

效果. 把 IL-2 cDNA 转入肿瘤细胞制成转基因瘤苗, 可诱导肿瘤特异性细胞毒 T 淋巴细胞的活性, 增强 NK、LAK 细胞活性、诱导细胞因子如 TNF、IFN 等的分泌, 从而产生抗肿瘤效应^[4]. 上述作用尤其在清除术后残留癌细胞, 预防由其所引起的肿瘤复发、转移方面有重要临床应用价值.

骨肉瘤恶性程度高, 手术可切除局部绝大部分瘤细胞, 但对于残留的瘤细胞尚缺乏有效治疗手段. 转基因技术, 一方面可通过转入各种细胞因子, 通过增强机体免疫调节, 来杀伤残留细胞; 另一方面通过用转基因瘤细胞作为瘤苗来预防骨肉瘤术后复发. 我科调查骨肉瘤患者手术前后血清 IL-2 水平发现术后 IL-2 水平明显高于术前, 而且 IL-2 水平高者, 存活时间长 (待发表), 因此, IL-2 可作为骨肉瘤术后的辅助治疗手段. 我室把 IL-2 cDNA 转入人骨肉瘤细胞并获得表达, 目前正在进行高表达株筛选和转基因后瘤细胞生物活性变化研究, 并准备将 pDOR-IL-2 转染人外周淋巴细胞, 为骨肉瘤基因治疗创造条件.

参 考 文 献

- 1 Rosenberg S A, Lotze M T, Muul L M *et al.* New Engl J Med, 1987; **316**: 889
- 2 Rosenberg S A, Anderson W F, Blaese M *et al.* Annals of Surgery, 1993, **218** (4): 455
- 3 Foa R, Guarini A, Gansbacher B. Br J Cancer, 1992; **66**: 992
- 4 Rees R C, Writrout R H. Immunol Today, 1990; **11**: 36
- 5 Whiteside T L, Letessier E, Hirabayashi H *et al.* Cancer Res, 1993; **53**: 5654
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁等译, 分子

克隆实验指南, 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 19~23

- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁等译, 分子克隆实验指南, 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 55~56
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁等译, 分子克隆实验指南, 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 464~465
- 9 杨贵贞, 宋 迅, 田志刚等, 免疫生物工程纲要与技术. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1991: 47~48
- 10 Rosenberg S A, Aebersold P, Cornetta K *et al.* New Engl J Med, 1990; **323**: 570

Expression of Human IL-2 cDNA in the Human Osteosarcoma Cell Line. Zheng Qiang, Fan Qingyu, Yin Jianning, Hui Hongxiang (Department of Orthopedics, Tang Du Hospital of the 4th Military Medical University, Xi'an 710038, China).

Abstract The human IL-2 cDNA was cleaved from pHIG53 and inserted in the intermediate vector pSP-72 which has the restriction sites compatible with clone site of the expression vector pDOR-neo, then IL-2 cDNA was directionally inserted into the retroviral vector pDOR-neo to construct a eukaryotic expression vector. The vector was transfected into human osteosarcoma cell line by lipofectin. The IL-2 was bioassayed in the culture of tumor cell after selection of G418. The production of IL-2 was 50~800 U per 1×10^5 cells every 24 h, which makes it possible to carry out osteosarcoma gene therapy.

Key words interleukin-2, gene therapy, retroviral vector

人癌胚抗原单链抗体基因的构建和筛选

章美云 孔 健

(卫生部北京生物制品研究所, 北京 100024)

摘要 从分泌抗癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 单抗的杂交瘤细胞株 C50 中提取总 RNA,

逆转录成 cDNA, PCR 扩增分别得到抗体轻、重链可变区基因, 再利用两对 PCR 引物合成和扩增得到全单链抗体基因. 将含轻、重链可变区序列的 DNA 片段克隆于含噬菌体基因 III 的噬菌粒 pCANTAB 5. 重组克隆在噬菌体表面表达基因 III 与单链抗体的融合蛋白. 表达具抗原结合活性的单链抗体的重组噬菌体可以通过亲和筛选的方法筛选得到并富集. 利用该方法我们可以从许多分泌不同抗体的杂交瘤细胞 RNA 中快速克隆和筛选功能性抗体可变区基因.

