DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.013

人抗甲肝噬菌体抗体重链可变区基因的序列分析

万泽生* 王海涛** 姜绍谆*** (第三军医大学基础医学部微生物学教研室)重庆,400038

提 要 目的:对人抗甲肝病毒噬菌体抗体阳性克隆597和646,进行重链DNA序列分析。方法:用Sanger末端终止法测定序列,计算机软件进行分析。结果:经同源性分析,这两个克隆的同源基因均来源于人免疫球蛋白重链基因序列。氨基酸序列推导可知,克隆646重链Fd基因和克隆597重链可变区基因均为单一开放读框,各编码225个氨基酸和119个氨基酸。2株克隆重链可变区含有明确的四个框架区和3个抗原决定互补区。结论:克隆646和克隆597的重链DNA序列具有典型的人免疫球蛋白基因序列特征。

关键词 噬菌体抗体;基因序列;甲肝病毒
中图法分类号 R512.61

90年代发展起来的噬菌体抗体库技术[1],使人们能够绕开细胞杂交瘤,直接从基因水平制备抗体,这无疑为人单抗的制备提供了较为有效的手段。我们利用这一技术从人外周血淋巴细胞中扩增人抗体基因,构建人源性噬菌体抗体库,并从该库中筛选到抗甲型肝炎病毒的噬菌体抗体阳性克隆[2]。本研究对克隆646和克隆597进行了基因序列分析,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

质粒M13mp18/M13mp19和Klenow酶购于华美生物工程公司;质粒pBluescriptⅡks(+)为军科五所11室保存;限制性内切酶购于promega公司;Sequence Version 2.0 DNA测序试剂盒购于USB公司;[^{35}S]dATP购自Du PonT公司。

1.2 实验方法

1.2.1 用M13mp18克隆重链Fd基因 用内切酶SpeⅠ酶解含待测基因质粒DNA,Klenow酶补平后再用内切酶XhoⅠ酶解,克隆入经内切酶SmaⅠ和SalⅠ酶解的M13mp18质粒中。转化大肠杆菌XLI-Blue,筛选出M13重组噬菌体。

1.2.2 用M13mp19克隆重链Fd基因 用内切酶SpeⅠ和XhoⅠ酶解含待测基因质粒DNA,克隆入PBluescriptⅡKS(+)质粒中。挑选重组子并用内切酶SadⅠ和XhoⅠ酶解后,再克隆入经内切酶SadⅠ和SalⅠ酶解的M13/mp19质粒中,筛选出M13重组噬菌体。

1.2.3 基因序列的测定及分析 DNA序列测定按测序试剂盒说明书操作,采用Sanger末端终止法行序列测定。测序结果用计算机软件进行分析。

2 结果

2.1 人抗甲肝噬菌体抗体重链Fd基因的序列测定

对抗甲肝噬菌体抗体克隆646进行了重链可变区、稳定区CH1基因序列的测定;克隆597进行了重链可变区基因序列的测定。

将用M13/mp18和M13/mp19这一对测序载体对克隆646重链DNA的测序结果拼接后,得到的重链Fd基因全序列见图1。第1至357位碱基为抗体可变区基因,358至675位为部分稳定区基因。克隆597重链可变区基因序列见图1。

比较克隆646与克隆597重链基因可变区中的三个CDR区基因序列,发现彼此间在CDRs区的基因序列存在差异,且CDR3区的碱基序列差异最大,见图1。

2.2 与已知人免疫球蛋白重链基因序列的同源性分析

将克隆646重链Fd基因序列和克隆597重链可变区基因序列输入计算机,通过Internet联网检索,用BLASTN1.4.9MP软件与已知基因序列进行同源性分析。结果表明克隆646重链稳定区基因(358~657 bp)与人免疫球蛋白IgGG1重链稳定区基因序列的同源性为99%。克隆646重链可变区基因(1~350 bp)与人免疫球蛋白IgGF4-23重链可变区基因序列的同源性为88%。克隆597重链可变基因(1~356 bp)与人免疫球蛋白IgG30P1重链可变区基因序列的同源性为88%。

2.3 可变区氨基酸序列推导

将测出的克隆646和597的重链基因序列输入计算机,推导的氨基酸序列见图1。克隆646重链可变区基因共编码119位氨基酸。基因中无终止密码,为一开放阅读框架。基因中第22位和第96位为可变区序列中仅有的两个半胱氨酸。有明确的抗体可变区四个框架区(Frameworks, FRs)和3个抗原决定互补区

* 万泽生,男,41岁,副教授,博士
** 军事医学科学院微生物流行病研究所 北京,100071
*** 第四军医大学基础医学部微生物学教研室 西安,710032

