

## 研究报告

## 抗 CD20 嵌合抗体的表达与活性检测

师明磊 胡显文\* 陈惠鹏 高丽华 李世崇

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

**摘要** 表达了基因重组抗 CD20 嵌合抗体并对其生物学活性进行了初步鉴定。设计合成轻、重链可变区序列;提取血液 RNA,通过 RT-PCR 得到人  $\kappa$ 、IgG1 的轻、重链恒定区序列。运用重叠延伸 PCR,连接可变区与恒定区,将轻、重链基因连接至 pIRES 双表达载体。将质粒以阳离子脂质体转染 CHO 细胞,ELISA 挑选阳性克隆,共获得 7 株表达较高的克隆,表达量约为 2mg/L。扩大培养阳性克隆 anti-CD20-1B3,收获上清,以蛋白 A 进行亲和层析纯化表达蛋白。SDS-PAGE 检测表明纯化纯度达到 95%,蛋白相对分子量与理论值吻合。以 CD20<sup>+</sup> 细胞 Raji、Daudi、Ramos 检测,表明该抗体能与 CD20 抗原特异性结合,体外杀伤试验说明抗体能够杀伤 CD20<sup>+</sup> 淋巴瘤细胞。

**关键词** 非霍奇金淋巴瘤 CD20 单克隆抗体 嵌合抗体

非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)是最常见的血液系统恶性肿瘤,也是发病率增长最快的恶性肿瘤之一,我国每年约有 3~4 万人死于该病。目前的放、化疗对 NHL 有部分疗效而副作用极大,因此研制更加高效低毒的药物很有意义。NHL 患者中,约 85%~90% 是 B 细胞淋巴瘤,而 CD20 是 B 淋巴细胞和 B 淋巴瘤细胞表面专有的膜表面蛋白,不表达于造血干细胞、原始 B 细胞、正常血浆细胞以及其它正常组织<sup>[1]</sup>。因此研制抗 CD20 的单克隆抗体就可能专一性地杀伤 B 细胞和 B 淋巴瘤细胞,达到更好的治疗效果。美国 Genentech 和 IDEC 公司开发的 anti-CD20 嵌合抗体于 1997 年获得 FDA 批准上市,是第一个用于肿瘤治疗的治疗性抗体,由于其在非霍奇金淋巴瘤治疗中表现出较好的疗效和较低的毒副作用,已经成为美国销售额最大的抗肿瘤药物。本研究旨在研制抗 CD20 嵌合抗体,并对其生物学活性进行初步检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 载体、菌种及相应试剂

pUC19 质粒(TaKaRa), pGEM-T Easy 质粒(Promega), pcDNA3.1(+ )质粒(Invitrogen), 双表达

载体 pIRES(Clontech)。DH5 $\alpha$  感受态大肠杆菌(Doupson)、Taq 酶、Pyrobest 酶、DNA 连接酶、T<sub>4</sub> 多聚核苷酸激酶(T<sub>4</sub> PNK)、限制性内切酶 SacI、SacII、HindIII、XbaI 均为 TaKaRa 产品,限制性内切酶 BamHI、EcoRI、NheI、NotI 为 NEB 公司产品。质粒提取、PCR 产物回收、酶切产物回收分别采用 Promega 公司 Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System、Wizard PCR preps DNA purification system、Wizard DNA clean-up 试剂盒, RNA 提取试剂 Trizol(Invitrogen)。

### 1.2 抗体轻、重链可变区的合成

根据文献报道<sup>[3,4]</sup>及计算机模拟,我们设计合成轻、重链可变区序列如下(见下页页首),该序列不仅在 CDR3 区与 Rituximab 不同,其 FR4 区采用人基因序列,因此人源化程度也较 Rituximab 更高。异于 Rituximab 的部分用下划线标出。

因现有碱基合成水平只能精确合成 80 个碱基以下的基因序列,过长则误差较大,为便于化学合成,根据以下原则设计合成基因的寡核苷酸片段:相邻的 2 条寡核苷酸片段间约有 20 碱基互补,寡核苷酸片段长度一般长约 75 个碱基,尽量保证各互补寡核苷酸片段互补序列的退火温度一致。用重叠延伸 PCR 方法组装合成轻、重链可变区寡核苷酸片段<sup>[5]</sup>。总体顺序:1) 将片段 1(VL1 或 VH1、下同)和 2, 3 和

