

抗 CD5 单链抗体的基因构建、蛋白纯化及活性鉴定

林晓思, 许 健, 王生育, 颜江华

(厦门大学医学院 抗癌研究中心, 福建 厦门 361000)

摘要:目的 构建高表达的抗 CD5 单链抗体(scFv anti-CD5) 工程菌, 为开展以抗 CD5 单链抗体为构件的肿瘤免疫治疗研究奠定基础。方法 从 Genbank 中获得抗 CD5 单克隆抗体 H65 的重链可变区(VH) 和轻链可变区(VL) 的基因序列, 用连接肽的编码序列连接, 用重叠 PCR 技术获得目的基因, 酶切后插入 pET22b(+) 构成重组质粒。测序正确的重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) 诱导表达, 产物经 Ni-NTA 柱纯化后复性, 流式细胞术和 Western blotting 检测活性。结果 获得序列正确的重组质粒, 工程菌表达量高, 产物复性后具有识别 CD5 抗原的活性。结论 成功构建了高表达 scFv anti-CD5 的工程菌, 为 scFv anti-CD5 的应用奠定了基础。

关键词: CD5; 单链抗体; 基因; 表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1005-4678(2011)04-0261-04

Gene construction, protein purification and activity evaluation of scFv anti-CD5

LIN Xiao-si, XU Jian, WANG Sheng-yu, YAN Jiang-hua

(Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen 361000, China)

Abstract: Purpose To construct a genetic engineering *E. coli* strain with high expression level of scFv anti-CD5 and to lay the foundation for tumor immunotherapy using scFv anti-CD5 as a component. **Methods** VH and VL fragment of H65 (an anti-CD5 mAb) is acquired from Genbank, and then joined with a linker coding sequence, and the gene via overlapping PCR is constructed. The gene is digested and inserted into pET22b(+) to form a recombinant plasmid. The *E. coli* BL21(DE3) bear the plasmid with right sequence is induced with IPTG and the product is purified with Ni-NTA column, renatured, and subjected to activity analysis via FCM and Western blotting. **Results** The recombinant plasmid and the engineering *E. coli* strain with high expression level of scFv anti-CD5 were acquired. The expression products were able to recognize CD5 antigen after being renatured. **Conclusion** The acquisition of engineering *E. coli* strain with high expression level of scFv anti-CD5 would contribute to further application of scFv anti-CD5.

Key words: CD5; scFv; gene; expression

双特异抗体可以有效的将效应细胞富集到靶细胞周围, 增强对靶细胞的杀伤, 因而双特异抗体介导的免疫细胞治疗是一种很有前景的肿瘤治疗手段。CD5 是一种泛 T 细胞(pan T Cell) 表面标记, 在双特异性抗体介导 T 细胞对肿瘤靶向治疗的过程中, CD5 可以取代 CD3 和 FcR 作为双特异抗体在 T 细胞表面的结合点, 并消除这两者和配体交联后引发

的副作用^[1-2]。另一方面在 T 淋巴瘤中由于 CD5 的表达上调, 因此 CD5 也被选作治疗靶点^[3-4]。本文拟采用基因工程手段, 构建 scFv anti-CD5/pET22b(+) 重组质粒, 原核表达重组蛋白。为构建以 scFv anti-CD5 为构件的双特异抗体以及免疫偶联物提供物质前提, 并为其应用于肿瘤的免疫治疗提供基础。

1 材料

菌种 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* DH5 α 和质粒 pET22b(+)、Novagen 公司; 细胞株 EC304, 南京凯基生物技术有限公司; 细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK), 长春藤生物技术有限公司; Pfu DNA 聚合酶, 天根生物技术有限公司; *Nco* I 和 *Xho* I 内切酶、

收稿日期: 2010-03-01

基金项目: 国家自然科学基金(30973485); 福建省科技厅基金(2009R10020-1)

作者简介: 林晓思, 男, 硕士研究生, 主要从事生化制药研究, E-mail: linxiaosi@yahoo.com.cn; 颜江华, 男, 通信作者, 教授, 博士, Tel: 0592-2180587, E-mail: jhyan@xmu.edu.cn。

