

## 研究简报

## 巨型引物 PCR 法对抗 CD3 改型单链抗体的定点诱变\*

刘晶<sup>1)</sup> 尹长城<sup>2)</sup> 黄华梁<sup>2)</sup>\*\* 姜述德<sup>1)</sup><sup>1)</sup>中国协和医科大学医学微生物学研究所, 昆明 650118; <sup>2)</sup>中国科学院遗传学研究所, 北京 100101)

**摘要** 亲和力和是影响改型单链抗体应用于临床的重要因素之一。利用巨型引物 PCR 定点诱变方法, 设计并化学合成出两组含多个突变位点的简并引物, 在第一轮 PCR 中使用简并引物分别扩增出含突变碱基的两条特异性的 DNA 片段, 即巨型引物, 将其经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后, 作为 3' 和 5' 的两端引物应用于第二轮 PCR 反应中, 通过改变标准 PCR 反应条件, 调整引物与模板的浓度, 扩增出特异性较强的目的 DNA 条带。PCR 产物经回收后, 进行 DNA 测序。测序结果表明利用该方法扩增得到特异的抗 CD3 改型单链抗体的突变体库。

**关键词** 改型单链抗体, 定点诱变, PCR, 巨型引物, 慢速退火

**学科分类号** Q75

基因工程抗体于 20 世纪 80 年代兴起, 到目前为止已发展有嵌合抗体 (chimeric antibody) 和改型抗体 (reshaped antibody) 两种。改型抗体系将鼠源抗体的 CDR 区移植入人源抗体的 FR 区 (框架区) 中, 在保留鼠源抗体的抗原结合特异性的前提下, 使其人源化以降低在临床应用中由鼠源抗体引发的 HAMA 反应 (human anti-mouse antibody)。然而往往由于人源抗体 FR 区与鼠源抗体 CDR 区同源程度的差异, 带来改型抗体亲和力的降低, 需进一步改造。其中一种解决办法是对构建好的改型抗体进行特定碱基的定点诱变 (site-directed mutagenesis)<sup>[1,2]</sup>。

基于 PCR 反应的“巨型引物 PCR 定点诱变法” (megaprimer PCR based site-directed mutagenesis method) 由 Kammann 等<sup>[3]</sup>于 1989 年首创, 即以其快速, 低成本, 易操作的优点受到瞩目, 但以往报道均仅使用单侧巨型引物在靶序列 DNA 的一端引入突变, 且常因巨型引物与模板之间的退火困难而妨碍目的产物的获得<sup>[4,5]</sup>。本文介绍了一种巨型引物 PCR 定点诱变方法, 利用两条巨型引物, 通过改变 PCR 反应条件来提高退火效率, 成功地扩增出抗 CD3 改型单链抗体的突变体库。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 抗 CD3 改型单链抗体: 由刘喜富等<sup>[6]</sup>构建。

1.1.2 试剂: 限制性内切酶 *Xho* I (Progema 公司); DNA 聚合酶 *AmpliTaq* Gold (Perkin-Elmer 公司); DNA 聚合酶 *Pfu* (Progema 公司); dNTPs (TaRaKa 公司); DNA 胶回收试剂盒 (上海华舜公司)。

### 1.2 仪器

PCR 扩增仪 PTC-100<sup>TM</sup> thermocycler (MJ Research Inc.); 紫外分光光度计 DU series 500 (Beckman 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 模板的制备: *E. coli* 质粒的提取, 酶切, 抽提, 沉淀等按常规方法进行<sup>[7]</sup>。紫外分光光度计 *A*<sub>260</sub> 测定含量。

1.3.2 抗 CD3 改型单链抗体的定点诱变: 按照图 1 所示的技术路线进行。

a. 引物: 引物的设计参照文献 [8, 9] 报道加以改动 (表 1), 所有引物由上海生工公司合成。

b. 第一轮 PCR 反应 (巨型引物的扩增): PCR 反应总体积为 50  $\mu$ l, 其中: dNTPs 150  $\mu$ mol/L, 模板 1 ng, 引物各 20 pmol, DNA 聚合酶 *AmpliTaq* Gold 2 U, 以矿物油覆盖。起始变性 95  $^{\circ}$ C 10 min 后, 按照: 95  $^{\circ}$ C 1 min, 退火 (分别为