收稿日期:2005-01-27 修回日期:2005-05-24

\* 通讯作者,电子信箱:hu.xianwen@tsinghua.org.cn

Light chain variable region

ATGGATTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGT  
CCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGG  
GAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTGAAGTGTAAGTTACATCCACTGGTT  
CCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGG  
CTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCA  
CCATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGT  
TTTAAACCCACCCACGTTCTGGAGGGGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Heavy chain variable region

ATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTACGCGTGTCCCTGTCC  
CAGGTACAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA  
AGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAA  
ACAGACACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGA  
TACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCC  
AGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTAC  
TGTGCAAGATCGACTTACTACAGTAACTCTTACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCCAA  
GGGACCACGGTCACCGTCTCT

4,5 和 6,7 和 8 分别混合,进行重叠延伸 PCR,得到 1-2,3-4,5-6,7-8。2) 将 1-2 和 3-4,5-6 和 7-8 分别混合进行重叠延伸 PCR,得到 1-4 和 5-8。3) 混合 1-4 和 5-8,重叠延伸 PCR 得到基因全长。

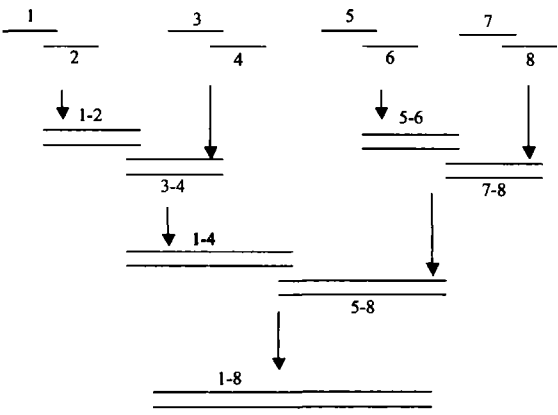


图 1 重叠延伸 PCR 方法组装成的轻、重链可变区寡核苷酸片断示意图

Fig.1 Construction of L, H chain variable region by overlap extension PCR form oligonucleotide

1.3 轻、重链恒定区基因的调取及可变区、恒定区基因的连接

根据在 Genbank 检索得到的抗体  $\kappa$  和 IgG1 型基因序列,设计调取的引物 L 上、L 下、H 上、H 下见表 1。分离健康人淋巴细胞,提取 RNA,通过 RT-PCR

扩增得到轻、重链恒定区序列。上述序列均测序正确后,通过重叠延伸 PCR,连接可变区与恒定区,得到完整抗体基因。再次测序正确后,将轻、重链基因分别用相应限制性内切酶切下,连接至 pIRES 双表达载体,抗体的轻重链基因共用同一个启动子,通过 IRES 序列连接。最终构建的表达载体如图 2。

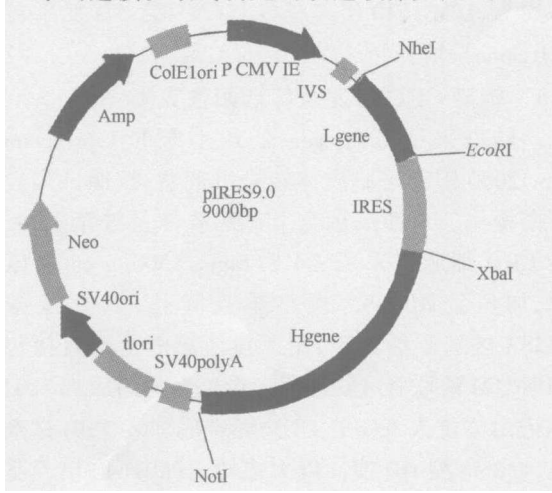


图 2 基因重组 anti-CD20 抗体的 pIRES 表达载体  
Fig.2 pIRES dicistronic expression vector with L, H chain gene sequence