关键词 聚合酶链反应, 抗体可变区基因, 重组噬菌体, 癌胚抗原

抗体轻、重链可变区基因的克隆和筛选是研究基因工程抗体的基础. 抗体可变区基因的分离有多种途径, 从杂交瘤细胞的基因文库中筛选和鉴别是一条最基本的途径. 由于免疫球蛋白基因在组织结构上的特殊性, 从基因文库中获得功能性的可变区基因远较筛选到别的蛋白质的基因困难; 用特异性引物延伸法直接合成可变区 cDNA, 克服了从 cDNA 文库中筛选繁琐的缺点, 用合成的互补于恒定区基因 5' 端的寡核苷酸作引物, 可以直接合成可变区的 cDNA, 再用 PCR 直接合成可变区 DNA, 这是一条最简便、快速获得可变区 DNA 的方法, 也是目前广泛采用的方法^[1~3].

功能性抗体可变区基因的筛选, 一般采用测序方法, 目的基因插入到适当的表达载体后, 再对诱导产生的目的蛋白进行检测. 而表面表达型重组噬菌体表达系统对目的基因的筛选与目的蛋白的检测同时进行; 利用免疫亲和筛选, 特异性高, 筛选量大, 快速方便^[4~10]. 本文利用 PCR 技术, 结合表面表达型噬菌体

载体的优点, 快速克隆并筛选得到了具抗原结合活性的癌胚抗原单链抗体基因.

1 材料与方法

1.1 材料

试验用噬菌粒 pCANTAB 5 购自 Pharmacia 公司. *E. Coli* TG1 菌种及 M13K07 辅助噬菌体为本室自存. 限制性内切酶和修饰酶购自德国 BM 公司. T7 DNA 测序试剂盒购自 Pharmacia 公司, (α -³²P)-dCTP 购自英国 Amersham 公司, DNA 合成试剂购自美国 ABI 公司. C50 抗癌胚抗原杂交瘤细胞株为本室所建^[11].

1.2 方法

1.2.1 引物的设计: 参照已知小鼠抗体轻重链可变区碱基序列, 设计合成轻重链可变区 5' 端及 3' 端引物 VH-5'、VH-3'、VL-5' 和 VL-3'. 含惰性连接子, 用于 VH 和 VL 连接的一对引物为 Linker-5' 和 Linker-3', 用于单链抗体基因扩增的一对引物为 Sc-5' 和 Sc-3'. 各引物的序列见表 1.

表 1 构建单链抗体基因的引物

引物	序列
VH-5'	5'-AGCCGGCCGAGGTTACCTGCAGCAGTCTTTGGC
VH-3'	5'-CACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTGCCCTTGACC
VL-5'	5'-GGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGC
VL-3'	5'-CCGCTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCTCCTCC
Linker-5	5'-GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGAGCTC
Linker-3	5'-CGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGT
Sc-5'	5'-AAGGAAGGCCCGAGCCGCGGAGGTTACCTGCAGCAGTCTTTGGC
	Sfi I
Sc-3'	5'-AGGATTCCGCGCCGCTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCTCC
	Not I

1.2.2 RNA 的提取与 cDNA 的合成: 方法参

照《分子克隆》所述. 逆转录引物为 VH-3' 或

VL-3'.

1.2.3 轻、重链可变区基因的 PCR 及回收: 100 μ l PCR 反应体系中含 VH-5'引物和 VH-3'引物或 VL-5'引物和 VL-3'引物各 50 pmol, 循环反应条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 循环 30 次后, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 Whatman DE-81 滤纸回收目的片段.

1.2.4 单链抗体基因的 PCR 及产物的纯化: 取等摩尔数的轻、重链可变区扩增产物和含连接子的连接引物 (Linker-5'和 Linker-3') 混合物 (1:1:1) 进行连接反应. 连接反应条件为 94 $^{\circ}$ C 60 s, 63 $^{\circ}$ C 240 s, 循环 7 次后, 直接以 Sc-5'和 Sc-3'为引物, 进行单链基因的 PCR 扩增, 循环条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s, 循环 30 次. 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 750 bp 左右的目的产物, 用 Microspin 柱纯化.

