标载体的反应官能团随机碰撞,实现抗体与纳米载体的共价偶联<sup>[27-28]</sup>。这种随机偶联会导致抗体偶联位点和偶联比例的不可控。偶联位点的不确定性可能会阻塞抗体的抗原结合位点,降低其特异性结合目标的能力,影响元素标签的专一性和亲和力;偶联比例无法控制会导致制备的元素标签无法进行准确的定量分析,增加元素标签异质性,影响标签的稳定性。随着 Thiomab 工程、非天然氨基酸插入等技术的发展,研究者可采用这些技术实现抗体位点特异性偶联<sup>[29-32]</sup>。但是,这些技术路线需要通过复杂的基因工程技术,将具有反应性的氨基酸引入到抗体的目标位点,技术要求高,生产过程周期长,并且价格昂贵。

多肽介导的亲标记技术是一种利用多肽作为桥梁,特异性地将标记物结合到目标生物分子(如蛋白质、核酸和细胞表面受体等)上的方法。Delano 等<sup>[33]</sup>通过建立环肽文库,筛选出可与 IgG 抗体的 Fc 片段特异性结合的亲和多肽 Fc-III (DCAWHLGELVWCT-NH<sub>2</sub>),并以 2.7 Å 的分辨率确定了 Fc-III 肽与 Fc 片段复合物的 X 射线晶体结构,证明了 Fc-III 肽与 Fc 片段的 CH2 和 CH3 区域的交界面结合。在此基础上, Kishimoto 等<sup>[34]</sup>结合之前的工作,通过空间结构分析,确定了序列为 GPDCAYHKGELVWCTFH 的环肽的第 8 位赖氨酸与抗体 Fc 片段的 K248 位赖氨酸距离仅为 6.1 Å,并在该多肽的第 8 位赖氨酸的氨基上修饰了一条碳链长度为 7.1 Å、末端带有甲基丙烯酸 *N*-琥珀酰亚胺酯(*N*-Hydroxysuccinimide ester, NHS)的 Linker。在亲和标记过程中,游离的亲和多肽分子首先与抗体的 CH2 和 CH3 区域发生非共价特异性结合(图 1)。这种非共价的结合拉近了抗体上 K248 的氨基和多肽上的 NHS 酯之间的距离,从而使得氨基亲和进攻羰基,形成酰胺键,实现抗体的位点特异性偶联;然后,通过多肽上的马来酰亚胺基团与巯基化 DNA 偶联,得到化学计量比为 1:1 的抗体-DNA 偶联物;最后,通过 IgG 与修饰了 Eu 的 MS2 蛋白纳米颗粒<sup>[35-36]</sup>之间的 DNA 杂交,实现元素标签的精准组装。这种元素标签制备技术可实现抗体的位点特异性偶联和化学计量比 1:1 的精确偶联,无需对抗体进行工程改造,具备更强的通用性。本研究采用

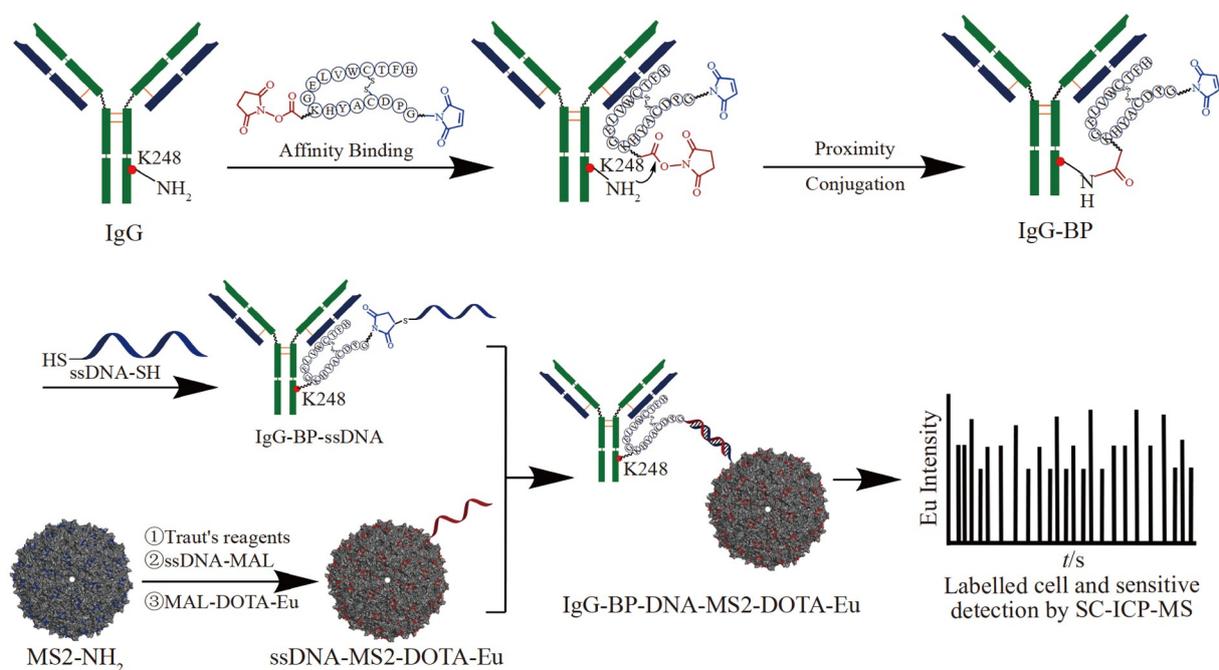


图1 基于多肽亲和标记策略的抗体元素标签 IgG-MS2-Eu 的制备及应用示意图

Fig.1 Schematic diagram of preparation and application of antibody element tag (IgG-MS2-Eu) based on peptide affinity-mediated site-specific labeling strategy

BP, 亲和多肽(Binding peptide); ssDNA: 单链脱氧核糖核酸(Single-stranded deoxyribonucleic acid); DOTA: 环环藤宁四乙酸(1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)

多肽介导的亲亲和标记技术,实现了抗体与修饰稀土元素 Eu 的 MS2 衣壳蛋白纳米颗粒定点偶联,构建了一种高灵敏和高亲和力的元素标签,并利用单细胞-电感耦合等离子体质谱(Single cell inductively coupled plasma mass spectrometry, SC-ICP-MS)技术对此元素标签的专一性和灵敏度进行了评价。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

LC-20AD 高效液相色谱仪和 LC-16P 制备液相色谱系统(日本 Shimadzu 公司); XBridge Protein BEH 尺寸排阻色谱柱(SEC, 7.8 mm×300 mm, 3.5 μm, 美国 Waters 公司); 制备色谱柱 C<sub>18</sub>(10 mm×150 mm, 5 μm, 日本 Shimadzu 公司); 分析色谱柱 C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm, 日本 Shimadzu 公司); NexION®2000 ICP Mass Spectrometer(美国 PerkinElmer 公司); autoflex®maX 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS, 美国 Bruker 公司); JEM1400 透射电镜(日本 JEOL 公司); PowerPac™基础电泳仪电源、Mini-PROTEAN®Tetra 电泳槽(美国 Bio-Rad 公司); UVP GelStudio PLUS 多功能凝胶成像系统(德国 Analytik Jena 公司); DYCP-31BN 型琼脂糖水平电泳仪(北京六一生物公司)。

