维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)02-0132-03

用聚合酶链反应制备抗端粒酶蛋白重链和轻链可变区基因

张 徽[1]，张 波[2]，韩继生[2]、侯 琳[2]

（1. 重从医科大学基础医学院病理学教研室 重庆 400016；2. 北京医科大学病理学教研室 北京 100083）

【摘 要】目的：为了制备抗端粒酶蛋白hTERT可变区基因。方法：采用Ni-NTA树脂层析法从PBKTRT转染的*E.coli* JM109阳性菌中分离纯化端粒酶蛋白hTERT，并免疫小鼠。从免疫的小鼠脾脏中提取淋巴细胞中总RNA，逆转录成cDNA，以逆转录合成的cDNA第一条链为模板，分别用VH和VL引物，通过PCR进行扩增。结果：PCR扩增反应产生350bp大小的抗hTERT重链和轻链可变区基因。VH和VL基因片段的获得为进一步制备抗hTERT单功能区抗体（dABs）和单链抗体ScFv奠定了实验基础。结论：提示该方法具有稳定性好，易于重复、扩增后V_H和V_L量较高的优点。

【关键词】端粒酶；重链可变区；轻链可变区；聚合酶链反应

【中国图书分类法分类号】R392.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-08-29

Preparing heavy and light chain variable region genes for anti-telomerase protein hTERT by the polymerase chain reaction

ZHANG Hui, et al

(Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*: To make variable region genes against telomerase protein hTERT. *Methods*: Telomerase protein hTERT was purified from E.coli JM 109 harboring pBKTRT by Ni-NTA resin chromatograph and immunized Balb/c mice. Total RNA of lymphocytes were extracted from spleens of immunized mice and converted to cDNA by RT-PCR. First-strant cDNA was used as a template, heavy and light chain variable region genes for anti-telomerase protein hTERT were amplified individually with VH primers and VL primers using polymerase chain reaction. *Results*: The heavy and light chain amplification reaction yielded a fragment approximately 350 base pairs in length. These fragment could provide possibility for preparing single-chain antibodies (ScFv) against telomerase. *Conclusion*: Results suggest that the method have better stability and easy repetition, and could get higher quantity of V_H and V_L.

【Key words】 Telomerase; Heavy chain variable region; Light chain variable region; Polymerase chain reaction

在人类许多疾病的血清治疗中，人源性单克隆抗体优于鼠源性，鼠源性免疫球蛋白会产生抗球蛋白抗体，使疗效减弱或消失，或引起超敏反应，然而用人-人杂交瘤技术产生人源性单抗还存在许多困难。基因工程抗体能克服鼠单抗用于临床疾病治疗所面临的异源性问题。免疫球蛋白可变区基因片段的获得使基因工程抗体的制备成为可能。本实验从端粒酶蛋白hTERT（human telomerase reverse transcriptase, hTERT）免疫的小鼠脾脏中提取编码抗hTERT mRNA进行逆转录，采用聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）扩增免疫球蛋白重链和轻链可变区基因，为进一步制备抗hTERT单链抗体（Single-chain Variable region frament, ScFv）作准备。

1 材料与方法

1.1 hTERT蛋白分离与纯化

在变性条件下，采用Ni-NTA树脂（QIAGEN公司产品）层析法[1]从pBKTRT转染的E.coli JM109阳性菌中分离纯化hTERT。PBKTRT为带有6×组氨酸尾的端粒酶hTERT cDNA重组质粒，由本实验室构建。E.coli JM109在100ml含氨苄青霉素（100mg/L）LB培养基中37℃振荡培养，细菌呈对数生长期（OD值达0.4－0.6），加入IPTG至终浓度为1mmol/L，再振荡培养5h，离心收集细菌。用Buffer A（6mol/L Gu HCl，0.1mol/L Na_2HPO_4，0.01mol/L Tris/

作者介绍：张 徽（1963- ），男，安徽南陵人，副教授，硕士，主要研究方向：肿瘤病理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

HCL，pH=8.0）重悬细菌沉淀，离心收集上清，与50%Ni-NTA混合，装入1.6cm的柱子。依次用Buffer A、Buffer B（pH8.0）和Buffer C（pH6.3）洗柱；分别用6mL Buffer D（pH5.9）和6mL Buffer E（pH4.5）洗脱蛋白。Buffer B，C，D，E组成为8mol/L Urea、0.1mol/L Na_2HPO_4、0.01mol/L Tris/HCl。层析洗脱液每1.5ml收集一管。每管取10μl用于SDS-PAGE分析，并用Western Blot检测。洗脱液装入透析袋中，在含有500mmol/L NaCl，20% glycerol，0.01mol/L Tris/HCl，pH7.4的不同摩尔浓度尿素（6M至1M）使蛋白复性，然后用PEG进行浓缩，浓缩液冻存待用。

