

# 融合基因 anti-erbB2 scFv-Fc-CD28-CD3( $\zeta$ )的构建及真核表达

隋文君 苏世振 胡望雄 李红智\* 布立敬

(温州医学院浙江省重点医学遗传学实验室, 温州 325035)

**摘要** 本研究利用 SWISS-MODEL 预测该融合蛋白的三级结构。利用 PCR 的方法分别从重组 pPIC9k、重组 pBullet 和 pSecTag2B 上扩增出 3 段基因片段, 即片段 anti-erbB2 scFv(简称 A)、片段 Fc-CD28-CD3( $\zeta$ )(简称 B)和信号肽序列(简称 S)。利用 SOE-PCR 将 3 段序列连接形成融合基因片段 S-A-B。经 TA 克隆扩增及鉴定后, 将融合基因片段与逆转录病毒表达载体 pLNCX 相连构建重组真核表达载体, 电转染人淋巴瘤 T 细胞株 Jurkat, G418 筛选后用流式细胞术检测融合蛋白稳定表达情况。经预测在 anti-erbB2 scFv 与 Fc 基因片段之间不加连接肽的融合蛋白; 在三级结构上可形成更佳的功能构象。经 PCR、酶切及测序鉴定均证实成功构建重组真核表达载体 pLNCX/S-A-B(在 A 与 B 基因片段之间不加 linker)。经流式细胞术检测, 在转染的 Jurkat 细胞中融合蛋白表达率约为 56.17%。本研究应用分子克隆的方法成功地构建了重组真核表达载体 pLNCX/anti-erbB2 scFv-Fc-CD28-CD3( $\zeta$ ), 融合基因能够在淋巴瘤 T 细胞株中表达, 为制备含该融合基因的原代 T 淋巴细胞, 进行 erbB2 过表达肿瘤的靶向基因治疗研究奠定了实验基础。

**关键词** erbB2; 融合基因; 表达载体; 肿瘤治疗

HER2/c-erbB-2 是编码一种生长因子受体(HER2/c-erbB-2 受体)的癌基因。HER2 作为一种重要的肿瘤相关抗原, 在肿瘤靶向治疗中倍受关注<sup>[1]</sup>。目前, 在以 HER2 为靶向/靶点的抗肿瘤治疗研究中, 以单克隆抗体 Herceptin 应用最为广泛。但对 Herceptin 进行的临床实验证明, 其有效率较低。

本实验应用基因工程的方法对抗 erbB2 单链抗体可变区基因(scFv)进行改造, 构建融合基因 anti-erbB2 scFv-Fc-CD28-CD3( $\zeta$ ), 不仅保留抗原结合特异性, 增加抗体 Fc 段使其接近全抗体的效果, 并引入 CD28 的跨膜区使其成为 T 细胞膜表面锚定型抗体, 引入 CD3 的  $\zeta$  链充分激活 T 细胞的抗肿瘤活性。本实验所构建的含 anti-erbB2 scFv-Fc-CD28- $\zeta$  融合基因的 T 细胞能够同时发挥体液免疫和细胞免疫的双重作用来产生免疫应答从而彻底清除肿瘤细胞。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 载体和质粒 pMD19 Simple T 购自大连宝生物公司, pLNCX 购自杭州远方生物公司, 含 Fc-CD28- $\zeta$  的重组 pBullet 由温州医学院俞康教授赠予, 含 anti-erbB2 scFv 的重组 pPIC9k 由中国科技大学刘兢教授

赠予, pSecTag2B 购自 Invitrogen。

1.1.2 细胞株 人急性淋巴瘤 T 细胞株 Jurkat 购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC)。

1.1.3 培养基(液) LB 培养基和 RPMI1640 培养液购自上海生工, FBS 购自杭州四季青生物工程公司。

1.1.4 主要试剂 Ex Taq 酶、Pyrobest Taq 酶、Hind III、Cla I 和 T4 连接酶均购自大连宝生物公司, PCR 产物琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒和 G418 均购自上海生工, Lipofectin 2000 购自 Invitrogen, anti-human IgG FITC 和 Mouse IgG1 FITC 购自 BD 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 融合基因的蛋白表达结构预测 已知融合基因各片段 DNA 标准序列便可利用 SWISS-MODEL 预测该融合蛋白膜外区的三级结构。通过比较三级结构, 评估两种连接方式(scFv 与 Fc 之间加连接肽或不加连接肽)的优缺点。