NexION Setup Solution 调谐液(TruQ™ms, 500 mL, 美国 PerkinElmer 公司); 四元素微球校准液(TruQ™ms, 100 mL, 美国 Fluidigm 公司); 西妥昔单抗(Cetuximab, 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心); 氯化铈(III)六水合物(25 g, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); DOTA-马来酰亚胺(100 mg, 陕西新研博美生物科技有限公司); 三氟乙酸(TFA, 500 mL, 上海麦克林生化科技股份有限公司); *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF, 500 mL, 国药集团化学试剂有限公司); 超滤管(30和100 kDa, 0.5 mL, 美国 Millipore 公司); 双琥珀酰亚胺戊二酸酯(Diosuccinimidyl glutamate, DSG, 50 mg, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 亲和多肽(BP)、ssDNA、BCA 试剂盒、SDS 预制胶和 Protein Ladder(生工生物工程(上海)股份有限公司); 尼龙筛网(300 目, 孔径约为 48 μm, 北京索莱宝科技股份有限公司); 非小细胞肺癌细胞系 A549 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 来自 American Type Culture Collection。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 基于多肽亲和标记策略的元素标签 IgG-MS2-Eu 的制备

**BP-NHS 的制备** BP 的 NHS 修饰反应在 DMF 中进行。在终浓度为 0.5 mmol/L 的多肽中加入 100 倍当量的双琥珀酰亚胺戊二酸酯(DSG), 于 37 °C 中振荡反应 5 h。采用制备色谱仪进行纯化, 流动相由 A 相(TFA/H<sub>2</sub>O, 0.1%, *V/V*)和 B 相(TFA/ACN, 0.1%, *V/V*)组成。以 0.5 mL/min 的流速洗脱, 洗脱程序为: 0~5 min, 5% B, 用于样品的加载及系统平衡; 5~15 min, 5%~90% B, 实现目标多肽的逐步分离; 15~20 min, 90% B, 用于快速洗脱未完全分离的杂质或高极性组分。

**IgG-BP 的制备** IgG 与 BP 的亲亲和偶联反应在磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=7.5)中进行。在终浓度为 7 μmol/L 的西妥昔单抗中加入 5 倍当量的亲和多肽 NHS-BP-MAL, 室温反应 1 h。采用超滤管(MWCO=30 kDa)在 4 °C 下超滤纯化 5 min, 共超滤 4 次, 得到抗体多肽偶联物 IgG-BP。

**IgG-BP-ssDNA 的制备** 向反应终浓度为 10 μmol/L 的 IgG-BP 偶联物中加入 20 倍当量的 ssDNA-SH, 于 4 °C 下过夜反应。采用超滤管(MWCO=30 kDa)滤除小分子, 并将溶剂置换为 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)缓冲溶液, 最终得到 IgG-BP-ssDNA 偶联物。

**ssDNA-MS2-DOTA-Eu 的制备** 在噬菌体 MS2 衣壳蛋白表面修饰 DOTA-Eu 和 ssDNA。首先将噬菌体 MS2 衣壳蛋白内外表面的氨基转化为巯基, 然后在噬菌体 MS2 衣壳蛋白中加入 20 倍当量的 2-亚氨基硫烷 Traut's 试剂, 在 5 mmol/L 的乙二胺四乙酸(EDTA)和 pH=8.0 的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中室温振荡反应 3 h。采用超滤管(MWCO=100 kDa)纯化, 得到巯基化 MS2 衣壳蛋白(MS2-SH)。

**对 MS2-SH 进行 DNA 和 Eu 元素的组装** 在 MS2-SH 中加入 9 倍当量的 ssDNA-MAL, 于 4 °C 过夜反应。然后继续加入巯基 50 倍当量的 MAL-DOTA-Eu, 振荡反应 2 h。采用超滤管(MWCO=100 kDa)超滤 3 次, 得到 ssDNA-MS2-DOTA-Eu。

**IgG-BP-DNA-MS2-DOTA-Eu 元素标签的组装** 反应在 50 mmol/L Hepes(pH=7.0)缓冲溶液中进行, 将 IgG-BP-ssDNA 与 ssDNA-MS2-DOTA-Eu 偶联物以 2:1 的比例混合, 即可组装得到 IgG-BP-DNA-MS2-

DOTA-Eu 元素标签。

### 1.2.2 基于氨基随机偶联策略的元素标签 IgG-PEG-MS2-Eu 的制备

通过抗体上的赖氨酸侧链上的氨基或 N 端的氨基实现偶联。为了将西妥昔单抗与 MS2-SH 偶联,需要在西妥昔单抗上偶联一端带有马来酰亚胺基团的连接子。西妥昔单抗和 MAL-PEG-NHS 连接子通过 NHS 酯与氨基发生酰胺化反应,生成 IgG-PEG-MAL 偶联物。此反应在含有 10%(V/V)二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)的 PBS 缓冲溶液中进行,在终浓度为 3  $\mu\text{mol/L}$  的西妥昔单抗中加入 4 倍当量的 NHS-PEG-MAL,室温下反应 2 h。采用超滤管(MWCO=30 kDa)于 4  $^{\circ}\text{C}$  以 4500 g 的离心力超滤纯化 5 min,共超滤 4 次,得到抗体偶联物。通过 BCA 微量蛋白定量试剂盒定量分析抗体偶联物的蛋白浓度。

通过巯基和马来酰亚胺的迈克尔加成反应,将抗体偶联物与 MS2-SH 偶联,并在标签上修饰 Eu,制备 IgG-PEG-MS2-DOTA-Eu 元素标签,此反应在 10 mmol/L HEPES 缓冲溶液(pH=7.0)中进行。在终浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$  的抗体偶联物中加入 2 倍当量的巯基化 MS2,室温反应 2 h,加入 5 倍巯基当量的 MAL-DOTA-Eu,室温反应 2 h。采用超滤管(MWCO=100 kDa)于 4  $^{\circ}\text{C}$  以 3500 g 离心超滤纯化 3 min,共超滤 4 次,得到元素标签 IgG-PEG-MS2-Eu。

### 1.2.3 元素标签中 Eu 含量的定量分析

采用柱后同位素稀释法测定元素标签中 Eu 的总量<sup>[37-38]</sup>。在每次测定前,采用含有 1  $\mu\text{g/L}$  的 Be、Ce、Fe、In、Li、Mg、Pb 和 U 的调谐液对 ICP-MS 进行调谐,以达到最大灵敏度。在测试样品前,使用 2%  $\text{HNO}_3$  溶液冲洗 ICP-MS 的雾化室 5 min。搭建尺寸排阻色谱/非形态特异同位素稀释电感耦合等离子体质谱法(Size exclusion chromatography/species-unspecific isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry, SEC/SUID-ICP-MS)平台,以三通接口连接高效液相色谱(High-performance liquid chromatography, HPLC)的流动相出口和注射泵上的注射器口,使得两股液流混合,共同进入 ICP-MS 进行检测。通过 SEC 柱分离蛋白样品,色谱流速为 0.3 mL/min,注射泵以 0.06 mL/min 的流速注入 1  $\mu\text{g/L}$   $^{153}\text{Eu}$  标准品溶液。通过色谱和质谱的信息对元素标签中 Eu 的含量进行绝对定量分析。

### 1.2.4 元素标签的单细胞 ICP-MS 分析<sup>[30]</sup>

贴壁细胞用胰蛋白酶处理后收集,悬浮细胞通过离心收集,然后采用预冷的 HEPES 溶液置换细胞培养液。在每组 100  $\mu\text{L}$  的  $2 \times 10^6$  个细胞中,加入不同浓度元素标签,在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min,期间将样品缓慢旋转混匀。采用预冷的 HEPES 缓冲溶液洗涤 3 次,在室温下加入 4% 通用多聚甲醛固定液并放置 15 min 以固定细胞。固定操作结束后,继续使用预冷的 HEPES 缓冲溶液洗涤 3 次,除去多余的元素标签。细胞样品测试前通过 300 目(孔径 48  $\mu\text{m}$ )的尼龙筛网过滤,防止粘连的细胞进入装置堵塞管路。采用 SC-ICP-MS 对细胞样品进行测试。

