

鼠抗CD71单抗轻链及重链可变区基因的克隆和序列分析

CD71分子又称转铁蛋白受体,是一种表达在包括肿瘤细胞在内的很多类型细胞的表面,与细胞的成熟、增殖、分化密切相关的分子,而成熟的淋巴细胞、红细胞、血小板均不表达CD71[1][2]。国内外大量的研究[3][4][5]表明,根据CD71分子的表达特点,可以在抗肿瘤治疗中将CD71作为某些异常细胞表面的一种特异标志,CD71作为靶目标引导外源药物或毒素进入增殖细胞,导致细胞毒效应。目前采用的CD71抗体主要为鼠源单抗,虽然有较大的应用价值,但在临床诊断与治疗上仍然存在一些不利因素,如应用于人体会诱导人抗鼠抗体反应,相对分子质量较大难以穿透实体瘤等[1]。国外已研制出抗CD71的单链抗体(ScFV)[4],ScFV作为抗体H链可变区和L链可变区由一短肽连接而成的抗体小分子片段,是抗体与抗原结合的最小单位。ScFV分子小,免疫原性低,渗透能力强,半衰期短,在临床影像学诊断、肿瘤治疗等方面有良好的应用前景。本研究应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术,直接从一株分泌抗CD71单抗的杂交瘤细胞 WuT9中扩增出重、轻链可变区,并进行序列分析,为下一步构建单链抗体奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Trizol试剂及cDNA第1链合成试剂盒购自Gibco公司, Taq酶购自华美公司,限制性内切酶(EcoR I、Hind III、EcoRV、Nco I、BamH I)购自Promega公司, pMD18-T载体系统购自TaKaRa公司。其他产品均为国产分析纯。

1.1.2 细胞株和菌株 分泌抗人CD71单克隆抗体的杂交瘤细胞株WuT9由武汉生物制品研究所免疫学研究室研制并保存[6],单克隆抗体为IgG1 κ 型; E. coli TG1购自Promega公司。

1.1.3 寡聚核苷酸引物设计 参照文献[7, 8]及BLAST抗体数据库的统计资料,结合所用载体系统上的酶切特点,设计并合成4条寡聚核苷酸引物(表1)。在这4条引物中分别引入限制性内切酶EcoRV、BamH I、Nco I、Hind III的识别顺序。所有引物均由TaKaRa公司合成(其中R=A/G, M=A/C, S=C/G, W= A/T, Y=C/T, K=G/T)。

表1 扩增免疫球蛋白轻、重链可变区基因的PCR引物
Tab.1 PCR primers for amplifying variable genes of immunoglobulin light and heavy chains

Primer	Nucleotide sequence
V κ FR1	5'CAGATGCCATGGCGATTGKTKTSACYCARTCTCCA 3'
V κ FR4	5'GATGACAAGCTTCGTTGGATCTCCAGCTTG 3'
VH FR1	5'GACGGTGATATCMARCTGCAGSAGTCWGG 3'
VH FR4	5'GATAAGGGATCCTGAGGAGACGGTGACCG 3'

1.2 方法

1.2.1 RNA的提取和分离 应用美国Gibco BRL公司的Trizol试剂,按照说明书从 3.2×10^6 个WuT9杂交瘤细胞中提取总RNA。

1.2.2 cDNA第1链的合成 按照Gibco BRL公司的cDNA第1链合成试剂盒说明书进行。

1.2.3 RT-PCR扩增轻链及重链可变区基因 以cDNA为模板,在50 μ l反应体系中,分别加入第1链 cDNA 1 μ l、10 \times PCR缓冲液 5 μ l、上游及下游引物各1 μ l(25 pmol)、dNTP 1 μ l、25 mmol/L MgCl₂ 3 μ l、DEPC 水37 μ l, 95 $^{\circ}$ C预变性10 min,加Taq酶1 μ l,进入温度循环,进行PCR扩增。反应条件为94 $^{\circ}$ C变性1 min, 58 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1.5 min,共30个循环,然后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取5 μ l PCR产物进行1.2%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 轻链及重链可变区基因的克隆和序列测定 按照克隆载体pMD18-T说明书,与pMD18-T载体连接,转化大肠杆菌TG1,用蓝白筛选并酶切鉴定阳性克隆。

DNA序列测定用PERKIN ELMER公司的ABI PRISM BigDye测序系统进行,采用PCR-双脱氧末端终止法序列测定。测定结果进行计算机网络基因库比较分析。

2.1 RT-PCR反应产物的鉴定

用RT-PCR扩增抗CD71单抗的重链及轻链可变区基因, 1.2%琼脂糖凝胶电泳观察到清晰的条带。通过与DNA标准 M_r 比较, 可以初步认定 V_H 和 V_L 分别为350、330 bp左右, 符合重链可变区及轻链可变区基因的长度(图1)。