\* 国家“863”资助项目 (102-09-04-01)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 010-64857285, E-mail: hlhuang@inw.com.cn

收稿日期: 2000-11-16, 接受日期: 2001-02-09

60 °C, 62 °C) 45 s, 72 °C 45 s, 扩增 25 个循环. PCR 产物分别经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 按 Kit 说明回收, 在第二轮 PCR 反应中作为引物使用.

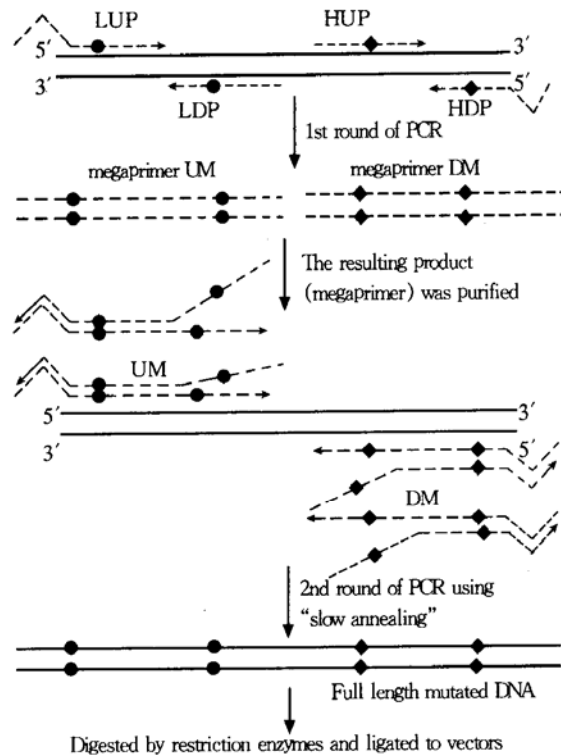


Fig. 1 Strategy of "slow annealing" PCR mutagenesis using two megaprimers

The steps are depicted with double-stranded DNA schematically represented as a double line, primers (upstream primer: LUP, HUP, UM; downstream primer: LDP, HDP, DM.) as line of dashes with horizontal arrows, mutation site as dot or diamond.

Table 1 Mutagenic primers and standard primers of anti-CD3 ScFv

LUP: 5'-TAT CTC gAg gA (g/C) ATC (gT/CA) A (C/A) Tg ACC CAg TG-3'
LDP: 5'-T AgC Tgg gA (T/C) ACC ACT Tg-3'
HUP: 5'-T AgA gTg ACC AT (g/C) ACC ACT g-3'
HDP: 5'-Cg gAA TTC TgA ggA gAC ggT gac-3'
SP: 5'-gAg ATC gTA CTg ACC CAg TG-3'

c. 第二轮 PCR 反应 (巨型引物扩增突变体库): 反应总体积为 50  $\mu$ l, 四组反应中分别包含: a. 0.5  $\mu$ g 的每端引物 (下同), 0.3  $\mu$ g 模板; b. 1.5  $\mu$ g 引物, 0.3  $\mu$ g 模板; c. 0.5  $\mu$ g 引物, 1  $\mu$ g 模板; d. 1.5  $\mu$ g 引物, 1  $\mu$ g 模板, 矿物油覆盖. 95 °C 预变性 5 min 后, 加入 DNA 聚合酶 *Pfu* 2.5 U, dNTPs 150  $\mu$ mol/L, 开始扩增. 反应循环

数为 25 个循环. 第一个循环为: 95 °C 变性 1 min, 然后以每秒 0.3 °C 的幅度降温至 76 °C (-0.3 °C/s), 76 °C 4 min; 其余 24 个循环为: 95 °C 90 s, -0.3 °C/s, 76 °C 2 min. PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 回收特异 DNA 条带.

d. 对照实验: 分别设两组对照实验. A 组: 单侧巨型引物 PCR 扩增. 仅使用 5' 巨型引物进行单侧扩增, 反应程序如第二轮 PCR 反应所述, 其中单侧引物 1.5  $\mu$ g, 其余成分不变. B 组: 常规 PCR 引物扩增. 采用引物 SP 和 HDP 各 20 pmol 为两端引物, 分别按照第一轮 PCR 的循环条件 (退火温度为 62 °C) 和第二轮 PCR 的循环条件进行 PCR 扩增.