## 2 结果与讨论

### 2.1 IgG-MS2-Eu 元素标签的制备及表征

#### 2.1.1 BP-NHS 的制备及表征

BP 的 NHS 修饰反应如图 2A 所示,BP 的第 8 位赖氨酸与 DSG 发生酰胺缩合,引入 NHS 官能团,用于后续与抗体的亲和交联反应。采用 HPLC 以及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对 BP-NHS 产物进行了纯化和表征(图 2B 和 2C),测得分子量( $[M+H]^+$ )为 2572.1290 Da,与理论分子量结果吻合,说明成功实现了多肽的 NHS 修饰(1:1),得到目标物 BP-NHS。

#### 2.1.2 IgG-BP 的制备及表征

利用多肽配体对单克隆抗体的亲和性,实现抗体与目标多肽之间的共价结合,最终完成对抗体 Fc 片段的定向修饰,具体的反应过程如图 3A 所示。使用 MALDI-TOF-MS 对产物进行表征分析,结果如图 3B 所示。抗体多肽偶联物(IgG-BP)的分子量为 153820.6 Da,而 IgG 的分子量为 151409.3 Da,表明西妥昔单抗均与 BP-NHS 成功偶联,并且平均每个单克隆抗体上偶联了一条目标多肽。利用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对产物进行分析,如图 3C 所示,随着 BP-NHS 加入剂量增加,抗体的重链

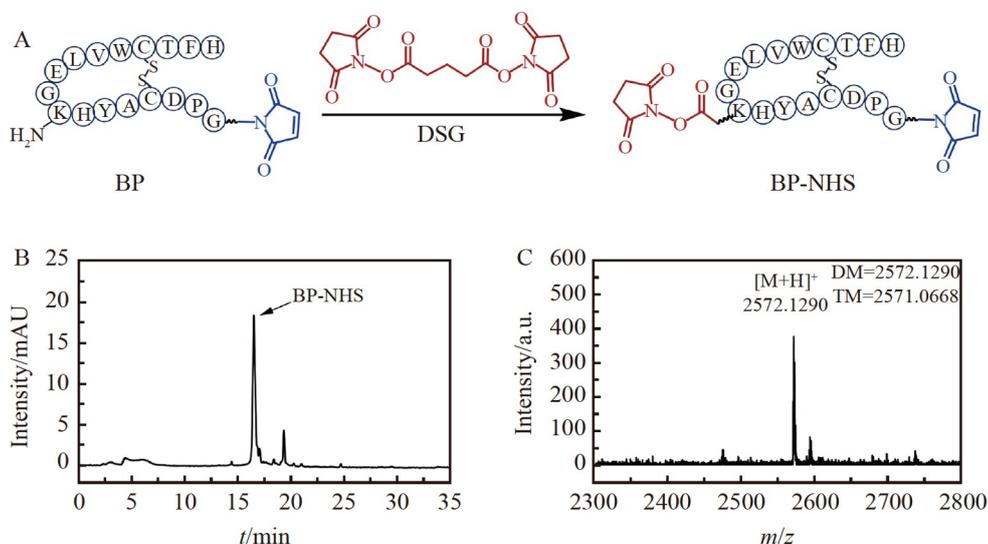


图2 BP-甲基丙烯酸 *N*-琥珀酰亚胺酯(NHS)的合成反应、纯化及表征: (A)BP-NHS 的合成路线; (B)BP-NHS 的高效液相色谱紫外检测(HPLC-UV)(214 nm)图; (C)BP-NHS 的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)图,质谱中的DM和TM分别表示检测分子量和理论分子量

Fig.2 Synthesis, purification and characterization of binding peptide *N*-hydroxysuccinimide ester (BP-NHS): (A) Synthesis route of BP-NHS; (B) Separation of BP-NHS by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV); (C) Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) characterization of the purified BP-NHS. DM and TM in the MS spectra denote deconvolution and theoretical molecular weight, respectively

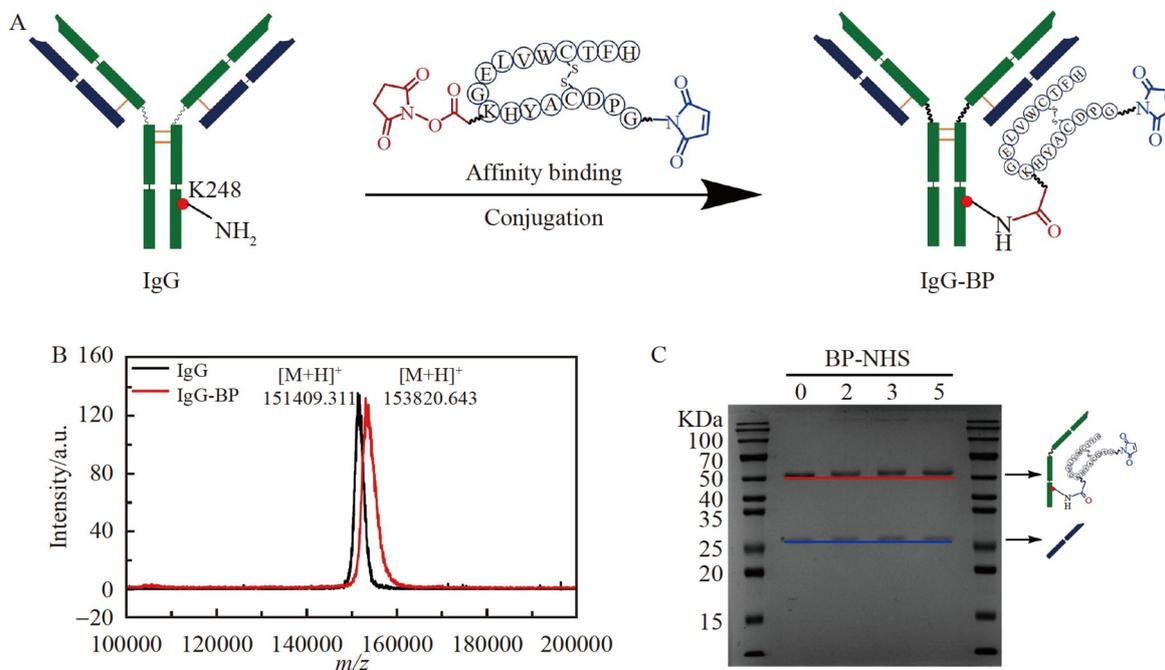


图3 西妥昔单抗(IgG)-BP 偶联物的合成及表征: (A) IgG-BP 的合成反应; (B) IgG-BP 的 MALDI-TOF-MS 表征; (C) 还原后的 IgG-BP 的 10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)表征

Fig.3 Synthesis and characterization of cetuximab-binding peptide (IgG-BP): (A) Synthesis route of IgG-BP; (B) MALDI-TOF-MS characterization of the IgG-BP; (C) 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) characterization of reduced IgG-BP