T4DNA 连接酶, NEB 公司; Ni-NTA agarose, GE 公司; HRP 标记抗 His-tag 兔多克隆抗体, 北京康维世纪生物技术有限公司; 异硫氰酸酯荧光素 (FITC), Amresco 公司。引物由上海生工合成。

EPICS XL 流式细胞仪, 美国 Beckman-Coulter 公司。

2 方法

2.1 重组质粒的构建

2.1.1 基因序列与引物设计 从 NCBI Genbank 里查到 DNA 序列 M90468 和 M90467, 扣除前面 66 bp 的 pelB 信号肽序列后得到的即是 anti-CD5 的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 的序列。在 VH 和 VL 之间插入 linker-(G4S)3 编码序列, 在 VH 的 5' 添加 Nco I 酶切位点, 在 VL 的 3' 端添加 Xho I 酶切位点, 并在整个基因两端添加保护碱基序列, 并通过 *E. coli* 高频率简并密码子取代原始序列中的稀有密码子, 设计出的目的基因 scFv anti-CD5 序列(共计 741 bp), 合成 10 条拼接引物 F1-R10, 以及一对扩增引物 F11 和 R11(表 1)。

2.1.2 重组质粒的构建 将 F1-R10 等 10 条拼接引物, 温育获得基因 scFv anti-CD5, 温育反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 68 °C 温育 2 h; 72 °C 延伸 10 min。加入 F11 和 R11 扩增目的基因, 扩增反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min; 33 个循环后, 72 °C 延伸 10 min, 对 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。鉴定后以 Nco I 和 Xho I 酶切 PCR 产物, 回收和纯化酶切产物, 在 T4 连接酶的作用下将其插入到经同种酶切的 pET22b(+) 中, 获得重组质粒并转化到 *E. coli* DH5 α 中。随机挑选转化子, 进行菌液 PCR 筛选, 选择 PCR 反应产物和理论设计值大小一致的克隆送上海 Invitrogen 公司测序。

2.2 重组蛋白在 *E. coli* 中的表达、纯化与复性

将测序正确的重组质粒 scFv anti-CD5/pET22b(+) 转化到 *E. coli* BL21(DE3), 挑取单菌落, 接种到含终浓度 50 μ g/mL 氨苄西林(Amp) 的 LB 培养液 3 mL 中, 37 °C, 250 r/min 振荡培养过夜; 再按 1:100 稀释至含终浓度 50 μ g/mL Amp 的 LB 培养液 300 mL 中, 37 °C 振荡培养至 A_{600} 为 0.6 ~ 0.8; 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 0.1 mmol/L, 37 °C, 250 r/min 诱导 6 h。包涵体溶解后的上清液, 用镍亲和色谱柱纯化, 操作过程参照 GE 公司提供的操作指南进行。纯化后的蛋白对含 1% PEG4000、0.4 mol/L 精氨酸的 100 mmol/L Tris 缓冲

液(pH 8.7)透析复性。

2.3 scFv anti-CD5 的 FITC 标记

对 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液透析后的 scFv anti-CD5 浓缩到 1 mL(约 200 μ g/mL), 往其中加入 1 mg/mL FITC 溶液 12 μ L, 置 4 °C 反应 4 h, 用超滤管 4 °C 离心重悬数次以去除游离的荧光素, 测得 A_{280} = 0.084, A_{495} = 0.100, 将 scFv anti-CD5-FITC 均分 4 份, 将最后一次离心得到的穿液吸出 1 mL, 平均分为 4 份。整个过程注意避光。

2.4 流式细胞仪检测 scFv anti-CD5 的活性

收获对数生长期的细胞, 冰冷的 PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次; 4% 多聚甲醛溶液重悬并室温固定 30 min 以上, 冰冷的 PBS (pH 7.4) 复洗 2 次; 血球计数板计数后, 调整各种细胞浓度至 2.5×10^5 , 取细胞 1 mL, 离心后用细胞封闭液封闭 2 h, 用冰冷的 PBS 洗 2 遍, 然后加入等量的 scFv anti-CD5-FITC, 4 °C 避光反应 12 h, 冰冷的 PBS (pH 7.4) 洗去未结合蛋白(每步离心条件均为: 4 °C, 1 200 r/min, 6 min); 洗涤 5 次, 加入 PBS 至 1 mL, 300 目尼龙网过滤后上机检测。

