维普资讯 http://www.cqvip.com

4-6 (2)

第24卷 第1期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.1
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

抗HBeAg单克隆抗体重链可变区基因的PCR法克隆和测序

基础医学院微生物学教研室 杨 春* 王 毅 朱道银

R392.11

提 要 本文应用PCR技术从HBeAg单克隆抗体鼠—鼠杂交瘤细胞基因组DNA中扩增出重链可变区基因(VH)，并将VH基因与pUC19载体连接，转化JM109菌，克隆出VH基因。重组质粒pUC－HBeAgVH经荧光核酸测序表明，该VH基因大小为327bp，编码109个氨基酸。

HBeAg 单克隆抗体 PCR

关键词 重链可变区基因; PCR克隆; 测序
中图分类号 R392.11

用鼠单克隆抗体免疫导向治疗恶性肿瘤或其它疾病时，由于存在人抗鼠抗体(Human anti-mouse antibody，HAMA)等问题[1]，使其临床应用受到限制。近年来，随着分子生物学技术的发展，利用基因扩增技术，获取鼠源单克隆抗体可变区基因，通过基因重组，将其与人Ig恒定区基因拼接，构建人－鼠嵌合抗体[2]，即可克服鼠源性单抗的缺点。本文用PCR技术直接从抗HBeAg单克隆抗体杂交瘤细胞基因组中扩增出重链可变区基因(VH)，并将VH进行克隆和测序，为构建基因工程抗体打下基础。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 抗HBeAg单克隆抗体杂交瘤细胞(由中山医科大学免疫学教研室林学颜教授惠赠)经再克隆后鉴定其分泌McAb属IgG2a。用RPMI 1640(含10%FCS)培养液培养三天，使细胞数达到对数生长期时离心洗涤后获取细胞备用。

1.2 杂交瘤细胞基因组DNA的提取[3] 杂交瘤细胞用预冷的PBS洗二次，悬浮于0.97ml的STE中，加10%SDS20μl和P－K(10mg/ml)10μl，摇匀，置55°C保温3h，37°C过夜，经酚/氯仿提取，乙醇沉淀后溶于100μl TE中。测定OD260/OD280比值为1.88。

1.3 聚合酶链(PCR)反应[4] 人工合成－对引物(VHBACK5′－ATGTCGACTAACGTTATGTCTCCAGCTTGGTC－3′;VHFOR5′－GTGAATTCGACATTGTGATGGACCCAGTCTC－3′)。50μl反应液中含基因组DNA5μl，引物各30pmol/L，在95°C预变性10min，然后加TaqDNA酶1u，在PTC－51B上进行扩增。循环参数为93°C、45s;55°C，45s;72°C，60s，35个循环，完成循环后延伸5min。取10μl PCR产物经1.5%琼脂糖电泳，紫外核酸检查仪上观察结果。

1.4 VH基因的克隆 将PCR产物与pUC19分别用EcoRI和SalI酶切后，经低熔点琼脂糖电泳回收酶切片段，用T4连接酶连接，转化JM109菌，蓝－白斑筛选重组质粒，酶切鉴定。

2 结果

2.1 基因组DNA的提取 用本法提取的DNA经紫外分光光度计检测，其OD260/OD280＝1.88，浓度为0.21μg/μl。分子大小为22Kb。

2.2 PCR扩增结果 取10μl PCR产物经1.5%琼脂糖电泳，紫外光下观查结果显示扩增片段大小为330bp。

2.3 VH基因的克隆 白斑菌经碱裂解法快速抽提质粒DNA，用EcoRI和SalI双酶切后可见330bp的插入片段，重组质粒命名为pUC－HBeAbVH。

---

* 女，1964－08出生，讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

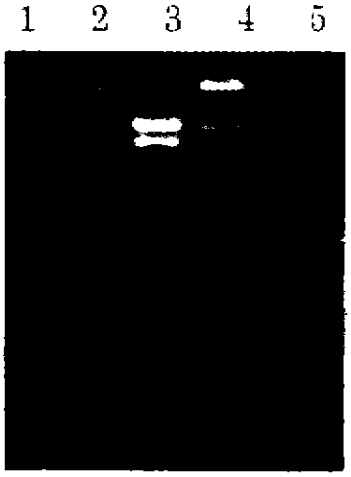


图 VH基因扩增产物的琼脂糖电泳
3道:λDNA/HindⅢ 1.2.4.5道: VH基因的扩增产物

2.4 pUC－HBeAbVH基因的测序 pUC－HBeAbVH基因经测序，结果显示VH基因有327bp，编码109个氨基酸，其碱基组成和推导氨基酸见下表。

3 讨论

国内外报道扩增小鼠免疫球蛋白可变区基因的方法一般均采用提取和分离mRNA，反转录为cDNA，然后再用PCR法扩增，克隆出VH基因[3,5,6]。本文探讨了提取杂交瘤细胞基因组DNA，直接用PCR扩增，然后克隆的方法。杂交瘤细胞一般在DNA水平已完成V－D－J重排[7]，而IgVH所编码的氨基酸在90～115个左右，推算其碱基数为270－345bp左右，所以只要扩增出的VH基因片段大小在300bp左右则可认定其不含内含子。我们对几株杂交瘤细胞VH基因进行直接扩增，其片段大小均在330－350bp之间，说明获取杂交瘤细胞VH基因可以采取从基因组DNA中直接扩增，这与国内文献报道的结果是一致的[6]。