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(Complementary determing regions, CDRs)。第 31位到 35位氨基酸为 CDR1区 ,第 50位到 66位氨基酸为 CDR2区 ,第 99位至 108位氨基酸为 CDR3区 (图 1划黑线处)。表明克隆 646重链可变区基因具有人抗体重链可变区基因特征。

克隆 597重链可变区基因特征同于克隆 646,其三个 CDR区见图 1划黑线处。

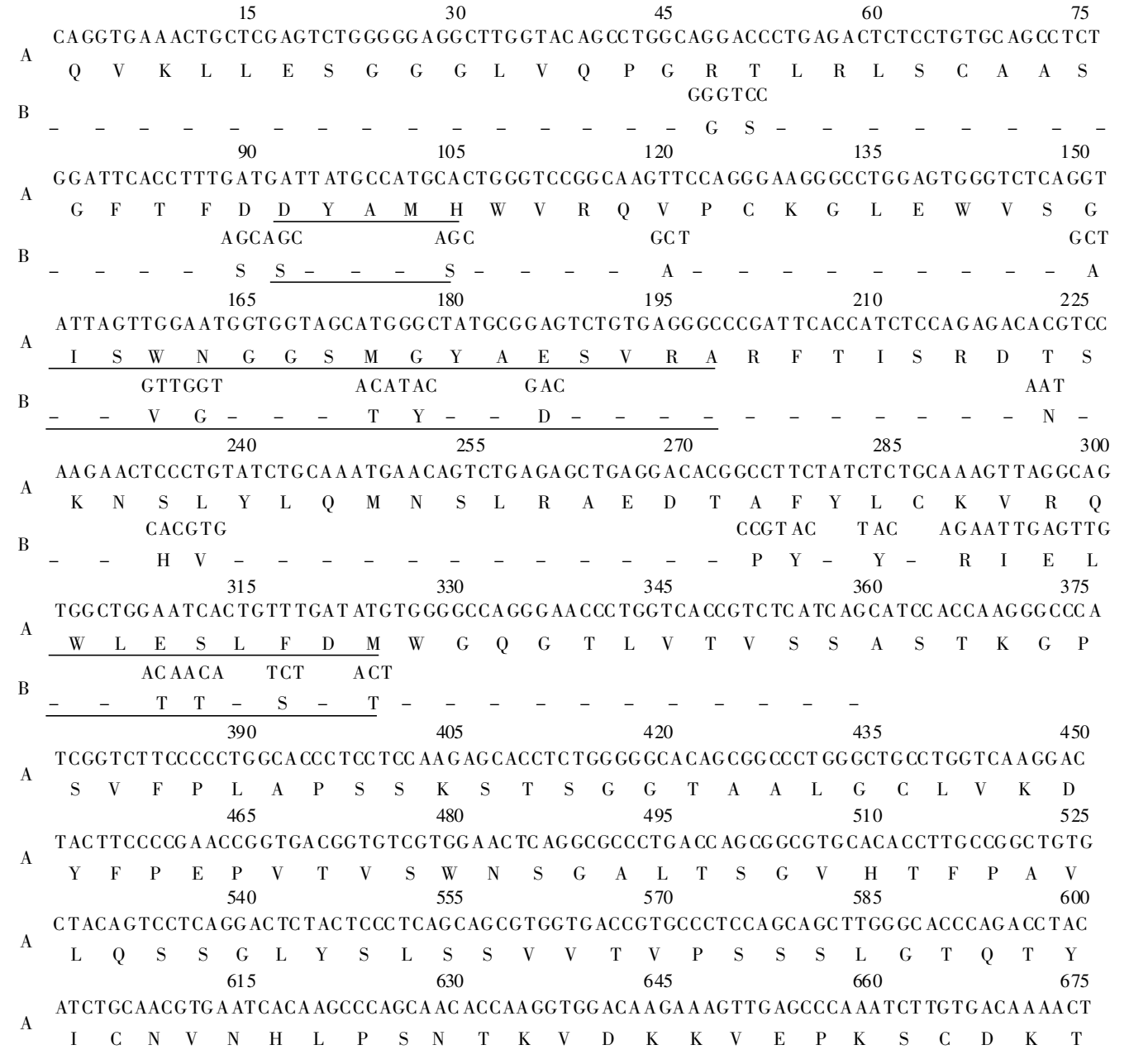


图 1　重链 DNA基因序列及氨基酸序列推导

Fig 1　Nucleotide and deduced amino acid sequence of heavy chain DNA, CDRs are underlined