1.3.3 测序: 第二轮 PCR 扩增产物经试剂盒纯化, 按常规方法<sup>[7]</sup>酶切, 连接, 转化, 筛选. 阳性克隆的测序工作由上海博亚公司完成.

## 2 结 果

### 2.1 巨型引物的扩增结果

用表 1 所列的两组简并引物分别对抗 CD3 改型单链抗体进行第一轮 PCR 扩增, 所得产物应分别约为 180 bp, 160 bp. 各取 PCR 产物 5  $\mu$ l 在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定, 按照所述的扩增条件, 引物 LUP, LDP 和 HUP, HDP 分别扩增得到清晰的特异性条带 (图 2).

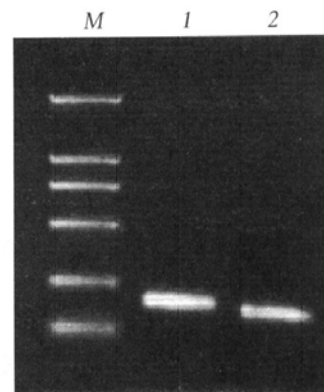


Fig. 2 Results of the first round of PCR

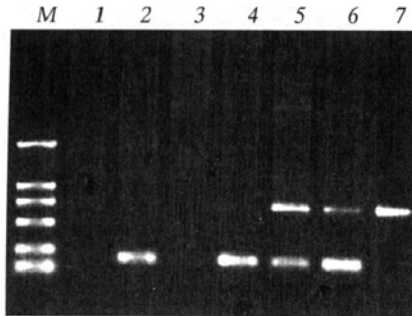
M: marker DL2000; 1: products using primer LUP and LDP;

2: products using primer HUP and HDP.

### 2.2 抗 CD3 改型单链抗体突变体库的扩增结果

第一轮 PCR 产物分别作为第二轮 PCR 中的 5' 和 3' 引物 (UM, DM), 以线性质粒 DNA 为模板进行扩增表明: 在引物或模板浓度较低的情况下, 无论是常规 PCR 程序还是慢速退火 PCR 反应程序, 都无法得到特异性扩增产物 (图 3-1, 3-2, 3

-3). 同样, 在标准 PCR 反应条件下, 即使是高浓度引物和模板也无法扩增出特异性 DNA 条带 (图 3-4). 只有在提高引物和模板浓度的同时, 使温度从变性温度 95 °C 缓慢地降至退火温度 76 °C, 才能得到特异性较强的 DNA 条带 (图 3-5), 事实上, 采用慢速退火, 即使退火温度改为 64 °C 也能达到同样目的 (图 3-6). 出于对时间和扩增特异性的考虑, 推荐使用高退火温度.

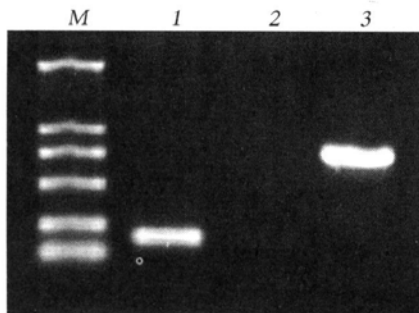


**Fig. 3 Results of the Second round of PCR**

*M*: marker DL2000; *1*: each megaprimer (EMP) 0.5 µg, template 0.3 µg; *2*: EMP 1.5 µg, template 0.3 µg; *3*: EMP 0.5 µg, template 1 µg; *4*: EMP 1.5 µg, template 1 µg, standard PCR procedure; *5*: EMP 1.5 µg, template 1 µg; *6*: slow annealing PCR procedure, 64 °C; *7*: 750 bp full-length control DNA.