1.2 Western Blot检测

SDS-PAGE电泳凝胶浸于转膜Buffer（39mmol/L 甘氨酸，48mmol/L Tris，0.037%SDS，20%甲醇）中，在40伏，4℃电泳10h，PAGE凝胶中的蛋白被转移到硝酸纤维素膜上，用TBS Buffer（10mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，150 mmol/L NaCl）洗2×10min，5%封闭Buffer（B.M公司产品）孵育1h，TBS-Tween Buffer（10mmol/L Tris-Cl，pH7.5，500mmol/L NaCl，0.05%Tween20）洗3×10min，硝酸纤维素膜在含有1/500 Ni-NTA AP（QIAGEN公司产品）的TBS-Tween液中孵育1h，TBS-Tween Buffer洗3×10min，Buffer F（100mmol/L Tris-HCl，pH 9.5，100mmol/L NaCl，5 mmol/L $MgCl_2$）洗1min，用显色液BCIP/NBT（Sigma公司产品）显色10min，用蒸馏水洗涤终止显色反应。

1.3 动物免疫

8周雌性Balb/c小鼠四只（北京医科大学动物中心提供）。采用两种免疫方式：

①腹腔免疫：hTERT与等量完全弗氏佐剂制成油包水乳剂，每只小鼠腹腔注射0.4ml（含hTERT 100μg），两周后用不完全弗氏佐剂制成油包水乳剂，每只小鼠腹腔注射0.4ml，两周后，经腹腔注射0.4mL hTERT，三天后取脾脏。

②脾内免疫：小鼠在乙醚麻醉下，打开腹腔，脾内直接注10μl hTERT（含1μg），5天后，再进行第二次脾内注射以加强免疫。5天后取脾脏。

1.4 总RNA的提取

采用一步法[2]提取小鼠脾细胞中的总RNA。剪碎脾脏，放入匀浆器中，加入500μl变性液（4mol/L 异硫氰酸胍，25 mol/L 柠檬酸钠pH7.0，0.5%十二烷基肌氨酸钠）和3.5μl β-巯基乙醇，充分匀浆组织后，加50μl 2mol/L 乙酸钠（pH4.0），500μl水饱和酚，100μl氯仿/异戊醇，混匀，冰育15min，4℃离心20min，取上清，加等体积的异丙醇，-20℃，1h；4℃离心10min，弃上清，加300μl变性液，3μl β-巯基乙醇，振荡直至RNA完全溶解，加等体积异丙醇，-20℃ 1h；4℃离心10min，弃上清，用70%乙醇洗涤RNA沉淀，稍晾干，加无RNAase水40μl，溶解RNA，取10μl进行逆转录和PCR扩增。

1.5 引物的合成

根据编码鼠免疫球蛋白重链可变区（heavy-chain variable region，VH）和轻链可变区（light-chain variable region，VL）核苷酸序列5'和3'端的相对恒定区设计其引物[3]

VH引物：5'端引物

VH back：5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3'

3'端引物

VH for:

5' TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG 3'

VL引物：5'端引物

VL back：5' GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA 3'

3'端引物

VL for：5'-GTTAGATCTCCAGCTTGGTCCC-3'

1.6 cDNA的合成和扩增

以总RNA为模板、VH for或VL for为引物、在AMV逆转录酶（promega公司产品）的催化下合成cDNA第一条链。反应终体积50μl。RNA模板10μl，20umol/L VHfor 1μl或20 umol/L VLfor 1μl，10mmol dNTPs 2μl，5×逆转录Buffer10μl，400U Rnasin 1μl，去离子水24μl，70℃加热5min，冰育1min，加200U AMV逆转录酶2μl，42℃，1.5h。

cDNA的扩增，反应终体积50μl。逆转录产物10μl，20umol/L VHfor 1μl或20 μmol/L VHback 各1μl或20μmol/L VL for和VL back各1μl，4mmol/L dNTPs 2μl，10×PCR Buffer 5μl，2.5U Taq酶（Promega公司产品），加50μl石蜡油，置于PCR仪中95℃预热1min，按下列程序进行30个循环：94.3℃ 50s，52℃ 1min，72℃ 2min。完成循环后于72℃延伸5min。PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳，在紫外灯下检测。

2 结 果

2.1 端粒酶hTERT融合蛋白分离纯化

带有6×组氨酸标记的hTERT融合蛋白在变性条件下被分离纯化。融合蛋白被溶于6mol/L盐酸胍中，用Ni-NTA树脂层析分离纯化，通过12%SDS-PAGE电泳，考马斯亮蓝染色，可见17KD的单一蛋白条带（图1），用Western Blot检测显示阳性反应（图2）。

