维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0594－04

人抗 HBs 轻链基因的序列测定及序列分析

石小枫，刘 杞，王志毅

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:获得人源性乙型肝炎病毒抗 HBs 轻链基因。方法:从已构建的人源性噬菌体抗体库中,用固相化 HBsAg 对构建的人源性噬菌体抗体库进行三轮淘筛,经 ELISA 实验,筛选到抗 HBs 噬菌体抗体(P/N:2.415)的阳性克隆,根据已知序列合成一对轻链引物,进行 PCR 扩增,扩增出轻链目的基因片段,将目的基因片段定向克隆入质粒 pUC18,进行序列测定及分析。结果:筛选出的克隆具有 HBsAg 特异性亲和力,构建了 pUC18－抗 HBsκ 链重组质粒,序列分析其为 κ 链,为 643bp 包括了可变区和恒定区。结论:利用抗原抗体特异性反应从噬菌体抗体库中筛选到抗 HBs 轻链基因。

【关键词】人源性 Ig 轻链;序列分析;HBsAg

【中国图书分类法分类号】R510.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－12－24

Sequence and analysis of human anti－HBsκ light chain gene

SHI Xiaofeng, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To obtain the clone and gene of light chain on human antibody against HBs. *Methods*: The phage displaying library was subjected to three rounds panning of "adherence－elution－amplification" with HBsAg coated in solid phase and help phage. The positive clone against HBsAg was characterized by ELISA assay and its P/N value was 2.415. The recombinant plasmid vectors from the positive clone was amplified by PCR with designed oligonucleotide primers of κ light chain. The κ chain PCR fragment was subcloned into plasmid pUC18 and sequenced. *Results*: The phage antibody against HBsAg was screened from a human immunoglouin phage displaying library. The pUC18－κ recombinant plasmid was constructed and sequenced. The gene size of κ chain is 643bp including variable region and constant region. *Conclusion*: According to the sequenceing and ELISA assay, we suggest that κ chain is a human anti－HBs－κ immunoglobuin.

【Key words】Human Ig light chain; Sequencing analysis; HBsAg

基因工程抗体在医学生物学研究、疾病的诊断、治疗等方面有着广泛的应用,尤其是利用感染某种疾病或接触某种抗原的人淋巴细胞得到的人源性抗体,较单克隆抗体及嵌合抗体等有许多优点。噬菌体抗体技术的问世,为人源性基因工程抗体的获取带来了极大的方便,通过建立足够大的噬菌体抗体库,用不同的抗原进行淘筛而获得多种特异性抗体。本文就是在已建立的噬菌体抗体库基础之上[1],经 HBsAg 反复的"吸附－洗脱－扩增",获得了抗 HBs 噬菌体抗体基因,经 PCR 扩增目的基因,亚克隆入质粒 pUC18,构建了人抗 HBs 的 pUC18－κ 重组质粒并进行了 DNA 序列分析。

作者介绍:石小枫(1964－),男,副教授,博士生,
主要研究方向:病毒性肝炎的免疫发病机理及治疗。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 质粒 pComb3Hss－Fab:为本所构建的人源性噬菌体抗体库[1],质粒 pUC18 购自上海生工生物工程公司。

1.1.2 引物 参照冷泉港实验室的实验手册[2]设计轻链引物。

轻链(κ 链):

5' 端: 5' － GAA (C) ATT (C) GAGCTCACG (C) CAGTCTCCA－3'

3' 端: 5 － GCGCCGTCTAGAATTAAACACTCTCC-CCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAACTCAG－3'。

由上海生工生物工程公司合成,2OD 值,PAGE 纯化。

1.1.3 血源性乙肝病毒 HBsAg 1mg/ml,批号:980709,购自北京医科大学肝病研究所肝炎试剂研究中心。各种生物酶、dNTP 及 DNA 质粒提取及回收试剂盒分别购自上海华顺及

