

BAT 脂肪酸合成所必需. 糖尿病动物不出现食物诱导性产热, 低温耐受力与 NE 刺激的产热也明显不足, 依剂量补偿胰岛素可使 UCP 量、GDP 结合量、细胞色素氧化酶活性等正常化, 高胰岛素水平还可增加线粒体数目, 从而提高 BAT 的 UCP 总量^[17]. 短日照通过松果体分泌褪黑激素以促进 BAT 增补. 妊娠动物的高催乳激素水平则使 BAT 功能减退. 其它垂体激素也间接参与调控 BAT 产热能力^[2].

在自然环境中, 食物、温度、光照的季节性变化综合影响着动物的状态. 冬眠动物是典型的例子, 进入冬眠季节前, 它们的 WAT 储量猛增, BAT 也得到相应增补, 但产热却不活跃, 这种能量消耗的减少有利于肥育, 尚不太低的环境温度也还不需要 BAT 增加产热. 低交感神经活动及由此而来的 UCP 遮蔽 (masking) 现象与此有关. 在冬眠动物的入眠期与深眠期, 产热抑制尤其明显; 开始觉醒时, 交感神经末稍分泌的 NE 可很快逆转 BAT 的产热抑制. 研究发现, 将动物冷暴露, BAT 的 GDP 结合量很快上升, 而显著的 UCP 增多则要冷适应几周后才出现, 提示冷暴露可能打开了 (unmasking) 被遮蔽的 UCP 潜在的 GDP 结合位点^[3].

参 考 文 献

- 1 Smith R E, Horwitz B A. *Physiol Rev*, 1969; **49**: 330
- 2 Nicholls D G, Locke R M. *Physiol Rev*, 1984; **64**: 1
- 3 Cannon B, Nedergaard J, Romert L *et al.* In: Wang L C

- H *et al.* eds. *Strategies in cold: Natural torpidity and thermogenesis*, New York: Academic Press, 1978: 567
- 4 Nedergaard J, Carneheim C, Alexson J *et al.* In: Malan A *et al.* eds. *Living in the Cold I*, Paris: Colloques INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, 1989: 387
- 5 Heldmaier G, Klaus S, Wiesinger H *et al.* In: Malan A *et al.* eds. *Living in the Cold I*, Paris: Colloques INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, 1989: 347
- 6 Stefano B, Bernard M, Bergmann *et al.* *Endocrinology*, 1990; **127**: 882
- 7 Miroux, Bruno, Casteilla L *et al.* *J Biol Chem*, 1992; **267** (19): 13603
- 8 Kartiyar S S, Shrago E. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991; **175**: 1104
- 9 Malan A. In: Malan A *et al.* eds. *Living in the Cold I*, Paris: Colloques INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, 1989: 333
- 10 Jezek P, Orosz D E, Garlid K D. *J Biol Chem*, 1990; **265** (31): 19296
- 11 Casteilla L, Blondel O, Klaus S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **87**: 5154
- 12 Amir, Shimon. *Brain Res*, 1990; **511** (2): 341
- 13 Nedergaard J, Mohell N, Nanberg E *et al.* In: Heller H C *et al.* eds. *Living in the Cold: Physiological and biochemical adaptations*, New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc., 1986: 83
- 14 Carvalho S D, Kimura E T, Bianco A C *et al.* *Endocrinology*, 1991; **128** (4): 2149
- 15 Bianco A C, Sheng X Y, Silva J E. *J Biol Chem*, 1988; **263** (34): 18168
- 16 Abelenda M, Puerta M L. *Horm Metab Res*, 1992; **24** (2): 60
- 17 Geloën A, Trayhurn P. *Am J Physiol*, 1990; **258** (2): R418

单克隆抗体生产的新时代

张志文 邹长江

(北京医科大学生理教研室, 北京 100083)

摘要 由 fd 噬菌体与质粒重组载体噬菌粒 (phagemid) 构建大容量, 高效筛选的表面表达抗体基因片段文库, 经突变、模仿体内 B 细胞亲和力成熟过程 (affinity maturation) 以免疫亲和层析筛选高亲和

力特异抗体片段. 取代单克隆抗体, 应用于免疫分析诊断.