收稿日期: 2010-07-05 接受日期: 2010-09-13

浙江省自然科学基金(No. Y205171)和温州市科技局对外合作项目(No. H20080059)

\* 通讯作者。Tel: 0577-86699656, E-mail: wzmclhz@yahoo.com.cn

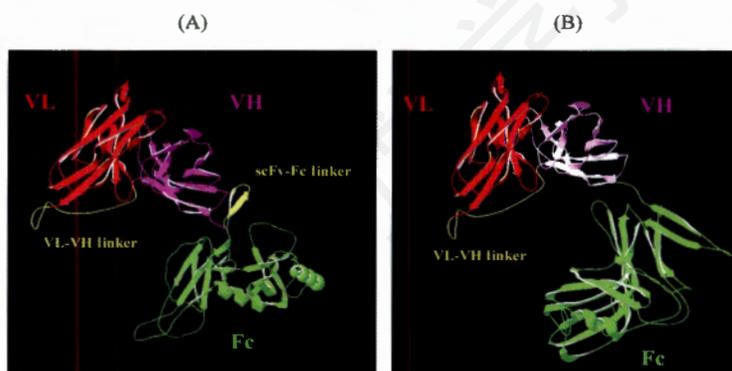
**Table 1 Primers for amplifying three gene fragments (regular PCR and SOE-PCR, 5'-3')**

Fragments	Primers	Tm (°C)
S	SF: GCT GGA <u>AGC TTA GCA</u> TGG AGA CAG ACA CAC	67.50
	SR: GTC AGC ACA ATG TCG TCA CCA GTG GAA CCT	67.50
A	AF: CTG GTG ACG ACA TTG TGC TGA CCC AAA CT	66.27
	AR: TCG GCT GAC GAG ACG GTG ACT GAG GTT	68.08
B	BF: CCG TCT CGT CAG CCG AGC CCA AAT CTC CT	70.51
	BR: AAC CAT CGA TCA GCA TCT CTC CAG TAT TAG CG	67.33

The underscores were the sites for restriction digest, the grey-highlighted sequences were complimentary tailer sequences, and the dotted sequences were start or termination codons. SF and AR were used as primers for amplifying S-A fragment in SOE-PCR, SF and BR were used as primers for amplifying S-A-B fragment in SOE-PCR.

**Table 2 PCR procedure for amplifying three gene fragments (S, A, and B)**

Fragments	PCR procedures
S	94°C 5 min; 94°C 30s, 59°C 30s, 72°C 45sec, 30 cycles; 72°C 5min
A	94°C 5 min; 94°C 30s, 58°C 45s, 72°C 1min, 30 cycles; 72°C 8min
B	94°C 5 min; 94°C 30s, 59°C 45s, 72°C 2min, 30 cycles; 72°C 8min

**Fig.1 Tertiary structure of the fusion protein**

A: with linker (scFv-linker-Fc); B: without linker (scFv-Fc).

1.2.2 pSecTag2B、重组 pPIC9K 和重组 pBullet 的转化、筛选、提取及电泳鉴定

1.2.3 3 段目的基因片段的获取及融合基因的构建 根据已知的 signal (简称 S)、anti-erbB2-scFv (简称 A)、Fc-CD28-CD3( $\zeta$ ) (简称 B) 3 段目的基因片段的 DNA 序列, 利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 设计普通 PCR 及 SOE-PCR 引物(表 1), 引物由上海生工合成。

应用高保真 Pyrobest Taq 分别从 pSecTag2、重组 pPIC9K 和重组 pBullet 上普通 PCR 扩增 3 段目的基因片段 S、A 和 B(PCR 反应程序见表 2)。经电泳鉴定后, 回收目的片段。

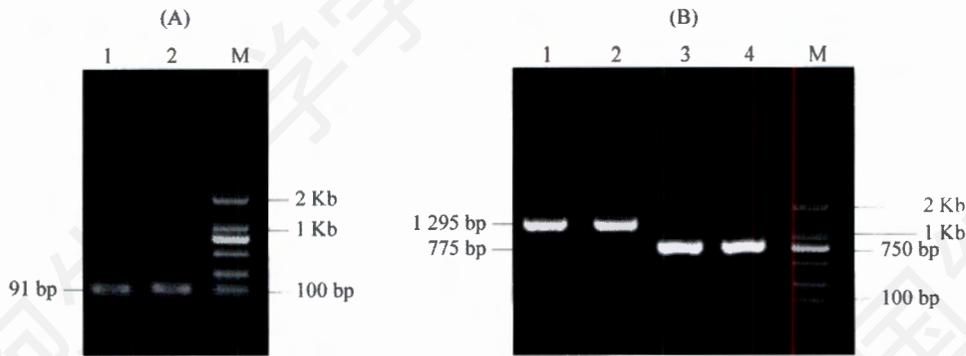
用高保真 Pyrobest Taq 进行 SOE-PCR 先将片段 S 与片段 A 相连得片段 S-A, 经电泳鉴定后回收, 之后再用 Ex Taq 进行 SOE-PCR 将片段 S-A 与片段 B 相连得融合基因片段 S-A-B, 并且在 S-A-B 尾端带上碱