A: Fd gene of clone 646; B: VH gene of clone 597

3　讨论

我们对人抗甲肝噬菌体抗体的 2个阳性克隆 (克隆 597和克隆 646),进行了重链基因的序列分析。根据所测的基因序列及通过计算机分析 ,得知这 2个克隆的重链 DNA序列 ,具有典型的人免疫球蛋白基因序列特征。经同源性分析 ,知克隆 597和克隆 646的同源基因序列均来源于人免疫球蛋白重链基因序列。根据 Kabat

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的分类系统[3],这2个克隆重链可变区基因属于人抗体第Ⅲ亚群。而这2个克隆在CDRs区基因序列的差异性,提示这2个克隆可能来自于人体中不同的淋巴B细胞。同时也间接说明,在我们所构建的噬菌体抗体库中,抗体基因存在着多样性。

Barbas[4]根据20个克隆的重链基因CDR3区的序列,将抗艾滋病毒噬菌体抗体分为6组。第1组中的4个克隆具有相同的重、轻链基因序列,但只有2个克隆产生的抗体具有中和活性。第2组的5个克隆中,仅有1个显示出能够中和艾滋病毒。Barbas[5]在对呼吸道合胞病毒F蛋白的3株噬菌体抗体阳性克隆测序后发现,有2株DNA序列完全一致。另1株虽然也表现出中和活性,但重链基因的CDR3区DNA序列与上2株完全不同,却与一些不具中和活性的噬菌体抗体的重链基因一致。Sanna[6]从构建的噬菌体抗体库中,筛选出2株能中和2型疱疹病毒的噬菌体抗体,其重链CDR区的基因序列基本相同。而另2株中和1型疱疹病毒的噬菌体抗体,尽管都识别病毒的囊膜D蛋白,但重链CDR2和CDR3区的基因碱基数及序列均有较大的差异。由此看来,具有相同抗原特异性的噬菌体抗体,其不同克隆在CDRs区的基因序列与它们的抗原结合位点,中和活性等生物学性质尚无十分明确的对应关系[7,8]。在我们的实验中,克隆646与克隆597在重链可变区CDR区显示出来的基因序列差异,其生物学意义尚不清楚。

参考文献

1 Winter G, Griffiths A D, Robert E *et al*. Making antibodies by phage display technology, Annu Rev Immunol, 1994, 12: 433

2 万泽生,王海涛,姜绍谆.用PCR扩增的人抗体基因构建人源性噬菌体抗体库.中国免疫学杂志,1996,12(增刊):107

3 Kabat E A, Wu T T, Perry H M *et al*. Sequences of proteins of immunological interest. Ⅷ Fifth Edition. U S Department of Health and Human Service. Public Health Service National Institutes of Helth, 1991. 1343~1577

4 Barbas C F, Bjorling E, Chiodi F *et al*. Recombinant human Fabfragments neutralize human type Ⅰ immunodeficiency virus in vitro. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(9): 9339

5 Barbas C F, Crowe J E, Cababa D *et al*. Human monoclonal Fabfragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprote in and neutralize infectivity. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(21): 10164

6 Sanna P P, Williamson R A, Logu A D *et al*. Directed selection of recombinant human monoclonal antibodies to herpes aimplex virus glycoproteins from phage display libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(4): 6439

7 Burioni R, Williamson R A, Sanna P P *et al*. Recombinant human Fab to glycoprotein D neutralizes infectivity and prevents cell-to-cell transmission of herpes simplex virus 1 and 2 *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(1): 355

8 Ping Tsui, Mark A T, Robert S A *et al*. Isolation of a neutralizing human RSV antibody from a dominant, non-neutralizing immune repertoire by epitope-blocked panning. J Immuno, 1996, 157(2): 772

(收稿: 1997-02-24;修回: 1997-08-30)

(编辑 王 红、沈锡庚)

Sequencing of the heavy chain genes from human phage antibodies against hepatitis A virus

Wan Zhesheng, Wang Haitao, Jiang Shaozhun (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To sequence the heavy chain genes from human phage antibodies against hepatitis A virus. **Methods**: The gene encoding HAV antigen-specific phage antibodies heavy chain from clones 597 and 646 were sequenced with Sanger's chain termination method. **Results**: The gene sequence of the two clones were homologous with that of known human immunoglobulin genes. Both of genes have one open reading framework. The Fd gene of clone 646 encoded 225 amino acids while the VH gene of clone 597 encoded 119 amino acids. There were four frameworks and three complementary determining regions in the VH genes of these two clones. **Conclusion**: The clones 597 and 646 have the typical character of human immunoglobulin gene.

Key words human phage antibody; gene sequencing; hepatitis A virus.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net