2.2 免疫球蛋白VH和VL基因的扩增

从hTERT免疫的小鼠脾脏中提取总RNA，分别用重链和轻链3'端引物（VH for和VL for），对编码抗hTERT mRNA进行逆转录。转录得到的cDNA产物分别用引物VH for和VH back或VL for和VL back采用PCR扩增免疫球蛋白重链和轻链可变区基因，扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳，在紫外灯下可见350bp的条带（图3，图4）。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图1 SDS-PAGE 电泳Ni-NTA树脂层析纯化hTERT蛋白
M: MW protein 14.4KD, 31KD, 42.7KD, 66.2KD
HTERT: 17KD



图2 Western Blot 检测 1-3: hTERT阳性反应条带

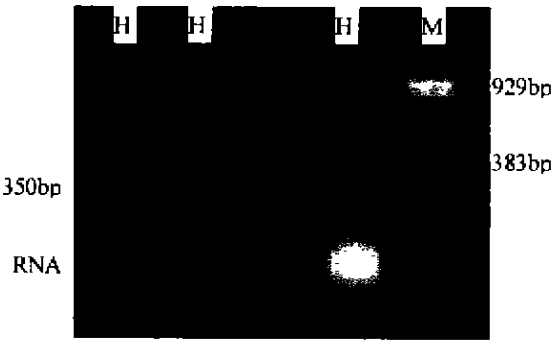


图3 VH基因PCR扩增产物凝胶电泳
M: PBR322 DNA/BstNI marker 1857, 1058, 929, 383
H: VH gene fragment

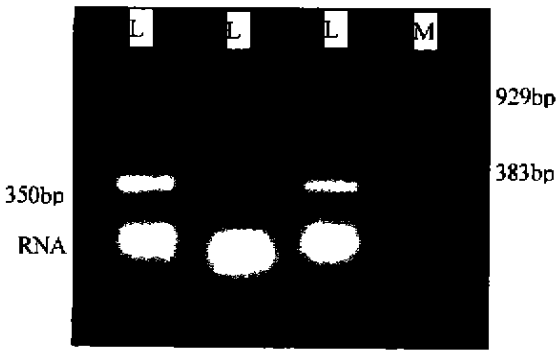


图4 VL基因PCR扩增产物凝胶电泳
M: PBR322 DNA/BstNI marker 1857,1058,929,383
L: VL gene fragment

3 讨 论

随着基因工程技术的不断发展，抗体技术已进入第三代抗体时期，其中噬菌体抗体库技术的建立，使基因工程抗体产生重大突破，将极大地促进抗体的开发和应用。利用噬菌体表面展示技术可构建单功能区抗体（single domain antibodies, dABs）、单链抗体（single-chain Fv, ScFv）[4,5]、异聚体抗体（disulfide-stabilized Fv, dsFv）[6]或Fab[7,8]抗体库。构建ScFv的抗体库有多种方法：其中一种方法是将VH和VL通过一小段连接片段（linker）经PCR装配在一起形成ScFv，再克隆入噬菌体载体[9]。在辅助噬菌体如M13K07帮助下包装产生单价的噬菌体，获得所需的抗体片段和基因[9,10]。ScFv与完整的IgG相比，其分子量小，穿透力强，结构简单，具有与IgG相类似的抗原亲合性[11]，在临床上有较好的应用前景。利用该技术还可直接用于改进抗体的催化活性[11]并对抗体进行诱变实验探查其作用机制[12]。

应用噬菌体表面展示技术构建抗体库的首要条件是通过PCR扩增出抗体可变区基因，PCR扩增反应引物是根据Kabat免疫球蛋白数据库信息而设计。编码免疫球蛋白决定簇互补区（complementarity-determining region, CDR）的核苷酸序列具有高度变化性，而J片段和重链可变区（VH）和K轻链可变区（VL）N末端具有相对较恒定的序列区，根据编码鼠免疫球蛋白VH和VL末端核苷酸相对保守序列区设计扩增的引物。VHfor和VLfor与IgG mRNA J片段相互补，VHback和VLback分别与编码重链和K轻链cDNA的N末端相互补。本实验通过对hTERT免疫的小鼠脾脏中提取的总RNA逆转录所得到的cDNA为模板，分别用VH和VL引物经过PCR扩增、1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，可见约350bp大小的条带，与文献报道结果一致[3,13]。我们所采用的两种免疫方法均得到一致的结果。并且经过多次反复实验均得到良好的结果。本实验具有稳定性好，易于重复，扩增的VH和VL量较高的优点。另外，该方法所需模板量少，操作简便，省时，重链、轻链引物中可引入限制性酶切位点，使扩增的基因可直接克隆于表达载体中。

