

# 抗人 CD3 单抗轻、重链可变区基因的克隆及序列分析

刘喜富 萧 飒 顾 征 王 勇 陈 艾 林 晴  
张卫国 蒋 欣 黄华梁

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

沈倍奋

(军事医学科学院基础所 北京 100850)

**摘 要** 根据抗体基因可变区两端保守序列 FR1 和 FR4, 设计并化学合成轻重链 PCR 扩增引物。从体外培养细胞 UCHT1 中提取总 RNA, 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板经 PCR 扩增轻、重链可变区基因片段。将扩增片段克隆至 pUC19 质粒, 筛选阳性克隆并测序, 序列分析结果为重链 366bp, 编码 122 个氨基酸, 轻链 327bp, 编码 109 个氨基酸。

**关键词** UCHT1, 抗体可变区基因, PCR, 序列分析

CD3 分子是广泛分布于人成熟 T 细胞表面的膜抗原, 它与 T 细胞表面膜受体 TCR 形成复合体, 在抗原识别和细胞内信息传递中起着重要作用。不同类型的抗 CD3 单抗可有免疫增强<sup>[1]</sup>, 免疫抑制<sup>[2]</sup>等作用; 抗 CD3 单抗在预防和治疗器官移植免疫排斥反应中得到广泛应用; 抗 CD3 单抗与一定的肿瘤抗原相偶联成双特异抗体, 还可用于肿瘤的导向治疗<sup>[3]</sup>。然而, 由于鼠单抗在人体应用时普遍存在的免疫原性, 治疗效果受到很大影响。基因工程抗体技术的兴起<sup>[4]</sup>, 人们可以通过改造抗体使其更加适用于人体的治疗, 国内曾有实验室从事此类研究<sup>[5,6]</sup>。本文应用 PCR 技术, 以 cDNA 为模板, 从分泌抗人 CD3 单抗杂交瘤细胞 UCHT1 扩增出可变区基因  $V_H$  和  $V_K$ , 为构建人鼠嵌合抗体, 改变抗体和单链抗体奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 分泌抗人 CD3 杂交瘤细胞 UCHT1 引自英国。UCHT1 分泌的抗体属 IgG1 亚类, 杂交瘤构建中亲代的骨髓瘤细胞为 NS1。

1.1.2 酶和试剂: PCR 用 Taq DNA 聚合酶, 由遗传所提供; 克隆用限制酶, 连接酶购自 Boehringer Mannheim (B.M) 公司; RNA 提取试剂盒购自 GIBCO/BRL 公司; 反转录试剂盒购自 B.M 公司; 测序用同位素 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 购自 NEN 公司, 测序试剂盒购自 Pharmacia 公司。

### 1.2 方 法

本文于 1995 年 5 月 10 日收到。

1.2.1 PCR 引物设计, 参照文献[7]设计对应于 FR1 和 FR4 的两对扩增引物如下:

VKB114 5'-GGGTCTAGAGACATCCAGATGACCCAGACYACCTC-3'  
Xba I

VKFOR46 5'-CCGAATTCAGCGCGCTTCAGTTCCAGTTGG-3'  
EcoR I

VHFOR43 5'-GGACTAGTTGAGGAGACRGTGACTGAGGTTC-3'  
Spe I

VHB14 5'-GGCTCGAGGAGGTGAAGCTGGTGGARTCYGG-3'  
Xho I

1.2.2 细胞总 RNA 提取: 参照试剂盒说明书, 并进行紫外定量和纯度测定。

1.2.3 总 RNA 反转录 cDNA: 参照说明书。反应总体积 50μl, 所用总 RNA 约 50μg。

1.2.4 PCR 反应: 取上述 PCR 产物 5μl 为模板, 加适量的 dNTP, 引物等。总体积 100μl, 100℃ 预变性 10min, 加入 0.5μl Taq 酶。开始循环如下:

轻链扩增: 72℃ 延伸 90s, 55℃ 退火 60s, 94℃ 变性 60s; 循环 30 次, 后延伸 5~10min。

重链扩增: 72℃ 延伸 90s, 55℃ 退火 60s, 94℃ 变性 60s; 循环 30 次, 后延伸 5~10min,

取 10μl 扩增产物作电泳检测。

1.2.5 基因克隆和测序: 将上述 PCR 产物回收并在 16℃ 过夜连接到经 Hinc II 酶切的 pUC19 载体质粒中, 转化筛选阳性克隆, 提取质粒酶切鉴定并测序。采用双链 DNA 模板, 双脱氧法测序, 具体参见 Pharmacia T7 测序试剂盒说明书。用 DNASIS 分析所测序列。