2.5 细胞膜蛋白提取

分别收集 EC304、CIK 细胞后, 冰浴超声破碎, 9 000 r/min 离心 10 min, 去除未破裂的细胞和细胞核碎片, 然后取上清, 加入适量体积的 solution B, 43 000 r/min 超速离心 1 h, 即得到细胞的总膜蛋白粗提物。

2.6 Western blotting

取细胞总膜蛋白 10 μ g 上样, 10% 聚丙烯酰胺 SDS-PAGE 电泳, 100 mA 电流半干转 2 h; 2% BSA 室温封闭 2 h, 倾去封闭液, 将硝酸纤维素膜放入干净的培养皿中, 分别加封闭液稀释的 scFv anti-CD5, scFv anti-CD5 约为 5 μ g/mL, 4 °C 过夜; TBST 洗 3 次, 每次 5 ~ 10 min, 加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记抗 His-tag 兔多克隆抗体, 室温放置 1.5 h; TBST 洗 3 次, 每次 5 ~ 10 min; DAB 显色。

3 结果

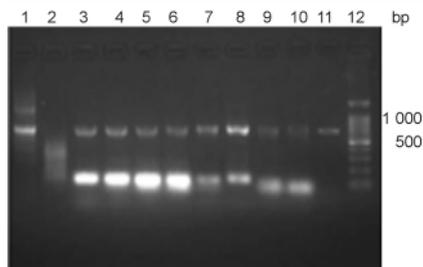
3.1 重叠 PCR 构建 scFv anti-CD5

将 F1-R10 等 10 条拼接引物, 温育获得含基因 scFv anti-CD5 的混合物, 以此为模板, 用 F11 和 R11 为引物, 常规 PCR 扩增出 scFv anti-CD5 基因。如图 1 所示, 在泳道 2 中从 100 ~ 800 bp 之间的弥散状条带为重叠 PCR 的产物, 泳道 1 为 F11 和 R11 扩增拼接产物后得到了两条带, 其中一条在 740 bp 左右, 可能是目的基因。纯化产物位于 740 bp 左右, 与理论设计值一致。

表 1 引物序列

Fig. 1 Sequence of primers

序号	引物
F1	5'-CATGCCATGGGTAACATCCAGTTGGTGCAGTCCGGCCCTGAGCTGAAGA AGCCTGGCGAGACTGTGAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTG-3'
R2	5'-AGCCCATCCAACGCAGACCCTTACCTGGAGCCTGCTTCACCCAGTTCAT ACCATAGTTGGTGAAGGTATAGCCAGAAGCCTTCAGGA-3'
F3	5'-CTGCGTTGGATGGGCTGGATCAACACCCACACTGGCGAGCCTACTTATG CTGATGACTTCAAGGGTCGCTTTGCCTTCTTTGAAA-3'
R4	5'-GGGTACAGAAATAGGTAGCCGTGCCTCATTTCGAGTTGTTGATCTG CAGATAGGCAGTGTGGCAGACGTTTCCAAAGAGAAGGC-3'
F5	5'-ACCTATTTCTGTACCCGTCGTGTTACGACTGGTACTTCGATGTCTGGG GCGCTGGAACCACGGTCACCGTATCTCCGGTGGAGGCG-3'
R6	5'-GCATACATGGAAGACGGAGACTGGGTCAATTTGATGTCCGATCCGCCGC CACCAGAGCCACCTCCGCTGAACCGCTCCACCGGAAGA-3'
F7	5'-CGTCTTCCATGTATGCATCTCTGGGTGAGCGTGTCACTATCACTTGCAA GGCGAGCCAGGACATTAATAGCTATCTGAGCTGGTTCCAT-3'
R8	5'-AACGAGATGGGACACCATCTACCAAACGGTTTCAGGATAGATCAGGCT CTTAGGAGATTTGCTGTTTATGATGGAACCAGCTCAGA-3'
F9	5'-GGTGTCCCATCTCGTTTCAGCGGCAGCGGCTCTGGCCAAGATTATCCC TCACCATCAGCAGCCTGGACTATGAAGATATGGGTATTTA-3'
R10	5'-TGGATCCTTTCATCTCAAGCTTGGTACCGCCACCGAACGTCACGGAGA CTCATCATACTGTTGACAATAATAATACCCATATCTT-3'
F11	5'-CATGCCATGGGTAACATCC-3'
R12	5'-GCCCTCGAGTTTCATCTCAAG-3'