关键词 抗体片段, 表面表达载体, 亲和力成熟

免疫分析是当代测定体内激素、生长因子、神经递质、细胞因子、细胞表面标志、肿瘤特异抗原、受体及体内药物浓度等微量生物活性物质的重要手段, 其原理是依据抗原抗体特异结合反应. 近 30 年来, 该领域不断取得重大进展, 曾多次获得诺贝尔奖, 成为生命科学中最活跃的学科之一.

1959 年 Yallow 和 Berson^[1]首次建立胰岛素放免测定法, 使得测定体内微量激素的宿愿得以实现、为现代免疫分析奠定了基础, 随之各种激素的测试药盒陆续问世. 1971 年又发展了以酶标记替代放免中的同位素, 提高了安全性, 延长了药盒的使用期, 促进了这一技术的完善普及. 1975 年 Kohler 和 Milstein^[2]创立了利用杂交瘤制备单克隆抗体的方法. 与多克隆抗体相比, 单克隆抗体仅与抗原分子中一个抗原决定簇结合, 可分辨抗原分子中间的微小差异. 此外, 抗体生产数量也不受限制. 单抗的应用不仅提高了免疫分析的敏感性、特异性和标准化程度, 而且使得测定细胞表面标志、分化抗原、肿瘤细胞特异性相关抗原成为可能. 单克隆抗体的出现为免疫分析的发展注入了巨大的动力, 目前各种测试药盒的制造已成为新兴的高科技产业. 估计到 2000 年, 世界范围内的销售量将超过 100 亿美元.

但是, 以杂交瘤技术生产单克隆抗体也存在着费用昂贵、耗时长 (3—6 月) 等缺点, 更严重的是不能产生某些半抗原和抗原的抗体. 从 1990 年起, 一种结合蛋白质工程、重组 DNA 和特殊大肠杆菌表达系统 3 种技术的全新生产单克隆抗体方法开始出现, 开辟了单抗生产的新纪元.

为理解该技术的工作原理, 现简要介绍抗体分子的结构 (图 1). 抗体由两条相同的轻链和两条相同的重链组成, 形成大致如 Y 型的结构, 每个抗体分子有两个 N 端, 每个 N 端由一条重链的可变区 (V_H) 和一条轻链的可变区

(V_L) 组成与抗原结合的表面 (F_v), 其中包括决定抗体特异性的互补决定区, 值得注意的是, 由部分重链和整条轻链组成的 Fab 片段及由 V_H 和 V_L 组成的单链 F_v 片段 (scF_v), 具有与整个抗体分子相同的特异性和亲和力, 若用重组 DNA 技术将抗体的 Fab 和 scF_v 片段基因克隆到高效表面表达载体 (display vector) 即可获得大量的 Fab 和 scF_v 替代整个抗体分子应用于免疫分析. 为此, 必须克服两大技术难点: a. 构建容量与体内抗体基因相当的抗体片段基因文库及其相应的筛选方法; b. 建立体外抗体亲和力成熟的方法.

