抗 CD5 单链抗体基因克隆和表达

王 菲 马清钧*

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘 要 以分泌抗 CD5 单克隆抗体的杂交瘤细胞 poly(A) mRNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增出抗 CD5 单克隆抗体的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L) cDNA 片段组装出抗 CD5 单链抗体(ScFv) cDNA 片段。该 ScFv 片段被克隆到 pCANTAB 5E 载体上,以 *E. coli* TG1 为宿主,进行噬菌体表面呈现。通过 Molt-4 细胞表面分子 CD 抗原,对噬菌体表面呈现的 ScFv 进行免疫亲和富集筛选。经细胞-ELISA 鉴定,得到 4 株高亲和力克隆。DNA 序列分析得知,单链抗体全长 732 碱基,其中 V_H 为 339 碱基,V_L 为 300 碱基。抗 CD5 ScFv 在 *E. coli* HB2151 中以可溶形式分泌表达,产物主要分布于周质之中,占周质中总蛋白的 20%。

关键词 单链抗体, CD5 抗原, 克隆, 表达

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)02-0131-04

单链抗体(single-chain fragment of variable region,ScFv)[1,2]由抗体重链可变区 V_H 和轻链可变区 V_L 通过设计的短肽连接起来,大小仅为原分子的 1/6~1/10,使其易通过生理屏障。小分子抗体的免疫原性明显下降,如果进一步人源化,其免疫原性有可能被消除。

CD5 是 T 淋巴细胞和慢性淋巴白血病 B 细胞表面糖蛋白[3,4]。因为表达 CD5 的 B 细胞与人的自身免疫疾病有关联,所以抗 CD5 单链抗体有望成为上述疾病治疗的候选药物。蓖麻毒素与抗 CD5 单抗化学偶联构成的免疫毒素[5,6],已经进入临床观察阶段。为了开展新一代抗 CD5 重组免疫毒素的研究,我们应用基因工程抗体技术与噬菌体表面呈现技术,以分泌抗 CD5 单克隆抗体的杂交瘤细胞为材料,构建单链抗体 cDNA,并进行了表达研究。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种 *E. coli* TG1、*E. coli* HB2151 和质粒 pCANTAB 5E 购于 Pharmacia 公司。抗 CD5 单抗分泌株细胞和 Molt-4 细胞由军事医学科学院基础医学研究所沈倍奋教授提供。

逆转录酶(AMV RT)购自 Promega 公司。M13KO7 辅助噬菌体、Vent DNA Polymerase 及其 PCR 系统和各种限制酶使用 Biolabs 公司产品。化学试剂基本使用国产分析纯试剂。[α-^{32}P]dATP 由北京亚辉生物医学工程公司提供。

1.2 单链抗体的克隆、表达与活性检测

使用了 Pharmacia Recombinant Phage Antibody System 中部分内容与方法。基因克隆、表达按《分子克隆》操作。

1.3 哺乳动物细胞的包被

悬浮生长的哺乳动物的细胞悬液(2×10^6 cell/mL)在培养板中离心,形成单层分散分布。缓慢加入 1 倍体积戊二醛固定液(0.2% 戊二醛于 PBS 中),室温 15min。用 PBS-BSA(0.25% BSA 溶于 PBS)溶液洗 2 遍后,用 0.1mol/L Gly-PBS 封闭液封闭,室温 30min,4℃ 保存待用。

2 结 果

2.1 抗 CD5 单链抗体的基因克隆

以分泌 CD5 单克隆抗体的杂交瘤细胞[7]中分离出 Poly A^+ mRNA 为模板,逆转录合成出 cDNA 第一链。用两组鼠抗体重链、轻链可变区简并性引物(Pharmacia 公司)扩增出重链可变区 V_H 和轻链可变区 V_L cDNA 双链。V_H 和 V_L cDNA 片段再用 Linker 引物(Pharmacia 公司)组装成单链抗体(ScFv) cDNA 片段。电泳显示 ScFv 片段符合 750bp 的设计长度(图 1)。ScFv 片段定向克隆到 pCANTAB 5E(p5E)噬菌粒(Pharmacia 公司)上,转

收稿日期:2000-09-28,修回日期:2000-12-04。

* 联系作者。Tel:86-10-66931808;Fax:86-10-68215721;E-mail:majq@nic.bmi.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