维普资讯 http://www.cqvip.com

生工公司。

1.2 主要方法

从已构建的噬菌体抗体库中[1]筛选抗人 HBs 抗体基因，然后进行克隆、鉴定、测序。

1.2.1 抗 HBs 抗体基因的获取

1.2.1.1 用固相化 HBsAg 对噬菌体库的富集筛选

先用包被液将 HBsAg 稀释成 0.5mg/ml，用 200μl/well（0.1mg/well）包被酶标板，置于 4℃ 湿盒中过夜。次日弃包被液，以 3% 的 BS 封闭，每孔加 50 μl 经扩增的人源性噬菌体抗体库，37℃ 湿盒中放置 2h，用 TBST 洗孔 4 次，每次静置 5min，每孔加 50μl 洗脱液，室温静置 15min，用吸头反复吹打后吸出全部液体，用 2 mol/L Tris 中和至 pH 7.5，－20℃ 冻存备用。这样反复筛选－扩增共 3 次。

1.2.1.2 PCR 扩增

HBsAg 富集筛选的人源性噬菌体抗体库，转化大肠杆菌 XL1－Blue，用 DNA 质粒提取 Kit 分别抽提质粒，作 PCR 扩增。PCR 参数：94℃ 预变性 5min；进入循环：93℃ × 45s，55℃ × 45s，72℃ × 60s，共 35 个循环，循环完成后 37℃ × 7min，4℃ 保存。将 PCR 扩增产物进行 1% agarose 电泳，有 660bp 扩增条带的重组质粒留作 ELISA 鉴定用。

1.2.1.3 ELISA 反应鉴定

用包被液将 HBsAg 稀释成 1μg/ml，用 50μl/well 包被酶标板（0.05μg/well），同时设 HBc 对照（用检测 HBc Ab 试剂盒），4℃ 湿盒过夜。3% BSA 封闭，将 PCR 有 660bp 扩增条带的重组人源性噬菌体抗体质粒作 1∶1、1∶2 稀释，按 Kit 的操作说明进行，同时设阴性对照、空白对照及待检样品（1∶10、1∶50 稀释），每孔加相同体积的相应样品，即：50μl/well，经 37℃ × 2h 孵育，然后用 TBST 洗 5 次，每次 5min，加入 Mouse－Anti－human－κ 50μl/well，空白对照加等体积的稀释液，再 37℃ × 1h 孵育，重复 TBST 洗 5 次，加入 1∶5000 的 Goat－anti－MouseIgG－HRP 50μl，37℃ × 1h，重复 TBST 洗 5 次，最后加酶底物显色反应液 A、B 各 1 滴，待显色后加 1 滴终止液，450nm 比色测 A 值，结果判断标准：P/N＞2.1 为阳性。

1.2.2 pUC18－Anti－HBs 重组质粒的构建

将 ELISA 阳性的人源性噬菌体质粒再作 PCR 扩增。反应条件同上，胶回收 660bp 大小的片段。与 pUC18 同时作 Sac Ⅰ、Xba Ⅰ 双酶切，经酶消化的 pUC18 与 κ 链 PCR 产物按 1∶3（v/v）进行连接，反应总体积 25μl，T_4DNA 连接酶 2μl，15℃ 连接过夜，转化 $CaCl_2$ 法[3]制备的感受态大肠杆菌 XL1－Blue 转化菌涂布于含氨苄青霉素和 IPTG、X－gal 的平皿，进行氨苄青霉素抗性和蓝白菌落筛选。挑含重组子的白色单菌落进行扩增，提取质粒进行 Sac Ⅰ、Xba Ⅰ 双酶切鉴定。