1.2.5 噬菌体抗体基因库的构建: 目的产物依次用 DNA 限制性内切酶 Sfi I 和 Not I 进行降解, Microspin 柱纯化后与 pCANTAB 5/ (Sfi I -Not I) 消化的载体大片段进行粘末端连接, 转化 TG1 感受态细胞, 通过 M13K07 辅助噬菌体援救, 组建噬菌体抗体基因库. 涂板法测定重组噬菌体滴度.

1.2.6 捕获与抗原反应的抗体重组噬菌体: 取直径为 5 cm 的塑料培养皿, 包被 5 ml CEA 抗原 (10 μ g/ml), 捕获能与 CEA 抗原结合的重组噬菌体.

1.2.7 重组噬菌体的援救及富集: 常规法.

1.2.8 间接 ELISA: 10 μ g/ml CEA 抗原每孔包被 200 μ l, 间接法检测具抗原结合活性的抗体重组噬菌体克隆.

1.2.9 DNA 碱基序列测定: 采用 Sanger 双脱氧末端终止法.

2 结 果

2.1 抗体可变区基因 PCR 产物的鉴定

以 pGEM DNA 分子质量标准 (Promega) 作对照, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增产物, 结果表明 PCR 扩增产物特异性

很好 (图 1).



图 1 轻、重链可变区基因的 PCR 产物

1: 重链可变区基因 PCR 产物; 2: pGEM DNA 分子质量标准; 3: 轻链可变区基因 PCR 产物.

2.2 单链抗体基因 PCR 产物的鉴定

扩增得到全长约 750 bp 的目的带 (图 2).



图 2 C50 单链抗体基因的 PCR 产物

1: pGEM DNA 分子质量标准; 2、3: C50 单链抗体基因 PCR 产物.

2.3 噬菌体抗体基因库的检定

援救法组建的噬菌体抗体基因库, 涂板法测定重组噬菌体的滴度为 2.2×10^{11} pfu/ml.

2.4 ELISA 检测

对 57 个重组噬菌体感染 TG1 而得到的噬菌体克隆进行了 ELISA 检测, 得到 4 个阳性显色孔, 编号分别为 4、31、42 和 50 号.

2.5 重组体酶切分析及序列测定

对 4、31、42 和 50 号重组噬菌粒进行了 Sfi I 和 Not I 双酶切分析, 证明 4 个克隆均含有 750 bp 左右的外源片段, 图 3 为其中 42 号克隆的双酶切结果, 我们对 42 号和 50 号克隆进行了序列测定, 以期对单链抗体的结构进行计算机模拟分析, 进一步进行改型抗体的研究, 两个克隆的碱基序列相同, 其碱基序列及所编码的氨基酸序列见图 4. 与已知的鼠抗体可变区基因序列相比, 我们发现它与抗卵巢癌细胞抗体 OVB3 具有较高的同源性.



图 3 pCANTAB 5-scFv 重组体的 Sfi I / Not I 双酶切鉴定

1: pGEM DNA 分子质量标准;
2: pCANTAB 5-scFv 重组体 (Sfi I / Not I 双酶切).

15	30	45	60
GAG GTT CAC CTG CAG CAG TCT TTG GCA GAG CTT GTG AGG TCA GGG GCC TCA GTC AAG TTG			
Glu Val His Leu Gln Gln Ser Leu Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala Ser Val Lys Leu			
75	90	105	120
TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA CAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAA CAG AGG			
Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys His Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg			
————— VH-CDR1 —————			
135	150	165	180
CCT GAA CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA TGG ATT AAT CCT GAG AAT GTT GAT ACT GAA TAT			
Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asn Pro Glu Asn Val Asp Thr Glu Tyr			
————— VH-CDR2 —————			
195	210	225	240
GCC CCC AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AAC ACA GCC TAC			
Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
255	270	285	300
CTG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC TGT AAT CAC TAT AGG			
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn His Tyr Arg			
315	330	345	360
TAC GCC GTA GGG GGT GCT TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGC ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA			
Tyr Ala Val Gly Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
————— VH-CDR3 —————			
375	390	405	420
GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT			
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr			
————— Linker peptide —————			
435	450	465	480
CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC			
Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala			
495	510	525	540
AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATA CAC TGG TAT CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA			
Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg			
————— VL-CDR1 —————			
555	570	585	600
TGG GTT TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG			
Trp Val Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly			
————— VL-CDR2 —————			
615	630	645	660
TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC ACC ATG GAG GCT GAA GTAGCT GCC ACT TAT			
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu Val Ala Ala Thr Tyr			
675	690	705	720
TAC TGC CAG CAG TGG AAT AAT AAC CCA TAC ACG TTC GGA GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATA			
Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Asn Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
————— VL-CDR3 —————			
AAA			
Lys			

