

DNA 免疫制备抗人 CD154 单克隆抗体 及其轻链可变区基因序列分析*

张志方¹, 张春艳²

(1. 中山大学中山医学院 生理学教研室, 广东 广州 510089;

2. 中山大学中山医学院 免疫学教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 采用 pcDNA3.1/hCD154 重组质粒 DNA 免疫 BALB/c 小鼠, 制备抗人 CD154 单克隆抗体, 得到了能分泌针对人 T 细胞表面 CD154 分子的特异性单抗的杂交瘤细胞株 (7E8)。通过 RT-PCR 扩增 7E8 单抗轻链可变区基因, 并对其进行克隆、测序、DNA 序列分析和氨基酸推导, 结果显示轻链可变区基因和氨基酸序列完全符合小鼠 Ig 轻链的结构特征, 为制备基因工程抗体并应用于临床打下了基础。

关键词: 人 CD154; DNA 免疫; 单克隆抗体; 基因克隆

中图分类号: R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 01-0125-03

CD154 是一种主要存在于激活的 T 淋巴细胞表面的 II 型跨膜糖蛋白, 是 CD40 的配体。CD40-CD154 之间相互作用, 是诱发体液免疫和细胞免疫的重要信号传导途径^[1]。研究表明, 采用抗人 CD154 单克隆抗体阻断第二活化信号, 可以诱导 T 细胞无反应性, 达到抑制免疫应答的目的^[2]。我们在已经构建的人 CD154 基因真核细胞表达载体的基础上^[3], 拟用 DNA 免疫研制抗人 CD154 单克隆抗体。鉴于鼠源性单抗用于人体内能诱导人体产生抗鼠抗体等限制其临床应用的缺点, 对所获得单抗的轻链可变区基因进行克隆, 并分析其基因序列。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 BALB/c 小鼠, 雌性, 5 周龄, 购自本校实验动物中心; 高纯度质粒提取试剂盒购自宝灵曼公司; PE anti CD154 McAb、CychromeTM-CD3McAb 为 Coulter immunotech 公司产品; 重组质粒 pcDNA3.1/hCD154 由免疫学教研室构建。

1.2 DNA 免疫制备抗人 CD154 单克隆抗体 将提纯的重组质粒 pcDNA3.1/hCD154 直接注入 8 只健康雌性 5 周龄的 BALB/c 小鼠后腿股四头肌, 共免疫 3 次, 在细胞融合前 3 d 用表达 hCD154 的 CHO 细胞作加强冲击免疫。取小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞 SP2/h 进行细胞融合, 获得杂交瘤细胞, 然后采用显微操作技术, 将阳性克隆经过 3 次亚克隆达到单克隆化。

1.3 单克隆抗体特异性鉴定 采用免疫荧光法检测所得单抗与表达 hCD154 的 CHO 细胞的结合特性; 采用流式细胞仪鉴定单抗与激活的人 T 细胞的结合特性; 采用竞争抑制实验进一步鉴定所获单抗与激活的人 T 细胞的结合的特异性。

1.4 抗体的特异性和亚类鉴定 采用双向免疫扩散鉴定 3 株细胞所分泌的单克隆抗体的类别。

1.5 杂交瘤细胞总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成 收集杂交瘤细胞, 用裂解液裂解细胞, 按照 QIAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA 后, 合成 cDNA 第一链。

1.6 PCR 扩增轻链可变区基因 以逆转录合成的 cDNA 第一链为模板, PVL1 5' GGCGATCCGACAT-TGTGATGACCCAGTC3', PVL2 5' CCAGTCGACTA-ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC3' 为引物, 进行 PCR 扩增。扩增条件 94℃变性 50 s, 55℃退火 55 s, 72℃延伸 60 s 共 30 个循环, 最后一个循环完成后, 72℃延伸 7 min。

1.7 将 VL 基因克隆入 PUC18 质粒 用 *sal* I 酶切纯化的 PCR 产物及其 PUC18 质粒, 回收后加入 T₄ 连接酶进行连接反应, 转化感受态菌, 将转化菌涂于预制的含有 X-gal 和 IPTG 溶液的 LBA 平板上, 37℃过夜。

1.8 重组质粒的筛选及鉴定 采用 α 互补法进行蓝白斑筛选, 再用 *Bam*H I 和 *sal* I 双酶切对重组

* 收稿日期: 2001-12-12;

基金项目: 广东省卫生厅基金资助项目 (A1997098)

作者简介: 张志方 (1964—) 男, 副教授; E-mail: zhangzf01@yahoo.com.cn

质粒进行鉴定，命名为 PUC18/VL。

1.9 VL 基因核苷酸序列测定和分析 应用 DNA 自动测序系统，以 PUC18/VL 为模板，采用双脱氧末端终止法测定 VL 基因序列，DNA 序列和氨基酸序列在 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站进行在线分析，DNA 序列和氨基酸序列分析使用 Standard nucleotide-nucleotide BLAST 和 Standard nucleotide protein BLAST，对获得的基因片段在 GenBank 及 Ig 库进行同源性检索。