1.2.3 K 链 DNA 的序列测定

将 PUC18－κ 重组质粒的酶切鉴定克隆委托上海基康生物技术有限公司进行序列测定。

2 结 果

2.1 抗 HBs 抗体基因的获取

2.1.1 HBsAg 的淘筛 将购的血源性 HBsAg 用包被液包被酶联板，利用抗原－抗体特异性反应原理进行三轮淘筛。建立了抗 HBs 抗体的子文库。

2.1.2 PCR 扩增 将轻链 5'引物、3'引物和重链 5'引物、3'引物分别配对，以建立的抗 HBs 抗体的子文库克隆质粒为模板进行 PCR 扩增，与 γ/Hind Ⅲ分子标准比较，轻链引物扩增出的 DNA 片段分子量大约 660bp，与文献报道的轻链基因大小相同，见图 1。

表 1 噬菌体抗体与 HBsAg 结合 ELISA 测定

	阴性对照	空白对照	噬菌体抗体上清	
			1∶1	1∶2
吸光度值	0.5110±0.1010	0	1.2340±0.1860	1.0560±0.3190
P/N			2.415	2.067

表 2 噬菌体抗体与 HBcAg * 结合 ELISA 测定

	阴性对照	噬菌体抗体上清	
		1∶1	1∶2
吸光度值	0.1315±0.0055	0.0950±0.0120	0.1150±0.0240
P/N		0.722	0.875

*：HBcAb 检测试剂盒

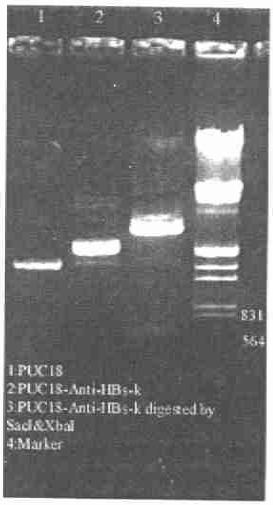


图 1 pUC18 抗 HBs 轻链重组质粒的构建及酶切鉴定

1：pUC18 2：pUC18 抗 HBs－κ 链 3：pUC18 抗 HBs－κ 的酶切消化 4：Marker

2.1.3 抗人 HBs 噬菌体抗体的特异性鉴定 将 PCR 扩增出 660bp 片段的重组噬粒（pComb3Hss－Fab）感染大肠杆菌 XL1－Blue，用库扩增的方法进行扩增，制备噬菌体抗体上清，以用于 ELISA 检测该噬菌体抗体与 HBsAg、HBcAg 的结合性。结果显示：噬菌体抗体与 HBsAg 呈阳性反应（P/N 值＞2.1），

维普资讯 http://www.cqvip.com

而与 HBcAg 反应为阴性。见表 1,表 2。

2.1.4 pUCl8 - Anti - HBs 轻链重组质粒的构建及鉴定

将 ELISA 检测鉴定为阳性的重组噬菌粒的 PCR 扩增产物和 pUC18 质粒经 Sac Ⅰ、Xba Ⅰ双酶,连接转化经 $CaCl_2$ 法制备的感受态大肠杆菌 XL1 - Blue,挑白色菌落,提质粒进行 Sac Ⅰ、Xba Ⅰ双酶切,用 1% 琼脂糖电泳分析酶切产物,有 660bp 大小的片段,见图 1。

2.1.5 pUC18 - Anti - HBs 轻链重组质粒的序列测定

委托上海基康生物技术有限公司进行序列测定,结果表明所克隆的 κ 链为 658bp 大小,经互联网 Blast 分析为人免疫球蛋白 IgG 轻链,结合我们的 ELISA 实验结果,认为是抗乙肝病毒 HBs 轻链。可变区(V 区)由相对恒定的支架区(Framework region,FR)和超变区(Hypervariable region,HVR)组成,其中 1 - 81bp 为 FR1、82 - 105bp 为 HVR1、106 - 144bp 为 FR2、145 - 177bp 为 HVR2、178 - 273bp 为 FR3、274 - 309bp 为 HVR3、310 - 328bp 为 FR4;恒定区(C 区)为 328 - 657bp[4]。