图 4 抗 CEA 单链抗体基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

3 讨 论

本方法具有快速简便的特点, 从 RNA 的提取到筛选到阳性克隆, 全部实验在两周内即可完成。

利用本方法可以从多种分泌不同抗体的杂交瘤细胞 RNA 中快速克隆和筛选功能性抗体可变区基因, 也可以直接从免疫脾细胞或外周血 B 淋巴细胞提取 RNA 进行可变区基因的克隆和筛选^[7]。如果不是从杂交瘤 RNA 进行 PCR 扩增, 那么在实验中就需进行多次捕获筛选, 以便得到具有较高抗原亲和力的单链抗体。

功能性抗 CEA 单链抗体基因的获得, 为我们进一步研制人源化抗 CEA 抗体、改型抗体及多功能抗体奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Chaudhary V K, Batra J K, Gallo M G *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **87**: 1066
- 2 Davis G T, Bedzyk W D, Voss E W *et al.* Bio/Technology, 1991, **9**: 165
- 3 Jones T J, Bending M M. Bio/Technology, 1991; **9**: 88
- 4 Smith G P. Science, 1985; **228**: 1315
- 5 McCafferty J, Griffiths A D, Winter G *et al.* Nature, 1990; **348**: 552
- 6 Cwirla S E, Peters E A, Barrett R W *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **87**: 6378
- 7 Marks J D, Hoogenboom H R, Bonnert T P *et al.* J Mol Biol, 1991; **222**: 581
- 8 Breitling F, Dubel S, Seehaus T *et al.* Gene, 1991; **104**: 147
- 9 Dubel S, Breitling F, Fuchs P *et al.* Gene, 1993; **128**: 97
- 10 Hogrefe H H, Mullinax R L, Lovejoy A E *et al.* Gene, 1993; **128**: 119
- 11 卢宝兰, 强来英, 程 明等. 生物工程学报, 1986; **2**: 37

Kong Jian (*National Vaccine and Serum Institute, Beijing 100024, China*).

Abstract A strategy based on polymerase chain reaction (PCR) and a phagedisplay system for the rapid method for constructing and screening functional single chain antibody genes was reported. Total RNA from a hybridoma (C50) producing an antibody that reacts with carcinoembryonic antigen (CEA) was used as a template to make the first strand of a cDNA, light- and heavy-chain variable-region genes were separately amplified by PCR. Then whole single chain antibody gene was synthesized and amplified by using two sets of DNA primers that (1) hybridized to the ends of the light- and heavy-chain variable regions, (2) encoded a linker peptide, and (3) contained appropriate restriction enzyme sites for cloning. After 30 cycles of PCR, the DNA fragments containing sequences encoding the light- and heavy-chain variable regions were cloned into pCANTAB 5 phagemid containing gene III of the phage. Clones encoding single-chain antibody was express on the surface of the phage as a fusion with gene III protein. Recombinant phage expressing anti-CEA single chain antibody which retained its antigen-binding capability was screened by affinity selection and enriched. By using this approach it should be possible to rapidly clone and screen the functional variable region sequences of many different antibodies from hybridoma RNA.

Key words PCR, variable-region antibody genes, recombinant phage, carcinoembryonic antigen

Construction and Screening of the Anti-CEA Single Chain Antibody Gene. Zhang Meiyun,