

抗 HFRSV 人单抗可变区基因克隆及其序列测定

高 磊 陈苏民 陈南春 杨安钢 崔运昌

(第四军医大学生物化学及分子生物学教研室, 西安 710032)

摘 要 从杂交瘤细胞株 87-2 提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA 链, 进行 PCR 反应。其中扩增重链可变区一对引物分别与人免疫球蛋白重链 V 区基因 5' 端和 J 区基因 3' 端互补, 扩增 λ 轻链可变区引物与人免疫球蛋白 λ 轻链 V 区基因 5' 端和 J 区基因 3' 端互补。将重、轻链可变区基因的 PCR 扩增产物分别插入 M13 噬菌体, 经转化筛选分别获得重组克隆。双脱氧法测定其序列, 所得核苷酸序列经计算机分析, 轻、重链可变区基因长度分别为 309bp 和 405bp, 编码 103 个氨基酸和 135 个氨基酸, 有明显抗体可变区特征, 具有骨架区和抗原互补区。

关键词 肾综合症出血热病毒, 人源性单克隆抗体, 抗体可变区, 基因序列

近年来随着基因工程技术的发展, 人们开始利用基因工程方法对人源性单克隆抗体和鼠源性单克隆抗体进行改造^[1-6]。本文利用反转录-PCR 方法成功地克隆了人源性抗肾综合症出血热病毒 (HFRSV) 核心抗原单克隆抗体可变区基因, 为获得人源性单克隆抗体基因工程产物打下了基础。

1 材料和方法

1.1 杂交瘤细胞系的培养

87-2 为一株人-人杂交瘤细胞系^[7], 用 RPMI1640 培养液 (含 10% 小牛血清) 培养, 经有限稀释法克隆筛选高产量株。扩大培养, 应用前第三天调整细胞数到 1×10^5 cells/ml, 应用前一天半量换入新鲜培养液。

1.2 提取杂交瘤细胞总 RNA^[8]

收集杂交瘤细胞, $1500r/min$ 离心 5 分钟, 弃上清, 加入异硫氰酸胍变性液 500 μ l, 混匀, 振荡 10 秒。加 2mol/L 醋酸钠 50 μ l, 水饱和酚 500 μ l 和氯仿/异戊醇 (49:1) 100 μ l, 颠倒混合数秒, 冰浴 15 分钟, $10000r/min$ 离心 10 分钟, 吸取上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇, $10000r/min$ 离心 10 分钟。弃上清, 70% 酒精洗涤一次, 真空抽干, 加 30 μ l H_2O 溶解, $-20^\circ C$ 保存, 备用。

1.3 cDNA 的合成^[9]

取上述制备的细胞总 RNA 4 μ l (约 20 μ g), 加入寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸 100pmol, $5 \times$ 反转录第一链缓冲液 4 μ l, 5mmol/L dNTP 4 μ l, 0.1mol/L DTT 1 μ l, $68^\circ C$ 水浴 5 分钟, 再加入 RNasin 20u, 反转录酶 1u。 $37^\circ C$ 温育 1 小时, 反应产物 $-20^\circ C$ 保存。

1.4 PCR 引物

依据计算机分析, 设计并人工合成人免疫球蛋白重链和人轻链可变区 5' 端和 J 区 3' 端引物, 同时在引物中加入限制酶 EcoR I 和 Sal I 酶切位点。VH BACK 和 VH FOR 一对引物用于扩增 VH 片段。Vλ BACK 和 Vλ FOR 用于扩增 Vλ 片段, 引物序列如下:

VH BACK: 5' CTGAATTCATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG3'

VH FOR: 5' ATGTCGACTATGAGGAGACGGTCGACCAGGGTGCC3'

Vλ BACK: 5' CAGAATTCAGTCACTCAECCFHICTC3'

Vλ FOR: 5' ACCGTCGACGGTHAKKTPGGTCCC3'

E: A or G; F: A or C or T or G; H: C or G;

I: C or A; K: C or A or G; P: T or G

1.5 PCR 反应^[11]

取反转录产物 2μl, 5×PCR 缓冲液 10μl, 一对引物各 100μmol/L, 加 H₂O 至 49μl, 煮沸 5 分钟, 冰浴下加 FD 聚合酶(复旦大学) 2u, 液体石蜡封面, 进入 PCR 循环, 92℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 1 分钟, 共 50 个循环, 反应产物于 4℃ 保存。取 8μl 反应液经 2% 琼脂糖凝胶电泳 5V/cm 30 分钟, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果。

