DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.03.005

抗人 C_1q 轻链可变区基因在 $DH_{5\alpha}$ 中的表达及序列同源性分析*

陈克敏 朱锡华 (第三军医大学基础部免疫学教研室)重庆,630038

提 要 利用基因工程技术在大肠杆菌中表达抗人 C_1q 轻链可变区基因 C_1qV_L。将质粒 pGEM-C_1qV_L 中的 C_1qV_L 基因克隆进表达载体 pBV220 中,在大肠菌中成功地表达出抗人 C_1q 轻链可变区片段(pC_1qV_L),并利用计算机分析软件进行了氨基酸序列同源性分析。本研究为进一步抗人 C_1q Fv 抗体的研制及用于自身免疫性发病机制的研究打下了一定基础。

关键词 人 C_1q;单克隆抗体;轻链可变区;表达;原核细胞

中图法分类号 R392.1

补体是机体免疫系统中一个调控精细的多分子效应系统。C_1q 是补体系统 C_1 的第一组成成份。它是一个巨分子量糖蛋白(Mr 460×10^3),含 A、B、C 三条不同链,由 18 条肽链组成。C_1q 与 C_1 激活物结合,激活 C_1,从而启动补体经典途径的活化。同时,巨分子结构赋予 C_1q 丰富的结合位点,可与体内多种分子相结合,发挥广泛的生物学作用。但 C_1q 庞大而复杂的分子结构,使人们对它结构功能认识望而却步。本研究选用本室制备的三株抗人 C_1q McAbs(A_4,B_5,D_6)中[1],抗原结合力最高的 A_4 株来制备基因工程小抗体,在大肠杆菌中表达抗人 C_1q 轻链可变区基因,并作了氨基酸序列同源性分析。这对进一步应用生物物理溶液构象方法研究 C_1q 的功能结构,探讨 C_1q 与抗 C_1q 抗体在自身免疫性疾病中的作用具有指导意义[2,3]。

1 材料与方法

1.1 试剂

限制性内切酶、CIP、Klenow 大片段、连接酶等购自华美生物工程公司、Promega 公司、Pharmacia 公司。地高辛标记试剂盒购自 Pharmacia 公司。

1.2 pGEM-C_1qV_L

由本室构建。

1.3 pBV220

含 cIts857 基因,编码温度敏感性入阻遏蛋白。由病毒所候云德教授馈赠。

1.4 质粒 DNA 的提取、鉴定、DNA 重组技术

按常规进行[4~6]。碱变性法抽提质粒 pGEM-C_1qV_L,以 Xba I、Not 酶切后回收 C_1qV_L 基因片段,然后在 Klenow 大片段作用下进行末端填平反应。Sma I 酶切表达载体 pBV220,以 CIP 作载体脱磷反应。在连接酶作用下将 C_1qV_L 克隆进 pBV220 中。重组子转化感受态菌 $DH_{5\alpha}$,转化菌液涂布于含氨苄(100 μg/ml)的 LB 平板,37℃培养过夜。

1.5 Dot blot 筛选重组子,酶切作进一步鉴定

由 pGEM-C_1qV_L 回收酶切片段 C_1qV_L,以地高辛配基引物法标记制备探针。从转化皿上随机挑取单菌落,快速粗提质粒,点于 NC 膜上,作预杂交、杂交、洗膜及显色反应。由此一次可筛选上百个菌落,从中筛选出的数个阳性菌落,碱裂解法小量抽提后,以 EcoRI 酶切作进一步鉴定,1.2%凝胶电泳比较片段大小。

1.6 抗人 C_1q 轻链可变区基因的表达[7,8]

将上述筛选的阳性重组表达子命名为 pBV-C_1qV_L。含有外源基因表达载体的在肠杆菌 $DH_{5\alpha}$ 在 30℃活化过夜,1%稀释后继续于 30℃摇床培养至 OD 达 0.6,迅速转至 42℃诱生 4 h。超声波裂解细菌,3 500× g 离心 5 min,表达的 pC_1qV_L 以不溶性包涵体形式存在于沉淀中,经 1%DSD 处理使之变为可溶性。采用 SDS-PAGE 法检测菌体裂解液中的重组蛋白(pC_1qV_L)。