逐渐上移,轻链无反应,表明此亲和标记反应仅发生在抗体的重链位置,与预期相符。

### 2.1.3 IgG-BP-ssDNA 的制备及表征

IgG-BP 与巯基化单链 DNA(ssDNA-SH)的反应过程如图 4A 所示, IgG-BP 上的亲和肽 C 端的马来酰亚胺官能团与 ssDNA-SH 反应形成稳定的硫醚键,实现 IgG-BP 和 ssDNA-SH 的共价偶联。如图 4B 所示,完整的 IgG-BP-ssDNA 条带存在明显上移,证实抗体与 DNA 成功结合。对产物 IgG-BP-ssDNA 进行还原处理,结果如图 4C 所示,抗体重链的条带出现上移,而轻链无变化,证实 ssDNA-SH 与抗体的共价反应仅发生在抗体的重链部位,而且每个抗体上仅偶联一条 ssDNA,证明发展的亲和介导的位点特异性偶联技术可实现对抗体的化学计量比修饰。

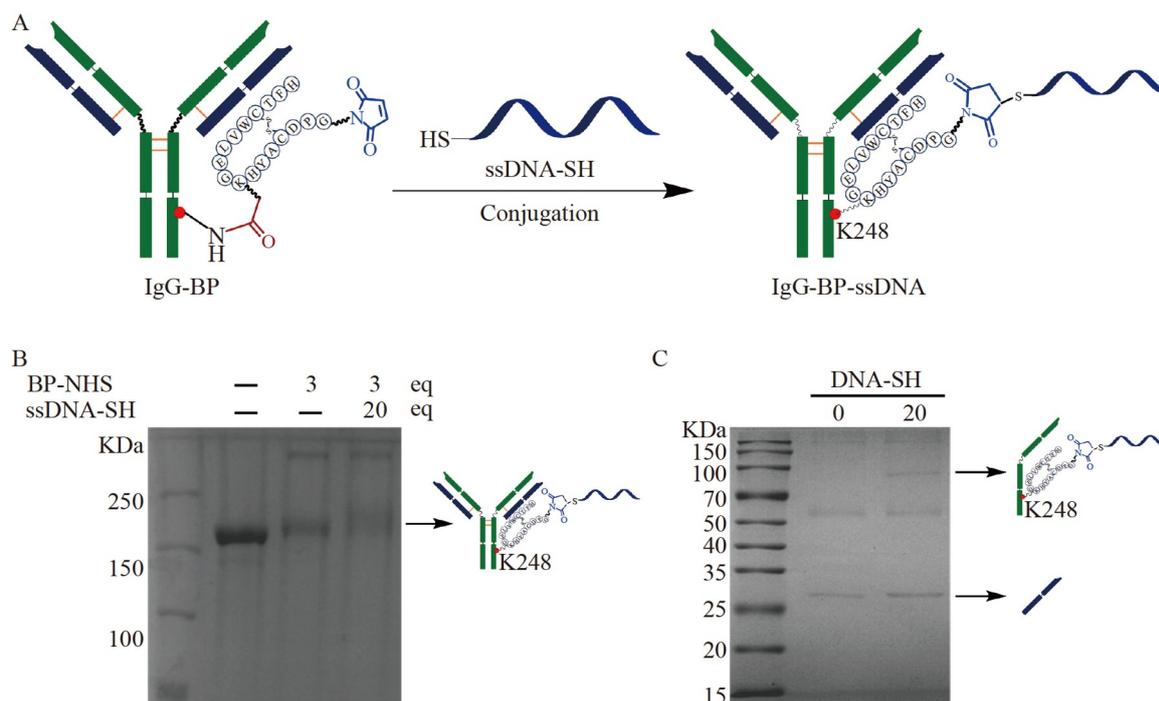


图4 西妥昔单抗-亲和多肽-单链 DNA 偶联物(IgG-BP-ssDNA)的合成路线及表征:(A)IgG-BP-ssDNA 的合成路线;(B) IgG-BP-ssDNA(完整)的6% SDS-PAGE 表征;(C) IgG-BP-ssDNA(还原)的10% SDS-PAGE 表征。

Fig.4 Synthesis and characterization of the cetuximab-binding peptide-ssDNA coupling (IgG-BP-ssDNA): (A) Synthesis route of IgG-BP-ssDNA; (B) 6% SDS-PAGE characterization of the IgG-BP-ssDNA (Intact); (C) 10% SDS-PAGE characterization of the IgG-BP-ssDNA (Reduced)

### 2.1.4 ssDNA-MS2-DOTA-Eu 的制备及表征

利用 Traut's 试剂对噬菌体 MS2 衣壳蛋白纳米颗粒表面的赖氨酸残基进行化学改造<sup>[36]</sup>,将噬菌体 MS2 衣壳蛋白中的天然氨基转化为巯基,再通过巯基与马来酰亚胺的反应分别在 MS2 的表面修饰 ssDNA 及 DOTA-Eu,反应路线图如图 5A 所示。为了监测反应过程中 MS2 纳米颗粒的完整性,使用透射电镜对产物进行表征,结果如图 5B 所示,经由多步偶联反应制得的元素标签仍保持完整形态,具有良好的稳定性,元素标签颗粒尺寸均一,并且分散性良好。采用 MALDI-TOF-MS 对 MS2-SH 表征,结果如图 5C 所示,MS2-SH 亚基分子量约为 14349 Da,而噬菌体 MS2 衣壳蛋白亚基分子量为 13760 Da,此结果表明 MS2 表面的氨基被成功转换成游离巯基,并且平均每个 MS2 亚基上修饰 6 个巯基。通过麦克加成反应实现 MS2-SH 表面的 DNA 偶联,利用 SDS-PAGE 对样品进行分析。如图 5D 所示,随着 ssDNA-MAL 剂量增加,ssDNA-MS2 的条带逐渐加深,表明 MS2-SH 与 ssDNA-MAL 成功偶联。