GAGCTCCGCAGTCTCAGTCACGTTGTCTTTGTCTCCAGGGGATACTGCCACCCTCTCCTGTCGGGCC
AGTCAGACTATTACCAGTGAGTATGTAGCCTGGTACCAGCACAGGCCCGGCCAGGCTCCCAGGTTGTTT
ATAGTTGGTACTTCCAGTCGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTAGCGGCACTGGGTCTGGGACAGAA
TTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGC
TCACCAAGGGAATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGTTGCACCATCT
GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCTCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA
GCAGACTACGAGAAACACAAACTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCGTCACA
AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAATTCTAGA

3 讨 论

应用噬菌体抗体库技术,选用自然感染的抗 - HBs 阳性的两名献血员的外周血淋巴细胞,提取总 RNA,用逆转录 PCR 技术扩增出抗体轻链 κ 基因和重链 Fd 基因,克隆入 pComb3Hss 表达载体,转化大肠杆菌,构建了库容量为 5×10^5 的人 Fab 抗体库[1]。

本文在构建的噬菌体抗体库基础之上,应用噬菌体抗体表达 Fab 的特点,利用抗原抗体特异性反应原理,固相化抗原 HBsAg 对此抗体库进行了三轮 panning,转化大肠杆菌,挑单菌落,提取质粒,经 PCR 扩增,扩增出轻链 660bp 的目的基因片段,ELISA 实验表明,其阳性克隆 P/N = 2.41(>2.1 为阳性),表明 panning 后的此库有与 HBsAg 特异性结合的能力。将目的基因片段及载体 pUC18 作 Sac Ⅰ &Xba Ⅰ双酶切,定向克隆入 pUC18,转化大肠杆菌,利用 α 互补原理挑白色菌落,提质粒酶切鉴定后,作 DNA 序列分析。据 DNA 序列结果、Blast 及 ELISA 结果,确定为抗 HBs 的 κ 链。由于只作了一个克隆的 DNA 序列分析,不能进行抗体基因多态性分析。

在噬菌体抗体库技术中,用以克隆抗体基因的 pComb3 载体引入了 M13 噬菌体外壳蛋白Ⅲ基因,使得抗体与外壳蛋白 CPⅢ形成融合蛋白分子 Fab - CPⅢ,能够呈现在噬菌体表面,如用内切酶将基因Ⅲ片段从表达载体中除去,通过自身环化,则可得到可溶性 Fab 段表达质粒,转化大肠杆菌,经 IPTG 诱导,从培养上清中直接获取 Fab,利用此方法,国内已获得了抗 HBs Fab 段抗体,并与 HBsAg 有着良好得亲和力[5],这在疾病的诊断及治疗上有良好的前景。同时应注意到,以大肠杆菌为主的原核表达,虽然其培养方法简单、迅速、经济又易于掌握,但由于不能象真核表达那样使抗体形成适当的折叠及糖基化,使之更接近抗体的自然结构而发挥更好的功能。因此如何更进一步地提高基因工程抗体的亲和性是广大科学工作者要解决的难题。在这方面人们通过抗体结合抗原位点的研究,发现了一些关键性位点,相信在不久的将来,一种高亲和性基因工程抗体必将展现在人们的眼前。