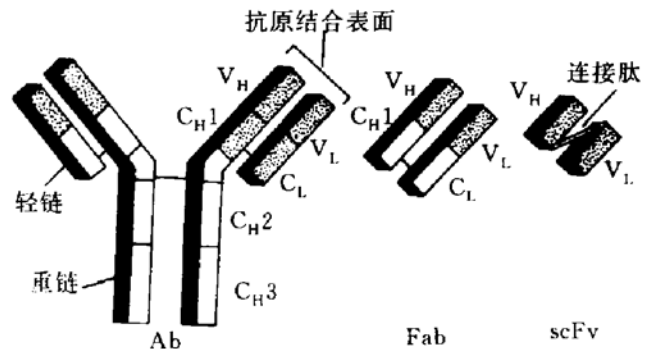


图 1 抗体及抗体分子片段

1 抗体片段基因文库的构建

抗体基因可变区的边测区的核苷酸序列已经清楚^[3], 从已免疫的动物细胞提取 RNA, 逆转录生成 cDNA, 分别应用 V_H 和 V_L 的特异引物, 经 PCR 扩增, 将 V_H 和 V_L 基因分别克隆到二个噬菌体, 构建成分别表达 V_H 和 V_L 抗体片段的载体, 扩增后再将两载体中 V_H 和 V_L 基因片段连接, 克隆到同一噬菌体, 构建成抗体片段基因的组合性文库 (combinatorial library). 应用上述方法 Huse^[4]于 1989 年构建成 Fab 表达性基因文库, 其表达的 V_H 和 V_L 组成的抗体片段显示与整个抗体分子相似的特异性和亲和力; 主要不足是容量小, 仅能达到 10^6 不同的抗体基因.

1990年剑桥大学 Winter 小组^[5]首次构建抗体片段组合文库,其载体为 fd 噬菌体和噬菌体-质粒重组载体噬菌粒(phagemid),后者为含有线性噬菌体 fd 主要基因间隔区的质粒,该间隔区含有病毒 DNA 合成的起始、终止和病毒颗粒包装的全部顺式调控原件,将 Fab 或 scFv 的基因插入到噬菌粒的克隆区,使 Fab 的 $V_H C_{H1}$, $V_L C_L$ 或 scFv 的 V_H , V_L 中的一个基因与外衣蛋白 III 基因融合,而另一个基因与信号肽基因融合,构成表面表达载体.当感染表面表达载体的大肠杆菌用辅助噬菌体进行第二次转染后,后者的基因 II 产物与噬菌粒所携带的基因间隔区相互作用,启动滚环复制,以产生噬菌粒 DNA 一条链和拷贝,这些单链拷贝经切割产生切口,然后环化,最后被包装进子代噬菌体.与此同时,在基因 II 产物作用下(作为转录调节蛋白),Fab 或 scFv 抗体片段得以表达,其中一条肽链通过共价键与噬菌粒外衣蛋白 III 融合,连接在噬菌体一端,另外一条在信号肽的引导下分泌到大肠杆菌的外周质中,通过二硫键(Fab)或连接肽(scFv)与噬菌体一端的抗体片段相连(图2).此外,亦可将 Fab 或 scFv 的二条肽段的基因分别克隆到不同的噬菌粒中,分别与外衣蛋白和信号肽基因融合,同时转染大肠杆菌,其中一个噬菌粒表达的可溶性肽段,可与连接到噬菌粒外衣蛋白的另一条肽段结合,组成功能性抗体片段.此种将表达产物提呈至载体表面文库的构建成功是筛选阳性克隆技术的重大突破,噬菌体可增殖至 $10^{12}/\text{ml}$,经过一次相应抗原亲和层析柱,可将阳性克隆富集 1 000 倍以上,筛选的克隆可转染到高效表达菌体.稍后,美国 Kang^[6]领导的小组也成功地构建了抗体 scFv 的文库,抗体片段与噬菌体外衣蛋白 VIII 融合,后者的拷贝数大于外衣蛋白 III (每个病毒外衣蛋白 VIII 与 III 的数量比为 2 000 : 3.5),筛选的效率也更高.1991 年底 Winter^[7]小组已从免疫小鼠脾细胞构建成功编码识别一种甾体半抗原的 scFv 表达文库.在另一种意义上,此项技术可直接从已免疫的人淋巴细胞构建人的基因文库用于治疗目

的.1991年 Winter 小组将噬菌体、噬菌粒重组载体分别以宠物猫、狗和鸡命名的.