基 A 方便下一步进行 TA 克隆, 经电泳鉴定后回收。实验中 SOE-PCR 的反应条件为 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 2.5min, 30 个循环; 72°C 8min。

1.2.4 融合基因的 TA 克隆、转化及鉴定 按照 pMD19 Simple T 载体使用说明进行 TA 克隆, 将融合基因转化、筛选、培养后提取质粒 DNA, 并进行电泳、酶切、测序鉴定。

1.2.5 重组表达质粒的构建、转化及鉴定 分别对逆转录病毒表达载体 pLNCX 和重组 pMD19 Simple T 载体, 用 *Hind* III 和 *Cla* I 进行双酶切, 回收纯化融合基因片段和 pLNCX 载体片段, 利用 T4 连接酶连接。将连接产物转化到 *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 筛选、培养后提取质粒 DNA, 并进行电泳、PCR、测序鉴定。

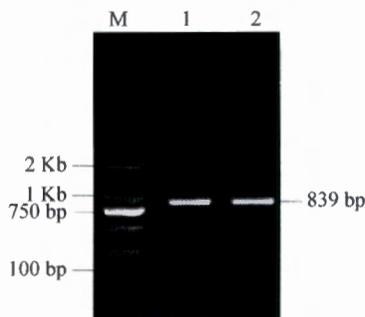
1.2.6 重组表达质粒 pLNCX/S-A-B 的电转染、筛选及融合蛋白表达检测 将 30~40  $\mu$ g/50  $\mu$ l 重组表



**Fig.2 Electrophoretic analysis of fragment S, A and B amplified by PCR**

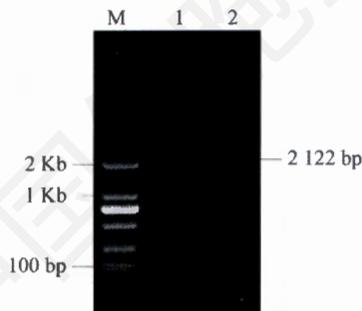
A: lane 1 and 2, fragment S; lane M: DL2 000 DNA marker;

B: lane 1 and 2, fragment B; lane 3 and 4, fragment A; lane M: DL2 000 DNA marker.



**Fig.3 Electrophoretic analysis of fragment S-A amplified by SOE-PCR**

Lane 1 and 2: fragment S-A; Lane M: DL2 000 DNA marker.



**Fig.4 Electrophoretic analysis of fragment S-A-B amplified by SOE-PCR**

Lane 1 and 2: fragment S-A-B; Lane M: DL2 000 DNA marker.

达质粒在  $1\ 000\ \mu\text{F}$ 、 $140\ \text{V}$  下电转染  $(5\sim 10)\times 10^6/50\ \mu\text{l}$  Jurkat 细胞。离心收集转染 48 h 后的细胞, 完全培养液培养过夜后加入含  $800\ \mu\text{g/ml}$  (最小致死浓度) G418 的完全培养液进行克隆筛选, 同时用未转染的细胞加入相同浓度 G418 作对照, 每 2 天换液, 10 天后 G418 浓度降至  $400\ \mu\text{g/ml}$ , 以维持筛选作用, 14 天后, 收集细胞。流式细胞术检测融合蛋白表达, 实

验组采用 anti-human IgG FITC, 同型对照组采用 Mouse IgG1 FITC。

## 2 结果

### 2.1 融合蛋白的三级结构预测

在两种连接方式下(scFv 与 Fc 之间加 linker 或不加 linker), scFv 段保持相同的功能性构象。scFv 与 Fc 之间加 linker (图 1A), 不仅 linker 段没有形成正常的无规则卷曲, 新形成了两个不正常的  $\beta$ - 折叠, 而且 Fc 段构象改变, 多个正常的  $\beta$ - 折叠减少, 新形成了一个不正常的  $\alpha$ - 螺旋。而 scFv 与 Fc 之间不加 linker (图 1B), Fc 段能形成正常的功能构象。