鼠Ig可变区基因结构相似，均由4个框架区(FRs)和3个互补决定区(CDRs)构成，其特异性主要由CDRs和临近CDRs的少数FRs碱基组成，而FR1和FR4区的碱基则相对保守。根据这一特点，可以设计出所谓的通用引物。我们曾用自行设计的一对引物，成功地扩增出四种杂交瘤细胞的VH基因，说明其通用性强，适合于多种杂交瘤细胞的VH基因的扩增。

VH基因的克隆和测序是构建基因工程抗体的基础。本文对抗HBeAgVH基因进行了克隆和测序。结果显示VH基因编码327bp，上游含有启动子ATG，基因内不含终止密码，并具有抗体特征性的半胱氨酸，为构建基因工程抗体打下基础。

参考文献

1.James C. R. et al. Nucl Med Biol. 1989;16:121
2.Raymond J. O. et al. J. Immuno Metho,

表 pUC－HBeAbHV碱基及氨基酸组成

ATG	TCG	ACT	AAC	GTT	AGT	TCT	CCA	GCT	TGG	TCT	AAG	GGG	TGC	TGC	CGA	GAC	TCT	CTG	GAC
Met	Ser	Thr	Asn	Val	Ser	Ser	Pro	Ala	Trp	Ser	Lys	Gly	Cys	Cys	Arg	Asp	Ser	Leu	Asp
ATC	AGC	GGC	ATG	TGG	CAA	AGT	TCA	AGT	GAA	CCA	GAG	CCT	ATT	GAG	TCA	TTT	ATT	AAG	TCT
LIe	Ser	Gly	Met	Trp	Gln	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	Glu	Pro	LIe	Glu	Ser	Phe	LIe	Lys	Ser
CAA	GCA	AGT	AAT	TAC	AAG	GCA	GGT	AGC	TTC	ATT	CCT	CGG	CAT	CGC	AGC	ACA	ACT	TCC	GTA
Cln	Ala	Ser	Asn	Thr	Lys	Ala	Gly	Ser	Phe	LIe	Pro	Arg	His	Arg	Ser	Thr	Thr	Ser	Val
GAA	ACC	GGT	GGG	TTA	TGC	ATA	TCA	AGA	GAC	AGC	GAC	GTC	TAT	CAT	GAG	TCA	ATA	CAT	CCA
Glu	Thr	Gly	Gly	Leu	Cys	LIe	Ser	Arg	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	His	GIu	Ser	LIe	His	Pro
CCT	CTG	TCA	AAA	TAC	GAG	TCT	GTC	AGC	ACA	CTG	TAC	CCC	TAT	TAC	CAC	GAT	TAC	ACG	AGA
Pro	Leu	Ser	Lys	Tyr	Glu	Ser	Val	Ser	Thr	Leu	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	His	Asp	Tyr	Tyr	Arg
CTG	GGT	CCA	TCA	CAA	TGT	CGA	ATT	CAC											
Leu	Gly	Pro	Ser	Gln	Cys	Arg	LIe	His											

维普资讯 http://www.cqvip.com

1994;168:149
3.Caroline V, et al. Mol Immuno, 1993;10:865
4.Bruce A. PCR cloning protocols. Humana Press, 1997;17
5.Gao Ning, 免疫学杂志 1997;4:214
6.Chen Kemin, et al.免疫学杂志 1997;1:5
7.杨贯贞,等.免疫生物工程纲要 科学出版社 1991;p68
8.张颈翼,等.单克隆抗体通讯 1991;4:83

(收稿日期 1998－06－02)

PCR Cloning, the sequencing of the heavy chain variable region gene of McAb against HBeAg

Yang Chun, et al
Department of microbiology, college of basic medical sciences

The VH gene ws amplified from genomic DNA of hybridomacells cells producing McAb against HBeAg by PCR reaction. The PCR products were ligated with pUC19 vector.Then VH gene was cloned by transforming it into JM109. The recombinant plasmid pUC－HBeAgVH was sequenced by chain terination－based cycle sequencing protocal. The result shows that the VH gene was 327 base pair encoding 109 amino acids.

KEY WORDS VH gene; PCR cloning; sequencing

书 讯

由重庆市委宣传部、重庆市教育委员会、重庆市卫生局、重庆市卫生防疫站牵头组织第三军医大学、重庆医科大学、重庆医科大学儿科学院、市中小学健康保健所等有关营养专家编写的《学生营养指南》即将于1999年一季度出版。

该书以问答形式共有150个问题，对大中小学生及学生家长和营养工作者均有有参考价值。附有常用食物成份表，适合于广大读者使用。

该书共160页，12万字，定价5.80元。

联系人：徐隆霞、朱万玲 电话：(023)68899943(白天) (023)68806606(晚)

联系地址：重庆大坪长江二路8号 邮编：400042