1.6 可变区基因的克隆及其序列测定

将 PCR 扩增可变区基因片段和 M13 噬菌体载体双链 DNA 分别用 EcoRI 和 Sal I 限制酶进行双酶切反应, 电泳回收酶切片段。加 T4 连接酶将可变区基因与载体 DNA 连接, 重组 DNA 转化 JM103 大肠杆菌, 筛选重组克隆, 提取单链重组 DNA, 加³²P 放射性同位素标记, 用双脱氧链中止法测定可变区基因序列。所得序列输入计算机分析。

2 结 果

2.1 细胞培养与 RNA 提取

本文应用上述方法培养杂交瘤细胞保证细胞生长状态良好, 抗体产量高。应用前台

CAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA AAG	Q V Q L L E S G G G L V K
CCT GGG GGG TCC CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA	P G G S L R L S C A A S G
TTC ACT TTC AGT AAC GCC TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG	F T F S N A W M S W Y R Q
GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT GGC CGT ATT AAA	A P G K G L E W V G R T K
ACG AAA ACT GAT GGT GGG ACA ACA GAC TAC GCT GCA CCC	<u>T K T D G G T T D Y A A P</u>
GTG AAA GGC AGA TTG ACC ATC TCA AGA GAT GAT TCA AAA	V K G R F T I S R D D S K
AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AAA ACC GAG	N T L Y L Q M N S L K T E
GAC ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC ACA GAT ACC CTC CGG	<u>D T A V Y Y C T T D T L R</u>
AAG ATT GTA GTA GTA CCA GCT GCT ATG GAA GAG ACC GGG	<u>K I V V V P A A M E E T G</u>
TAT AGC AGT GGC TGG TAC GGC TGG GGC CAG GGC ACC CTG	<u>Y S S G W Y G W G Q G T L</u>
GTC ACC GTC TCC TCA	V T V S S

图 1 抗体 (87-2) 重链可变区基因序列

Fig. 1 VH nucleotide and deduced amino acid sequence of 87-2

The complementarity determining regions (CDRs) are underlined

酚蓝染色检查细胞成活率 $>95\%$ 。同时采用异硫氰酸法快速一步提取细胞 RNA, 提取量多, 质量好。紫外测定 RNA 提取量, 约为 $20\mu\text{g}/10^6\text{cells}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值达 2.0。

2.2 PCR 扩增可变区基因片段

分别用 VH BACK 和 VHFOR、V λ BACK 和 V λ FOR 两对引物, 从杂交瘤细胞 cDNA 中扩增得到人源性抗 HFRSV 单克隆抗体轻、重链可变区基因, 电泳结果显示轻、重链可变区基因大小分别约为 300bp 和 400bp。

2.3 可变区基因克隆及其序列测定

将轻、重链可变区基因与 M13 噬菌体 mp18 和 mp19 两种载体双链 DNA 连接, 转化大肠杆菌 JM103, 筛选阳性克隆, 经酶切鉴定含克隆基因的重组体。取轻、重链重组 DNA 各 2 个克隆, 提取单链 DNA, 进行序列测定。所得序列输入计算机进行分析, 轻、重链可变区基因长分别为 309bp 和 405bp, 编码 103 个氨基酸和 135 个氨基酸。含有抗体可变区基因特征, 有明确的框架区和抗原互补区。轻、重链可变区全基因序列见图 1 和图 2。

3 讨 论

1989 年, Sastry^[11] 等成功地应用 PCR 方法扩增鼠单抗的轻、重链可变区基因, 此方法虽简便易行, 但也存在一定难度, 其中关键之一, 是引物设计。我们在引物设计中首先考虑到引物的通用性^[12], 而我们所扩增可变区基因为未知基因, 故引物要通用于扩增各类重、轻链基因。Sirirury^[13] 等设计了几对引物用于扩增各种不同类别的人 λ 轻链可变区, 这样目的性强, 但费用高。另外, 我们还考虑了引物特异性, 将设计好的引物序列输入计算机, 筛选一对与抗体可变区两端保守序列特异性最高的引物, 从而确保 PCR 扩增产物为抗体可变区基因, 而不出现非特异性扩增带。最后我们还在引物中加入适于克隆、表达的限制酶酶切位点。Chandhary^[14] 等统计了鼠抗体可变区基因中各种限制酶酶切位点图谱, 发现各种限制酶酶切位点序列在抗体可变区中出现频率不同。我们选择了出现频率低, 而且价格较低廉的 EcoRI 和 Sal I 两种限制酶位点做为引物酶切位点。本研究结果为表达抗肾综合症出血热病毒人源性基因工程抗体奠定了基础。