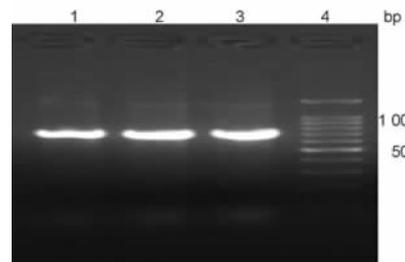
1. 拼接后首次 PCR 扩增产物; 2. 拼接产物; 3~10. 目的基因纯化后 PCR 扩增产物; 11. 纯化后的基因; 12. DNA marker
1. PCR product using the mixture from lane 2 as template; 2. Product of overlapping PCR; 3-10. PCR product from purified target gene; 11. Purified target gene; 12. DNA marker

图 1 scFv anti-CD5 基因的构建

Fig. 1 Gene construction of scFv anti-CD5

3.2 scFv anti-CD5 重组子的复筛

基因和载体连接后,转化 DH5 α 感受态细胞,挑取 3 个单菌落,以 F11 和 R11 为上下游引物进行 PCR 复筛鉴定,1.2% 琼脂糖凝胶电泳显示在 700 ~ 800 bp 处均有一特异性亮带(图 2),与理论设计值相符,测序结果进一步证明 2 号和 3 号菌落含有序列正确的重组质粒 scFv anti-CD5/pET22b(+) 的克隆(测序结果略)。



1~3. 1~3 号菌落的菌液 PCR 产物; 4. DNA marker
1-3. PCR product of scFv anti-CD5 recombinant bacterium colony No. 1-3 using primers F11 and R11 as primers; 4. DNA marker.

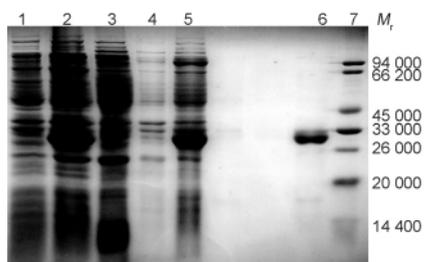
图 2 scFv anti-CD5 重组子筛选 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 Analysis of PCR product of scFv anti-CD5 recombinant using primers F11 and R11

3.3 融合蛋白 scFv anti-CD5 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达

诱导 scFv anti-CD5 表达后,将菌体裂解,分别收集超声上清、沉淀进行电泳,经过染色、脱色,结果如图 3 所示。在相对分子质量(M_r) 约 28 000 处有一明显的表达带,而未诱导菌没有出现相同的条带,同时观察到目的蛋白绝大部分存在于超声沉淀中,说明融合蛋白在宿主菌中主要以包涵体的形式存

在。包涵体处理后,过镍亲和柱纯化,电泳后几乎只出现 1 条蛋白质条带,说明经亲和色谱纯化到较高的纯度。



1. 未诱导的菌样; 2. 诱导后的菌样; 3. 超声破碎的上清液; 4. 包涵体洗涤样品; 5. 包涵体; 6. 纯化后的样品; 7. 蛋白质 marker

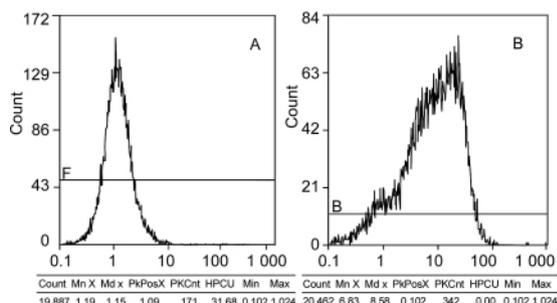
1. scFv anti-CD5/pET22b(+) without IPTG; 2. scFv anti-CD5/pET22b(+) with 0.1 mm IPTG for 6 h; 3. Lysate supernatant of sample in lane 2; 4. Inclusion body washing supernatant; 5. Inclusion body; 6. Purified scFv anti-CD5 protein; 7. Marker

图 3 蛋白表达形式以及纯化

Fig. 3 Protein expression analysis and purification.

