

研究快报

抗人 CD8 单抗 κ 轻链可变区基因的克隆和序列测定

杨安钢 吉昌华 韩 骅 杨立宏 苏成芝 许 辉 金伯泉

(第四军医大学生物化学教研室, 西安 710032) (第四军医大学免疫学教研室)

关键词 抗体, 单克隆, 免疫球蛋白 κ 链, 基因, 碱基序列

OK T8 杂交瘤细胞株从 American type culture collection (ATCC) 获得^[1], 产生抗人 CD8 分子的单克隆抗体 IgG2a (γ 2a, κ), 为了对这一鼠源性单抗进行基因工程改造, 我们首先克隆了该单抗的 κ 轻链可变区基因, 并测定了其碱基序列, 现将结果报道如下:

通过计算机查找并分析了已发表的几十株抗体的轻链可变区基因序列, 经比较其 5' 端保守序列和 J 区序列, 设计了一对 DNA 引物: GTGAATTCATGGACATCCAGATGACCCA-GTCTCC 和 CAGTCGACTAACGTTTGATC-TCCAGCTTGGTCCC, 用于扩增抗 CD8 单抗 κ 链可变区基因, 其中正向引物中含有 EcoRI 酶切位点和起始码, 反向引物中含有 SalI 酶切位点和终止码, 以便于 PCR 扩增产物的克隆和表达, 用异硫氰酸胍法从培养的杂交瘤细胞中提取总 RNA, 以寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸为引物, 反转录合成 cDNA. 以此 cDNA 为模板, 加入化学合成的轻链可变区引物进行 PCR 反应, 经过于 35—45 次循环, 扩增出轻链可变区基因片断, 以 EcoRI 和 SalI 双酶切位点将 PCR 产物克隆入 pUC19 质粒, 筛选出阳性克隆, 随机挑选 2 个克隆, 用链终止法进行 DNA 序列分析.

通过琼脂糖凝胶电泳可见长度约为 350bp 的 PCR 产物, 碱基序列分析结果表明, 两个阳性克隆序列完全一致, 其碱基序列及推导的氨基酸序列附后, 三个 CDR 区及两个引物的序列

均已标出, 包括引物在内该基因共长 336bp, 编码 112 个氨基酸.

分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株只产生一种抗体分子 (一种重链可变区和一种轻链可变区), 即只产生一种抗体的 mRNA. 以此 mRNA 反转录生成的 cDNA 为模板, 用根据 κ 链可变区序列设计的引物进行 PCR, 就只能扩增出该杂交瘤细胞所表达单抗的 V κ 基因. 我们所测定的抗 CD8 单克隆抗体 κ 链可变区基因与已发表的小鼠免疫球蛋白 κ 轻链可变区胚系基因 V κ -21B^[2] 相比, 同源性大于 95%, 表明所克隆 κ 链基因由 V κ -21B 重排而来.

CD8 分子是 T 淋巴细胞的表面分化抗原, 主要分布于细胞毒性 T 细胞和抑制性 T 细胞亚群, 鼠源性抗 CD8 单克隆抗体已被用于抑制骨髓移植抗宿主反应, 但其应用受到其免疫原性的限制. 本研究旨在构建抗 CD8 基因工程抗体, 以降低其免疫原性, 而构建基因工程抗体的首要步骤是得到抗体可变区基因. 本文报道了抗人 CD8 单抗轻链可变区基因的克隆和序列测定结果(图 1 见封二), 为下一步的研究工作奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Hoffman R A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; **77**: 4914
- 2 Heinrich G *et al.* *J Exp Med*, 1984; **159**: 417