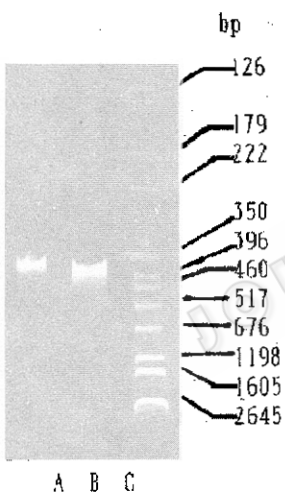


图 1 抗人 CD3 单抗轻、重链可变区基因的 PCR 结果  
Fig. 1 Amplification of immunoglobulin heavy and light chain variable genes by PCR. The PCR products were examined on 8% PAGE  
A: V<sub>κ</sub> gene, B: V<sub>h</sub> gene, C: PGEM DNA Marker (promega company)

## 2 结果

### 2.1 抗人 CD3 单抗 V<sub>H</sub>, V<sub>K</sub> 基因扩增

如图 1 所示: 用所设计引物均可扩增出 V<sub>H</sub> 和 V<sub>K</sub> 特异条带。包括引物外侧酶切位点序列。V<sub>K</sub> 长约 350bp, V<sub>H</sub> 长约 380bp。

### 2.2 V<sub>H</sub> 和 V<sub>K</sub> 基因克隆和筛选

将 V<sub>H</sub> 和 V<sub>K</sub> 基因插入 pUC19 质粒, 均筛选得数个阳性克隆, 经酶切鉴定插入片段大小与预期一致, 进一步用 PCR 验证也得到相应大小的条带。

### 2.3 DNA 序列测定及分析

重链共测序 4 个克隆, 轻链共测序 8 个克隆。图 2 和图 3 为所测 V<sub>H</sub> 和 V<sub>K</sub> 基因序列及其推导的氨基酸序列, V<sub>H</sub> 基因长 366bp, 编码 133 个氨基酸, V<sub>K</sub> 基因 327bp, 编码 109 个氨基酸在轻链 23 位和 87 位以及重链 22 位和 96 位分别是 cys。它们形成链内二硫链, 在抗体可变区立体结构形成中起重要作用。图中列出相应的 FR 区和 CDR 区。

进一步分析表明,  $V_K$  属 subgroup V 亚型。由 V 片段和 MUS JK2 重排而成。与一个种系成员 NQ589.4 同源达 95.2%, 其中主要差异来自 FR(JK 片段)。  $V_H$  属 subgroup II 亚类由 V 片段, MUS JH1 和 D 区重排而成, 与一种系成员 NQ11.1.18 同源高达 80% 以上, 其中 D 片段差异极大, V 片段同源高达 95%。

```

E V K L V E S G P E L
GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGA GGT GAG CTG

V K P G A S M K I S C
GTG AAG CCT GGA GCT TCA ATG AAG ATA TCC TGC

K A S G Y S F T G Y T
AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC ACT GGC TAC ACC
                                CDR1
M N W V K H T H G K N
ATG AAC TGG GTG AAG CAC ACT CAT GGA AAG AAC

L E W M G L I N P Y K
CTT GAG TGG ATG GGA CTT ATT AAT CCT TAC AAA
                                CDR2
G V S T Y N Q K F K D
GGT GTT AGT ACC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GAC

K A T L T V D K S S S
AAG GCC ACA TTA ACT GTA GAC AAG TCA TCC AGC

T A Y M E L L S L T S
ACA GCC TAC ATG GAA CTC CTC AGT CTG ACA TCT

E D S A V Y Y C A R S
GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA TCC

G Y Y G D S D W Y F D
GGG TAC TAC GGT GAT AGT GAC TGG TAC TTC GAT
                                CDR3
V W G A G T S V T V S S
GTC TGG GGC GCA GGA ACC TCA GTC ACT GTC TCC TCA

```

图 2 抗人 CD3 单抗重链可变区基因序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of  $V_H$  gene of UCHT1, CDRs are underlined.