化到 *E. coli* TG1 中。在含有氨苄青霉素和葡萄糖的 SOBAG 平板上长出约 10^5 个菌落。酶切鉴定证明克隆连接方向正确。

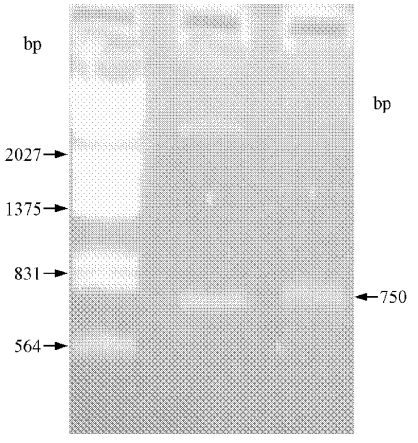

图 1 ScFv PCR 组装产物的电泳分析

Fig. 1 cDNA of ScFv after PCR assembly

1. Marker λDNA/*Hin*dIII + *Eco*RI 2. ScFv DNA marker; 3. cDNA fragment of ScFv (about 7500bp)

2.2 单链抗体基因的 DNA 序列分析

从正反两个方向分别测定 V_H 和 V_L DNA 序列。结果 V_H 的 DNA 序列为 339bp;V_L 的 DNA 序列为 300bp;连接两者的 Linker 为 93bp,其中包含了一个 $(Gly_4Ser)_4$ 的连接肽;与设计结构一致。通过与鼠抗体基因库的比较分析,V_H 和 V_L DNA 序列既与鼠抗体家族有很高的同源性,又与其它抗 CD5 单克隆抗体的 CDR 区序列有差异。

ATA	GCC	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	CAG	TCA	GGG
GGA	GAC	TTA	GTG	AAG	TCT	GGA	GGG	TCC	CTG
AAA	CTC	TCC	TGT	GCA	CCC	TCT	GGA	TTC	ACT
TTT	AGT	TAC	TAT	ACC	ATG	TCT	TGG	GTT	CGC
CAG	ACT	CCG	GAG	AAG	AGG	CTG	GAG	TGG	TCG
CAA	CCA	TTA	GTA	GTG	GTG	ACG	CTT	ACA	CCT
ACT	ATC	CAG	ACC	AGT	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC
ATC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	GCC	AAG	AAC	ACC
CTG	TTC	CTG	CAA	TTG	AAC	AGT	CTG	AAG	TCT
CAG	GAC	ACA	GCC	ATG	TAT	TAC	TGT	ACC	AGA
GGG	GCC	CTC	TAT	GAA	CGG	GCT	ATG	GAC	TAC
TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC
TCA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC
TCT	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	GAC	ATC	GAG	CTC
ACT	CAG	TCT	CCA	ACA	CTC	ATG	GCT	GCA	TCT
CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATC	ACC	TGC	AGT
GTC	AAC	TCA	AGT	ATA	AGT	TCC	AGC	AAC	TTG
CAC	TGG	TAC	CGG	CAG	AAG	TCA	GAA	ACC	TCC
CCC	AAA	CCC	TGG	ATT	TAT	GGC	ACA	TCC	AAC
CTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CTG	TTC	GCT	TCA	GTG
GCA	GTG	GAT	CTG	GAC	CTC	TTA	TTT	CTC	ACA
ATC	AGC	AGC	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC
ACT	TAT	TAC	TGT	CAA	CAG	TGG	AGT	TCT	TAC
CCG	GTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG
GAG	CTG	AAA	CGG						

2.3 抗 CD5 单链抗体基因克隆的富集和鉴定

噬菌体表面呈现的 ScFv 表达于噬菌体颗粒尾部。用表达 CD5 抗原的 Molt-4 细胞对 ScFv 重组噬菌体进行两轮亲和富集。96 个克隆中有 12 个克隆对 Molt-4 细胞具有亲和力。用 Cell-ELISA 方法对富集出来的重组噬菌体克隆做亲和力鉴定(图 2)。结果,4 个克隆亲和力很强。它们是 G7、F8、F10、A12 克隆。将这 4 个克隆转化到 *E. coli* HB2151 中获得了 4 株表达抗 CD5 单链抗体基因的菌株,分别命名为 ScFv-CD5 的 G7、F8、F10 和 A12 株。