### 2.2 基因片段(S、A、B)的 PCR 扩增

经 PCR 扩增出 3 段基因片段, 经电泳证实 S、A 和 B 片段大小正确, 分别为 91 bp、775 bp 和 1 295 bp (图 2)。

### 2.3 SOE-PCR 构建融合基因

**2.3.1 S 与 A 片段的连接** 第一步 SOE-PCR 连接 S 与 A 片段, 经电泳证实 S-A 片段大小正确, 为 839 bp (图 3)。

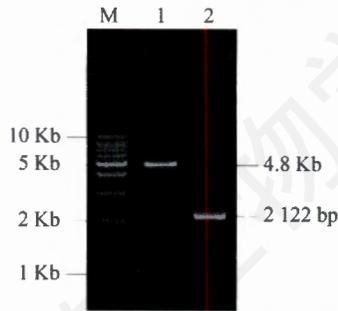
**2.3.2 S-A 与 B 片段的连接** 第二步 SOE-PCR 连接 S-A 与 B 片段, 经电泳证实 S-A-B 片段(A 与 B 片段之间无 linker)大小正确, 为 2 122 bp (图 4)。

### 2.4 S-A-B 融合基因的 TA 克隆及鉴定

重组 T 载体 pMD19 Simple T/S-A-B 进行 *Hind* III 单酶切及 PCR 扩增, 经电泳鉴定(图 5)和测序鉴定, 融合基因序列正确。

### 2.5 重组表达质粒的构建及鉴定

重组表达质粒 pLNCX/S-A-B 构建策略图解见图 6。重组表达质粒进行 *Hind* III 单酶切及特异 PCR 扩增, 经电泳鉴定, 见图 7。经测序鉴定融合基因



**Fig.5 Electrophoretic analysis of recombinant T-vector pMD19 T/S-A-B digested by *Hind* III and amplified by PCR**

Lane 1: recombinant T-vector pMD19 T/S-A-B digested by *Hind* III; Lane 2: fusion gene S-A-B amplified by PCR; Lane M: 1kb DNA Marker.

序列正确。

## 2.6 G418 筛选

筛选前 4 天, 细胞碎片明显增多, 存活细胞数目渐渐减少。筛选第 10 天, 转染的实验组 Jurkat 细胞仍可见少量散在的活细胞, 而未转染的对照组 Jurkat 细胞均已死亡(图 8A)。筛选第 14~20 天, 转染的 Jurkat 细胞状态渐渐恢复, 可见单克隆细胞逐渐增多, 成簇分裂生长(图 8B)。以后细胞数量逐渐增多, 生长速度基本恢复正常。

## 2.7 流式细胞术检测融合蛋白的表达

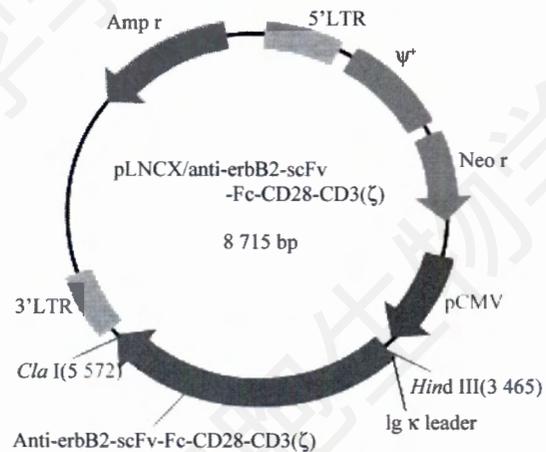
重组质粒 pLNCX/S-A-B 稳定转染 Jurkat 细胞, 经流式细胞术检测, 与同型对照相比融合蛋白表达率约 56.17%(图 9)。

## 3 讨论

研究表明, 约 30%~50% 的乳腺癌患者 c-erbB-2 过表达<sup>[1]</sup>, c-erbB-2 过表达的乳腺癌患者化疗及内分泌治疗效果不佳, 且倾向于早期复发, 生存期缩短, 这种基因过表达对乳腺癌患者极为不利。除乳腺癌外, c-erbB-2 过表达的还包括卵巢癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌等肿瘤。因此 HER2 作为一种重要的肿瘤相关抗原, 在肿瘤靶向治疗中倍受关注。针对 c-erbB-2 的单克隆抗体 Herceptin 在临床上的治疗效果已经被证实。但临床试验表明, 其对 c-erbB-2 过表达的晚期乳腺癌的单药有效率仅为 15%~23%。