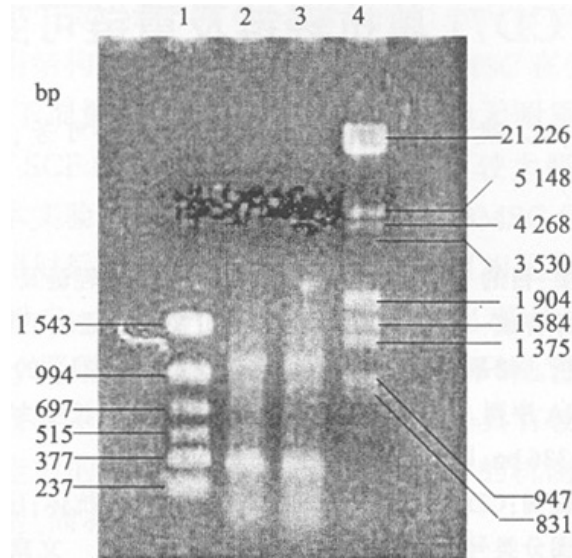


图1 抗CD71单抗 V_H 、 V_L 基因RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 RT-PCR product of variable genes of immunoglobulin light and heavy chains against CD71 molecule on agarose gel electrophoresis

Lane 1,4: Standard molecular weight DNA; Lane 2: V_H ; Lane 3: V_L

2.2 抗CD71单抗 V_H 和 V_L 基因的阳性克隆鉴定

转化菌通过蓝/白菌落初步筛选, 各得到上百个白色菌落, 挑取单个菌落扩增, 提取质粒, 用引物中特异性酶切位点进行双酶切(切出340 bp左右片段), 进一步鉴定特异性重组片段(图2), 筛选出阳性克隆。

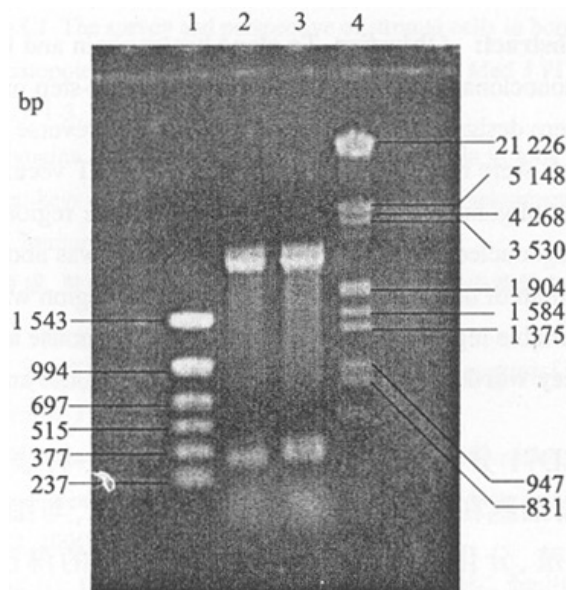


图2 抗CD71单抗 V_L 、 V_H 基因克隆产物限制性内切酶分析

Fig.2 Analysis of cloning products of variable genes of immunoglobulin light and heavy chains against CD71 molecule by restriction endonuclease

Lane 1, 4: Standard molecular weight DNA; Lane 2: V_H ; Lane 3: V_L

2.3 抗体可变区基因序列的测定

经与BLAST基因数据库比较分析, 确定均为免疫球蛋白的重、轻链基因。并同时可读出CD71单抗的FRS和CDRS序列。与Kabat数据库[7]中已发表的鼠抗体可变区序列进行比较确定其 V_H 基因属于鼠重链 V_H 第I A亚类, 全长348 bp, 可编码116个氨基酸; 其 V_L 基因属于鼠 κ 轻链第II亚类, 全长336 bp, 可编码112个氨基酸(图3A、B)。

EcoR V Q L Q E S G P E L V K P G T S V K M S
 GACGGT**GATATC** CAG CTG CAG GAG TCA GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG ACT TCA GTG AAG ATG TCC

 C K A S G Y T F T N Y Y I H W V K Q R P G Q G L
 TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACA AAC TAC TAT ATA CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAG GGA CTT
 CDR1
 E W I G W V Y P G N G S T N Y I E N F K G K T T
 GAG TGG ATT GGA TGG GTT TAT CCT GGA GAT GGT AGT ACT AAC TAC ATT GAG AAC TTC AAG GGC AAG ACC ACA
 CDR2
 L T A N K S S S T A Y M L L S S L T S E N S A I
 CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG TTG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG ATC

 Y F C A S N L S G P W F T Y W G Q G T P V T V S
 TAT TTC TGT GCA AGT GAC CTT TCG GGC CCC TGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CCG GTC ACC GTC TCC
 CDR3