1.4 引物

PCR 主要引物见表 1。

表 1 PCR 主要引物  
Table 1 Primers for PCR

引物名称	碱基序列	功能碱基	说明
PLU	5'-ATA <b>TCTAGA</b> ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATC-3'	<i>Xba</i> I 酶切位点	V <sub>L</sub> 上游引物
PLD	5'-ATAA <b>AGCTT</b> TTTGATTTCCAGCTTGGTCCCC-3'	<i>Hind</i> III 酶切位点	V <sub>L</sub> 下游引物
PHU	5'-ATA <b>TCTAGA</b> ATGGGTGGAGCCTCATCTTGC-3'	<i>Xba</i> I 酶切位点	V <sub>H</sub> 上游引物
PHD	5'-ATAA <b>AGCTT</b> AGAGACGGTGACCGTCCCTTG-3'	<i>Hind</i> III 酶切位点	V <sub>H</sub> 下游引物
L 上	5'-TTCGGAGGGGGACCAAGTG-3'		C <sub>L</sub> 上游引物
L 下	5'-TCAACACTCTCCCTGTGAAG-3'		C <sub>L</sub> 下游引物
H 上	5'-GGCCAAGGGACCAAGTGAC-3'		C <sub>H</sub> 上游引物
H 下	5'-TCATTTACCGGAGACAGGAG-3'		C <sub>H</sub> 下游引物
VLUII	5'-GTGG <b>CTAGCGCC</b> GCCACCATGGATTTTCAGGTGCAGATTATC-3'	<i>Nhe</i> I 酶切位点 <u>Kozak 序列</u>	L 上游引物
VLDII	5'- <b>GCCACCGTACGTTTGATTTCACCTTGGTCCCCCTCGAAC</b> -3'	<u>重叠片段</u>	重叠延伸引物
CLUII	5- <b>GGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATC</b> -3		
CLDII	5-GTG <b>GAAATTC</b> TCAACACTCTCCCTGTGAAG-3	<i>Eco</i> RI 酶切位点	L 下游引物
VHUII	5-GTG <b>TCTAGA</b> GCGGCCACCATGGGTGGAGCCTCATCTTG-3	<i>Xba</i> I 酶切位点 <u>Kozak 序列</u>	H 上游引物
VHDII	5-GGTGCTAGCAGACGCGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAGACATTG-3	<u>重叠片段</u>	重叠延伸引物
CHUII	5-CACCGTCTCTGTAGCAACCAAGGGCCATC-3		
CHDII	5-GTG <b>GGATCC</b> ACTTACCTGTGCTTCTTGTCACCTTGGTGTGC-3	<i>Bam</i> HI 酶切位点 <u>剪接供体</u>	H 下游引物

V<sub>L</sub>: 轻链可变区基因; V<sub>H</sub> 重链可变区基因; C<sub>L</sub> 轻链恒定区基因; C<sub>H</sub> 重链恒定区基因; 引物合成及序列测定由上海博亚公司完成

### 1.5 细胞系及培养条件

CHO-K1 细胞为本室保存, 培养条件为 DMEM/F12 培养基 (GIBCO), 含 5% 加强型小牛血清 (Hyclone), 培养于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 温箱<sup>[6]</sup>。Raji、Daudi、Ramous、Jurkat 细胞均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心, HL60 购自中国药品生物制品检定所, PBMC 由健康人血液分离, 培养条件均为 RPMI1640 培养基 (GIBCO), 含 5% 胎牛血清 (Hyclone), 培养于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 温箱。

### 1.6 转染 CHO 细胞及筛选阳性克隆

转染采用 Invitrogen 公司生产的 Lipofectamine (tm)2000 阳离子脂质体转染试剂盒, 按照试剂盒说明书操作。对照采用空 pIRES 载体及鲑精 DNA 转染 CHO 细胞。采用 G418 (Sigma) 500 μg/ml 加压筛选, 加压约 10d 后, 挑出单克隆孔, 以直接竞争 ELISA 挑选阳性克隆, 用无血清培养上清直接包被 NUNCTM 酶联板 4℃ 过夜, 3% BSA 封闭后加入 HRP 标记山羊抗人 IgG (H+L), 孵育后加入 TMB 试剂显色, 450nm 测 OD 值。以无血清 RPMI1640 培养基为阴性对照<sup>[7]</sup>。