(下转第 650 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

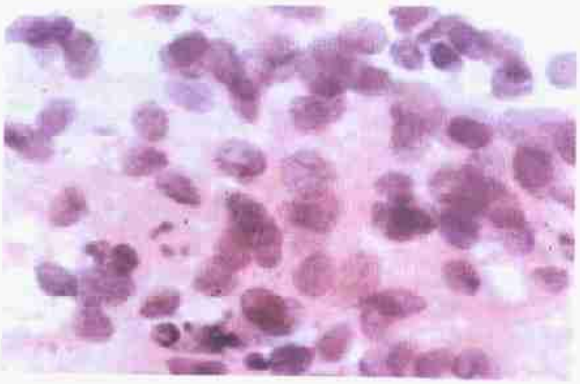


图 1 HE 染色巴氏Ⅴ级涂片(×400)
背景单一,细胞结构不清,尤其是细胞核染色显示不清

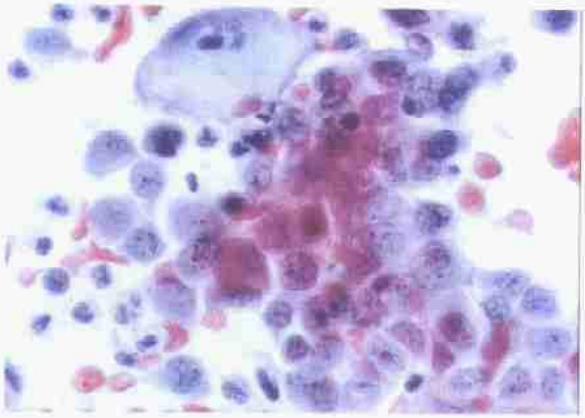


图 2 巴氏染色 TBS 诊断(×400)
背景艳丽,细胞层次分明,核结构清晰,染色质颗粒显示清楚

巴氏染色法背景艳丽,细胞层次分明、核结构清晰,有利于细胞病理诊断(见附图 2)。TBS 报告系统将标本质量作为报告的一部分,便于实验室与临床医师间的沟通,以保证取材质量和了解做为诊断依据的重要病史;引用了鳞状上皮内病变(SIL)的概念,与组织病理学相对应,提高了细胞病理与组织病理的符合率(特别是 HSIL 的符合率可达 100%),容易被临床医师理解;对感染、反应性等良性细胞改变有具体的诊断,便于临床针对性的进行治疗;对异常涂片提出了比较客观的检查治疗建议。

HE 染色巴氏分级报告系统与巴氏染色 TBS 报告系统相比较,异常细胞发现率有显著性差异。即巴氏染色 TBS 报告系统提供了更多的活检病例,其阳性率成倍提高,具有显著的临床意义。

TBS 报告目前对 ASCUS 这一诊断存在争议,认为它含义较模糊,包括的范围过于广泛等,尚有待于进一步完善。

参 考 文 献

[1] Diane Solomon. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: developed and approved at the national cancer institute workshop in Bethesda [J]. HumPathology, 1990; 2: 704 - 708.

[2] Robert J, Solomon KD. The Bethesda System for reporting cervical/viginal cytologic diagnoses [M] New York: Springer, 1994; 1 - 50.

[3] 刘树范,冼美生. 宫颈及阴道细胞病理学诊断报告方式的建议[J]. 中华妇产科杂志, 1998; 33(5): 316.

[4] 颜昌礼,曹荃孙. 30 年妇科门诊常规阴道细胞学检查总结[J]. 实用妇产科杂志, 1994; 10(4): 201.

[5] 贺又娥,郎景和. 子宫颈及阴道细胞学分类和检查的新方法[J]. 中华妇产科杂志, 1996; 31(7): 441 - 443.

(上接第 596 页)

参 考 文 献

[1] 王志毅,刘 杞,万泽生,等. 抗 - HBs 的人源性噬菌体抗体库的构建[J]. 中华肝脏病杂志, 1999; 7(3): 159 - 161.

[2] Barbas CF, Burbon DR. Monoclonal antibody from combinatorial libraries: a laboratorycourse[M]. Califonia: Cold Spring Habor Laboratory Press, 1993; 21 - 37.

[3] J 萨姆布鲁克,EF 弗里奇,T 罗尼阿帝斯. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1993; (2): 55 - 56.

[4] Charkes AJ, Paul T, Mark W, et al. Immunobiology: The immune system in hepalth and disease [M]. Fourth edition, American, CUrrent biology publication press, 1999; 86 (3 - 2 Structure of a typical antibody molecule).

[5] 王 琰,刘群英,徐建军,等. 人抗 - HBs Fab 段基因的序列分析及表达[J]. 中华肝脏病杂志, 1995; 15(5): 304 - 307.