### 2.1.5 IgG-BP-DNA-MS2-DOTA-Eu(IgG-MS2-Eu)标签的制备及表征

将上述纯化后的 IgG-BP-ssDNA 和 ssDNA-MS2-DOTA-Eu 在 50 mmol/L HEPES 缓冲溶液中混匀,抗体

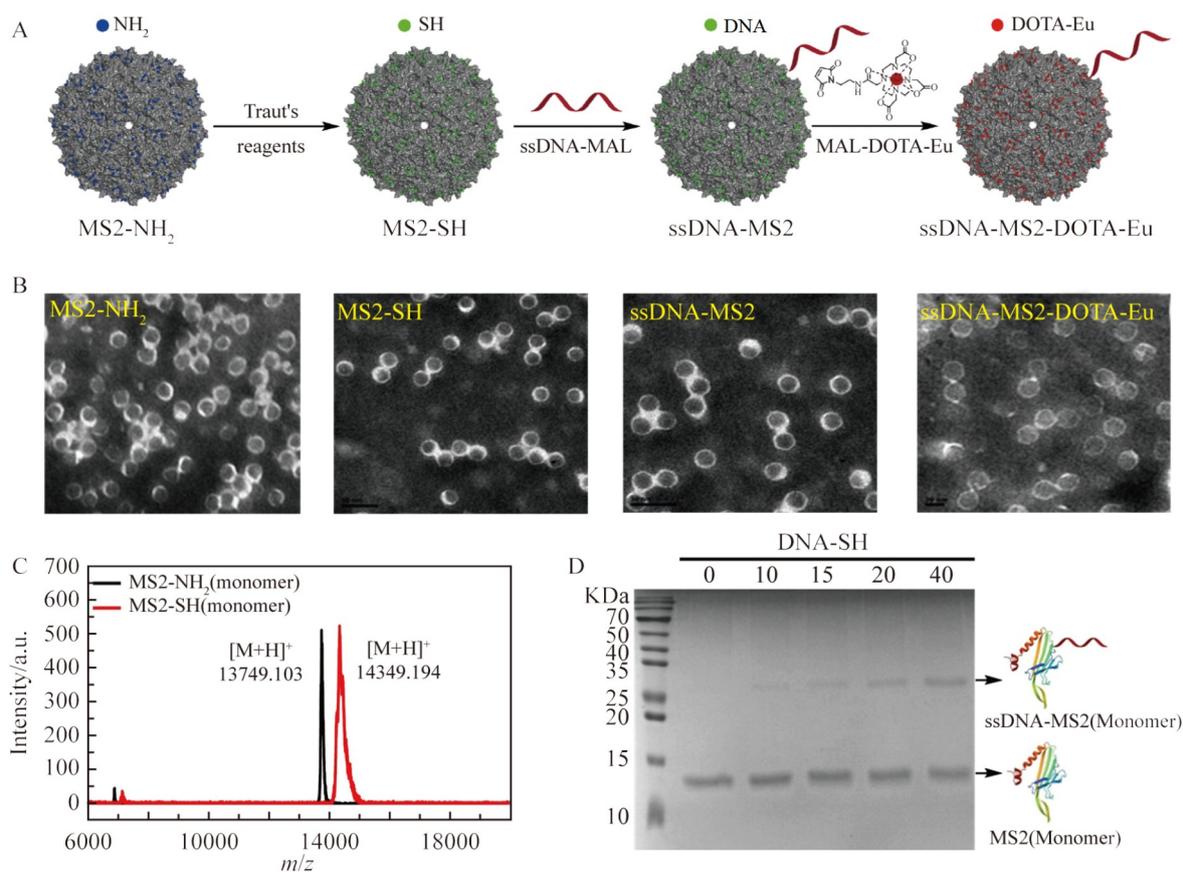


图5 ssDNA-MS2-DOTA-Eu 的合成路线及表征: (A) ssDNA-MS2-DOTA-Eu 的合成路线; (B) MS2-NH<sub>2</sub>、MS2-SH、ssDNA-MS2 和 ssDNA-MS2-DOTA-Eu 的透射电镜(TEM)表征; (C) MS2-NH<sub>2</sub> 和 MS2-SH 的 MALDI-TOF-MS 表征; (D) ssDNA-MS2-DOTA-Eu 的 12% SDS-PAGE 表征

Fig.5 Synthesis and characterization of ssDNA-MS2-DOTA-Eu: (A) Synthesis route of ssDNA-MS2-DOTA-Eu; (B) Transmission electron microscope (TEM) characterization of MS2-NH<sub>2</sub>, MS2-SH, ssDNA-MS2 and ssDNA-MS2-DOTA-Eu; (C) MALDI-TOF-MS characterization of MS2-NH<sub>2</sub> and MS2-SH; (D) 12% SDS-PAGE characterization of ssDNA-MS2-DOTA-Eu

与 MS2 在 DNA 的杂交作用下实现精准组装,反应过程如图 6A 所示。采用琼脂糖凝胶电泳对反应过程进行检测,结果如图 6B 所示,反应物条带消失,并且出现了全新的条带,表明 IgG-BP-ssDNA 和 MS2-ssDNA 经由单链 DNA 的碱基互补配对杂交成功。采用柱后同位素稀释法对元素标签 IgG-MS2-Eu 的 Eu 含量进行定量分析。将元素标签稀释 10<sup>4</sup> 倍,采用 SEC/SUID-ICP-MS 对样品中 Eu 进行定量检测,结果见图 6C。计算结果表明,平均每个 MS2 颗粒上携带了 800 个 Eu 原子。

为获得最佳标记细胞的元素标签浓度,考察了不同浓度的 IgG-MS2-Eu 标签对 A549 肺癌细胞的标记效果,建立了标签浓度与细胞信号强度的关系。如图 6D 所示,随着元素标签孵育浓度增加,细胞的 Eu 信号强度逐渐增强。当元素标签的浓度为 40 nmol/L 时, Eu 的检测值达到最大。因此,最佳的元素标签孵育浓度为 40 nmol/L。

## 2.2 IgG-BP-DNA-MS2-Eu 的 SC-ICP-MS 分析

为了检测元素标签 IgG-BP-DNA-MS2-Eu 在细胞标记实验中的靶向性能以及评价其非特异性吸附情况,选择 A549 细胞(表皮生长因子受体(EGFR)阳性)和 MDA-MB-231 细胞(EGFR 阴性)作为对照样品,利用 SC-ICP-MS 进行单细胞分析,并通过产生的元素单细胞信号响应强度进行对比分析。

如图 7A 所示,未标记 A549 细胞没有 Eu 元素的信号,说明 A549 细胞中 Eu 元素背景很低。如图 7B 所示, A549 细胞与 MS2-DOTA-Eu 孵育后,仅存在微弱的脉冲信号,说明元素标签对 A549 细胞没有非特异性吸附。如图 7C 所示,在 IgG-BP-DNA-MS2-Eu 标记 A549 细胞 30 min 后,得到很强的 Eu 元素信号响

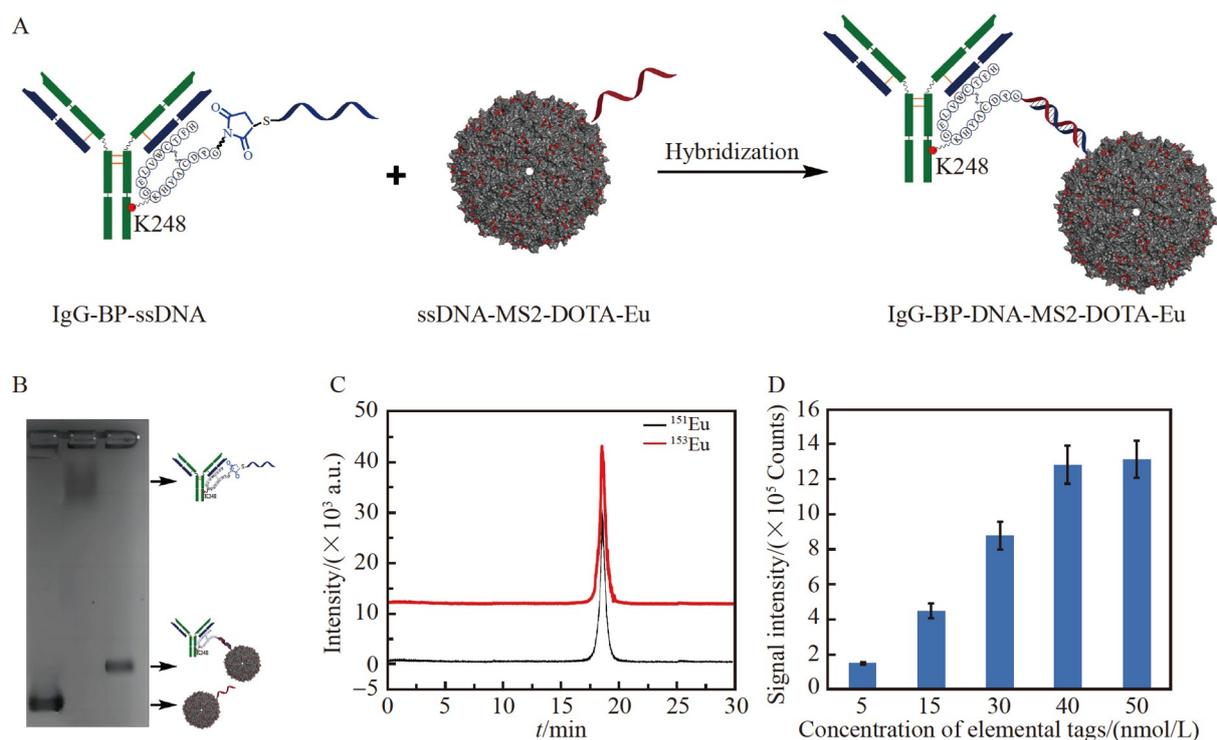


图6 IgG-BP-DNA-MS2-DOTA-Eu 的合成路线及表征: (A) IgG-BP-DNA-MS2-DOTA-Eu 的合成路线; (B) IgG-BP-DNA-MS2 的 1% 琼脂糖凝胶电泳表征; (C)  $^{153}\text{Eu}/^{151}\text{Eu}$  的尺寸排阻色谱/非形态特异同位素稀释电感耦合等离子体质谱 (SEC/SUID-ICP-MS) 图; (D) 不同浓度的 IgG-BP-DNA-MS2-Eu 标记 A549 细胞的信号强度结果图