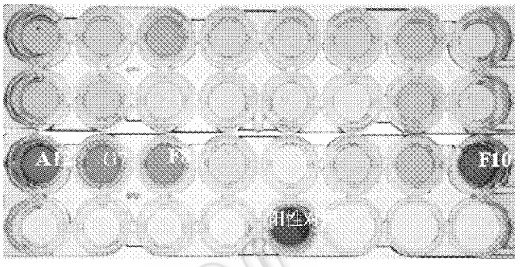

图 2 细胞-ELISA 测定重组噬菌体的亲和性

Fig. 2 Affinity determination of recombinant phages by cell-ELISA with Molt-4 cell-line

2.4 抗 CD5 单链抗体基因的表达

重组噬菌粒 p5E/ScFv-CD5 转化到 *E. coli* HB2151 受体菌中。HB2151 是琥珀突变非抑制表型,融合基因可表达游离的抗 CD5 ScFv,并借助 g3 信号肽分泌性表达。工程菌 G7、F8、F10、A12 株于 SB-AG 培养基中 37℃ 培养。经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 分析培养物上清、全菌体裂解液和周质提取物。ScFv-CD5 分子量理论值为 31kD。电泳结果显示(图 3 和图 4)4 株菌的细胞周质和全细胞裂解样品均在 SDS-PAGE 上呈现 31kD 表达产物区带,在全细胞裂解样品中,所占比例较小。在培养上清中则未显示该区带。表明 ScFv-CD5 基因得到有效表达,表达产物主要分布于周质之中。

我们对 ScFv-CD5 的工程菌进行了培养及诱导时间对表达影响的观察。培养时间延长,可提高菌体密度,有利于获得 ScFv-CD5 表达产物,但菌体密度过高,表达水平下降,以培养 2 小时较合适。延长诱导培养时间将会增加表达产量,但诱导 5h 之后表这量不再提高。所以,诱导培养时间以 4h 为宜。

3 讨 论

CD5 是 T 淋巴细胞表面糖蛋白[8],在慢性淋巴白血病 B 细胞表面也被检测出来[9]。现已证实,表达 CD5 的 B 细胞与人的自身免疫疾病有关联,如系

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

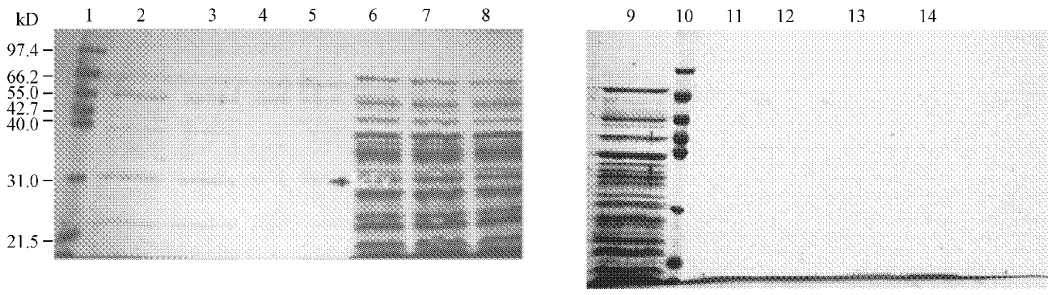

图 3　菌株表达 ScFv-CD5 蛋白样品的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3　ScFv-CD5 expressed in strains G7, F8, F10 and A12

Lane 1 and 10: MW Marker; 2 – 5: periplasms; 6 – 9: whole-cell extracts; 11 – 14: culture supernatants; 2.6.11: strain G7; 3.7.12: strain F8; 4.8.13: strain F10; 5.9.14: strain A12

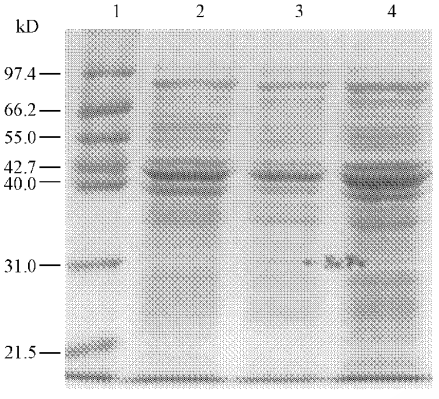

图 4　ScFv-CD5 的工程菌周质蛋白样品的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4　Periplasms of *E. coli* HB2151 and *E. coli* HB2151 (p5E/ScFv-CD5)

