

TP-PCR 法构建抗人 CD28 嵌合抗体双启动子昆虫杆状病毒重组转移载体 Construction of a Recombinant Baculovirus Transfer Vector with Two Promoters Expressing the Anti-human CD28 Chimeric Antibody by Using TP-PCR Method

朱 艳¹, 陈永井², 邱玉华², 郑峰丰¹, 朱 江^{1*}

ZHU Yan¹, CHEN Yong-Jing², QIU Yu-Hua², ZHENG Feng-Feng¹ and ZHU Jiang^{1*}

1. 苏州大学生命科学学院, 苏州 215006

2. 苏州大学医学生物技术研究所, 苏州 215007

1. Life Sciences School, Suzhou University, Suzhou 215006, China

2. Medical Biotechnology Institute, Suzhou University, Suzhou 215007, China

摘 要 为构建能同时表达抗人 CD28 嵌合重链和嵌合轻链基因的双启动子杆状病毒转移载体, 利用 PCR 法扩增出抗人 CD28 鼠源性单抗的可变区基因和人 IgG1 的恒定区基因, 再采用一种不需要限制性核酸内切酶和连接酶的新方法——三引物 PCR (TP-PCR) 法将两者拼接后分别插入杆状病毒转移载体 pAcUW3 的 *ph* 和 *p10* 启动子后, 并通过酶切、电泳、PCR 扩增和测序对重组体进行了鉴定。研究结果表明, TP-PCR 法快速、方便、准确, 无需设计外源的 DNA 序列, 就能构建完好的融合表达基因。该转移载体的构建成功为嵌合抗体基因在昆虫细胞中的表达奠定了基础。

关键词 杆状病毒, 转移载体, CD28 单克隆抗体, 嵌合抗体, TP-PCR

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0832-05

Abstract CD28, a cell surface glycoprotein, predominantly expressed on T cells, belongs to the Ig superfamily and provides critical co-stimulatory signals. The data which have published indicate that the monoclonal antibody against CD28 can decrease curative effects when it was applied *in vivo* for a long time. In order to avoid the human-anti-mouse action, anti-CD28 mAb must be humanized before it can be used in clinical study. Chimeric antibody, consisting of variable regions of mouse antibody and the constant regions of human IgG1, is often chosen by designers in generating humanized antibody. In this study, to prepare the anti-human CD28 chimeric antibody, the genes coding variable regions of anti-CD28 mAb and the constant regions of human IgG1 were cloned by PCR method. Then, the target genes were assembled by TP-PCR, a novel method developed for fusing genes without designing endonuclease sites at the both end of the target genes, and inserted into the baculovirus transfer vector pAcUW3 respectively. Thus, the recombinant baculovirus transfer vector with two strong promoters, *ph* and *p10* was successfully constructed, which can express two different foreign genes at the same time. The recombinant vector was identified by the methods of restriction digesting, electrophoresis, PCR amplification and further verified by DNA sequence analysis. This work will contribute to expressing the chimeric CD28 antibody in insect cells.

Key words baculovirus, transfer vector, CD28 mAb, chimeric antibody, TP-PCR

Received: April 19, 2005; Accepted: July 1, 2005.

This work was supported by a grant from the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2004203).

* Corresponding author. Tel: 86-512-67604682; E-mail: sdzjyz@hotmail.com

江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2004203)

CD28 分子是表达于 T 淋巴细胞表面的跨膜糖蛋白,参与介导 T 细胞活化所需的协同刺激信号^[1-3],CD28 分子的激发/阻断型单抗可增强/阻断协同刺激信号的转导^[4,5]。采用这一免疫干预手段,对肿瘤、自身免疫性疾病及移植排异等均具有重要的治疗意义^[6-8]。目前采用 B 淋巴细胞杂交瘤技术获取的鼠源性抗体,体内应用可产生人抗鼠抗体而降低治疗效果,同时还可能导致过敏反应等副作用^[9-12]。解决的办法是采用基因工程技术对鼠源性抗体进行改造,即保留鼠源性抗体的可变区,用人免疫球蛋白的恒定区取代鼠源性抗体的相应区域。

以杆状病毒为载体,昆虫细胞或虫体为受体的基因工程表达系统在上世纪 80 年代建立以来,由于其独特的优点和

巨大的潜力,已有近千种外源基因通过这一表达系统得以表达,该系统后加工过程好,表达量高,表达产物具有天然生物活性而受到国内外广泛关注^[13]。

本研究在已获取了稳定分泌鼠抗人 CD28 单抗的杂交瘤细胞株并对抗体特性进行鉴定的基础上,以杆状病毒为载体,采用图 1 所示的策略,将鼠抗人 CD28 单抗的重、轻链可变区基因与人 IgG1 恒定区基因通过 TP-PCR (tri-primer PCR) 的方法进行拼接,再将嵌合重链基因和嵌合轻链基因分别插入杆状病毒转移载体 pAcUW3 中的多角体蛋白基因 (polyhedrin, *ph*) 和 *P10* 基因启动子后,构建成重组转移载体 pAcUW3(*vH- γ_1* , *vL- κ*)。本文报道这一研究结果。

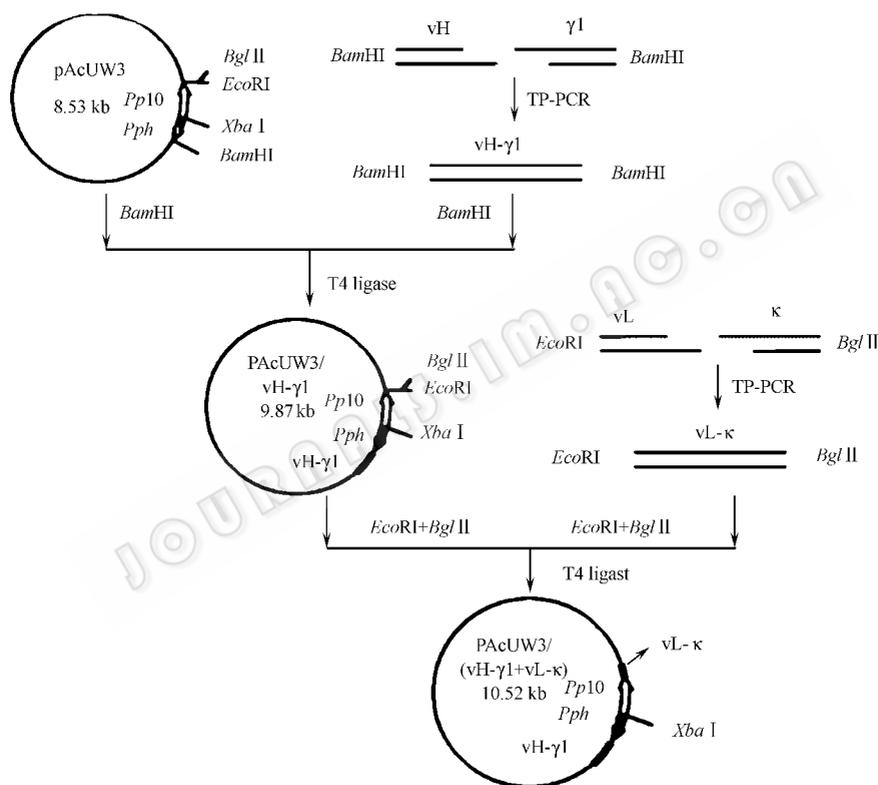


图 1 重组转移载体 pAcUW3(*vH- γ_1* , *vL- κ*) 的构建策略图

Fig.1 Construction of recombinant transfer vector pAcUW3(*vH- γ_1* , *vL- κ*)

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司;双启动子昆虫表达载体 pAcUW3 由中国科学院上海细胞与生物化学研究所吴祥甫教授惠赠,苏州大学生命科学学院生物化学与分子生物学教研室保存;转化用宿主菌 *E. coli* Top10,含有编码鼠抗人 CD28 单抗重、轻链可变区基因、人 IgG1 恒定区基因的质粒均由苏州大学医学生物技术研究所保存。

1.2 工具酶和主要试剂

LA Taq DNA 聚合酶、Pyrobest DNA 聚合酶、限制酶

EcoRI, *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, *BglII*, T4 DNA 连接酶等均购自大连 TaKaRa 公司。少量质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自杭州维特洁公司。

1.3 引物设计

根据鼠抗人 CD28 单抗重链可变区基因和人 IgG1 重链恒定区基因以及鼠抗人 CD28 单抗轻链可变区基因和人 IgG1 轻链恒定区基因序列分别设计配对引物 28H-A 和 28H-B、gamma1-A 和 gamma1-B、28L-A 和 28L-B、Kappa-A 和 Kappa-B。按照 TP-PCR 法设计,图中方框部分是抗人 CD28 单抗可变区基因,阴影部分是人 IgG1 恒定区基因。

TCA GGA CCT-3(含 *Bam*H I 位点)

28H-B: 5'-GGG GAA GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA

GGC TGA GGA GAC TGT GAG AGT-3'

gamma1-A: 5'-TGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC-3'

gamma1-B: 5'-GAG GGA TCC TCA TTT ACC CGG AGA

CAG GGA GAG-3(含 *Bam*H I 位点)

28L-A: 5'-GCA AGA TCT ATG GAC ATT GAG ATG ACC

CAG TCT C-3(含 *Bgl* II 位点)

28L-B: 5'-GAT GAA GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT

CCG TTT GGT TTC CAG CTT GGT-3'

Kappa-A: 5'-ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC-3'

Kappa-B: 5'-GCA GAA TTC CTA ACA CTC TCC CCT GTT

GAA GCT-3(含 *Eco*R I 位点)

以上引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

pAcUW3 转移载体测序引物:

P1: 5'-AAT GAT AAC CAT CTC GCA AAT AAA TAA GT-3'

P2: 5'-GTA CAA CAA TTG TCT GTA AAT CAA CAA C-3'

以上测序引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.4 鼠抗人 CD28 单抗重、轻链可变区基因(vH, vL)和人 IgG1 重、轻链恒定区基因(γ_1 、 κ)的扩增

用小量质粒抽提试剂盒分别抽提含鼠抗人 CD28 单抗重、轻链可变区基因和人 IgG1 重、轻链恒定区基因的质粒,并以此为模板,在 *Pyrobest* 酶作用下分别用 28H-A 和 28H-B、28L-A 和 28L-B、gamma1-A 和 gamma1-B、Kappa-A 和 Kappa-B 扩增出鼠抗人 CD28 单抗重、轻链可变区基因 vH、vL 和人 IgG1 重、轻链恒定区基因 γ_1 、 κ ,扩增条件为 94°C 预变性 1min 94°C 变性 55s 58°C 退火 50s 72°C 延伸 55s 扩增 35 个循环 最后 72°C 延伸 10min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒回收目的基因。

1.5 vH 和 γ_1 、vL 和 κ 嵌合基因的融合拼接

利用 TP-PCR 的方法,分别以 vH 和 γ_1 、vL 和 κ 为模板,用 LA Taq DNA 聚合酶将 vH 和 γ_1 、vL 和 κ 基因拼接起来。反应分两步进行,先是在不加引物的情况下 94°C 预变性 1min,94°C 变性 45s 50°C 退火 45s 72°C 延伸 1min,扩增 10 个循环后,分别加入引物 28H-A 和 gamma1-B、28L-A 和 Kappa-B,然后 94°C 变性 1min 60°C 退火 1min 72°C 延伸 2min,扩增 35 个循环 最后 72°C 延伸 10min。PCR 产物电泳后割胶回收拼接成功的目的片段,并克隆至 pMD18-T 载体,进一步测序验证。

1.6 感受态细菌的制备、连接产物的转化、重组质粒的筛选与鉴定

均按 Sambrook 的方法进行^[14]。

1.7 序列测定与序列分析

序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成,测序结果提交 NCBI 网站进行在线分析。

1.8 含 vH- γ_1 和 vL- κ 人鼠嵌合基因的转移载体的构建

测序正确的 pMD18-T/vH- γ_1 质粒用 *Bam*H I 单酶切,37°C 4h,同时单酶切 pAcUW3,37°C 4h,割胶回收酶切后的

目的片段,继而连接、转化感受态细菌,分别用 pAcUW3 载体上的引物(P1, P2)PCR 法和载体上的酶切位点 *Eco*R I 和融合基因上的酶切位点 *Pst* I 双酶切鉴定的方法获得 vH- γ_1 连接方向正确的重组转移载体 pAcUW3/vH- γ_1 。然后将测序正确的 pMD18-T/vL- κ 质粒用 *Eco*R I 和 *Bgl* II 双酶切,37°C 5h,同时双酶切含 vH- γ_1 的重组转移载体 pAcUW3/vH- γ_1 ,37°C,5h,同样割胶回收酶切后的目的片段,连接、转化感受态细菌,挑选、鉴定重组转移载体 pAcUW3(vH- γ_1 , vL- κ),并再次测序验证。

2 结果

2.1 抗人 CD28 单抗可变区基因 vH、vL 和人 IgG1 恒定区基因 γ_1 、 κ 的扩增

根据合成的上述配对引物,用 *Pyrobest* 酶分别从 pMD18-T/CD28vH、pMD18-T/CD28vL、pTX-B₁/ γ_1 、pMD18-T/ κ 中扩增出 CD28 单抗的可变区基因 vH、vL 和人 IgG1 恒定区基因 γ_1 、 κ 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,这四条特异性条带与理论值一致,大小分别为 350bp、320bp、990bp、320bp 左右。

2.2 vH 和 γ_1 、vL 和 κ 嵌合基因的拼接

用 vH 和 γ_1 、vL 和 κ 作为拼接 vH- γ_1 、vL- κ 的模板,根据 TP-PCR 法,选择配对引物 28H-A 和 gamma1-B、28L-A 和 Kappa-B,分别用 LA Taq 酶拼接两段基因。琼脂糖凝胶电泳显示,有大约 1330bp 和 650bp 左右的两种 DNA 条带产生,这与嵌合重、轻链的分子量是一致的。将纯化后的 vH- γ_1 、vL- κ 融合基因分别装进 pMD18-T 载体,酶切鉴定结果如图 2。经上海博亚生物技术有限公司测序,全长测序结果显示重、轻链融合基因均成功获得。重链融合基因有两处同义突变,而轻链融合基因无任何突变。

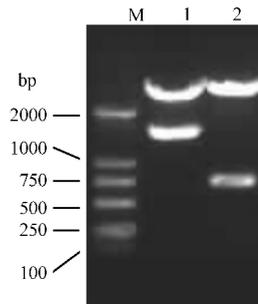


图2 pMD18-T/vH- γ_1 、pMD18-T/vL- κ 酶切鉴定图

Fig.2 Identification of pMD18-T/vH- γ_1 、pMD18-T/vL- κ by digestion with restriction enzymes

1 pMD18-T/vH- γ_1 / *Eco*R I and *Hind*III ;

2 pMD18-T/vL- κ / *Eco*R I and *Hind*III ; M : DNA marker DL2000.

2.3 含 vH- γ_1 和 vL- κ 基因的双启动子重组转移载体的构建

将测序正确的 pMD18-T/vH- γ_1 质粒和载体 pAcUW3 用 *Bam*H I 单酶切后,割胶回收目的片段,经连接、转化和筛选得阳性重组转移载体。为了确保 vH- γ_1 基因连接方向的正确性,选取 vH- γ_1 为模板,以 pAcUW3 载体上的引物 P1 和

gamma1-B 扩增目的基因,用载体上的酶切位点 *EcoR* I 和目的基因的酶切位点 *Pst* I 双酶切鉴定。若插入的融合基因是正向的,PCR 应扩增出大小为 1338bp 的基因片段,酶切片段应为 9490bp 和 380bp;若基因插入方向是反向的,则 PCR 扩增不出条带,酶切片段则为 8180bp 和 1690bp。结果显示 PCR 扩增出了大小约为 1340bp 的基因片段,而酶切片段大小也与正向插入的预测结果相同(图 3A)。随后将测序正确的 pMD18-T/vL- κ 质粒和含 vH- γ_1 的重组转移载体 pAcUW3/vH- γ_1 用 *EcoR* I 和 *Bgl* II 双酶切,割胶回收后,连接、转化细菌。筛选的阳性克隆酶切后产生的目的基因片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析与 vL- κ 融合基因大小一致,结果如图 3B。测序结果表明含目的基因的重组转移载体 pAcUW3(vH- γ_1 , vL- κ) 构建成功。图 4A、B 显示了测序正确的重轻链融合基因接头部分序列及其编码的氨基酸。

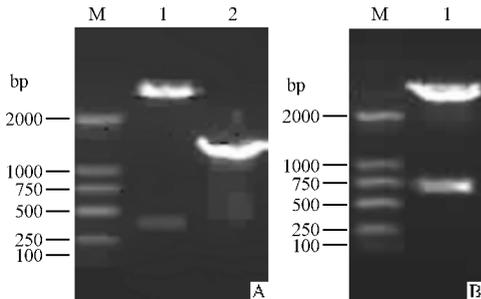


图 3 重组转移载体 pAcUW3/vH- γ_1 的酶切

及 PCR 鉴定电泳图(A)和 pAcUW3(vH- γ_1 , vL- κ) (B)

Fig. 3 Identification of recombinant transfer vector pAcUW3/vH- γ_1 by digestion with restriction enzymes and PCR(A) and pAcUW3(vH- γ_1 , vL- κ) (B)

A. 1: pAcUW3/vH- γ_1 /*EcoR* I and *Pst* I; 2: pAcUW3/vH- γ_1 PCR; M: DNA marker DL2000.

B. 1: pAcUW3(vH- γ_1 , vL- κ)/*EcoR* I and *Bgl* II; m: DNA marker DL2000.

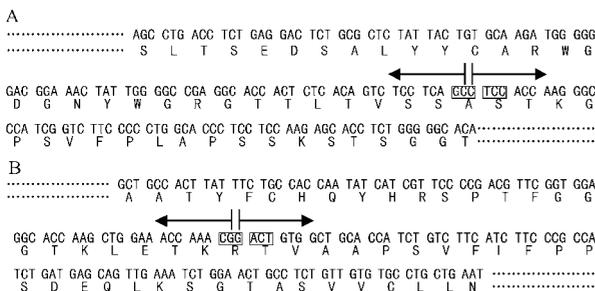


图 4 重链及轻链融合基因接头部分序列及其编码的氨基酸

Fig. 4 Nucleotide sequence and its deduced amino acid sequence of the chimeric region in the fused gene vH- γ_1 and vL- κ

A: the sequence before GCC is the variable region of anti-CD28 mAb

heavy chain; B: the sequence after TCC is the constant region

of human gamma-1; the sequence before CGG is the variable region of anti-CD28 mAb light chain.

3 讨论

本实验是在已成功采用 B 淋巴细胞杂交瘤技术获取了多株鼠源性稳定分泌抗人 CD28 分子单抗的杂交瘤细胞株,且对单抗特性进行初步鉴定的基础上进行的。

已有的研究结果表明,激发型抗人 CD28 单抗可在体外高效活化及扩增 T 淋巴细胞,故在肿瘤的生物治疗中具有重要的应用和开发价值^[4,5]。在肿瘤的临床治疗方案中,免疫抑制剂很多都是生物制剂,许多单抗类生物制剂来源于小鼠,患者会产生人抗鼠抗体,很快使生物制剂失效,解决的办法是鼠源性单抗人源化^[15]。为此,我们在实验中将鼠源性 CD28 单抗的可变区和人 IgG1 的恒定区拼接起来,构成嵌合抗体,选择了转移载体 pAcUW3,此载体是一种杆状病毒转移载体,可在同一昆虫细胞中高水平表达两个不同基因。pAcUW3 携带 AcNPV 两个强启动子, *ph* 和 *p10* 基因启动子。这两个启动子具有相似的强度,可在感染昆虫细胞的晚晚期被活化,同时表达重、轻链嵌合基因^[16]。*ph* 启动子后有一 *Bam*H I 克隆位点,而 *p10* 启动子后有 *Bgl* II 和 *Eco*R I 的克隆位点。正是根据这些特点,我们设计了引物,为避免引入额外的密码子产生多余或变异的氨基酸,研究中不引入新的酶切位点而直接采用三引物 PCR(TP-PCR)的方法快速实现了两个基因的融合拼接。测序结果显示,鼠的可变区与人的恒定区均连接在一起。克隆进 pMD18-T 载体测序正确后,分别将其酶切,插入到转移载体的相应位点。由于轻链融合基因中有 *Bam*H I 位点,为避免将其切断,故先将重链融合基因插入到载体,鉴定正确后再将轻链装进。为了确定单酶切重链基因插入方向的正确性,我们根据载体序列在多克隆位点两侧的载体上设计了一对引物(P1, P2)并通过分析酶切产物片段大小的方法进行鉴定。此重组转移载体 pAcUW3(vH- γ_1 , vL- κ) 的成功构建为进一步构建抗人 CD28 嵌合抗体的重组杆状病毒及其在昆虫细胞中表达奠定了良好的物质基础。

本实验所使用的融合基因的拼接方法为 TP-PCR 法,它是近年来备受广大研究者青睐的一种 PCR 方法。传统的融合基因构建多是通过限制酶将两个 DNA 片段进行酶切,然后通过连接酶将两个具有互补粘性末端酶切位点的 DNA 片段进行连接。这一方法需要对 DNA 片段的限制性酶切位点有所了解,而且有时很难找到合适的内切酶对 DNA 片段进行酶切,因此某种程度上限制了该方法的应用。TP-PCR 法有很多方面的应用(1)拼接融合基因^[17-21](2)目的基因中碱基的定点突变(3)目的基因中某些功能结构域的人工缺失研究^[22](4)在目的基因中的任何位置插入外源基因片段,进行重组基因的研究。TP-PCR 法简便、快捷、经济,无需高档设备仪器和试剂盒,即可实现对所研究的目的基因的改造。本方法的突出优点在于无需设计外源的 DNA 序列,从而避免在原有基因中引入冗余的酶切位点的碱基序列,即可实现对目的基因的任何常规性改造。正因为这些优点,TP-PCR 法在分子生物学和基因工程领域发挥了越来越重要的

作用。

本研究表明,应用 TP-PCR 法构建表达融合蛋白基因时,需注意以下因素(1)精心设计合理的中间引物是保证融合基因构建成功的关键之一,通过反复的实验条件摸索,构建本融合基因较理想的中间引物长度为 36~48nt。(2)合适的模板浓度,TP-PCR 所需模板浓度是普通 PCR 的 1%左右为宜。(3)必须用高保真的 DNA 聚合酶来代替普通 Taq 聚合酶,以降低 PCR 过程中的突变率和避免在被拼基因的 3'加入 A 碱基。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Watts TH, Debenette MA. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol*, 1999, **11**(3): 286 - 289
- [2] Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Immunol*, 2002, **2**: 116 - 126
- [3] Harding FA, McArthur JG, Gross JA et al. CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones. *Nature*, 1998, **370**: 607 - 609
- [4] Qiu YH(邱玉华), Yu GH(於葛华), Chen YJ(陈永井) et al. T cells and its surface type stimulated by the activated CD28 mAb. *Shanghai Journal of Immunology*(上海免疫学杂志), 2003, **23**(5): 324 - 326
- [5] Qiu YH(邱玉华), Zhao WH(赵文宝), Sun ZW(孙中文) et al. The deactivation of marrow tumor cells by the activated CD28 mAb. *Shanghai Journal of Immunology*(上海免疫学杂志), 2003, **23**(6): 378 - 381
- [6] Michael T, Gabriele H. CD28-induction of proliferation in resting T cells *in vitro* and *in vivo* without engagement of the T cell receptor: evidence for function distinct forms of CD28. *Eur J Immunol*, 1997, **27**: 239 - 247
- [7] Chang AE, Aruga A, Cameron MJ et al. Adoptive immunotherapy with vaccine-primed lymph node cells secondarily activation with anti-CD3 and interleukin-2. *J Clin Oncol*, 1997, **15**: 796 - 807
- [8] Li Q, Fueman SA, Bradford CR et al. Expanded tumor-reactive CD4+ T cell responses to human cancer induced by secondary anti-CD3/anti-CD28 activation. *Clin Cancer Res*, 1999, **5**: 461 - 469
- [9] Larsen CP, Pearson TC. The CD40 pathway in allograft rejection, acceptance, and tolerance. *Curr Opin Immunol*, 1997, **9**: 641 - 647
- [10] Elwood ET, Larson CP, Cho HR et al. Prolonged acceptance of concordant and discordant xenografts with combined CD40 and CD28 pathway blockade. *Transplantation*, 1998, **65**: 1422 - 1428
- [11] Sun H, Subbotin V, Chen C et al. Prevention of chronic rejection in mouse aortic allografts by combined treatment with CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand monoclonal antibody. *Transplantation*, 1997, **4**: 1838 - 1843
- [12] Requirements for the promotion of allogeneic engraftment by anti-CD154(anti-CD40L) monoclonal antibody under nonmyeloablative conditions. *Blood*, 2001, **98**(2): 467 - 474
- [13] Zhu J(朱江), Wu XF(吴祥甫). Research progress and application of insect baculovirus expression system. *Acta Sericologica Sinica*(蚕业科学) 2003, **29**(2): 114 - 119
- [14] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor-Laboratory Press. 2001, pp. 26 - 118, 611 - 627
- [15] Peng JX(彭建新). The development of humanized antibody technology. *Shanghai Journal of Immunology*(上海免疫学杂志), 2001, **3**(2): 13 - 16
- [16] Hou L(侯理理), Jiang S(蒋昉), Shen WY(沈卫英) et al. The expression of recombinant human follicular hormone in insect cells. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*(实验生物学报), 2003, **4**: 33 - 35
- [17] Chen YX(陈英旭), Liu H(刘和), Zhang WB(张文波) et al. A novel tri-primer PCR method (TP-PCR) for rapid construction of *fpg* gene. *J Microbiol Methods* 2004, **56**(3): 359 - 364
- [18] Liu H(刘和), Chen YX(陈英旭), Zhang WB(张文波) et al. Construction of a fused *fpg* gene by using TP-PCR method. *Hereditas* 2004, **26**(4): 525 - 528
- [19] Deng CY, Song GS, Xu JW et al. Increasing accumulation level of foreign protein in transgenic plants through protein targeting. *Acta Botanica Sinica*(植物学报) 2003, **45**(9): 1084 - 1089
- [20] Etienne Leygue, Helmut Dotzlaw, Peter H et al. Watson expression of estrogen receptor $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 5$ messenger RNAs in human breast tissue. *Cancer research*, 1999, **59**: 1175 - 1179
- [21] Deng CY, Song GS, Xu JW et al. A novel three primers PCR (TP-PCR) method to obtain recombinant DNA molecule independent of restriction enzyme. *Chinese Science Bulletin*, 2002, **47**(24): 2067 - 2070
- [22] Falk M, Fröster U, Vojtkova M. Methods of determination of the number of CTG/CAG repeats in trinucleotide repeats in the human genome. *Cas Lek Cesk*, 2003, **142**(10): 609 - 614