1.7 pC_1qV_L 的序列计算机分析

图 1 示抗 C_1q 轻链可变区的基因序列及其推衍的氨基酸序列。应用 Scan databse、SEQDP、alignment 程序作序列的同源性分析。

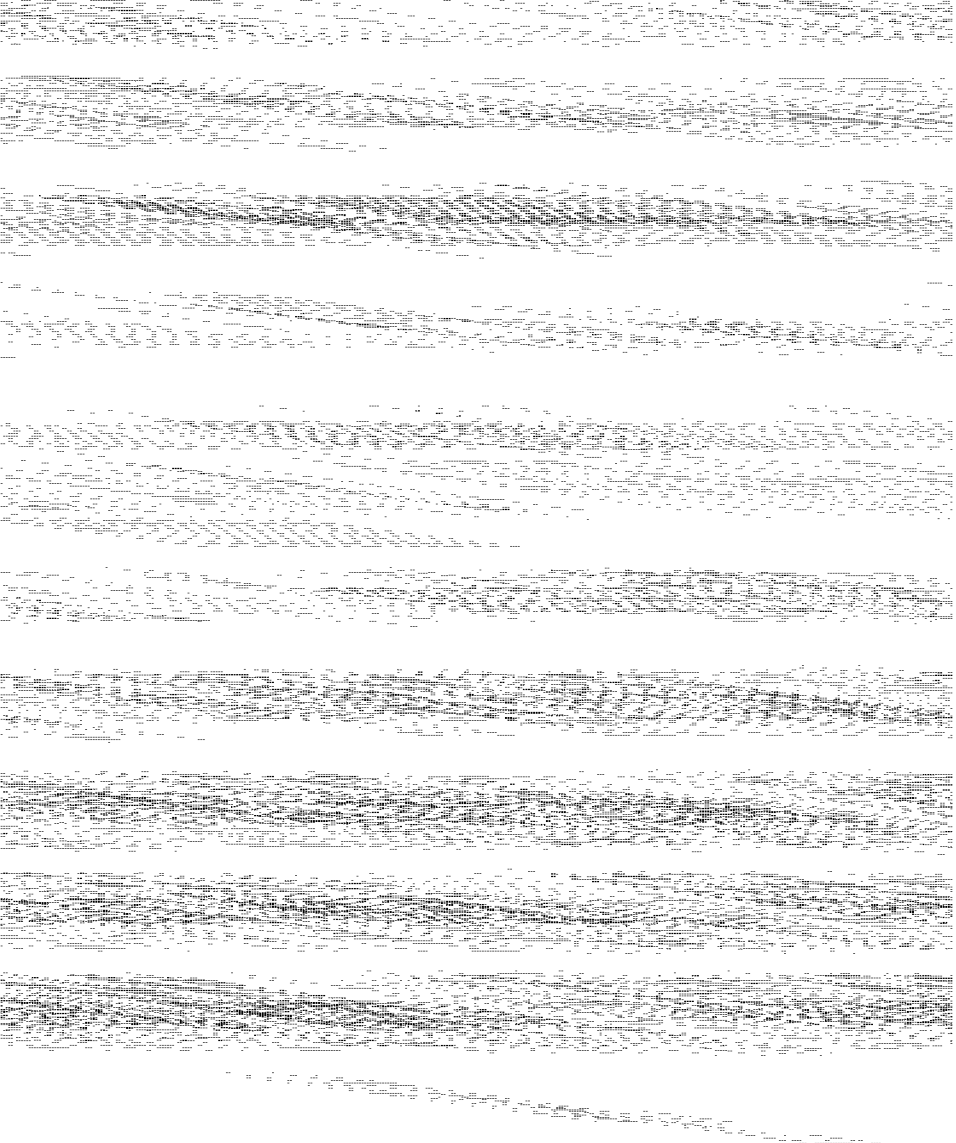
```
Sequence: C1QVL  Length: 333  Type: D
CCT CTA GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC ATG TCT GTA 45
P   L   D   I   V   M   T   Q   S   P   S   S   M   S   V
TCT CTG GGA GAC ACA GTC AGC ATC ACT TGC CAT GCA AGT CAG GGC 90
S   L   G   D   T   V   S   I   T   C   H   A   S   Q   G
ATT AGC AGT AAT ATA GGG TGG TTG CAA CAG AAA CCA GGG AAA TCA 135
I   S   S   N   I   G   W   L   Q   Q   K   P   G   K   S
TTT AAG GGC CTG ACC TAT CAT GGA ACC AAC TTG GAA GAT GGA GTT 180
F   K   G   L   T   Y   H   G   T   N   L   E   D   G   V
CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGA GCA GAT TAT TCT CTC 225
P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   A   D   Y   S   L
ACC ATC AGC AGC CTG CAA TCT GAA GAT TTT GCA GAC TAT TAC TGT 270
T   I   S   S   L   E   S   E   D   F   A   D   Y   Y   C
TAC AGT ATG CTC AGT TTC GGT CGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA GCT 315
Y   S   M   L   S   F   G   R   G   T   K   L   E   I   K   A
GGA AAT AAA AGC GCC CCC 333
G   N   K   S   G   R
```