S *Bam*H I
 TCA **GGATCCC**TTTCA

 A

*Nco*I I V L T Q S P S S L T V T A G E K V T M
 CAGATGCC**ATGGCG** ATT GTG CTG ACT CAG TCT CCA TCC TCC CTG ACT GTG ACA GCA GGA GAG AAG GTC ACT ATG

 S C K S S Q S L L N Y G N Q K N Y L T W N Q Q I
 AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGT CTG TTA AAC AGT GGA AAT CAA AAG AAC TAC CTG ACC TGG AAC CAG CAG ATA
 CDR1
 P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P N K F T
 CCA GGG CAG CCT CCT AAA CTG TTG ATC TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA
 CDR2
 G S G S G T N F T L T I S S V Q A E N L A V Y Y
 GGC AGT GGA TCT GGA ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC

 C Q N N Y I Y P L T F G A G T K L E I Q *Hind* III
 TGT CAG AAT GAT TAT ATT TAT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG ATC CAA **CGAAGCTT**GTGCATC
 CDR3

 B

图3 抗CD71 V_H (A)、 V_L (B)基因核苷酸及相应氨基酸序列
 Fig.3 V_H (A), V_L (B) gene nucleotides and relevant amino acids sequences for the CD71 mAb

3 讨论

CD71分子与肿瘤和某些血液系统疾病如肝细胞癌、急性淋巴细胞白血病、免疫母细胞性淋巴瘤等的发生、发展有着密切的联系，目前在抗体的导向治疗及放射免疫显像中被认为是一种比较理想的结构型肿瘤相关抗原，国内外已有很多应用抗CD71单抗，对肿瘤进行定位显像诊断和治疗取得成功的报道[3][4][5]。

本实验中我们从一株分泌抗CD71的单克隆抗体杂交瘤细胞(WuT9)中提取总RNA，应用RT-PCR扩增出抗体的 V_L 和 V_H 基因，并将其克隆进行了序列分析。在杂交瘤细胞总RNA提取的过程中，我们选用mAb产量高、特异性好、处于对数生长期的细胞，尽量避免RNA酶的污染，应用Trizol一步法进行操作，简便、省时，得到了高纯度、高产量的总RNA。引物的设计中，我们根据FR1和FR4框架区的保守序列，尽量保持其完整性，采用了通用引物。此次克隆为下一步进行抗CD71的单链抗体、免疫毒素的构建打下了良好基础。

参考文献：

- [1] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京：科学出版社，2000. 43-4, 97-8.
- [2] Taetle R. The role of transferrin receptor in hemopoietic cell growth[J]. Exp Hematol, 1990, 18: 360-63.
- [3] Moos T. Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems[J]. Cell Mol Neurobiol, 2000, 20(1): 77-95.
- [4] Li JY. Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression and in vivo application of an

anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein[J]. Protein Eng, 1999, 12(9): 787-96.

[5] Woodward JE, Bayer AL, Chavin KD, et al. Anti-transferrin receptor monoclonal antibody: a novel immunosuppressant[J]. Transplantation, 1998, 65(1): 6-9.

[6] 史良如, 陈善华, 孙可芳, 等. 武汉(Wu)系列抗人T细胞及其亚群的单克隆抗体[J]. 生物制品学杂志, 1988, 1(1): 27-32.

[7] Kabat EA, Wu TT, Perry H, et al. Sequences of proteins of immunological interest [M]. 5th Ed, Washington: Public Health Service National Institutes of health, 1991. 1250, 1350, 2142.

Orandi R, Gussow DH, Jones PT, et al. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 3833-7.

参考文献:

[1] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 43-4, 97-8.

[2] Taetle R. The role of transferrin receptor in hemopoietic cell growth[J]. Exp Hematol, 1990, 18: 360-63.

[3] Moos T. Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems[J]. Cell Mol Neurobiol, 2000, 20(1): 77-95.

[4] Li JY. Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression and in vivo application of an anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein[J]. Protein Eng, 1999, 12(9): 787-96.

[5] Woodward JE, Bayer AL, Chavin KD, et al. Anti-transferrin receptor monoclonal antibody: a novel immunosuppressant[J]. Transplantation, 1998, 65(1): 6-9.

[6] 史良如, 陈善华, 孙可芳, 等. 武汉(Wu)系列抗人T细胞及其亚群的单克隆抗体[J]. 生物制品学杂志, 1988, 1(1): 27-32.

[7] Kabat EA, Wu TT, Perry H, et al. Sequences of proteins of immunological interest [M]. 5th Ed, Washington: Public Health Service National Institutes of health, 1991. 1250, 1350, 2142.

Orandi R, Gussow DH, Jones PT, et al. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 3833-7.

[回结果列表](#)