3.4 流式细胞仪检测 scFv anti-CD5 的活性

CD5 仅在 T 淋巴细胞及其分化亚群高表达, CIK 细胞是 T 细胞在体外由 anti-CD3 和 IL2 诱导分化得到的 CD5 阳性细胞株^[2]。将 scFv anti-CD5 标记上 FITC 后,用流式细胞仪检测 scFv anti-CD5 结合 CD5 的能力。结果如图 4 所示, EC304 组和 CIK 组的平均荧光强度分别为 1.19 和 6.83; 可见 scFv anti-CD5-FITC 特异的结合到了 CIK 上。



A. EC304 细胞; B. CIK 细胞

A. EC304 cell; B. CIK cell

图 4 流式细胞术检测 scFv anti-CD5 活性

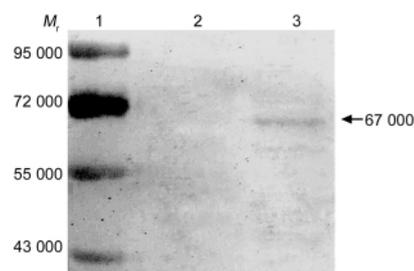
Fig. 4 Flow cytometry for cell labeled with scFv anti-CD5-FITC

3.5 scFv anti-CD5 结合 CD5 能力的验证

采用 Western blotting 的方法进一步分析 scFv anti-CD5 是否特异的结合到 CD5 分子上。结果如图 5 所示,在 M_r 约 67 000 有条带,这个位置与文献报道的 CD5 的位置相符^[5],说明得到的 scFv anti-CD5 能够识别 CD5 抗原。

4 讨论

本研究成功地构建了 scFv anti-CD5/pET22b



1. 预染 Marker; 2. EC304 膜蛋白; 3. CIK 膜蛋白

1. Prestained Marker; 2. Total membrane of EC304; 3. Total membrane of CIK

图 5 Western blotting 分析 scFv anti-CD5 的抗原结合特异性

Fig. 5 Western blotting analysis of antigenic specificity of scFv anti-CD5

(+) 重组质粒,表达的蛋白纯化复性后能够特异的识别 CD5 抗原。目前常用的 CD5 抗体多为鼠源性的完整抗体。这些抗体人体内反复使用可引起人体产生人抗鼠抗体反应;完整的抗体 M_r 大,不易穿透各种屏障;而且它们的 Fc 段的存在可使其与体内具有 Fc 受体的非特异组织细胞结合,影响其靶向效果。完整抗体的这 3 个缺点使之在临床的应用方面大大受到限制,而且用杂交瘤技术生产完整抗体 (mAb 或 bsAb) 的成本比较高,不利于大量的制备。反观单链抗体,其免疫原性低、组织穿透能力强,不具有 Fc 片段,而且可以在原核系统中高效表达,克服了完整抗体的 4 大缺陷,因此本研究结果有着重要的意义。然而,由于单链抗体只有一个抗原结合位点,因此其结合抗原的能力较弱。本研究的实验结果也印证了这一点,流式细胞术和 Western blotting 的结果信号都不是很强。通过化学交联或对单链抗体进行多聚化改造,可望增强其亲和力。

参考文献:

- [1] Weiner L M, Holmes M, Richeson A, et al. Binding and cytotoxicity characteristics of the bispecific murine monoclonal antibody 2B1 [J]. J Immunol, 1993, 151: 2877-2886.
- [2] Tita-Nwa F, Moldenhauer G, Herbst M, et al. Cytokine-induced killer cells targeted by the novel bispecific antibody CD19 × CD5 (HD37 × T5.16) efficiently lyse B-lymphoma cells [J]. Cancer Immunol Immunother 2007, 56(12): 1911-1920.
- [3] Miller R A, Oseroff A R, Stratte P T, et al. Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma [J]. Blood, 1983, 62: 988-995.
- [4] Kjer-Nielsen L, Dunstone M A, Kostenko L, et al. Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 7675-7680.
- [5] Lankester A C, van Schijndel G M, Cordell J L, et al. CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex [J]. Eur J Immunol, 1994, 24: 812-816.