图 1 C_1qV_L 的核苷酸顺序及推衍的氨基酸顺序

Fig 1 Nucleotide sequence of C_1qV_L with deduced amino acid sequence below

* 国家自然科学基金资助项目,No.39300117

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



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

3 讨论

基因工程抗体的研究发展迅速，已克隆出各种单克隆抗体轻、重链可变区基因，部分获得了表达。其中基因工程抗体的表达是目前该研究领域的热点、难点。而目前尚未见到补体基因工程抗体的研究报道。

本研究利用 pBV220表达载体，构建了 pBV-C_1qV_L 重组子。在 C_1qV_L 基因的第1，2，3读框中，仅第一位读框可通译为111个氨基酸，第2，3位读框分别在第2和第31编码子遇到终止子，表明第1位读框为 C_1qV_L 的正确开放阅读框架。利用 C_1qV_L 中第6位编码 Met 的密码子作为起始密码子来表达 pC_1qV_L。在理论上，缺失了5个氨基酸残基的 pC_1qV_L 并不影响其功能及活性。由于表达子所携带的 cIts857抑制基因与 P_L 启动子同在一个载体上，可以转化任何菌株，因此本实验选用蛋白酶活性较低的 $DH_{5\alpha}$ 作宿主菌，使表达产物不易为菌体蛋白酶降解，结果表明 C_1qV_L 在 $DH_{5\alpha}$ 中获得有效表达(图4)。由大肠杆菌表达大量均一分子形式的 C_1q 小抗体，对深入了解 C_1q 的结构、功能，提供了更精细有效的研究工具，这表现为在许多免疫细胞上(如 B、M_φ)，同时存在 C_1qR、FcR，二者功能交工重叠，而 C_1q 小抗体 Fc 段缺失，提供了研究 C_1q 免疫调节功能的新型分子。

计算机序列的同源性分析表明 pC_1qV_L 仅与免疫球蛋白可变区序列具有显著意义的同源性，图4所示 pC_1qV_L 与鼠免疫球蛋白 V_K 的同源性片段中，主要为抗-DNA，抗-独特型，抗-RBC 等自身抗体的 V_K 片段[9~13]。表明 pC_1qV_L 与鼠 IgV_K 自身抗体相关。根据自身抗体 V 基因学说，提示：(1)pC_1qV_L 可能属正常自身抗体，协同 C_1q 具有一定调节作用。人们现在认为，自身抗体可能具有重要的生理作用，如参入抗体库的发生、发展、成熟及免疫调节作用。(2)C_1qV_L 与病理性 C_1q 自身抗体可能来源于同一基因片段。在许多类型的自身免疫性疾病患者中，发现血清中存在抗 C_1q 自身抗体，并与疾病的严重程度呈正相关[14]，本文的 PC_1qV_L 与病理性 C_1q 自身抗体的关系及在自身免疫性疾病中的作用是一个令人感兴趣的问题，值得进一步研究。

参考文献

1 谢佩蓉，王雪峰，朱锡华等. 分泌抗人 C_1q 单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立. 免疫学杂志，1985；1(2)：13

2 徐崇钧，鲁子贤. 荧光标记 C_1q 与 Ig 聚集的相工作用. 生物化学与生物物理学报，1991；23(1)：54

3 Seigert CE, Daha MR, Tseng CM et al. Predictive value of IgG autoantibodies against C_1q for nephritis in systemic lupud erythematosus. Ann Rheum Dis，1993；6：28

4 Sambrook J. Molecular cloning. 2nd. New York: cold spring Harbor laboratory，1989；6：28

5 Dillon JR, Bezanson GS, Yenng KH. Miniming the circularizationof plasmid with alkaline phosphatase in: Dillon JR, ed. Recombinant DNA methodology Newyork，1985；52

6 Jeyaseelan K. Restriction and ligation in Jeyaseelan K ed. Genes and proteins, USA: ICSU press，1987：27

7 张智清，姚立红，候云德. 含 P_RP_L 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用. 病毒学报，1990；6(2)：111

8 Leammli VK. Cleavage of structural proteins during the assebly of the head of bacterophage. Nature，1970；227：680

9 Marion TN, Tillman DM, Jon NT. Interclonal and intraclonal diversity among anti-DNA antibodies from an (NZB×NZW) F1 mouse. J Immuol，1990；145(7)：2311

10 Bruck C, Co MS, Slaoui M et al. Nucleic acid sequence of an internal image bearing monoclonal anti-idiotype and its comparison to the sequence of the external antigen. Proc Natl Acad Sci USA，1986；83：6578

11 Bonilla FA, Zaghouani H, Bona C et al. V_K gene, usage, idiotype expression and antigen binding among clones expressing the V_H24 gene family derived from naive and anti-idiotype immune Balb/c mice. J Immunol，1990；145(2)：616

12 Kasturi KN, Mager R, Bona CA et al. Germline V gene encode variable region of mouse autoantibodies against thymocytes and red blood cells. J Immunol，1990；145(7)：2304

13 Conger JD, Sage HJ, Corley RB. Diversity in the available repertoire of murine antibodies reaction with bromelain-treated isologous erythrocytes. J Immunol，1989；143(12)：4044

14 Prada AE, Strife CF. IgG subclass restriction of autoantibody to solid-phase C_1q in membranoproliferative and lupus glomerulonephritis. Clin Immunol Immunopath，1992；63(1)：84

(收稿：1995-01-11；修回：1995-05-20)

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

V_K expression of anti-human C_1q McAb in $DH_{5\alpha}$ and its homological analysis

Chen Kemin, Zhu Xihua (Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The expression of the light chain variable gene of anti-human C_1q monoclonal antibody (C_1qV_L) was achieved in E. Coli. The C_1qV_L inserted into pGEM-C_1qV_L was subcloned into pBV220 resulting in the construction of expression plasmid pBV-C_1qV_L, and the product of C_1qV_L (pC_1qV_L) in $DH_{5\alpha}$ was analysed with a molecular weight about 1.2 kDa by SDS-PAGE. Homological comparison between pC_1q and Swiss database was performed. The findings are of significance for the study of the role of C_1q and anti-C_1q antibody in autoimmune disease.

Key words human C_1q; V_K expression; $DH_{5\alpha}$; homological comparison

83岁高龄妇女切除巨大卵巢肿瘤一例报告

Excision of a massive mucous cystadenoma of ovary in 83 year old woman

程显杰 （第三军医大学附属新桥医院妇产科）重庆，630037

患者郭冰轮，女，83岁，住院号108830。因绝经30余年，阴道不规则流血，腹部包块及低位肠梗阻于1989年6月13日急诊入院。

病人绝经30余年后无明显诱因于1年半前出现不规则阴道流血，同时发现下腹部有包块逐渐增大，今年1月下腹包块拳头大，并出现尿频症状，夜间小便3～4次，最近一月下腹包块迅速长大似儿头大，常伴呕吐，逐渐消瘦，于6月初去当地医院检查，B超提示可疑卵巢肿瘤，因大便解不出且呕吐，门诊以盆腹腔巨大包块，低位肠梗阻急诊收入院。

既往患有慢性支气管炎，肺气肿，两年前右股骨骨折，跛行，生活勉强自理。

查体，老年妇女貌，检查合作。体温36℃，脉搏84次/min，呼吸20次/min，血压11/8 kPa，心率84次/min，心律齐，双肺呼吸音粗糙，闻及干鸣音。

妇科检查：腹部膨隆，包块腹测30 cm×21 cm、外阴及宫颈萎缩，阴道宫颈有中量暗红色血液，子宫水平位稍大，其前方可扪及7月孕大小囊实性包块。B超提示腹盆部巨大包块来自附件，恶性可能性大。X光胸平片示：慢性支气管炎、双肺肺气肿，未见转移病灶。

经周密讨论充分准备于6月22日在持硬麻醉下行全子宫双附件切除术[1]，术中所见：子宫稍大，长有3个小肌瘤，右卵巢萎缩呈线状，左卵巢增大约30 cm×20 cm×20 cm囊实性不规则与左盆壁相粘连，放液2000 ml，完整切除包块及全子宫右附件，手术历时2 h。术后合并肺部感染及心功能障碍，病情危重，经大力抗感染，改善心功能，纠正电解质紊乱，精心护理等措施，并发症基本治愈，腹部伤口8 d拆线愈合好，术后16 d康复出院，术后4年随访病人健在。

最后诊断：(1)左卵巢多房性粘液性囊腺瘤。(2)子宫内膜囊腺性增殖症并肌腺瘤。(3)慢性支气管炎并感染，肺气肿。

讨 论

随着国民经济的发展和人民生活条件的改善，人均寿命逐渐提高。老年人口不断增加[2]，老年人的医疗保健问题，已日益受到人们普遍重视，为此对老年病的医治要求更高了，为保障老年人的健康长寿，积极开展对老年病的治疗，包括手术治疗显得更为重要。本病例的报道，对于80岁以上高龄妇女手术成功，说明老年病手术虽然并发症多，但只要加强手术前充分准备，术后加强管理、护理，对老年病仍可手术治疗。

关键词 卵巢肿瘤/外科手术

中图法分类号 R737.31

参考文献

1 江 森. 关于卵巢恶性肿瘤几个问题的探讨. 国外医学：肿瘤学分册，1993；20(4)：226

2 张丽珠. 老年妇科学. 中华妇产科杂志，1991；(26)：157

（收稿：1994-06-09；修回：1995-03-16）

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