Fig.6 Synthesis and characterization of IgG-BP-DNA-MS2-DOTA-Eu: (A) Synthesis route of IgG-BP-DNA-MS2-DOTA-Eu; (B) 1% agarose gel electrophoresis characterization of IgG-BP-DNA-MS2; (C) Size exclusion chromatography/species-unspecific isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC/SUID-ICP-MS) analysis of  $^{153}\text{Eu}$  and  $^{151}\text{Eu}$  isotopes in IgG-BP-DNA-MS2; (D) Signal intensity of A549 cells labeled with different concentrations of IgG-BP-DNA-MS2-Eu tag

应,说明元素标签具有高灵敏性,并且标记作用来自标签与 A549 细胞表面 EGFR 抗原之间的特异性相互作用,表明 IgG-BP-DNA-MS2-Eu 能够与 A549 细胞特异性结合,并且这种结合能力来源于西妥昔单抗的靶向特异性。

以低表达 EGFR 的 MDA-MB-231 细胞作为阴性对照,测试结果见图 7D~7F。如图 7D 所示,未标记的 MDA-MB-231 细胞没有 Eu 元素的脉冲信号,说明 MDA-MB-231 细胞中 Eu 元素背景很低。如图 7E 所示,MS2-DOTA-Eu 孵育后的 MDA-MB-231 细胞仅存在少量脉冲信号,说明元素标签对 MDA-MB-231 细胞的非特异性吸附也很少。利用相同浓度的元素标签 IgG-BP-DNA-MS2-Eu 进行标记实验后,MDA-MB-231 的信号强度远低于 A549 细胞。此结果再次说明标记作用是来自标签与 A549 细胞表面 EGFR 抗原之间的特异性相互作用。以上结果表明,亲和标记技术制备得到的 IgG-BP-DNA-MS2-Eu 元素标签能够与目标细胞表面的 EGFR 特异性结合,并具有低的非特异性吸附和高灵敏度的优势。

### 2.3 基于随机偶联技术制备的元素标签的 SC-ICP-MS 分析

为比较亲和标记技术和通过随机偶联技术制备的元素标签的差异,利用 NHS-PEG-MAL 将 IgG 抗体的氨基与 MS2-SH 的巯基通过随机偶联,合成了 IgG-PEG-MS2-Eu 标签(图 8A)。采用相同浓度的元素标签对 A549 细胞进行标记和 SC-ICP-MS 分析,结果如图 8B 和图 8C 所示,在 A549 单细胞检测分析中,使用基于随机偶联方法得到的 IgG-PEG-MS2-Eu 元素标签,其细胞上几乎没有 Eu 的信号;而基于亲和标记制备的元素标签 Eu 信号良好,说明采用随机偶联得到的元素标签几乎未靶向定位到细胞表面 EGFR 受体。这可能是由于 NHS-PEG-MAL 与抗体的随机偶联发生在抗体轻链的抗原识别区,导致标签无法特异性识

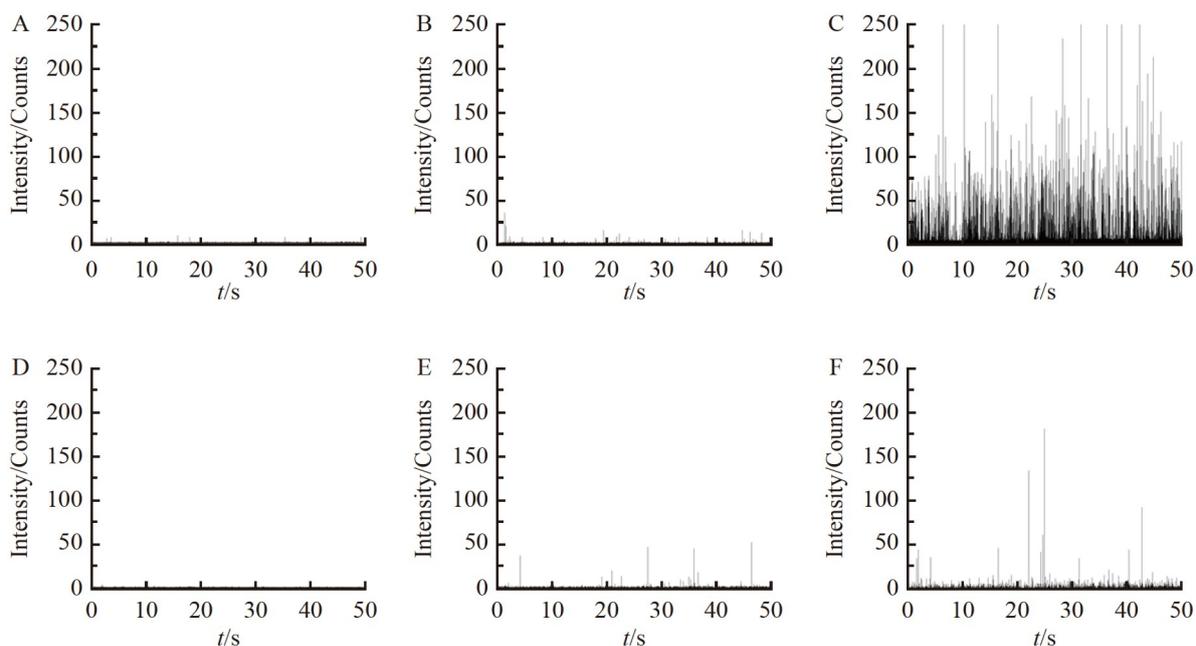


图7 A549(EGFR 阳性)和MDA-MB-231(EGFR 阴性)两种癌细胞在不同标记条件下的 SC-ICP-MS 分析结果: (A) 未标记的 A549 细胞; (B) 与 MS2-DOTA-Eu 孵育后的 A549 细胞; (C) IgG-BP-DNA-MS2-Eu 标记的 A549 细胞; (D) 未标记的 MDA-MB-231 细胞; (E) MS2-DOTA-Eu 孵育后的 MDA-MB-231 细胞; (F) IgG-BP-DNA-MS2-Eu 标记的 MDA-MB-231 细胞

Fig.7 SC-ICP-MS results of (A) unlabeled A549 cells, (B) A549 cells after incubation with MS2-DOTA-Eu, (C) A549 cells labeled with IgG-BP-DNA-MS2-Eu, (D) unlabeled MDA-MB-231 cells, (E) MDA-MB-231 cells after incubation with MS2-DOTA-Eu, and (F) MDA-MB-231 cells labeled with IgG-BP-DNA-MS2-Eu