以单链抗体为代表的靶向治疗策略是当今的一个热点。单链抗体可变区 scFv 具备与全抗体一样的抗原结合能力, scFv 基因治疗较单抗治疗的优点是在实体瘤中穿透性较好, 能较长时间稳定表达, 且生产

成本低得多。Alvarez 等曾报道采用抗 erbB2 scFv 腺病毒进行卵巢癌基因治疗, 且已进入 I 期临床试验。但研究发现 scFv 与抗原的亲合力、特异性相对单抗较差, 加之缺乏 Fc 段, 不产生细胞介导的细胞毒作用(ADCC 效应)。而且分泌型 scFv 的原位 scFv 不能达到有效和持续水平, 因此具有局限性。如何改善特异性、有效性等? Barker 和 Alvarez 等<sup>[2]</sup>研究提高抗 erbB2 scFv 腺病毒基因治疗卵巢癌的特异性和有效性。有报道<sup>[3]</sup>采用腺病毒介导的 Herceptin 全抗体基因治疗卵巢癌。有报道将 anti-erbB2 scFv 与 IL-2 融合<sup>[4]</sup>, 或与免疫毒素 SEC2 融合<sup>[5]</sup>, 或与肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  融合<sup>[6]</sup>, 或与 caspase-3 融合<sup>[7]</sup>, 或与核糖核酸酶融合<sup>[8]</sup>, 这些融合蛋白均具备双重抗肿瘤效应。Von Minckwitz 等<sup>[9]</sup>构建的 anti-erbB2 scFv-ETA 重组抗体外毒素 A, 在对过表达 erbB2 肿瘤细胞和肿瘤动

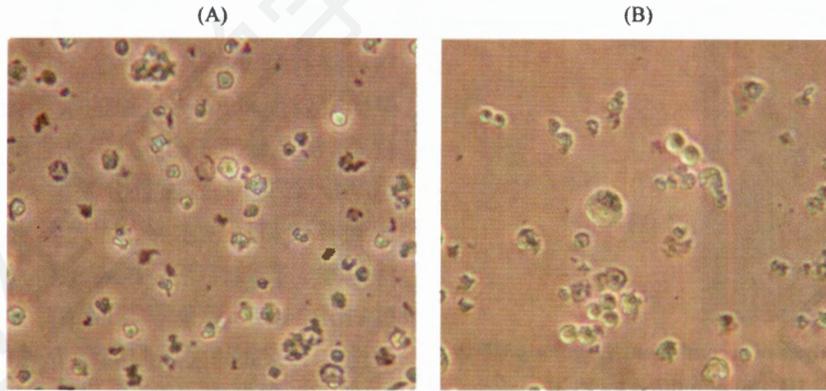


**Fig.6 Schematic structure of recombinant expression plasmid pLNCX/S-A-B**



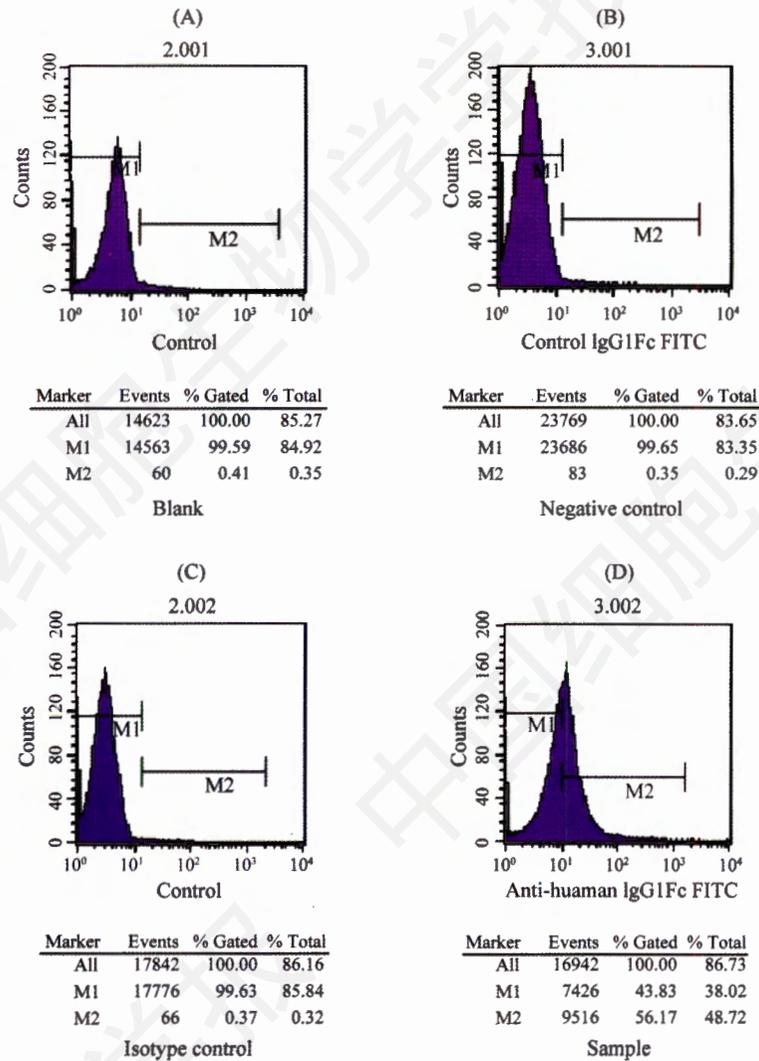
**Fig.7 Electrophoretic analysis of recombinant expression plasmid pLNCX/S-A-B digested by *Hind* III and amplified by PCR**