### 1.7 单克隆的扩大培养及蛋白收获

选择表达水平最高的基因重组 CHO 工程细胞系 anti-CD20-1B3 于 1000ml 转瓶中用含 2% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, 待细胞长满瓶壁时, 换为无血清培养基, 隔天收液, 可连续进行收液 3~5 次。

### 1.8 表达蛋白的纯化及初步测定

利用蛋白 A 对 IgG 的特异性吸附作用, 采用 nProtein A Sepharose 4 Fast Flow 分离介质 (Amersham Biosciences) 进行亲和层析, 纯化表达蛋白。操作方法参见产品说明。纯化后, 以紫外分光光度计测定 A260 和 A280 值, 按 1.45 A280-0.74 A260 推算蛋白浓度<sup>[8]</sup>。以 SDS-PAGE 测定蛋白的纯度、分子量。

### 1.9 细胞 ELISA 检测产物的特异性

以 CD20<sup>+</sup> 细胞 Raji、Daudi、Ramous (均为 Burkitt 淋巴瘤细胞) 检测表达抗体对 CD20 的结合能力; 以 T 淋巴瘤细胞株 Jurkat、人白血病细胞株 HL60 以及 PBMC 检测表达抗体与 CD20<sup>-</sup> 细胞的结合情况, 均以 Protein A 洗脱缓冲液 Gly-HCl 为阴性对照。操作时以细胞直接包被 NUNCTM 酶联板 (经多聚赖氨酸处理), 待细胞附于底部后, 以戊二醛固定, 3% BSA 封闭后加入表达抗体, 孵育后充分洗涤, 再加入 HRP 标记山羊抗人 IgG (H+L), 孵育后加入 TMB 试剂显色, 450nm 测 OD 值。

### 1.10 检测产物对 CD20<sup>+</sup> 细胞的杀伤作用

根据文献报道<sup>[9,10]</sup>, 抗体与 CD20 结合以后, 能够引起细胞凋亡, 从而达到消除肿瘤细胞的作用, 因此, 我们将该抗体直接加入 CD20<sup>+</sup> 细胞 Ramous 的培养体系中, 观测抗体的杀伤细胞作用。在 96 孔板中培养细胞, 保持各孔细胞数目相等, 将抗体稀释至 0.5、5、50 μg/ml 3 个浓度加入至相应细胞孔, 37℃ 作用 24h 后, 以 Annexin V、PI 双染 (Annexin

V 使凋亡细胞绿染;PI 使死亡细胞红染),荧光显微镜下观测染色情况<sup>[11]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 抗体基因片段的克隆及表达载体的构建

经过 RT-PCR、重叠延伸 PCR 等一系列基因克隆与扩增,测序并修改错误碱基,最终得到完全正确的基因片段,见图 3。测序结果证明,所调取抗体恒定区重链为 IgG1 型,轻链为  $\kappa$  型。

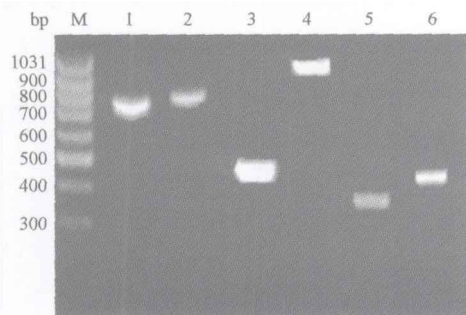


图 3 各 DNA 电泳条带

Fig.3 Electrophoretic bands of DNA

1: L 728bp; 2: V<sub>H</sub> + C<sub>H1</sub> 734bp; 3: V<sub>H</sub> 420bp; 4: C<sub>H1</sub> 993bp;  
5: C<sub>L</sub> 324bp; 6: V<sub>L</sub> 384bp

### 2.2 转染 CHO 细胞及筛选阳性克隆

直接竞争 ELISA 挑选阳性克隆,共筛选 72 孔单克隆,其中有 20 余株有表达,1B3、1B4、1D3、2A2、2D4、3A2、4F10 等 7 株表达水平较高。细胞单克隆形态见图 4(a)。因各单克隆生长速度不同,因此只能分批进行筛选。图 4(b)是第一批 ELISA 筛选阳性克隆照片,阳性克隆率约 25%。选用羊抗人 IgG(H+L)作为二抗,检测无血清培养上清呈阳性结果,说明我们研制的抗体中含有人轻重链恒定区,是人源化的基因工程抗体。