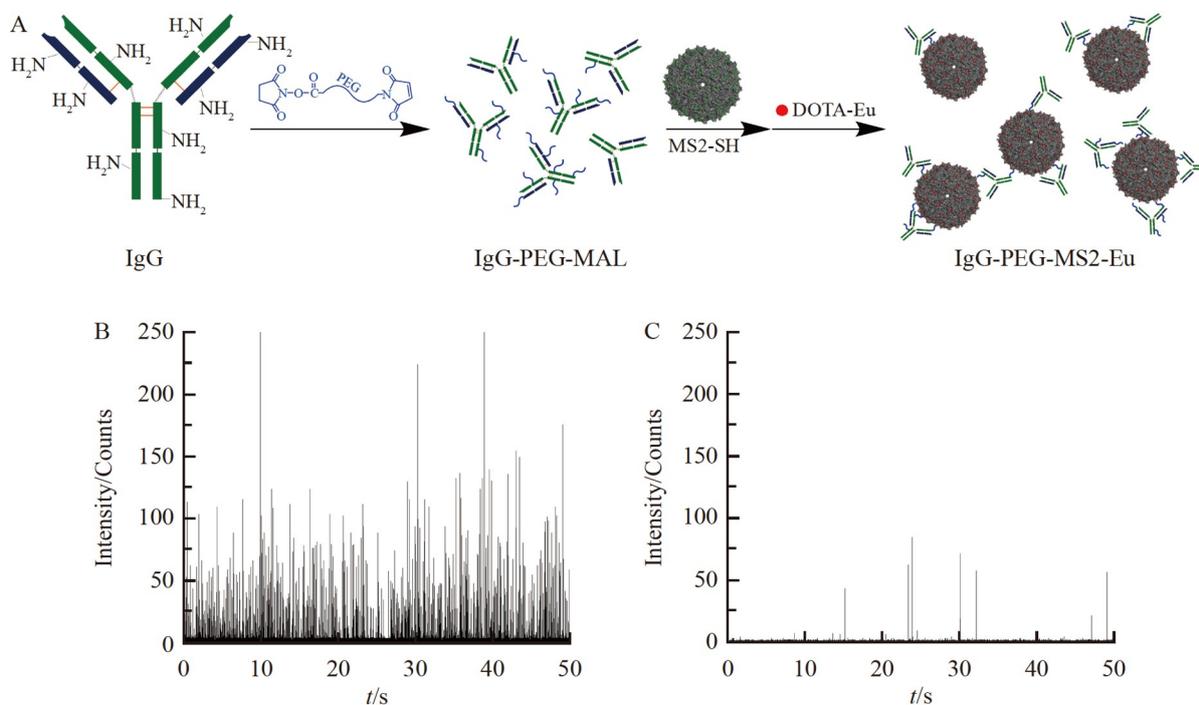


图8 IgG-PEG-MS2-Eu 的合成路线及表征: (A) IgG-PEG-MS2-Eu 的合成路线; (B) IgG-PEG-MS2-Eu 标记 A549 的 SC-ICP-MS 结果; (C) 随机反应得到的 IgG-PEG-MS2-Eu 标签标记 A549 的 SC-ICP-MS 结果

Fig.8 Synthesis and characterization of IgG-PEG-MS2-Eu: (A) Synthesis route of IgG-PEG-MS2-Eu; SC-ICP-MS results of (B) IgG-PEG-MS2-Eu labeled A549 cells and (C) IgG-BP-DNA-MS2-Eu labeled A549 cells

别细胞表面抗原,进而无法实现对细胞的标记和定量分析;也可能是在反应的过程中,多个抗体和多个巯基化 MS2 之间发生交联,阻碍了抗体与抗原的特异性识别与结合,最终导致标签无法正常标记细胞。

### 3 结论

建立了一种通过多肽介导的亲标记策略,实现了抗体的定点偶联与噬菌体 MS2 衣壳蛋白纳米颗粒元素标签的组装。此亲和标记策略避免了随机偶联造成的元素标签的异质性和无法正常标记的问题,制备得到的抗体纳米元素标签具有偶联位点精确、化学计量比可控、专一性好以及灵敏度高优势,已成功用于癌细胞表面生物标志物的高灵敏度、高特异性单细胞分析。此外,该策略无需对抗体进行基因工程改造,可用于天然抗体的偶联,具有很好的普适性;可用于快速精准地合成不同类型天然抗体元素标签,通过对不同细胞生物标志物的靶向标记检测,实现对低丰度蛋白的定性和定量分析,以及对疾病的诊断和不同类型癌症的诊断、分型和预后分析。然而,该策略仅在 IgG1 抗体上验证了其可行性,存在偶联步骤较复杂的问题。在此基础上,未来可研究蛋白纳米颗粒与不同类型的抗体偶联,简化偶联步骤,实现模块化组装,形成标准的纯化工艺,发展成为质谱流式细胞仪的配套试剂盒。此外,基于此偶联策略,可在 MS2 蛋白纳米颗粒上偶联/组装药物,构建抗体-药物偶联物(Antibody-drug conjugate, ADC),用于药物的靶向递送。

### References

- [1] SUN Gong-Wei, HONG Wei-Zhe, ZHANG Yu-Qing, HU Zhi-An, XING Zhi, ZHANG Si-Chun, ZHANG Xin-Rong. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2017, 45(12): 1786-1794.  
孙公伟, 洪伟哲, 张钰清, 胡志安, 邢志, 张四纯, 张新荣. *分析化学*, 2017, 45(12): 1786-1794.
- [2] SUN Qi-Xuan, WEI Xing, LIU Xun, YANG Ting, CHEN Ming-Li, WANG Jian-Hua. *Spectrosc. Spectral Anal.*, 2019, 39(5): 1340-1345.  
孙绮旋, 魏星, 刘珣, 杨婷, 陈明丽, 王建华. *光谱学与光谱分析*, 2019, 39(5): 1340-1345.
- [3] YANG Pu, FANG Hao, MENG Zi-Wei, ZHENG Ling-Na, WANG Bing, WANG Meng, LIU Guang-Cai, CHENG Wen-Bo, FENG Wei-Yue. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2023, 51(6): 1059-1065.  
杨璞, 方昊, 孟紫薇, 郑令娜, 汪冰, 王萌, 刘广才, 程文播, 丰伟悦. *分析化学*, 2023, 51(6): 1059-1065.
- [4] BECKER J S, JAKUBOWSKI N. *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38(7): 1969-1983.
- [5] DU H, YANG P, XIA L, CHEN J, HOU X. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2024, 172: 117552.
- [6] JIN X, YANG L, YAN X, WANG Q. *ACS Chem. Neurosci.*, 2021, 12(7): 1093-1099.
- [7] LIANG Y, LIU Q, ZHOU Y, CHEN S, YANG L, ZHU M, WANG Q. *Anal. Chem.*, 2019, 91(13): 8341-8349.
- [8] YAN X, LI Z, LIANG Y, YANG L, ZHANG B, WANG Q. *Chem. Commun.*, 2014, 50(50): 6578-6581.
- [9] YAN X, YANG L, WANG Q. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50(22): 5130-5133.
- [10] YAN X, YANG L, WANG Q. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, 405(17): 5663-5670.
- [11] ZHOU Y, CHEN Z, ZENG J, ZHANG J, YU D, ZHANG B, YAN X, YANG L, WANG Q. *Anal. Chem.*, 2020, 92(7): 5286-5293.
- [12] DOBLE P A, DE VEGA R G, BISHOP D P, HARE D J, CLASES D. *Chem. Rev.*, 2021, 121(19): 11769-11822.
- [13] VAN ACKER T, THEINER S, BOLEA-FERNANDEZ E, VANHAECKE F, KOELLENSPERGER G. *Nat. Rev. Methods Primers*, 2023, 3(1): 52.
- [14] GONG Xiao-Yun, XIONG Xing-Chuang, ZHANG Si-Chun, FANG Xiang, ZHANG Xin-Rong. *Sci. China: Chem.*, 2016, 46(2): 133-152.  
龚晓云, 熊行创, 张四纯, 方向, 张新荣. *中国科学: 化学*, 2016, 46(2): 133-152.
- [15] SHI Jun-Wen, ZHANG Xin-Ying, LI Liang, FENG Wei-Yue, WANG Hai-Fang, WANG Meng. *Prog. Biochem. Biophys.*, 2016, 43(8): 739-746.  
史俊稳, 张欣颖, 李亮, 丰伟悦, 王海芳, 王萌. *生物化学与生物物理进展*, 2016, 43(8): 739-746.
- [16] YOU Mu-Ying-Nan, LIU Xin-Yu, SHI Xian-Zhe, XU Guo-Wang. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.*, 2024, 45(3): 316-331.  
尤穆英楠, 刘心昱, 石先哲, 许国旺. *质谱学报*, 2024, 45(3): 316-331.
- [17] KOO W T, MILLSTONE J E, WEISS P S, KIM I D. *ACS Nano*, 2020, 14(6): 6407-6413.
- [18] PICHAANDI J, ZHAO G, BOUZEKRI A, LU E, ORNATSKY O, BARANOV V, NITZ M, WINNIK M A. *Chem. Sci.*, 2019, 10(10): 2965-2974.