**2.3 对照实验结果**

如图 4 所示, 采用常规引物按标准 PCR 循环条件进行扩增, 可以得到相应的扩增产物 (图 4-3). 而无论利用单侧巨型引物还是常规引物进行



**Fig. 4 Results of control PCR**

*M*: marker DL2000; *1*: one side megaprimer, slow annealing PCR procedure; *2*: routine primers, slow annealing PCR procedure; *3*: products of standard PCR using HDP and SP.

慢速退火 PCR 扩增, 都无法得到目的产物 (图 4-1, 图 4-2), 从而证明了巨型引物慢速退火 PCR 法的有效性.

**2.4 测序结果**

测序结果表明 (图 5), 在欲进行定点诱变的位置上碱基不同程度地发生了突变, 证明使用该方法得到了目的性抗 CD3 改型单链抗体的突变体.

**3 讨 论**

亲和力的高低是影响改型抗体应用于临床的关键性因素之一. 尽管目前关于改型抗体亲和力的方法有诸如链替换 (chain shuffling), 易错 PCR (error prone PCR) 及利用 *E. coli* 高突变株来增加突变等方法, 但对于仅需替换几个碱基的改型抗体来说, 定点突变仍不失为一种有效的方法<sup>[10]</sup>. 将含突变碱基的 PCR 产物作为引物再次进行扩增的巨型引物 PCR 定点诱变法, 使靶基因上特异位点碱基的更换变得简便易行. 利用两条巨型引物的 PCR 定点诱变法, 打破了以往只能在目的 DNA 的有限位点引入突变的局限, 使得靶基因上任意位点碱基的突变成为可能. 然而由于巨型引物作为大片段, 双链 DNA 的自身特点, 常导致其与模板之间退火效率的低下. 我们根据模板与引物之间退火过程的特点, 放慢从变性温度到退火温度的降温速度, 以期在维持巨型引物的解链状态和快速布朗运动的同时, 增加引物与模板的碰撞几率, 从而把任意位点的定点诱变和有效的巨型引物 PCR 扩增衔接在一起, 并得到了满意的扩增结果. 这种将两端巨型引物和慢速退火联合应用于 PCR 定点诱变的方法, 尚未见报道. 此外, 高保真酶 *AmpliTaq Gold* 和 *Pfu* 的使用以及 PCR 循环数的限制, 保证了 PCR 突变产物的忠实性, 为后期筛选高亲和力的抗 CD3 改型单链抗体奠定了基础.

**致谢** 感谢王沂研究员, 张端阳博士和王金凤硕士对本工作的大力支持, 感谢石怀生老师对本文图片摄影的支持, 感谢和兆荣博士和王崇云博士对本论文的完成所给予的帮助.

```

          1 Δ   Δ Δ Δ                               50
ReCD3 (1) GAGATCGTACTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA
sequence 1 (1) *****A*A*****
sequence 2 (1) *****A*****
sequence 3 (1) *****
sequence 4 (1) **C**CA*****
sequence 5 (1) *****A*****
sequence 6 (1) **C*****A*****

          51                               CDR1 (L 链)                               100
ReCD3 (51) AAGAGCCACCCTCTCCTGCTCCGCATCTTCCTCCGTTTCTTACATGAACT
sequence 1 (51) *****
sequence 2 (51) *****
sequence 3 (51) *****
sequence 4 (51) *****
sequence 5 (51) *****
sequence 6 (51) *****

          101                               150
ReCD3 (101) GGTACCAACAGAAACCTGGTCAAGCTCCTAGAAGATGGATCTATGACACC
sequence 1 (101) *****
sequence 2 (101) *****
sequence 3 (101) *****
sequence 4 (101) *****
sequence 5 (101) *****
sequence 6 (101) *****

          151 CDR2 (L 链) Δ                               200...
ReCD3 (151) TCCAAACTAGCAAGTGGTATCCCAGCTAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGG
sequence 1 (151) *****
sequence 2 (151) *****
sequence 3 (151) *****
sequence 4 (151) *****
sequence 5 (151) *****
sequence 6 (151) *****

          ...551                               CDR2 (H 链) Δ                               600...
ReCD3 (551) CTA ACTACAACCAAAAATCAAAGATAGAGTGACCATGACCACTGACAAA
sequence 1 (551) *****
sequence 2 (551) *****
sequence 3 (551) *****
sequence 4 (551) *****
sequence 5 (551) *****
sequence 6 (551) *****C*****