图 4(a) 表达 anti-CD20 嵌合抗体的细胞克隆

Fig.4(a) Cell clones expression anti-CD20 antibody

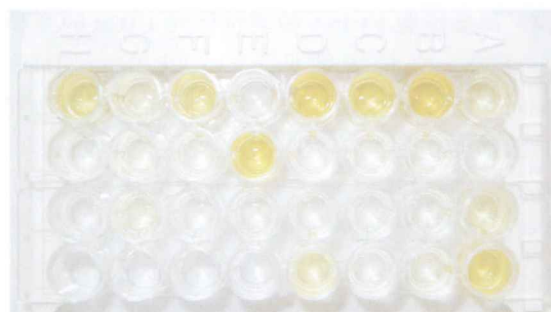


图 4(b) ELISA 挑选阳性克隆结果

Fig.4(b) Positive clones selected by ELISA

### 2.3 表达蛋白的纯化及初步测定

将 3 次收获上清约 1.5L 纯化后,得到蛋白溶液约 25ml。根据紫外检测法测得蛋白浓度推算该单克隆表达水平约为 2mg/L。由于能够与 Protein A 亲和柱结合,因此可以进一步判定该蛋白为抗体类物质。

图 5 为在非还原和还原条件下的 SDS-PAGE 结果,非还原条件下蛋白质的分子量约 150kDa,和人体内的 IgG1 的分子量一致。在还原条件下,有 2 条电泳带,分子量分别为 23kDa 和 51kDa,与设计轻重链分子量吻合。表明我们得到的蛋白质是 IgG1 型的完整抗体分子。

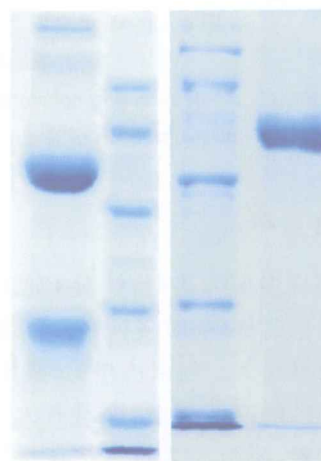


图 5 SDS-PAGE 检测蛋白

1:还原型 SDS-PAGE; 2: 标准蛋白 1, 97.4, 66.2, 43, 31, 20, 14.4kDa; 3: 标准蛋白 2, 22, 17, 11.6, 76, 53kDa; 4: 非还原型 SDS-PAGE

Fig.5 Result of SDS-PAGE

1: reduced SDS-PAGE; 2: Mark 1, 97.4, 66.2, 43, 31, 20, 14.4kDa;  
3: Mark 2, 22, 17, 11.6, 76, 53kDa; 4: non-reduced SDS-PAGE

## 2.4 间接细胞 ELISA 检测抗体对 CD20 的亲合性

ELISA 检测结果见表 2。以 Raji、Daudi、Ramos 3 种细胞为抗原,其各检测孔与阴性对照孔相比,OD450 值均有明显差别,说明该抗体可与 CD20<sup>+</sup> 细胞发生结合。检测表达抗体与 CD20<sup>-</sup> 细胞结合情况的实验表明该抗体与 Jurkat 基本不结合、与 HL60 以及 PBMC 部分结合(资料未显示),与文献报道相符,说明该抗体能够与 CD20 抗原发生特异性结合。