### 3 讨 论

抗体基因扩增引物的设计有多种方法, 如按照前导肽序列及 J 序列引物的设计, 基于基因家族性保守序列设计家族性引物等。我们参照文献[7], 以 FR1 和 FR4 保守序列为基础设计的一套引物, 实验表明在抗体库基因扩增以及从特定杂交瘤中扩增抗体基因均取得好的效果。

```

D I Q M T Q T T S S L
GAC ATC CAG ATG ACC CAG ACC ACC TCC TCC CTG

S A S L G D R V T I S
TCT GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT

C R A S Q D I R N Y L
TGC AGG GCA AGT CAG GAC ATT AGA AAT TAT TTA
                                CDR1
N W Y Q Q K P D G T V
AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT

K L L I Y Y T S R L H
AAA CTC CTG ATC TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC
                                CDR2
S G V P S K F S G S G
TCA GGA GTC CCA TCA AAG TTC AGT GGC AGT GGG

S G T D Y S L T I S N
TCT GGA ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATT AGC AAC

L E Q E D I A T Y F C
CTG GAG CAA GAG GAT ATT GCC ACT TAC TTT TGC

Q Q G N T L P W T F A
CAA CAG GGT AAT ACG CTT CCG TGG ACG TTC GCT
                                CDR3
G G T K L E L K R A
GGA GGC ACC AAA CTG GAA CTG AAG CGC GCT

```

图3 抗人 CD3 单抗轻链可变区基因序列及推导的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of  $V_K$  gene of UCHT1, CDRs are undelined

根据克隆选择学说,一种杂交瘤只分泌一种单抗。从分泌单抗的杂交瘤细胞中扩增的抗体基因应该只有一种且为功能性的。本文中以 cDNA 为模板,经 PCR 扩增出特异性的  $V_H$  基因片段,所测 4 个克隆均正确,在  $V_K$  基因扩增中,虽然也扩增出特异条带,但序列分析发现个别克隆在 282 位碱基(94 位氨基酸)有缺失,且在氨基酸序列推导中发现,在 23 位极其保守的 cys 突变为 Tyr(序列另文讨论)。进一步分析发现,这是一相应于骨髓瘤 NS1 细胞系  $V_K$  基因的假基因。文献报道<sup>[8]</sup>,这种现象在  $V_K$  基因扩增中经常遇到。

PCR 技术在抗体基因克隆中已广泛使用,其优点是快速简便。但由于扩增条件的差异会出现不同程度的碱基突变。我们所扩增的  $V_K$  基因的一个克隆在(CDR1)第 31 位由 Asn-Ser 这种突变对抗体特异性的影响尚难推测,目前正在进行单链抗体的表达,以进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Van wauwe J P, Jan R De Mey, Jan G Goossens, *J Immunol*, 1980, **124**:2708.  
[2] Laudegren U, Ramstedt U, Axberg I *et al.*, *J Exp Med*, 1982, **155**:1579.  
[3] Nishimura T, Nakamura Y, Tsukamoto H, *et al.* *Int J Cancer*, 1992, **50**:800.  
[4] Sherie L, Jacqueline Johnson M, Leonard A H *et al.* *PNAS*, 1984, **81**:6851.  
[5] 刘建国, 李以莞, 李治华等. *中国医学科学院学报*, 1992, **14**(2):131.  
[6] 杨安钢, 许 辉, 吉昌华等. *生物化学杂志*, 1994, **10**(2):213.  
[7] Elvin A K, Tai T W, Harold M P *et al.* *Sequence of Protein of Immunological Interest*, 1991, 5th Ed.  
[8] Willian L C, Eilleen M, Shoshana L *et al.* *Mol Immunol*, 1988, **25**:991.

### Cloning and Sequence Analyses of the $V_H$ and $V_K$ Genes of an Anti-human CD3 Monoclonal Antibody

Liu Xifu Xiao Sa Gu Zheng Wang Yong Chen Ai Lin Qing Zhang Weiguo

Jiang Xin Huang Hualiang

(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*)

Shen Beifen

(*The Basic Institute of Academy of Military Medical Science, Beijing 100850*)

**Abstract** The two sets of PCR primers were designed based on the conserved sequences FR1 and FR4 of antibody variable genes. Hybridoma cell line UCHT1 were cultured, and the total RNA were extracted. By reverse transcription, the cDNA were synthesized and used as templates for PCR, and the desired  $V_H$  and  $V_K$  gene fragments were amplified. The PCR products were cloned into pUC19, and the recombinants were screened and sequenced. The sequence analyses results showed that  $V_H$  is in length of 366 bases for 122 amino acids and  $V_K$  is 327 bases for 109 amino acids.

**Key words** UCHT1 cell line, variable genes of McAb, PCR, sequence analyses