2 实验结果

2.1 抗人 CD154 单克隆抗体的获得 经筛选和单克隆化后，得到 3 株能分泌抗人 CD154 单克隆抗体的杂交瘤细胞株，分别命名为 7E8、2C5、6D6。

2.2 抗人 CD154 单克隆抗体的特异性鉴定 ①免疫荧光结果显示，3 株细胞分泌的抗体可以与 CD154 基因转染的 CHO 细胞反应，与未转染 CHO 细胞不反应。②流式细胞仪双标结果显示，7E8 所分泌的抗体能与激活的人 CD3⁺T 细胞结合，结合量达 4.6%，大多数分布于 CD3⁺CD8⁻T 细胞 (4.1%)，少量分布于 CD3⁺CD8⁺T 细胞 (0.5%)，证明所得到的抗体是特异性针对人 CD154 分子的单克隆抗体。③竞争抑制实验结果显示，7E8 细胞分泌的抗体，可以部分抑制人 PE CD154 标准抗体对 CD154 分子的结合，抑制率为 60%，证明此抗体是针对人淋巴细胞表面的 CD154 分子的单抗。

2.3 抗体类别的鉴定 双向免疫扩散结果显示，2C5、6D6 两株细胞分泌的抗体属于小鼠 IgG1 类，7E8 细胞分泌的抗体属于小鼠 IgG2a 类免疫球蛋白。

2.4 人 CD154 单抗轻链可变区基因扩增和克隆 琼脂糖凝胶电泳结果显示，PCR 扩增出一条大约 341 bp 特异性条带，与小鼠免疫球蛋白轻链可变区基因的理论值相符。双酶切重组质粒，经琼脂糖凝胶电泳鉴定，双酶切可以切出大约 341 bp 的条带，证明轻链可变区基因已经克隆到重组质粒。

2.5 轻链可变区基因及氨基酸的序列分析 将含有轻链可变区基因的重组质粒进行 DNA 序列测定，结果显示，抗人 CD154VL 基因全长为 341 bp，编码 113 个氨基酸，通过国际互联网检索，发现此轻链可变区基因与小鼠 Ig κ 链的同源性达 94%，氨基酸与小鼠 Ig κ 链的同源性达 92%，应归属于 Ig 的 Vκ 2 基因；氨基酸序列分析结果显示，重链可变区含有明确的 4 个骨架区和 3 个抗原决定簇互补区，第 23 和第 93 位氨基酸为半胱氨酸，是抗体二硫键形

成有关的两个特征性氨基酸 (图 1)。

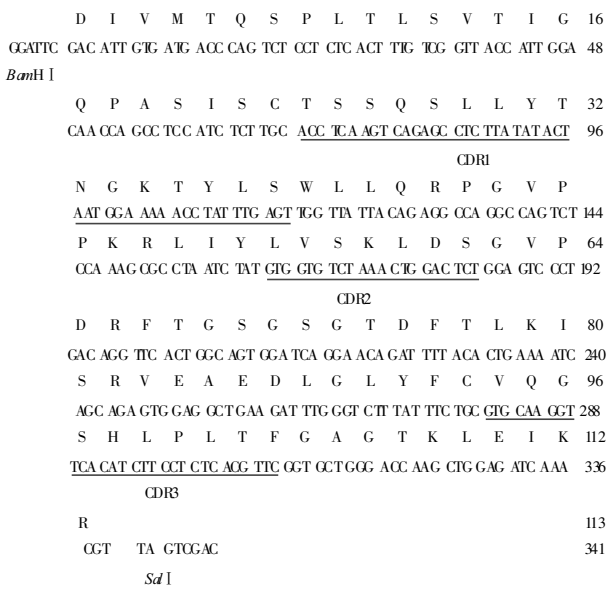


图 1 抗人 CD154 单抗 VL 基因的核苷酸及氨基酸序列分析
Fig 1 Analysis of the nucleotide sequence of anti-hCD154 McAb VL gene and its amino acid sequence; the complementary determining regions (CDRs) are indicated with lines

3 讨论

DNA 免疫是将编码外源性蛋白的核酸表达载体，直接转化到机体，以激发机体产生针对外源性蛋白的特异性免疫应答过程。免疫方案的选择直接影响免疫效果：①免疫途径：DNA 免疫途径包括皮下、肌肉和粘膜等。通过皮下和粘膜途径虽然可以诱导免疫应答，但由于细胞代谢较快，外源 DNA 的表达往往是一过性的，维持时间短，免疫效果不好；采用肌细胞注射的方法进行免疫，转入的外源性 DNA 可长期存在并稳定表达，因此，选择 BALB/c 小鼠的股四头肌作为编码人 CD154 基因的重组质粒进入小鼠体内的途径。结果显示，在末次免疫后的第 4 周，小鼠体内产生较高效价的抗体。②免疫原的免疫次数：由于外源性 DNA 在肌组织的扩散和肌细胞对 DNA 的摄取率受限，1 次免疫难以达到理想的免疫效果，采用连续 3 次免疫法给小鼠肌肉注射 DNA，在末次免疫后的第 4 周，小鼠体内产生较高效价抗体。