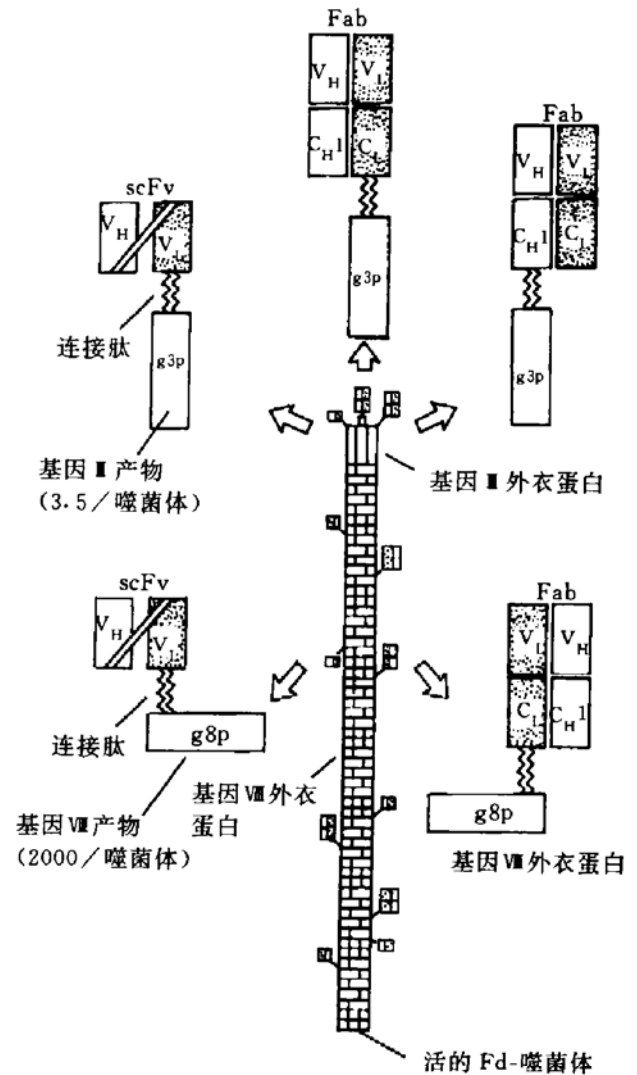


图2 抗体片段表面表达载体

以上文库有二个缺点:a.容量上不能达到哺乳动物初次免疫后抗体基因的数量(10^{10}),主要为携带抗体片段基因的噬菌体转染效率降低所致;b.文库构建过程中 V_H 和 V_L 相互竞争与外衣蛋白基因连接, V_H 和 V_L 的配对比例与细胞中原有的明显不同.最近 Winter 小组与澳大利亚 Hooganboum^[8]协作,正在构建一种双重组文库(dual combinatorial libraries DCLS),将两个小容量文库经过交叉转染成大容量的文库,如两个各含有 10^7 的 V_H 或 V_L 文库经过交叉转染可产生容量为 10^{14} 的超级文库.需要指出的是,这些第一代文库在稳定性、相容性、表达调控和转染效率方面都有改善的

潜力.

2 抗体亲和力成熟

哺乳动物免疫反应的发展过程中, 抗原刺激后, 抗体的亲和力是逐步升高的, 其中包括体内超级突变导致抗体分子可变区, 特别是决定抗体特异性的互补决定区氨基酸序列和组成的改变以及高亲和力抗体的筛选^[9], 其确切的机理目前尚不清楚. 上述表达载体产生的抗体亲和力较低, 亲和常数为 $10^4-10^5 \text{ (mol/L)}^{-1}$, 最近在体外模仿体内 B 细胞抗体基因超级突变和筛选技术也取得了进展^[10]. 应用相应抗原为配基的免疫亲和层析, 可高度选择性地吸附携有相应抗体片段的表面表达载体, 再从富集的噬菌体提取编码抗体片段的基因, 通过各种在体和离体的基因突变技术, 改造基因编码的顺序, 再构建成新的文库, 在较严格的条件下进行第二轮免疫亲和层析, 筛选出较高亲和力的抗体, 这种突变和筛选的循环基本上模仿了体内亲和力成熟和筛选过程 (图 3). Kang^[11]应用上述方法, 从低亲和力抗体文库 [亲和常数为 $10^5 \text{ (mol/L)}^{-1}$] 筛选出亲和力为 $2.5 \times 10^8 \text{ (mol/L)}^{-1}$ 的孕酮抗体 scFv 片段.