```

Fig. 5 Comparison of sequences of "megaprimer" PCR products and anti-CD3 reshaped single chain antibody (partial)

"\*" represents the bases identical to those of ReCD3 while the others are the mutated bases; the base with "Δ" above is the one which may be mutated by the degenerate primer. ReCD3: anti-CD3 reshaped single chain antibody.

## 参 考 文 献

- 1 田 波, 李传昭, 孙仑泉, 等. 分子进化工程. 北京: 科学出版社, 1999. 71~ 72  
Tian P, Li C Z, Sun L Q, *et al.* Molecular Evolution Engineering. Beijing: Science Press, 1999. 71~ 72
- 2 Dall'Acqua W, Carter P. Antibody engineering. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, **8** (4): 443~ 450
- 3 Kammann M, Laufs J, Schell J, *et al.* Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Res*, 1989, **17** (13): 5404
- 4 Colosimo A, Xu Z, Novelli G, *et al.* Simple version of "megaprimer" PCR for site directed mutagenesis. *BioTechniques*, 1999, **26** (5): 870~ 873
- 5 Brons-Poulsen J, Petersen N E, Horder M, *et al.* An improved PCR-based method for site-directed mutagenesis using megaprimers. *Mol Cell Probes*, 1998, **12** (6): 345~ 348
- 6 刘喜富, 萧 飒, 顾 征, 等. 抗人 CD3 单链抗体与改型单域抗体的表达. *中国科学 (C 辑)*, 1996, **26** (5): 428~ 435  
Liu X F, Xiao S, Gu Z, *et al.* Construction of expression vectors and study on single-chain antibody and reshaping single-domain antibody against CD3. *Science in China (series C)*, 1997, **40** (3): 270~ 276
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~ 24
- 8 Shalaby M R, Shepard H M, Presta L, *et al.* Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med*, 1992, **175** (1): 217~ 225
- 9 Woodle E S, Thistlethwaite J R, Jolliffe L K, *et al.* Humanized OKT3 antibodies: successful transfer of immune modulating properties and idiotype expression. *J Immunol*, 1992, **148** (9): 2756~ 2763
- 10 Hayden M S, Gililand L K, Ledbetter J A. Antibody engineering. *Curr Opin Immunol*, 1997, **9** (2): 201~ 212

## Site-directed Mutagenesis of Anti-CD3 Single-chain Fv Fragment (ScFv) Using Two Side Megaprimer PCR Method\*

LIU Jing<sup>1)</sup>, YIN Chang-Cheng<sup>2)</sup>, HUANG Hua Liang<sup>2)\*\*</sup>, JIANG Shu De<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>*Institute of Medical Biology, Peiking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118, China;*

<sup>2)</sup>*Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)*

**Abstract** In order to improve the affinity of anti-CD3 ScFv, one site-directed mutagenesis method using "megaprimer" PCR was designed. Adopting the mutagenic primer in the first round of PCR, mutation DNA fragments of 180bp and 160 bp were amplified, respectively. Using these fragments as "megaprimers" in the second round of PCR, specific full-length DNA by changing the PCR program and adjusting the concentration of the primer and template were obtained. The sequencing results showed that the mutant pool of anti-CD3 ScFv had been yielded successfully.

**Key words** Anti-CD3 ScFv, site-directed mutagenesis, polymerase chain reaction, megaprimer, slow annealing

\* This work was supported by a grant from The China National "863" Planning (102-09-04-01).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-64857285, E-mail: hlhuang@inw.com.cn

Received: November 16, 2000 Accepted: February 9, 2001