参 考 文 献

```

AAT ICG CTG ACT CAG CCT GAC TCG GTG TCA
N   S   L   T   Q   P   D   S   V   S
GTG TCC CCA GGA CAA ACG GCC AGG ATC ACC
V   S   P   G   Q   T   A   R   I   T
TGC TCT GGA GAT GCA TTG CCA AAA AAA TAT
C   S   G   D   A   L   P   K   K   Y
GCT TAT TGG TAC CAG CAG AAG TCA GGC CAG
A   Y   W   Y   Q   Q   K   S   G   Q
GCC CCT GTG CTG GTC ATC TAT GAG GAC AGC
A   P   V   L   V   I   Y   E   D   S
AAA CGA CCC TCC GGG ATC CCT AAG AGA TTC
K   R   P   S   G   I   P   E   R   F
TCT GGC TCC AGC TCA GGG ACA ATG GCC ACC
S   G   S   S   S   G   T   M   A   T
TTG ACT ATC AGT GGG GCC CAG GTG GAG GAT
I   T   I   S   G   A   Q   V   E   D
GAA GCT GAC TAC TAC TGT TAC TCA ACA GAC
E   A   D   Y   Y   C   Y   S   T   D
ACG AGT GGT AAT CAT AGG GGG GTG TTC GGT
T   S   G   N   H   R   G   V   F   G
GGA GGG ACC
G   G   T

```

图 2 抗体 (87-2) 轻链可变区基因序列

Fig. 2 V λ nucleotide and deduced amino acid sequence of 87-2
The complementarity determining regions (CDRs) are underlined

[1] Morrison S L. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 6851—6855.

- [2] Boulianne G I. *et al.* Nature, 1984, **312** : 643—646.
[3] Neuberger M *et al.* Nature, 1985, **314** : 268—270.
[4] Jones PT *et al.* Nature, 1986, **321** : 522—525.
[5] Verhoeyen M *et al.* Science, 1988, **239** : 1534—1536.
[6] Riechmann L. Nature, 1988, **332** : 323—327.
[7] 崔运昌等. 中华医学杂志, 1989, **69** (4) : 217—220.
[8] 董增军, 李德春. 中国免疫学杂志, 1991, **7** (1) : 56—57.
[9] Kurtz DT. Gene, 1981, **13** : 145.
[10] Orlard R, Gussow DH. P N A S, 1989, **86** : 3833—3837.
[11] Sastry L. P N A S, 1989, **86** : 5728—5732.
[12] Kabat EA *et al.* Sequences of proteins of immunological interest, NIH 1987.
[13] Sirirury S *et al.* Eur J Immunol, 1990, **20** : 2661—2666.
[14] Chudhary YK *et al.* P N A S, 1990, **87** : 1066—1077.

Gene Cloning and Sequencing of the Variable Region of Human Monoclonal Antibody Against Hemorrhagic Fever Virus

Gao Lei Chen Sumin Chen Nanchun Yang Angang Cui Yunchang

(The Fourth Military Medical University, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xi'an 710032)

Abstract Human-Human hybridoma cell line 87-2 secretes anti-HFRSV human monoclonal antibody. Total RNA was extracted from the cell and was reverse transcribed to the first strand cDNA using oligo d(T) as primer. A set of oligonucleotide primers were designed to amplify the cDNA of human immunoglobulin heavy and light chain variable domains by polymerase chain reaction. The amplified VH and VL fragments were ligated to the phage M13 vector DNA. The clones containing V gene inserts were sequenced. The sequences were confirmed as the human immunoglobulin variable genes by comparing with those of known sequences. There are framework (FR) and complementarity determining (CDR) regions in the variable genes.

Key words Human monoclonal antibody, variable region, gene sequence