VH和VL基因片段的获得为进一步制备抗hTERT单功能抗体以及进一步将VH、VL基因片段与linker随机拼接成VH-linker-VL，并克隆于噬菌粒载体，制备抗hTERT单链抗体ScFv奠定了实验基础。

(下转第138页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

3.3 横断面提供的信息一般较少，但可较好地观察半月板的全貌，髁间隆突层面显示最佳。在横断面上，半月板仅占一个断面，但其前、后角与体部常不在同一层面上，因此当扫描平面与半月板体部平行时，其体部的撕裂易显示，但前、后角撕裂（尤其是后角）则难诊断。

3.4 半月板在矢状面、冠状面上均能清楚显示，但在矢状面上前、后角显示更佳。在CT、MRI诊断半月板撕裂中，膝横韧带、半月板股骨韧带、腘肌腱等常造成假阳性，而这些结构在矢状面上也易鉴别，故矢状面对半月板损伤的诊断能提供较多的信息。在手术证实的33个撕裂半月板中，李文元[10]在MRI矢状面上诊断了31个，冠状面上显示了19个，仅1例唯冠状面显示清晰，在影像上验证了诊断半月板撕裂应以矢状面为重点，辅以冠状面检查。

参 考 文 献

[1] Passariello R, Trecco F, Paudis F, et al. Meniscal lesions of the knee joint: CT diagnosis[J]. Radiology, 1985;157:29-34.

[2] Justice WW, Quinn SF. Error patterns in the MR imaging evaluation of menisci of the knee[J]. Radiology 1995;196:617-621.

[3] Disler DG, Kattapuram SV, Chew FS, et al. Meniscal tears of the knee: preliminary comparison of three-dimensional MR reconstruction with two-dimensional MR imaging and arthroscopy[J]. AJR, 1993;160:343-345.

[4] Crues JV, Mink J, Levy TL, et al. Meniscal tears of the knee: accuracy of MR imaging[J]. Radiology, 1987;164:445-448.

[5] Reicher MA, Rauschning W, Gold RH, et al. High-resolution magnetic resonance imaging of the knee joint: normal anatomy [J]. AJR, 1985;145:895-902.

[6] Prescher A, Adam G. Cross-sectional anatomy of the knee[J]. Surg Radiol Anat. 1990;12:19-29.

[7] 马兆龙，王唯析，董志宏等. 膝关节的断层影像解剖学研究[J]. 解剖学报，1998; 7(s):126-128.

[8] 李克，陈星荣. 盘状半月板的MRI表现[J]. 中华放射学杂志，1993;27(4):250-253.

[9] 陈尔瑜. 中国成人膝关节半月板的形态观察[J]. 解剖学报，1965;8(3):432-440.

[10] 李文元，杨秀军，庄海越. 膝关节半月板撕裂的MRI诊断价值[J]. 现代医用影像学，1999;8(2):60-62.

(上接第134页)

参 考 文 献

[1] The Qiaexpressionist. The high level expression&protein purification system. Summer, 1992.

[2] 李永明，赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京：科学出版社出版，1998;248-249.

[3] Orlandi R, Gussow DH, Jones PT, et al. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction[J]. Proc. Natl. Acod. Sci. USA. 1989; 86:3833-3837.

[4] Mccafferty J, Griffiths AD, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody[J]. Nature, 1990;348:552-554.

[5] Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, et al. Making antibody fragment using phage display libraries[J]. Nature.1991; 352:624-628.

[6] Brinkmann V, Chowdhury PS, Roscoe DM, et al. Phage display of disulfide-stabilized FV fragments[J]. J Immunol Methods.1995;182:41-50.

[7] Barbas C, Kang AS, Lerner RA, et al. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site[J]. Proc.Natl.Acad.sci.USA. 1991;88:7978-7982.

[8] Chang CN, Landolfi NF, Queen C. Expression of antibody Fab domains on bacteriophage surfaces potential use for antibody selection[J]. J Immunol. 1991;147:3610-3614.

[9] Chowdhury PS, chong K, Postan I. Isolation of anti-mesothelin antibodies from a phage display library[J]. Molecular Immunology. 1997;34:9-20.

[10] Chowdhury PS, Viner JL, Beers R, et al. Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity[J]. Proc, Natl. Acod.Sci.USA. 1998;95:669-674.

[11] Tang Y, jiang N, Parakh C, et al. Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology [J]. The Journal Biological Chemistry. 1996;271:15682-15686.

[12] Kim SH, Schindler DG, Lindner AB, et al. Expression and characterization of recombinant single-chain FV and FV fragments derived from a set of catalytic antibodies[J]. Molecular Immunology. 1997;34:891-906.

[13] Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, et al. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from escherichia coli[J]. Nature. 1989;341:544-546.