Lane 1: fusion gene S-A-B amplified by PCR; Lane 2: recombinant expression plasmid pLNCX/S-A-B digested by *Hind* III; Lane M: 1Kb DNA marker.



**Fig.8 G418 selection**

A: normal Jurkat cells (selected for 10 d, 100 ×); B: transfected Jurkat cells (selected for 20 d, 100 ×).



**Fig.9 Detection of the stable expression of the fusion protein in Jurkat cells by FACS**

A: normal Jurkat cells, no anti-human IgG added; B: normal Jurkat cells, anti-human IgG added; C: transfected Jurkat cells and selected for 32d, Mouse IgG added; D: transfected Jurkat cells and selected for 32d, anti-human IgG added.

物模型试验成功的基础上, 已进行 I 期临床试验, 应用于过表达 erbB2 的乳腺癌、前列腺癌、头颈部癌和非小细胞肺癌等。Shahied 等<sup>[10]</sup>构建 anti-erbB2 scFv-CD16 融合基因, 促进效应细胞对肿瘤细胞的吞噬作用和 ADCC 效应。还有报道构建抗 erbB2 scFv-B7.2 或抗 erbB2 scFv-CD86<sup>[11]</sup> 融合基因, 激活 T 细胞。

CD3- $\zeta$  链是 T 细胞膜上重要的信号转导分子, 能影响 T 细胞的活化。近年来有报道乳腺癌、卵巢癌等肿瘤患者 T 细胞  $\zeta$  链的表达水平低下甚至缺失, T 细胞免疫功能缺陷, 提示可以利用  $\zeta$  链对肿瘤患者进行基因治疗。而且 scFv- $\zeta$  融合基因 T 细胞与特异的肿瘤细胞结合后, 不需要识别 MHC, 单信号便能激活 T 细胞。近年已报道的与  $\zeta$  链融合的 T 细胞相关抗原有 CD19<sup>[12]</sup>、CD20<sup>[13,14]</sup>、CEA 等。另外经研究证实, scFv- $\zeta$  融合基因 T 细胞与特异的肿瘤细胞结合后只能被部分激活, 而 scFv-CD28- $\zeta$  融合基因 T 细胞能被完全激活。即表达 scFv-CD28- $\zeta$  基因的 T 细胞与特异的肿瘤细胞结合后, 在不需要识别 MHC 和外源 CD28-B7 协同刺激(很多肿瘤缺乏协同刺激分子而逃脱免疫监视)的情况下, 便能够完全激活 T 细胞, 其中 CD28 还有阻止 T 细胞凋亡的功能。

本研究在保证 scFv 基因治疗优点的基础上, 为提高其治疗效果, 用基因工程的方法改造抗 erbB2 scFv 基因结构: (1) 整合人 IgG1Fc, 使产生 ADCC 效应等, 接近全抗体的效果。(2) 整合 CD28, 其跨膜疏水区使 anti-erbB2 scFv 锚定在细胞的表面, 这种锚定型抗体较分泌型抗体具有更大的抑制肿瘤细胞生长的能力。另外 CD28 可以协助  $\zeta$  链使 T 细胞完全被激活。(3) 整合 CD3- $\zeta$  链, 这种靶向 T 细胞结合表达有 c-erbB-2 的肿瘤细胞以后, 不但通过产生抗体抑制细胞生长的途径杀死肿瘤细胞, 而且同时也通过  $\zeta$  链激活 T 细胞的途径杀死肿瘤细胞。即所构建的含 anti-erbB2 scFv-Fc-CD28- $\zeta$  融合基因的 T 细胞能够同时发挥体液免疫和细胞免疫的双重作用来产生免疫应答从而彻底清除肿瘤细胞。