1: M. W. Marker; 2: *E. coli* HB2151 (blank); 3. *E. coli* HB2151 (p5E/ScFv-CD5) induced by IPTG; 4. *E. coli* HB2151 (p5E/ScFv-CD5) without IPTG induce

统红斑狼疮、类风湿性关节炎等。抗 CD5 免疫毒素有望成为自身免疫疾病、淋巴性白血病及一些传染性疾病的治疗和辅助治疗的候选药物。在淋巴细胞瘤和淋巴细胞白血病[10,11]、类固醇顽固性移植物抗宿主病[12]、I 型糖尿病[13]和系统红斑狼疮[14]上的临床疗效已被肯定,也可用于在骨髓同体或异体移植前,清除残留肿瘤细胞[15]和免疫活性 T 细胞[16]。蓖麻毒素与抗 CD5 单抗化学偶联构成的免疫毒素[6,17],已经进入临床观察阶段。在人体的自身免疫疾病的治疗和辅助治疗中,已经观察到肯定的治疗效果。为了开展新一代抗 CD5 重组免疫毒素的研究,我们应用基因工程抗体技术与噬菌体表面呈现技术,以分泌抗 CD5 单克隆抗体的杂交瘤细胞为材料,构建单链抗体 cDNA。

为了克服以往抗 CD5 免疫毒素存在的弱点,我们构建抗 CD5 单链抗体用来构建免疫毒素,既减小抗体的分子量以利于通过生理屏障(如肿瘤的毛细血管内皮间隙),又可望去除抗体恒定区带来的免疫原性和非特异性吸附,使靶细胞识别特异性增高。我们构建成功抗 CD5 ScFv cDNA,得到 4 株高亲和力的基因克隆。在大肠杆菌中,抗 CD5 ScFv 基因获得了可溶性分泌表达,产物主要分布于周质中,单链抗体含量约占周质蛋白的 20%～25%。

用于噬菌体表面呈现的结构蛋白有 g3p 和 g8p 蛋白[18]。g3p 是鞭毛噬菌体外壳上的结构蛋白,在每个噬菌体上只有 3～5 个拷贝,与噬菌体成熟无关,与抗体片段融合后,不会影响噬菌体包装成熟过程。g8p 蛋白在噬菌体的外壳上拷贝数很多(>300 个),可它有一个弱点:g8p 与抗体片段融合后,本身的结构发生变化,影响噬菌体的成熟,使呈现抗体片段的重组噬菌体产量下降[19]。因此,我们选择了 g3p 结构蛋白来融合单链抗体,进行噬菌体表面呈现。选择 g3p 结构蛋白的另一个原因是:在免疫亲和筛选时,ScFv-g8p 呈现的拷贝数高,与抗原结合牢固,掩盖了亲和力的作用因素,不利于筛出高亲和力的单链抗体。

我们观察到单链抗体的表达水平不高,原因可能是 Plac 启动子较弱,也可能是单链抗体表达产物对宿主菌具有毒性。在噬菌粒 p5E 上,控制单链抗体基因表达的是可诱导 Plac 启动子,它的表达被宿主菌 *E. coli* TG1 和 HB2151 所携带的 Lac Iq 基因阻遏。诱导前低温培养(30℃)且用葡萄糖抑制 Plac 启动子的菌体在诱导后的表达水平仍不高,表达量没有随诱导时间增加而明显增加。这一现象很可能是表达产物对细胞的毒性所致。文献中也有类似报道,过量的 g3p 或 g3p 融合蛋白基因的表达对宿主菌的生长产生致死性[20]。

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

REFERENCES(参考文献)

[1] Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW *et al*. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 1988, **242**(4877): 423～426

[2] Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. *Nature*, 1991, **349**(6307): 293～299

[3] Hwang J, Fitzgerald DJ, Adhya S *et al*. Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell*, 1987, **48**(1): 129～136

