

人源性抗出血热单克隆抗体重链可变区 基因克隆及其序列测定

高磊 陈苏民 陈南春 杨安钢 韩骅 刘新平 崔运昌*

(第四军医大学生物化学教研室, 西安 710033)

关键词 肾综合症出血热病毒, 人源性单克隆抗体, 抗体可变区, 基因序列

单克隆抗体已广泛应用于医学生物学的各个领域。但目前使用的单克隆抗体多为鼠源性, 在临床应用中常使患者产生抗异种蛋白的免疫反应。人源性单抗用于临床比鼠源性优越, 但其制备尚有许多难题, 其杂交瘤细胞不稳定、抗体产量低、多为 IgM, 难以达到临床的应用。我们前已报道了成功地获得能分泌人源性抗肾综合症出血热病毒 (HFRSV) 核心蛋白 IgM 型单克隆抗体的 87-2 杂交瘤细胞株。本文则报道从此细胞株提取 mRNA, 采用反转录-PCR 扩增方法成功地克隆了抗 HFRSV 人单抗重链可变区基因, 并测定了可变区基因序列。

方法及结果如下: a. 用 RPMI1640 培养液培养分泌抗 HFRSV 人单抗的 87-2 杂交瘤细胞系, 培养至对数生长期, 收集细胞, 用硫氰酸胍-酚-氯仿/异戊醇法提取细胞总 RNA。b. 取细胞总 RNA, 以寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸为引物, 反转录合成 cDNA 链。c. 设计并合成人免疫球蛋白重链 V 区 5' 端引物 (含 EcoRI 酶切位点) 和人免疫球蛋白 J 区 3' 端引物 (含 Sall 酶切位点), 用 Taq DNA 聚合酶, 对反转录产物, 进行 PCR 反应, 取反应产物作琼脂糖凝胶电泳, 可见扩增出长约 400bp 的 DNA 片段。d. 用低熔点琼脂糖回收 PCR 扩增带, 用 EcoRI 和 Sall 酶切, 插入 M13 噬菌体 DNA,

转化大肠杆菌 JM103, 筛选阳性克隆。e. 制备单链噬菌体 DNA, 用链终止法测定克隆基因的全序列。

所得核苷酸序列已输入计算机分析, 得知其限制性内切酶位点。开放读框长 405bp, 编码 135 个氨基酸 (见图 1), 有明确的骨架区和超变区。骨架区序列与已报道的人免疫球蛋白重链可变区第三族同源率为 84.8%。

克隆抗体可变区基因、测定其序列, 是制备基因工程抗体关键的第一步。本文结果表明, 反转录-PCR 法是克隆人单抗可变区基因的较好方法。其成功关键在于: a. 培养杂交瘤细胞至对数生长期, 此时细胞代谢旺盛, 抗体产量高, 可提取高质量 mRNA, 为 cDNA 合成与 PCR 扩增提供良好基础。b. PCR 引物的合理设计是保证克隆得到正确的可变区基因的重要环节。

N_端 QVQLLESGGGLVKGPGGSLRLSCAASGFTFSNA-
WMSWVRQAPGKGLEWVGRITKTDGGTTDY-
AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDT-
AVYYCTTDTLRKIVVPAAMEETGYSSGWY-
WGQGTLLVTVSS C_端

图 1 由 cDNA 推导所得的抗 HFRSV 人源性 87-2 单克隆抗体重链可变区氨基酸序列
黑线标出三个超变区

* 第四军医大学人单抗研究组。

收稿日期: 1992-02-18 修回日期: 1992-03-31