本研究首先通过 SWISS-MODEL 对融合蛋白进行了三级结构预测, 保证融合基因所表达的蛋白能具备应有的生物学功能。连接肽对于保证相邻两个蛋白组分的正确折叠具有重要意义。但是, 大量的研究工作表明, 连接肽会影响融合蛋白的功能及稳定性。本研究中, scFv 与 Fc 为两个大的功能组分, 现在我们在考虑 scFv 与 Fc 的连接时, 比对了添加不同长度连接肽与不加连接肽对融合蛋白构象的影响, 认为采取 scFv 与 Fc 两部分之间不加连接肽这样的构建

策略较为合适(本课题组曾采取 scFv 与 Fc 两部分之间加连接肽的构建策略)。信号肽在真核细胞表达系统中与外源蛋白的引导定位、能否分泌及分泌效率有重要关系, 本课题组曾采用含 anti-CD20 scFv 的重组表达载体 pLNCX 上的信号肽基因序列, 现改用质粒 pSecTag2B 上的 IgGk 轻链信号肽基因序列构建融合基因, 据刘兢课题组报道质粒 pSecTag2B 上的 IgGk 轻链信号肽对类似外源蛋白的实际作用更确定。本研究通过对融合基因的两次测序(在重组 T 载体上和重组表达载体上)来确保融合基因序列的完整, 进而保证其表达出正确的蛋白。为了提高该融合基因的表达率, 首先在引物设计时加入了 Kozak 序列(AGCATGG)以提高真核表达率, 其次选择了逆转录病毒表达载体 pLNCX, 它可以感染难以转染的原代人外周血 T 淋巴细胞, 以便后续实验的顺利进行。

在我们之前的研究中采取脂质体方法转染 Jurkat 细胞, 经 G418 筛选后流式细胞术检测结果, 融合蛋白表达率仅 23.68%。脂质体转染法简单, 可携带大片段 DNA, 通用于各种类型的裸露 DNA 或 RNA, 能转染各种类型的细胞, 对细胞损伤相对较小, 但转染效率不高。我们现在采用电穿孔转染法, 流式细胞术检测结果, 融合蛋白表达率达 56.17%, 建立了稳定表达 pLNCX/anti-erbB2 scFv-Fc-CD28-CD3( $\zeta$ )的细胞株。电转染法每次可将大量 DNA 转染入大量细胞, 具有参数容易控制、操作简便快捷、可重复性强、转染率高、无残留毒性、适用谱广泛等优越性, 尤其对目前一般认为较难转染的悬浮培养细胞(如 Jurkat)亦能获得较高的转染率。

## 参考文献(References)

- 1 Xu MK, Zhang CG. Gene expression and function study of fusion immunotoxin anti-Her-2-scFv-SEC2 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 70(1): 78-84.
- 2 Barker SD, Dmitriev IP, Nettelbeck DM, Liu B, Rivera AA, Alvarez RD, et al. Combined transcriptional and transductional targeting improves the specificity and efficacy of adenoviral gene delivery to ovarian carcinoma. *Gene Ther* 2003; 10(14): 1198-204.
- 3 郭明高, 姜明红, 杨琴, 李月敏, 崔贞福, 李林芳, 等. 腺病毒介导的全抗体基因治疗卵巢癌的实验研究. *中华医学杂志* 2004; 84(14): 1147-51.
- 4 Shen YC, Wang XH, Wang XM, Chen ZL, Shen XP, Zhao CC, et al. High efficient mammalian expression and secretion of a functional humanized single-chain Fv/ human interleukin-2 molecules. *World J Gastroenterol* 2006; 12(24): 3859-65.
- 5 Xu MK, Zhang CG, Zhang HW, Zhou YF, Zhang XE, Liu L. Fusion immunotoxin anti-HER-2-scFv-SEC2 expressed in *E.coli* with an improved expression vector pASK75-EX: its construction and functioning. *Prog Biochem Biophys* 2006; 33(8): 781-8.