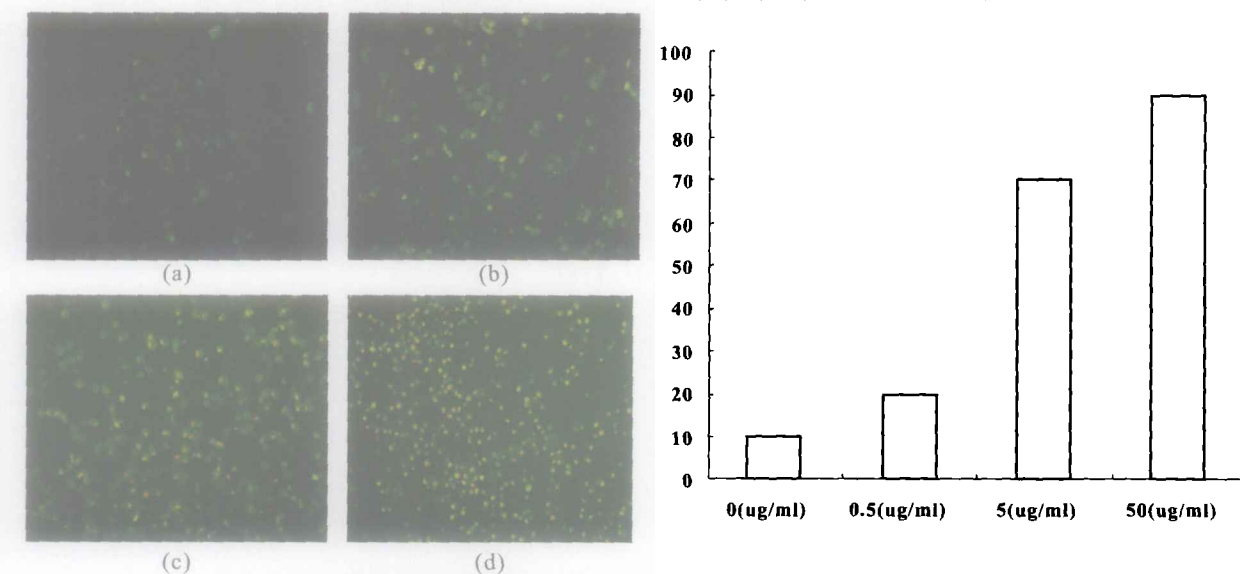
表 2 各检测孔吸光度

Table 2 Absorbance of each plot

	1 #	2 #	control
Raji	1.017	0.781	0.134
Daudi	1.497	1.379	0.888
Ramos	0.688	0.813	0.078

## 2.5 基因工程抗体对 CD20<sup>+</sup> 细胞的杀伤作用

实验结果发现,在抗体浓度为 0、0.5、5、50 $\mu$ g/ml 的条件下,引发了不同程度的细胞凋亡与死亡,并且随着抗体浓度的增加,杀伤效应也随之增强,见图 6。

图 6 a~d:蛋白浓度依次为 0、0.5、5、50 $\mu$ g/ml 引起的细胞凋亡荧光显微照片;

e:细胞凋亡死亡百分数随抗体浓度的增加而增加

Fig.6 a~d:microfluorophotometric photos of cell apoptosis,protein concentration 0, 0.5, 50 $\mu$ g/ml;

e:the proportion of death cell increasing along with the addition of antibody concentration

## 3 讨论

国内外许多研究表明,针对 CD20 的抗体可有效杀伤 B 淋巴瘤细胞,对多种 B 淋巴细胞功能紊乱的疾病有较好疗效。与鼠抗相比,嵌合抗体既保留了鼠源可变区的高亲和性,又具有人 Fc 段的多种免疫杀伤功能,降低了人抗鼠抗体反应的发生率,改善了临床治疗效果。与其它小分子基因工程抗体相比,嵌合抗体作为完整抗体分子,在体内半寿期更长,并具有人 Fc 段的多种免疫杀伤功能。

提高完整抗体分子的表达量必须同时提高轻链和重链的表达。目前表达抗体分子有两种方式:一类是将轻、重链基因分别连接至不同表达载体,一类是轻、重链基因连在同一载体上但处于不同的表达单元中。使用这两种表达方式,由于轻重链表

达水平存在较大差异,往往导致完整抗体分子表达水平极低<sup>[12]</sup>。本试验采用双表达载体表达抗体分子,使轻重链基因处于同一表达单元之中,从而有利于轻重链基因表达水平相当,且同一细胞同时表达轻重链,有利于完整抗体分子的正确折叠。