[4] Royston I, Majda JA, Baird SM *et al*. Human T cell antigens defined by monoclonal antibodies: the 65,000-dalton antigen of T cells (T65) is also found on chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglbulin. *J Immunol*, 1980, **125**(2): 725～731

[5] Blythman HE, Casellas P, Gros O *et al*. Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumour cells. *Nature*, 1981, **290**(5802): 145～146

[6] Lambert JM, Goldmacher VS, Collinson AR *et al*. An immunotoxin prepared with blocked ricin: a natural plant toxin adaptoed for therapeutic use. *Cancer Res*, 1991, **51**(23 Pt 1): 6236～6242

[7] CHEN Y(陈勇), SUN Y X(孙瑛勋), SHEN B F(沈倍奋) *et al*. Isolation of four monoclonal antibodies against human T cell and its major functional subgroups. *Chinese Communication of monoclonal antibodies*(单克隆抗体通讯), 1988, (2): 7～9

[8] Hwang J, Fitzgerald DJ, Adhya S *et al*. Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell*, 1987, **48**(1): 129～136

[9] Royston I, Majda JA, Baird SM, *et al*. *J Immunol*, 1980, **125**(2): 725～731

[10] Vitetta ES, Stone M, Amlot P *et al*. Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res*, 1991, **51**(15): 4052～4058

[11] LeMaistre CF, Rosen S, Frankel A *et al*. Phase I trial of H65-RTA immunoconjugate in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, 1991, **78**(5): 1173～1182

[12] Henslee PJ, Byers VS, Jennings CD *et al*. A new approach to the prevention of graft-versus-host disease using XomaZyme-H65 following histo-incompatible partially T-depleted marrow grafts. *Transplant Proc*, 1989, **21**(1 Pt 3): 3004～3007

[13] Skyler JS. Strategies in diabetes mellitus. Start of a new era. *Postgrad Med*, 1991, **89**(6): 45～46, 49, 53～56 passim

[14] Wacholtz MC, Lipsky PE. Traeatment of lupus nephritis with CD5 PLUS, an immunoconjugate of an anti-CD5 monoclonal antibody and ricin A chain. *Arthritis Rheum*, 1992, **35**(7): 837～839

[15] Muirhead M, Martin PJ, torok-Storb B *et al*. Use of an antibody-ricin A-chain conjugate to delte neoplastic B cells from human bone marrow. *Blood*, 1983, **62**(2): 327～332

[16] Henslee-Downey PJ, Parrish RS, MacDonald JS *et al*. Combined *in vitro* and *in vivo* T lymphocyte depletion for the control of graft-versus-host disease following haploidentical marrow transplant. *Transplantation*, 1996, **61**(5): 738～745

[17] Blythman HE, Casellas P, Gros O *et al*. Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumour cells. *Nature*, 1998, **290**(5802): 145～146

[18] Kang AS, Barbas CF, Janda KD *et al*. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(10): 4363～4366

[19] Greenwood J, Willis AE, Perham RN. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from Plasmodium falciparum circumsporozoite protein as antigens. *J Mol Biol*, 1991, **220**(4): 821～827

[20] Knappik A, Pluckthun A. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng*, 1995, **8**(1): 81～89

Cloning and Expressing of An Anti-CD5 Single Chain Antibody

WANG Fei MA Qing-Jun

(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing* 100071, *China*)

Abstract Novel anti-CD5 single-chain fragment of variable domain (ScFv) was cloned and expressed. Anti-CD5 ScFv was constructed with cDNA fragments of heavy and light variable regions (V_H and V_L) which were reverse-translated from poly (A) mRNA of hybridoma cells producing anti-CD5 McAb. By phage displaying, ScFv in form of ScFv-g3p fusion protein was panned based on its binding capacity to the CD5 antigens on the cell surface of Molt-4 cells. Assayed by the cell-ELISA, 4 clones were found to have high affinity to CD5 antigen. DNA sequencing confirmed that the V_H fragment is 339 base pairs, the V_L 300bp, and the ScFv belongs to the mice gene family. In *E. coli* HB2151 the soluble ScFv-CD5 was expressed mainly in the periplasm.

Key words single-chain fragment of variable domain, CD5-antigen, monoclonal antibody

Received: September 28, 2000

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931808; Fax: 86-10-68215721; E-mail: maiq@nic.bmi.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn