

抗人 CD28 单链抗体基因的构建及在 BmN 细胞和家蚕中的表达 Construction of Anti-CD28 Single Chain Antibody Genes and Expression of the ScFv in BmN Cells and the Larvae of *Bombyx mori*

朱 艳^{1‡}, 郑峰丰^{1‡}, 陈永井², 邱玉华², 朱 江^{1*}

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

1 苏州大学生命科学学院, 苏州 215123

2 苏州大学医学生物技术研究所, 苏州 215007

1 Life Sciences School, Suzhou University, Suzhou 215123, China

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

摘 要 采用 TP-PCR 法, 将抗人 CD28 单链抗体的重、轻链可变区基因和人工设计的昆虫杆状病毒多角体蛋白基因(*ph*)偏好的连接肽序列, 拼接成抗人 CD28 单链抗体(抗 CD28-ScFv)基因, 并将其插入昆虫杆状病毒转移载体 pBacPAK8 的 *ph* 启动子, 构建成重组转移载体 pBacPAK8/CD28-ScFv。为便于表达产物的纯化, 在 CD28-ScFv 的 C 端增加了 6 × His tag 序列。通过脂质体介导法将重组转移载体 pBacPAK8/CD28-ScFv 和线性化病毒 Bm-BacPAK6 共转染 BmN 细胞, 经空斑分析和蓝白斑筛选, 获得重组杆状病毒 Bm-BacPAK6 CD28-ScFv。将重组病毒 Bm-BacPAK6 CD28-ScFv 感染 BmN 细胞和 5 龄家蚕, SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析表明, 在分子量约为 28kD 处有一表达带。BmN 细胞的表达始于 24h, 表达峰在 72h, 96h 时表达量开始下降, 而 5 龄家蚕的表达始于 48h, 表达峰在 120h。结果证明, 抗人 CD28 单链抗体基因在 BmN 细胞和家蚕中得到了特异性表达。上述研究成果为抗人 CD28 基因工程抗体的研制奠定了基础。

关键词 CD28, 单链抗体, BmN 细胞, 家蚕, 真核表达

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0577-07

Abstract The V_H and V_L gene fragments of anti-CD28 mAb were combined to form anti-CD28 ScFv gene by using TP-PCR method. Sequence analysis showed that 6 × His tag was added to it for the ease of purification and the V_H and V_L gene fragments were connected by a linker containing 15 amino acids which are biased by the baculovirus promoter, *ph*. Then ScFv gene fragment was inserted into baculovirus transfer vector pBacPAK8. The recombinant transfer vector, pBacPAK8/CD28-ScFv was constructed successfully. The pBacPAK8/CD28-ScFv and the linear Bm-BacPAK6 were co-transfected into the cell line of *Bombyx mori* (BmN) with the help of Lipofectin, then the product was purified by plaque assay and identified by PCR method. The recombinant virus, Bm-BacPAK6 CD28-ScFv, was obtained successfully. The BmN cells and the larvae of *Bombyx mori* were infected by the recombinant baculovirus and harvested every 24h postinfection. SDS-PAGE and Western Blotting analysis

Received: November 9, 2006; Accepted: December 12, 2006.

This work was supported by the grants from the Natural Science Foundation of Jiangsu Province and a grant from the Higher Education High-Tech development of Jiangsu Province (No. BK2004203, No. JHB05-45).

‡ 二人在研究中的贡献相同。

* Corresponding author. Tel: +86-512-65880278; Fax: +86-512-65880278; E-mail: zjiang@suda.edu.cn

江苏省自然科学基金(No. BK2004203)及江苏省高校高新技术发展基金(No. JHB05-45)

confirmed the expression of *ScFv* with the molecular weight of about 28kD. The expression in BmN cells was detected 24h post infection and it peaked at 72h, while in the larvae of *Bombyx mori*, the expression was detected 48h post infection and it peaked at 120h.

Key words CD28 single-chain Fv antibody, BmN cell, *Bombyx mori*, eukaryotic expression

T 细胞的活化需要两个信号: 抗原特异性的第一信号和协同刺激信号。在已发现介导协同刺激信号的分子中, B7/CD28 是最基本的协同刺激分子, 而大多数肿瘤细胞缺乏或低表达 B7 分子, 从而导致不能有效激发机体的抗肿瘤免疫应答, 这可能是肿瘤逃逸免疫监视的重要原因之一^[1]。研究表明, 抗 CD28 激发型抗体可以代替 B7 分子协同第一信号激活 T 细胞, 激发其抗肿瘤效应^[2-4]。针对 CD28 分子的多重肿瘤治疗策略已成为研究的热点, 抗 CD28 激发型单抗有望成为有效治疗恶性肿瘤的生物制剂。由于鼠源性单抗在人体使用后可产生人抗鼠抗体 (HAMA), 分子量大, 不能有效进入病灶部位, 临床使用受到限制。而单链抗体 (single chain Fv, ScFv) 因其分子小, 实体组织穿透力强, 血浆半衰期短, 因而在临床疾病的诊断和治疗中具有重要的应用价值^[5-8]。

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 20 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, 表达产物具有天然的生物活性而受到国内外广泛关注^[9]。本研究在成功建立稳定分泌鼠抗人 CD28 单抗的杂交瘤细胞株并对抗体特性进行鉴定基础上, 以杆状病毒为载体, 采用图 1 所示的策略, 拼接抗人 CD28 人鼠单链抗体基因, 构建了昆虫杆状病毒重组转移载体 pBacPAK8/CD28-ScFv, 并成功地在家蚕细胞 (BmN) 和蚕体中进行了表达, 上述成果为抗人 CD28 人鼠单链抗体抗肿瘤效应研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、病毒、菌株、细胞和家蚕: 昆虫杆状病毒转移载体 pBacPAK8、线性化病毒 Bm-BacPAK6、BmN 细胞由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所吴祥甫教授惠赠, 苏州大学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、轻链可变区基因片段的质粒均由苏州大学医学生物技术研究所保存; 5

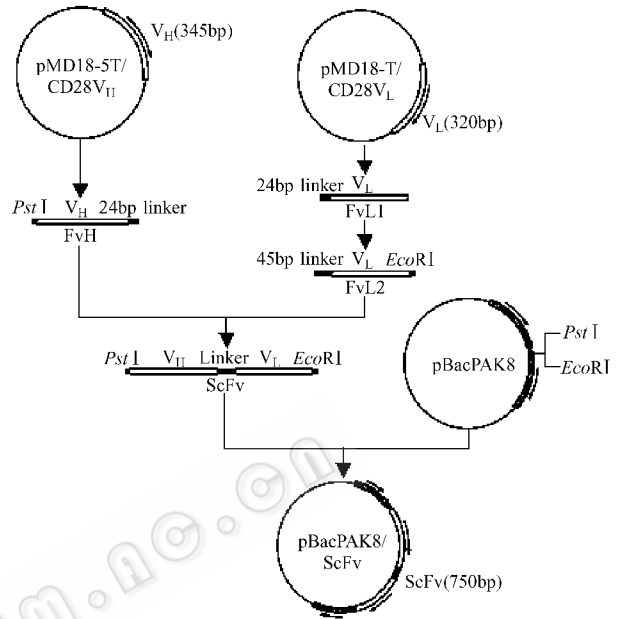


图 1 昆虫杆状病毒重组转移载体 pBacPAK8/CD28-ScFv 的构建策略图

Fig. 1 Construction of recombinant transfer vector pBacPAK8/CD28-ScFv

龄家蚕 (吴花 × 许星) 由苏州大学遗传与基因工程实验室提供。

1.1.2 工具酶与试剂: LA Taq DNA 聚合酶、Pyrobest DNA 聚合酶、限制酶 *EcoR* I, *Bam*H I, *Hind* III, *Pst* I, *Bsu*36 I (*Eco*R81) 等均自 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; TC-100 培养基、胎牛血清 FBS 购自 INVITROGEN 公司; 鼠抗 His 单克隆抗体, NOVAGEN 公司产品; 羊抗鼠 IgG-HRP, TIANGEN 公司产品。

1.1.3 引物设计: FvH-A: 5'-GTC CTG CAG ATG GTG CAG CT T CAG CAG TCA GGA CCT GAG-3' (含 *Pst* I 位点, 进行了定点突变 CT T:CTG→CTT); FvH-B: 5'-TCC GCC TCC GCT ACC TCC GCC GCC GGC TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT-3'; FvL-A1: 5'-GGA GGC TCT GGC GGA GGC GGT AGC GAC ATT GAG ATG ACC CAG TCT CCA-3'; FvL-B1: 5'-ATG GTG GTG ATG GTG GTG CCG TTT GGT TTC CAG CTT GGT GCC-3' (阴影部分代表 6 × His 的 tag

序列); FvL-A2: 5'-GGC GGC GGA GGT AGC GGA GGC GGA GGC TCT GGC GGA GGC GGT AGC-3'; FvL-B2: 5'-CTG GAA TTC TTA CCG ATG GTG GTG ATG GTG GTG CCG TTT-3' (下划线部分代表 *EcoR* I 位点, 阴影部分代表 6×His 的 tag 序列)。以上引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 抗人 CD28 单抗重、轻链可变区基因的克隆: 用小量质粒抽提试剂盒分别抽提含抗人 CD28 单抗重、轻链可变区基因的质粒 pMD18-T/CD28V_H、pMD18-T/CD28V_L, 并以此为模板, 用 Pyrobest 酶分别以 FvH-A 和 FvH-B、FvL-A1 和 FvL-B1 为引物扩增出抗人 CD28 单抗重、轻链可变区基因 FvH、FvL1。PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳后用胶回收试剂盒回收。

以割胶回收产物 FvL1 为模板, 用 LA Taq DNA 聚合酶以 FvL-A2 和 FvL-B2 为引物扩增出 FvL2。PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳后用胶回收试剂盒回收。

1.2.2 FvH 和 FvL2 基因的拼接: 分别以 FvH 和 FvL2 为模板, 用 LA Taq DNA 聚合酶将 FvH 和 FvL2 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℃ 预变性 1min, 94℃ 变性 45s, 50℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 1min, 扩增 10 个循环后, 加入引物 FvH-A 和 FvL-B2, 然后 94℃ 变性 1min, 60℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 扩增 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物为拼接成功的 *ScFv* 基因片段, 经 1% 的琼脂糖电泳后用胶回收试剂盒回收。

1.2.3 昆虫杆状病毒重组转移载体 pBacPAK8/CD28-*ScFv* 的构建及筛选: 将上述 PCR 产物 *ScFv* 基因片段纯化后用 *EcoR* I 和 *Pst* I 进行双酶切, 37℃, 5h, 同时双酶切转移载体 pBacPAK8, 37℃, 5h, 割胶回收酶切后的目的片段, 连接、转化感受态细菌 Top10, 挑选、鉴定重组转移载体 pBacPAK8/CD28-*ScFv*, 筛选阳性克隆, 用 *EcoR* I 和 *Pst* I 进行双酶切及 PCR 鉴定。

1.2.4 序列测定: 基因序列测定由上海博亚生物技术有限公司使用 3730 测序仪进行。

1.2.5 病毒培养: 线性化病毒 Bm-BacPAK6 在 BmN 细胞中传代, 用 1MOI (multiplicity of infection, 感染复数) 的病毒感染 1×10^6 个 BmN 培养细胞, 28℃ 培养 48~72h 后收集上清, 12000r/min, 10min 去杂质, 分装密封后保存于 4℃ 备用。

1.2.6 Bm-BacPAK6 基因组 DNA 的制备: 根据 Wu 等^[10]的方法从感染的培养 BmN 细胞提取病毒 DNA, 溶于 TE (pH8.0) 的 Bm-BacPAK6 DNA 经浓度测定和电泳检查, 4℃ 保存待用。

1.2.7 Bm-BacPAK6 酶切线性化: 用 *Bsu*36 I 酶切上述提取的 Bm-BacPAK6 DNA, 37℃ 过夜。

1.2.8 Lipofectin 共转染: 根据朱江等^[11]的方法进行。转移质粒 pBacPAK8/*ScFv* DNA 用量为 2~5μg, 线性化 Bm-BacPAK6 DNA 用量为 0.5~1μg。经共转染的 BmN 细胞, 培养 4~5 d 后出现明显的病毒感染症状, 收集上清, 用于重组病毒筛选。

1.2.9 重组病毒的筛选: 将共转染上清液感染 BmN 细胞, 先用 35mm 培养皿进行空斑筛选, 再经 3 轮 96 孔板的蓝白斑筛选, 将最后一轮阳性斑接种到新的细胞瓶中, 进行重组病毒扩增。

1.2.10 重组病毒的 PCR 鉴定: 以提取的重组病毒 DNA 为模板, Bm-BacPAK6 DNA 为对照, 以引物 FvH 和引物 FvL2 进行重组病毒鉴定。

1.2.11 重组病毒的感染及细胞 BmN、家蚕表达样品制备: 用 Bm-BacPAK6-*ScFv* 分别感染对数生长期的 BmN 细胞及 5 龄家蚕, 每隔 24h 收集细胞及家蚕血淋巴。同时以接种了线性化病毒 Bm-BacPAK6 (96h) 的 BmN 细胞和家蚕作为对照。制备的细胞裂解物和家蚕血淋巴 -20℃ 保存备用。

1.2.12 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 检测: SDS-PAGE 按 Laemmli 的方法进行, 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%。将电泳分离后的凝胶转移至硝酸纤维素膜上, 加入封闭液室温温育 1h。用鼠抗 His-tag 抗体室温孵育 1h, TTBS 充分洗涤 3 次后, 加入稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 多抗, 室温孵育 1h, TTBS 洗涤 3 次, 再用显色液显色。

2 结果与分析

2.1 鼠抗人 CD28 单抗重、轻链可变区基因的扩增: 根据设计的引物 FvH-A 和 FvH-B、FvL-A1 和 FvL-B1, 分别从 pMD18-T/CD28V_H、pMD18-T/CD28V_L 各成功扩增出 1 条大小在 250~500bp 之间的目的片段 (FvH 为 380bp, FvL1 为 344bp), 且条带单一, 无非特异性 (图 2A)。

序列测定结果显示, FvH 和 FvL1 DNA 序列与理论值一致, 无任何碱基突变。FvH 实现了定点突变

CTT → CTC → CTT, 成功将 *Pst* I 位点突变。进一步

以 FvL1 为模板, FvL-A2 和 FvL-B2 为引物, 成功扩增出 1 条大小在 380bp 左右的目的片段, 与理论值大小一致(图 2B)。

2.2 FvH 和 FvL2 基因的融合拼接

分别以 FvH 和 FvL2 为模板, 用 LA Taq DNA 聚合酶拼接 FvH 和 FvL2, 成功扩增出 1 条大小在 750 左右的目的片段(ScFv 为 750bp), 且条带单一, 无非特异性(图 2C)。经上海博亚公司测序, 结果显示, 拼接获得的抗人 CD28 人鼠单链抗体(ScFv)基因与设计单链抗体基因分子大小一致, 大小为 750bp, 无任何碱基突变。

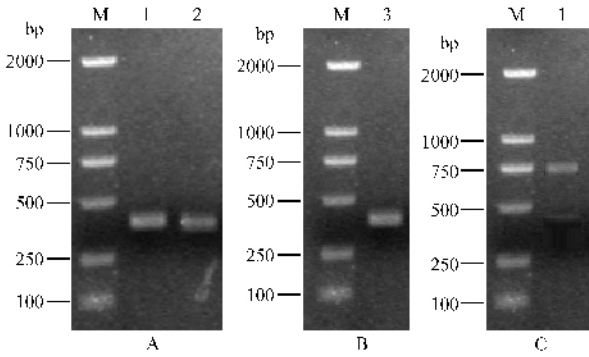


图 2 抗人 CD28 单克隆抗体可变区基因 FvH 和 FvL1 PCR 扩增(A); FvL2 PCR 扩增(B); 可变区基因(FvH, FvL2)拼接产物抗人 CD28 人鼠单链抗体(ScFv)基因扩增(C)

Fig.2 The amplification of variable region gene FvH and FvL1 of anti-human CD28 monoclonal antibody(A); the amplification of variable region gene FvL2(B); PCR product of anti-human CD28 ScFv(C)

M: DNA molecular weight marker(DL2000); 1: FvH(345bp); 2: FvL1(344bp); 3: FvL2(380bp); M: DNA molecular weight marker(DL2000); 1: ScFv(750bp).

2.3 昆虫杆状病毒重组转移载体 pBacPAK8/CD28-ScFv 的获得

将纯化的 ScFv 基因片段与转移载体 pBacPAK8 分别进行 EcoR I 和 Pst I 双酶切, 回收后进行连接并转化感受态细菌 Top10, 挑选阳性克隆, 进行酶切及 PCR 鉴定(图 3)。电泳结果显示 ScFv 基因片段成功克隆至转移载体 pBacPAK8。

2.4 抗人 CD28 单链抗体基因的序列分析

从正反两个方向分别测定 V_H 和 V_L DNA 序列, 结果显示, 序列全长 735bp, 其中包括 V_H 序列 345bp; V_L 序列 320bp 和连接肽序列 45bp; 在抗体链段的 C 端增加了 6 × His 的 tag 序列, 并成功实现了定点突变 CTT:CTG → CTT。测序结果显示抗人 CD28 ScFv 基因序列与理论值一致, 无任何碱基突变。

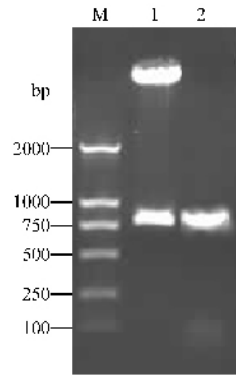


图 3 重组昆虫转移载体 pBacPAK8/CD28-ScFv 的酶切和 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of recombinant insect baculovirus transfer vector by restriction and PCR

M: DNA molecular weight marker(DL2000); 1: restriction digestion of pBacPAK-8/CD28-ScFv 2: PCR product of ScFv.

2.5 共转染和重组病毒的筛选、鉴定

病毒 Bm-BacPAK6 提取后经 Bsu36 I 酶切线性化, 线性化 Bm-BacPAK6 DNA 与 pBacPAK8/CD28-ScFv 按 1:5 共转染 BmN 细胞, 5d 后细胞局部变圆, 出现病毒感染症状, 取共转染上清转接另一瓶正常 Bm-N 细胞, 4d 后开始发病, 感染细胞核染色质浓缩、核仁增大, 细胞内出现较多折光较强的颗粒物, 细胞破碎悬浮, 可见已经发生同源重组(图 4A)。

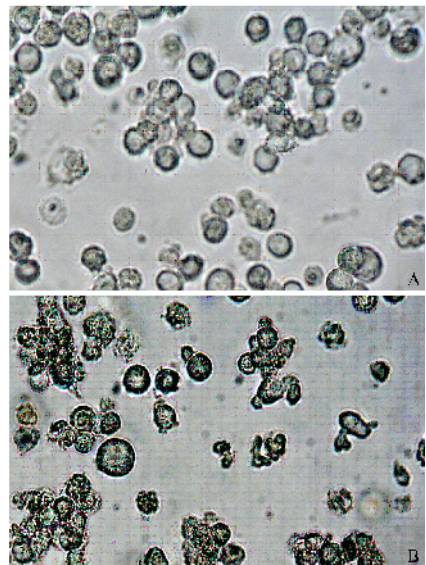


图 4 重组转移载体和 Bm-BacPAK6 共转染 BmN 细胞(A); 筛选的重组病毒感染 BmN 细胞 96h(B)

Fig. 4 Co-transfection of Bm-BacPAK8/ScFv and Bm-BacPAK6(A); BmN cell infected with Bm-BacPAK6 CD28-ScFv for 96h(B)

将共转染上清按设定要求稀释并感染 BmN 单层细胞, 进行空斑筛选。重组病毒以感染细胞为中心对四周细胞进行感染, 而可线性化病毒的 BmN

BacPAK6 感染细胞后几乎每个细胞都出现感病症状。挑取数个空斑病毒,96 孔板培养 3d 后加入 X-gal 大部分未出现变蓝现象,表明第一轮筛选即可产生不表达 β -半乳糖苷酶的重组病毒株。选取未出现变蓝现象的 2 个病毒株,进行第二轮和第三轮筛选,最后用挑选的阳性空斑扩增病毒。

重组病毒感染 25cm² 培养瓶中的 BmN 细胞,感染细胞形状首先由原来的多梭形变为圆形,随后核染色质浓缩、核仁增大、数目增多,最后细胞内出现较多的颗粒物,细胞离壁悬浮。96h 后细胞病变的效果如图 4B 所示。

PCR 检测结果表明,经三轮空斑筛选的阳性重组病毒即为所需的重组病毒 Bm-BacPAK6 CD28-ScFv。

2.6 CD28-ScFv 基因在 BmN 细胞中的表达及表达产物的鉴定

将 MOI 约为 5 ~ 10 的重组毒株 Bm-BacPAK6 CD28-ScFv 及 Bm-BacPAK6 分别感染对数生长期的 BmN 细胞,0h、24h、48h、72h、96h 分别收取病毒感染的细胞,以 Bm-BacPAK6 感染 96h 的细胞为对照。病毒感染 24h 时细胞开始出现病变症状,部分 BmN 细胞形状由原来的多梭形变为圆形,但尚有部分细胞仍呈梭形,48h 时感染细胞核染色质浓缩、核仁增大、数目增多,72h 时细胞内出现较多的颗粒物,大部分细胞离壁悬浮,96h 时全部细胞离壁悬浮,部分细胞开始破裂。

表达产物经处理后进行 SDS-PAGE 检测,结果显示,感染后 24h,重组病毒感染区就可见到分子量约 28kD 的蛋白条带,随时间推移,表达量增加,72h 时表达量最大(图 5A)。进一步的 Western Blotting 分析表明,Bm-BacPAK6 CD28-ScFv 感染 24h 时,细胞表达蛋白中就有单链抗体基因表达,72h 时表达量最大,96h 时表达量开始下降,而 Bm-BacPAK6 毒株的免疫印迹结果为阴性(图 5B)。实验证明,BmN 细胞所表达的蛋白具有 His 抗性,表达产物即为预期的单链抗体 CD28-ScFv。

2.7 CD28-ScFv 基因在家蚕中的表达及表达产物的鉴定

用重组毒株 Bm-BacPAK6 CD28-ScFv 及 Bm-BacPAK6 分别接种家蚕,每隔 24h 收取感染家蚕的血淋巴直至 120h,同时收取 120h 的 Bm-BacPAK6 感染的家蚕血淋巴作为对照。表达产物经处理后进行 SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析,尽管 SDS-PAGE 图谱中不能见到清晰的表达条带,但 Western Blotting

分析结果表明,感染后 48h 重组病毒感染区就可见到分子量约 28kD 的蛋白条带,随时间推移,表达量增加,120h 时表达量最大(图 6 A、B)。家蚕所表达的蛋白具有 His 抗性,其表达谱同 BmN 细胞中的相似,但表达峰在 120h,对照的免疫印迹结果为阴性。

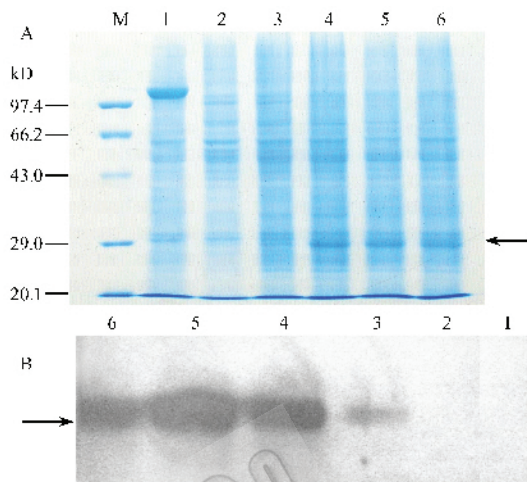


图 5 ScFv 基因在 BmN 细胞中表达产物的 SDS-PAGE 分析(A)和 Western Blotting 分析(B)

Fig.5 SDS-PAGE (A) and Western Blotting (B) analysis of ScFv products expressed in BmN

A. M :protein marker ;1 :Bm-BacPAK6 ;2 0h ;3 24h ;4 48h ;5 72h ;6 :96h ;B. 1 :control ;2 0h ;3 24h ;4 48h ;5 72h ;6 96h.

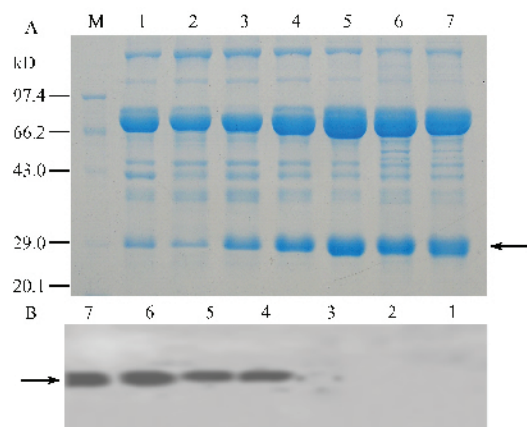


图 6 ScFv 基因在家蚕中表达产物的 SDS-PAGE 分析(A)和 Western Blotting 分析(B)

Fig.6 SDS-PAGE (A) and Western Blotting (B) analysis of ScFv products expressed in BmN

A. M :protein marker ;1 :Bm-BacPAK6 ;2 0h ;3 24h ;4 48h ;5 72h ;6 :96h ;7 :120h ;B. 1 :control ;2 0h ;3 24h ;4 48h ;5 72h ;6 96h ;7 :120h.

3 讨论

肿瘤的生物治疗已经成为当今研究的热点。机体在肿瘤状态下,肿瘤特异性 T 细胞(CTL)处于免疫耐受状态,CD28 激活型单抗在体内、外均可有效

逆转 T 细胞的耐受,再次激发其抗肿瘤效应。近年来,利用 CD28 激发型单抗单独或联合 CD3 单抗或细胞因子 IL-2 等扩增肿瘤特异性 CTL 的研究正在日益深入^[12-14]。同时,器官移植的基础和应用研究也获得了很大突破,目前特异性免疫抑制剂的开发研制是移植免疫的研究热点。越来越多的研究表明,通过特异性阻断协同刺激信号 B7/CD28 以及 CD40/CD40L 的传导,可获得外周性免疫耐受^[15,16]。实验证实,CD28 阻断型抗体的运用,可有效延长移植物的存活时间,若同时与 CD40L 单抗联合使用,效果更好^[17]。因此,鉴于单链抗体在临床治疗方面的独特优势,本实验成功构建了抗人 CD28 单链抗体基因,并在昆虫细胞和家蚕中表达,为抗人 CD28 单链抗体在今后临床治疗的研究奠定了基础。

pBacPAK8 的启动子后有一 *Pst* I 和 *Eco*R I 的克隆位点,由于抗人 CD28 单链抗体重链可变区 (V_H) 基因也含有一个 *Pst* I 位点,所以在引物设计时进行了定点突变 (CT \square T :CTG→CTT)。为避免引入额外的密码子产生变异的氨基酸,本研究不引入新的酶切位点而直接采用 TP-PCR 的方法快速实现了两个基因的融合拼接。TP-PCR 特别适用于没有合适酶切位点情况下通过所设计的三对引物实现两基因的快速拼接^[18,19]。

无论原核生物还是真核生物,对同一氨基酸使用的密码子是有选择偏倚的 (bias in codon choice),本研究在设计连接肽时,根据昆虫密码子的使用频率,连接肽的密码子大部分采用了昆虫杆状病毒多角体蛋白基因的偏爱密码子^[20]。由于 ScFv 仅为抗体分子可变区片段,为了便于纯化和检测表达产物,设计单链抗体时,在抗体链段的 C 端增加了 6 × His tag 序列。

SDS-PAGE 电泳和 Western Blotting 分析显示,重组病毒 Bm-BacPAK6 CD28-ScFv 在 BmN 细胞和家蚕中得到了融合表达,Bm-BacPAK6 CD28-ScFv 感染 BmN 细胞后 24h,CD28-ScFv 就开始表达,72h 时表达量最高,96h 时表达量开始下降;感染家蚕蚕体后 48h 亦开始表达,120h 时表达量最高。Bm-BacPAK6 CD28-ScFv 在 BmN 细胞和家蚕中的表达谱与大多数以家蚕为生物反应器表达外源基因的情况相似。表达的目的蛋白分子量的理论值应为 25.6kD,但是,实际表达的 CD28-ScFv 比理论值稍大,分子量的增加可能与 CD28-ScFv 的糖基化相关,而糖基化的鉴定、糖基化的种类和程度尚待进一步研究。家蚕 5

龄幼虫血淋巴蛋白中有一群分子量 28 ~ 32kD 的小分子脂蛋白,SDS-PAGE 电泳中不能清楚地见到 CD28-ScFv 的表达条带,可能是由于该表达条带被小分子脂蛋白覆盖的缘故^[21]。

目前单链抗体及其融合蛋白的研制尚处在体外实验和动物模型阶段,进入临床研究和利用的还较少。主要存在的问题有:大量生产有活性的可溶性蛋白技术尚不成熟,包涵体的复性困难,单链抗体的稳定性不够,在体内易降解;鼠源抗体的免疫原性;单链抗体与功能蛋白(如各种毒素^[22]等)的连接要保持二者的活性,对连接链的要求较高。目前有将 V_H 与 V_L 的适当部位各引入一半胱氨酸,形成二硫键稳定的 Fv (DsFv),其稳定性和结合能力比 ScFv 高^[23]。为降低免疫原性,采用噬菌体库直接制备人源抗体以及表位印膜选择构建人抗体库,再用抗原进行选择可制备人源单链抗体。相信随着分子生物学技术的迅速发展,将会解决现在的难题,制备更多、更好的基因工程产品应用于临床。

Bm-BacPAK6 CD28-ScFv 在 BmN 细胞及家蚕体内表达产物的分离纯化以及 CD28-ScFv 的生物学活性分析将是我們继续探讨的问题。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Zheng P, Supria S, Guo Y, et al. Two mechanisms for tumor evasion of preexisting cytotoxic T cell responses. *Cancer Research*, 1999, **59**: 346 - 347.
- [2] Qiu YH (邱玉华), Yu GH (於葛华), Chen YJ (陈永井), et al. The T cells directly by the against CD28 monoclonal antibody and its epitopes. *ShangHai Journal of Immunology* (上海免疫学杂志), 2003 **23**(5): 324 - 326.
- [3] Qiu YH (邱玉华), Zhao WB (赵文宝), Sun ZW (孙中文), et al. Study on the apoptosis of multiple myeloma cells induced by agonist monoclonal antibody against human CD28. *ShangHai Journal of Immunology* (上海免疫学杂志) 2003 **23**(6): 378 - 381.
- [4] Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nature Review Immunol* 2002 **2**(2): 116 - 126.
- [5] Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. *Nature*, 1991, **349**: 293 - 299.
- [6] Zhao BF (赵宝峰), Wang XB (王祥斌), Zhao Q (赵琦), et al. Soluble expression, purification and bioactivity assay of anti-ovarian carcinoma anti-CD3 anti-CD28VH single chain trispicific antibody. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物学和免疫学杂志) 2003 **23**(6): 476 - 479.
- [7] Grosse HL, Hartlapp I, Marwan W, et al. A recombinant bispecific single chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28 stimulation and tumor cell killing. *Eur J Immunol*, 2003, **33**(5):

- [8] Nieroda CA ,Milenic DE ,Carrasquillo JA ,*et al.* Improved tumor radioimmuno-detection using a single chain Fv and gamma-interferon: Potential clinical applications for radioimmunoguided surgery and gamma scanning. *Cancer Res* ,1995 ,**55**(13):285 - 288 .
- [9] Zhu J (朱江) ,Wu XF (吴祥甫) . Research progress and application prospect of insect baculovirus expression system. *Acta Sericologica Sinica*(蚕业科学)2003 ,**29**(2):114 - 120 .
- [10] Wu F ,Lavina B ,Ikeda M ,*et al.* Cloning and biological characterization of *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae) in nucleopolyhedrovirus isolated from China. *J Seric Sci Jpn* ,2000 ,**69**(3):177 - 189 .
- [11] Zhu J (朱江) ,Jiang XY (姜秀英) ,Cao GL (曹广力) ,*et al.* Expression of 6 × His-porcine growth hormone fusion gene in *Bombyx mori* bioreactor. *Acta Sericologica Sinica* 2004 ,**30**(4):376 - 381 .
- [12] Michael T ,Gabriele H ,Thomas H ,*et al.* CD28-induction of poliferation 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 .
- [13] 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 .
- [14] Li Q ,Fueman SA ,Bradford CR ,*et al.* Expanded tumor-reactive CD4⁺ T cell responses to human cancers induced by secondary anti-CD3/anti-CD28 activation. *Clin Cancer Res* ,1999 ,**5** :461 - 469 .
- [15] Larsen CP ,Pearson TC . The CD40 pathway in allograft rejection , acceptance and tolerance. *Curr Opin Immunol* ,1997 ,**9** :641 - 647 .
- [16] Elwood ET ,Larsen CP ,Cho HR ,*et al.* Prolonged acceptance of concordant and discordant xenografts with combined CD40 and CD28 pathway blockade. *Transplantation* ,1998 ,**65** :1422 - 1428 .
- [17] Sun H ,Stubbs 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 .
- [18] Chen YX ,Liu H ,Zhang WB ,*et al.* A novel tri-primer PCR method (TP-PCR) for rapid construction of fpg gene. *J Microbiol Methods* ,2004 ,**56**(3):359 - 64 .
- [19] Zhu Y (朱艳) ,Chen YJ (陈永井) ,Qiu YH (邱玉华) ,*et al.* Construction of a recombinant baculovirus transfer vector with two promoters expressing the anti-human CD28 chimeric antibody by using TP-PCR method. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报)2005 ,**21**(5):832 - 836 .
- [20] Ayres MD ,Howard SC ,Kuzio J ,*et al.* The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* ,1994 ,**202** :586 - 602 .
- [21] Xiang ZH (向仲怀) . Biology of Sericulture(蚕丝生物学) , Beijing : China Forestry Publishing House(中国林业出版社) ,2005 .
- [22] Tang CH (唐彩华) ,Liu CZ (刘长征) . Application of recombinant single-chain antibody and its fusion protein to diagnosis and treatment for cancer. *Bulletin of Chinese Cancer*(中国肿瘤) ,2004 ,**13**(3):167 - 170 .
- [23] Fu Y (付勇) ,Liu YF (刘彦仿) ,Zhao J (赵君) ,*et al.* Construction and expression of disulfide-stabilized humanized scFv and hEDN recombinant immunotoxin fusion gene against hepatocellular carcinoma. *Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China*(西北国防医学杂志) ,2004 ,**25**(5):325 - 328 .