- [19] ALEJANDRA W P, IRENE J P M, ANTONIO G S F, PATRICIA R G R, ELIZABETH T A, PABLO A A J, REBECA G V. *Int. Immunopharmacol.* , 2023, 120: 110376.
- [20] CHIAVENNA S M, JAWORSKI J P, VENDRELL A. *J. Biomed. Sci.* , 2017, 24(1): 15.
- [21] STONE C A, SPILLER B W, SMITH S A. *J. Allergy Clin. Immunol.* , 2024, 153(3): 539-548.
- [22] ARNETT L P, RANA R, CHUNG W W Y, LI X, ABTAHI M, MAJONIS D, BASSAN J, NITZ M, WINNIK M A. *Chem. Rev.* , 2023, 123(3): 1166-1205.
- [23] MAJONIS D, HERRERA I, ORNATSKY O, SCHULZE M, LOU X, SOLEIMANI M, NITZ M, WINNIK M A. *Anal. Chem.* , 2010, 82(21): 8961-8969.
- [24] ZHANG C, WU F, ZHANG Y, WANG X, ZHANG X. *J. Anal. At. Spectrom.* , 2001, 16(12): 1393-1396.
- [25] BENDALL S C, SIMONDS E F, QIU P, AMIR E D, KRUTZIK P O, FINCK R, BRUGGNER R V, MELAMED R, TREJO A, ORNATSKY O I, BALDERAS R S, PLEVITIS S K, SACHS K, PE'ER D, TANNER S D, NOLAN G P. *Science*, 2011, 332(6030): 687-696.
- [26] LIU R, ZHANG S, WEI C, XING Z, ZHANG S, ZHANG X. *Acc. Chem. Res.* , 2016, 49(5): 775-783.
- [27] CLASES D, DE VEGA R G. *Anal. Bioanal. Chem.* , 2022, 414(25): 7363-7386.
- [28] YANG B, ZHANG Y, CHEN B, HE M, YIN X, WANG H, LI X, HU B. *Biosens. Bioelectron.* , 2017, 96: 77-83.
- [29] CHIN J W. *Nature*, 2017, 550(7674): 53-60.
- [30] SCHNEIDER H, DEWEID L, AVRUTINA O, KOLMAR H. *Anal. Biochem.* , 2020, 595: 113615.
- [31] TSUCHIKAMA K, AN Z. *Protein Cell*, 2018, 9(1): 33-46.
- [32] WALSH S J, BARGH J D, DANNHEIM F M, HANBY A R, SEKI H, COUNSELL A J, OU X, FOWLER E, ASHMAN N, TAKADA Y, ISIDRO-LLOBET A, PARKER J S, CARROLL J S, SPRING D R. *Chem. Soc. Rev.* , 2021, 50(2): 1305-1353.
- [33] DELANO W L, ULTSCH M H, DE, VOS A M, WELLS J A. *Science*, 2000, 287(5456): 1279-1283.
- [34] KISHIMOTO S, NAKASHIMADA Y, YOKOTA R, HATANAKA T, ADACHI M, ITO Y. *Bioconjugate Chem.* , 2019, 30(3): 698-702.
- [35] LIU Z, LIANG Y, ZHOU Y, GE F, YAN X, YANG L, WANG Q. *iScience*, 2021, 24(5): 102397.
- [36] YUAN R, GE F, LIANG Y, ZHOU Y, YANG L, WANG Q. *Anal. Chem.* , 2019, 91(8): 4948-4952.
- [37] YAN X, XU M, YANG L, WANG Q. *Anal. Chem.* , 2010, 82(4): 1261-1269.
- [38] YAN X, LUO Y, ZHANG Z, LI Z, LUO Q, YANG L, ZHANG B, CHEN H, BAI P, WANG Q. *Angew. Chem. Int. Ed.* , 2012, 51(14): 3358-3363.

## Synthesis and Single-cell Analysis Application of Antibody-Element-Tag Based on Peptide Affinity-mediated Site-specific Labeling Strategy

WANG Lei<sup>#1</sup>, YI Li<sup>#1</sup>, LI Hua-Min<sup>1</sup>, CHEN Shi<sup>1</sup>, YANG Li-Min<sup>1</sup>,  
YAN Xiao-Wen<sup>\*1,2</sup>, WANG Qiu-Quan<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>(MOE Key Laboratory of Spectrochemical Analysis & Instrumentation, Department of Chemistry,  
College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

<sup>2</sup>(Innovation Laboratory for Sciences and Technologies of Energy Materials of Fujian Province (IKKEM),  
Xiamen 361005, China)

**Abstract** Recently, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has shown great potential in the quantitative analysis of biomolecules due to its high sensitivity, high accuracy, anti-interference ability and multi-element detection capability. Elemental tags enable specific labeling of target biomolecules with element-reporter groups, playing a critical role in the performance of bioanalysis using ICP-MS. Antibodies are highly specific to antigens on cell surfaces and are one of the most commonly used targeted delivery vehicles. Traditional random chemical coupling methods are difficult to control the coupling sites and loading numbers of element reporters, which lead to heterogeneity of antibody conjugates, affecting the specific recognition and binding ability of antibodies and antigens, and thus reducing the targeting ability and quantitative accuracy. To solve these issues, site-specific coupling of antibodies with element reporter was studied in this work. By using peptide-mediated affinity labeling technology, a short chain DNA was specifically labeled to immunoglobulin G (IgG) antibody K248, and then DNA base complementary pairing was used to realize accurate assembly of monoclonal antibodies and Eu-modified phage MS2 capsid, resulting in the preparation of highly sensitive and selective element tags. This method overcame the heterogeneity problem of element tags caused by random coupling, and ensured the targeting specificity, affinity and signal amplification ability of element tags. The element tag prepared here showed a specificity to bind/label with epidermal growth factor receptor (EGFR) biomarker on the surface of cancer cells, realizing single cancer cell analysis using ICP-MS.

**Keywords** Peptide mediated affinity labeling; Site-selective conjugation; Antibodies; Element tags; Single cell inductively coupled plasma mass spectrometry.

(Received 2024-06-07; accepted 2024-07-24)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFF0710200), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22074127, 22193053), the Science and Technology Projects of Innovation Laboratory for Sciences and Technologies of Energy Materials of Fujian Province (IKKEM) (No. H RTP-[2022]-13), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 20720200073).