- 6 Huang TH, Morrison SL. A trimeric anti-HER2/neu scFv and tumor necrosis factor- $\alpha$  fusion protein induces HER2/neu signaling and facilitates repair of injured epithelia. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316(3): 983-91.
- 7 Zhang LH, Jia LT, Zhao J, Xu YM, Wen WH, Bao W, *et al.* Specific targeted killing of erbB2 positive breast cancer by retro virus-mediated immunocaspase-3 secreting T cells. *Chin Sci Bull* 2004; 49(13): 1380-5.
- 8 Edelweiss E, Balandin TG, Ivanova JL, Lutsenko GV, Leoniva OG, Popenko VL, *et al.* Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells. *PLoS One* 2008; 3(6): e2434.
- 9 Von Minckwitz G, Harder S, Hövelmann S, Jäger E, AL-Batran SE, Loibl S, *et al.* Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv (FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas. *Breast Cancer Res* 2005; 7(5): R617-26.
- 10 Shahied LS, Tang Y, Alpaugh RK, Somer R, Greenspon D, Weiner M, *et al.* Bispecific minibodies targeting HER2/neu and CD16 exhibit improved tumor lysis when placed in a divalent tumor antigen-binding format. *J Biol Chem* 2004; 279(52): 53907-14.
- 11 Biburger M, Weth R, Wels WS. A novel bispecific tetravalent antibody fusion protein to target costimulatory activity for T-cell activation to tumor cells over-expressing erbB2/HER2. *J Mol Biol* 2005; 346(5): 1299-311.
- 12 Cooper LJ, Topp MS, Serrano LM, Gonzalez S, Chang WC, Naranjo A, *et al.* T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood* 2003; 101(4): 1637-44.
- 13 Jensen MC, Cooper LJ, Wu AM, Forman SJ, Raubitschek A. Engineered CD20-specific primary human cytotoxic T lymphocytes for targeting B-cell malignancy. *Cytherapy* 2003; 5(2): 131-8.
- 14 Wang JJ, Press OW, Lindgren CG, Greenberg P, Riddell S, Qian XJ, *et al.* Cellular immunotherapy for follicular lymphoma using genetically modified CD20-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *Mol Ther* 2004; 9(4): 577-86.

## Construction of Fusion Gene anti-erbB2-scFv-Fc-CD28-CD3 ( $\zeta$ ) and Expression in Eukaryotic Cell

Wen-Jun Sui, Shi-Zhen Su, Wang-Xiong Hu, Hong-Zhi Li\*, Li-Jing Bu

(Zhejiang Provincial Key Lab of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

**Abstract** SWISS-MODEL was used to predict the tertiary structure of the fusion protein. PCR was used to amplify DNA fragment anti-erbB2-scFv (abbreviated to A) from recombinant plasmid pPIC9K, signal (abbreviated to S) from plasmid pSecTag2B and Fc-CD28-CD3 ( $\zeta$ ) (abbreviated to B) from recombinant plasmid pBullet respectively. SOE-PCR was used to construct fusion gene fragment S-A-B. After amplifying and confirming the recombinant gene fragment through TA cloning, a recombinant eukaryotic expression vector pLNCX/S-A-B was constructed and transfected to Jurkat cell line by electroporation, with stable cells selected by G418 and validated for fusion gene expression by FAM. The structure prediction showed that the fusion protein with no linker between gene fragments anti-erbB2-scFv and Fc could form better functional tertiary structure. Using the methods of PCR, restriction digest and sequencing, the recombinant eukaryotic expression vector pLNCX/S-A-B (without linker between gene fragments A and B) was constructed successfully. As analyzed by FAM, the fusion protein anti-erbB2-scFv-Fc-CD28-CD3( $\zeta$ ) could be expressed in Jurkat cells at a stable level of 56.17%. By using molecular clone method, the recombinant eukaryotic expression vector pLNCX/ anti-erbB2 scFv-Fc-CD28-CD3( $\zeta$ ) was constructed successfully and the fusion gene can be expressed in T lymphoma cell line. These results may provide a way to establish primary T lymphocyte harboring this fusion gene, and in turn build a practical basis of targeted therapy of erbB2 over-expressing tumors.

**Key words** erbB2; fusion gene; expression vector; tumor therapy

Received: July 5, 2010 Accepted: September 13, 2010

This work was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China(No.Y205171) and the Joint Research Fund for Overseas Chinese of Wenzhou Science and Technology Bureau of China(No.H20080059)

\*Corresponding author. Tel: 86-577-86699656, E-mail: wzmclhz@yahoo.com.cn