抗体在体内通过多种途径发挥免疫杀伤作用,其完整与确切的作用机理至今仍不完全清楚。目前国内外文献<sup>[9,10]</sup>报道抗 CD20 嵌合抗体的作用机理主要包括:抗体依赖的细胞毒作用、补体依赖的细胞毒作用以及抗体与 CD20 分子结合引起的直接效应(包括抑制细胞生长,改变细胞周期以及凋亡)。抗 CD20 嵌合抗体还可通过致敏肿瘤细胞协助增强传统细胞毒性药物的疗效。细胞因子对改善它的疗效也有一定作用。本实验研制的嵌合抗体已初步证明具有杀伤细胞的活性。

## 参考文献

- [ 1 ] Buben J K, Zhou L J, Bell P D, et al. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a  $Ca^{2+}$  conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol*, 1993, 121 (5): 1121 ~ 1132
- [ 2 ] 胡显文, 陈惠鹏, 汤仲明, 等. 生物制药的现状与未来(1): 历史与现实市场. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(12): 95 ~ 101  
Hu X W, Chen H P, Tang ZH M, et al. *China Biotechnology*, 2004, 24(12): 95 ~ 101
- [ 3 ] Anderson D R, Hanna N, Newman R A, et al. Chimeric and radiolabelled antibodies specific to human CD20 antigen and use thereof for treatment of B-cell lymphoma. United States Patent, 6399061, 2002-06-04
- [ 4 ] Robinson R R, Liu A Y, Ledbetter J A. Chimeric antibody with specificity to human B-cell surface antigen. United States Patent, 5500362, 1996-03-19
- [ 5 ] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 597 ~ 618
- [ 6 ] Hartung T, Balls M, Bardouille C, et al. Good cell culture practice. *ATLA*, 2002, 30: 407 ~ 414
- [ 7 ] 董志伟, 王琰. 抗体工程. 第二版. 北京: 北京医科大学出版社, 2002. 291 ~ 292  
Dong Z W, Wang Y. *Antibody engineering*. 2 ed. Beijing: Beijing Medical University Press, 2002. 291 ~ 292
- [ 8 ] 李建武. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994. 171 ~ 173  
Li J W. *Biochemistry experiment: principle and methods*. Beijing: Peking University Press, 1994. 171 ~ 173
- [ 9 ] Flieger D, Renoth S, Beier I, et al. Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cell Immunol*, 2000, 204: 55 ~ 63
- [ 10 ] Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 2003, 101 (3): 949 ~ 954
- [ 11 ] Harlow E, Lane D. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. 67 ~ 86
- [ 12 ] 刘国奇, 陈小密, 徐静, 等. 用 IRES 及 dhfr 构建哺乳动物细胞双表达载体. *军事医学科学院院刊*, 2000, 24(1): 9 ~ 11  
Liu G Q, Chen X M, Xu J, et al. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2000, 24(1): 9 ~ 11

## Construction, Expression and Characterization of Anti-CD20 Chimeric Monoclonal Antibody

SHI Ming-lei HU Xian-wen CHEN Hui-peng GAO Li-hua LI Shi-chong

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences Beijing 100071, China)

**Abstract** A chimeric antibody against CD20 on B cell was constructed and expressed in CHO cell and its characters was studied.  $V_H$  and  $V_L$  genes were designed according to reported sequence, they were synthesised as oligonucleotide and then connected by overlap extension PCR;  $C_H(IgG1)$  and  $C_L(\kappa)$  genes were amplified from normal B cell RNA by RT-PCR. They were connected by overlap extension PCR and then cloned into pIRES bicistronic expression vector. The vector was transfected into CHO cell for expression. High expression level clones were selected by ELISA. 7 clones were found to secrete antibody productively. The expression product of anti-CD20-1B3 was purified by proteinA affinity chromatography which specifically bind to Fc fragment of antibody. Protein concentration was measured by ultraviolet spectrometer. The expression concentration of 1B3 was about 2mg/L. Reduced SDS-PAGE analysis showed that the relative molecular weight of chimeric antibody was coincidence with expectation, its purity was about 95%. ELISA assay revealed that the chimeric antibody being capable of binding specifically to human lymphoma cell lines(Raji, Ramos, Daudi) expressing CD20 antigen. Cytotoxicity experiment revealed that the chimeric antibody alone induced direct cytotoxicity in CD20-expressing human lymphoma cell line.

**Key words** Lymphoma Non-Hodgkin's CD20 Monoclonal antibody Chimeric antibody