为鉴定单克隆抗体的特异性，首先采用免疫荧光法检测所得单抗与表达目的基因的 CHO 细胞的结合活性；然后采用流式细胞仪，检测所得单抗与激活淋巴细胞表面天然 CD154 分子的结合活性；最后，通过竞争抑制实验检测所得单抗与标准 CD154 单抗竞争结合 CD154 分子的情况。实验结果表明，

制备的3株杂交瘤细胞株分泌的单抗都可以结合表达CD154的CHO细胞;7E8单抗可以结合激活的CD3⁺T细胞,其中大多分布于CD3⁺T CD8⁺T细胞(4.1%),少量分布于CD3⁺CD8⁻T细胞(0.5%);7E8单抗可以部分抑制人PE-CD154标准抗体对CD154分子的结合,此结果与国外报道的CD154在活化的淋巴细胞的分布特征是一致的,最终证明所得到的抗体是特异性针对人CD154分子的单克隆抗体。

由于通过RT-PCR扩增的抗体可变区基因是未知序列,所以引物的设计显得尤为重要。根据小鼠Ig可变区基因的保守序列设计轻链可变区引物^[4],并引入可变区基因中出现频率较低的酶切位点,以保证在克隆入载体时,所扩增的基因序列不被限制性内切酶切断。实验结果显示,扩增到341bp的轻链可变区基因,证明了设计引物的正确性。采用RT-PCR扩增出人CD154单抗轻链可变区基因,酶切后克隆入PUC18测序质粒,经序列测定后,抗人CD154轻链可变区基因全长为341bp,编码113个氨基酸,通过互连网检索,发现此轻链可变区基因及氨基酸与小鼠Igκ链的同源性在94%,应归属于Ig的Vκ基因,变异碱基主要位于抗原决定簇互补区(CDR);氨基酸序列分析结果显示,轻链氨基酸序列符合小鼠Ig框架结构,含有明确的4个骨架区和3个抗原决定簇互补区,在第23/93位氨基酸

为半胱氨酸,是与抗体二硫键形式有关的两个特征性氨基酸^[5],提示能够形成抗体结构的正确折叠。抗人CD154单克隆抗体的制备和轻链可变区基因的序列分析为人CD154基因工程抗体的制备并应用于临床治疗打下了基础。

参考文献:

- [1] WEKERLE T, SAYEGH M H, ITO H, et al. Anti-CD154 or CTLA4Ig obviates the need for thymic irradiation in a non-myeloablative conditioning regimen for the induction of mixed hematopoietic chimerism and tolerance [J]. Transplantation, 1999, 68(9): 1348.
- [2] GORDON E J, MARKEES T G, PHILLIPS N E, et al. Prolonged survival of rat islet and skin xenografts in mice treated with donor splenocytes and anti-CD154 monoclonal antibody [J]. Diabetes, 1998, 47(8): 1199.
- [3] 张春艳, 宁波, 李树浓, 等. 人CD154基因真核细胞表达载体的构建、鉴定及序列测定[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(2): 88.
- [4] WANG Z, RAIFU M, HOWARD M J, et al. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity[J]. Immunol Methods, 2000, 233(1-2): 167.
- [5] MARISEV S P, CHUMANEVICH A A, VLASOV A P. Anti-ferritin single-chain Fv fragment is a functional protein with properties of a partially structured state; comparison with the completely folded V(L) domain[J]. Biochemistry, 2000, 39(27): 8047.

Preparation of Anti hCD154 Monoclonal Antibody by DNA Immunization and Sequencing of Light Chain Variable (VL) Genes

ZHANG Zhi fang, ZHANG Chun yan

- (1. Department of Physiology, Sun Yat sen Medical College, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510089, China;
2. Department of Immunology, Sun Yat sen Medical College, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: Anti hCD154 monoclonal antibody (7E8) was prepared by pcDNA3.1/hCD154 immunization. Its specificity was verified by MIF and flow cytometry. The results show that McAb (7E8) can bound to CHO cells expressing the hCD154 and human T cells activated. Competition tests with standard anti hCD154 McAb showed that McAb (7E8) could inhibit standard anti hCD154 McAb binding CD154 molecules on human T cells. These results suggested that McAb (7E8) was a specificity McAb against hCD154 molecules. VL cDNA of McAb against hCD154 were amplified by RT-PCR from total cellular RNA of hybridoma cell 7E8 secreting specific McAb against hCD154 and was cloned into PUC18 vector. Sequence analysis of VL cDNA showed that VL cDNA of 7E8 McAb consists of 341bp encoding 113 amino acid residues. Comparing with mouse Ig database, the VL region is in agreement with the characterization of DNA sequence presented in the mouse Ig Vκ region.

Key words: human CD154; DNA immunization; monoclonal antibody; gene cloning