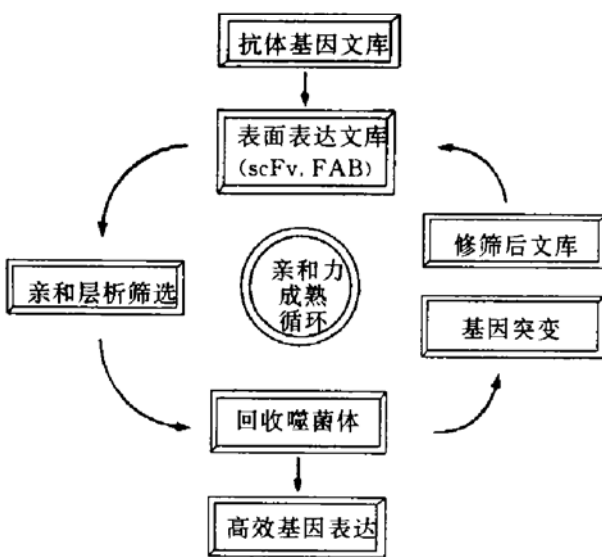


图 3 抗体片段体外亲和力成熟及筛选

下面就离体抗体片段基因文库的突变方法作简要介绍:

a. 错配 PCR (Error-prone PCR)^[12] 改变 PCR 反应条件, 如改变反应液的组成, 增加引物浓度等, 在扩增过程中产生核苷酸错配.

b. 将表面表达载体转染至突变型大肠杆菌 mutD, 在其指数生长期, 噬菌体基因突变机率较野生型高出 1 000 到 10 000 倍^[12].

c. 应用 HIV 病毒的逆转录酶进行逆转录, 提高合成 cDNA 的突变机率^[14].

d. 利用合成寡核苷酸进行定点突变, 可在抗体片段基因的特定区域如互补决定区进行, 制备新的抗体片段基因.

单独或联合应用上述突变技术不仅能构建大容量复杂文库还可模拟体内 B 细胞亲和力成熟过程.

3 应用

上述新技术可迅速地生产高亲和力特异性抗体, 特别适合于工业化大规模生产各种免疫诊断药盒, 与传统的药盒相比, 使用 Fab 和 scFv 抗体片段有两大优点: a. 检测时间短, 可在 1min 内得到结果; b. 假阳性率低. 更为重要的是, Fab 和 scFv 抗体片段的出现为免疫分析技术的进一步发展奠定了坚实的基础. 免疫成像技术可准确地定位肿瘤或血栓的发生部位, 其关键试剂抗体为小鼠或人和小鼠嵌合抗体 (抗体分子的抗原结合部位来自小鼠, 其它部分为人 IgG), 使用人 Fab 或 scFv 片段可减少抗小鼠反应, 提高成像质量, 预防致命的过敏反应发生. 最新发展的微型免疫生物传感器是免疫分析和微电子技术组合的产物, 可连续监测血中各种激素、抗生素或药物浓度. 以表面等离子体共振 (surface plasmon resonance) 监测抗体在金泊的连续沉积的第一代产品最近已由 Pharmacia 公司推出. 抗体基因文库筛选技术可特异地对抗片段的生物活性参数进行修正, 为这类仪器最终用于人体内提供了选择的余地.

杂交瘤技术在免疫分析方面作出了巨大的贡献, 因此难以预言特殊细菌表达系统为主的新技术能否完全取代单克隆抗体, 可以肯定的是, 单一含有哺乳动物 (包括人) 全部抗体片

段的 cDNA 文库, 经过一次简单的免疫亲和层析, 得到任何一种相应半抗原或抗原的抗体片段应用到临床免疫诊断和科学研究的时代已指日可待。

致谢 承我校免疫教研室分子生物学实验室马大龙教授审阅, 特此致谢!

参 考 文 献

- 1 Yakiw R, Berson S. *Nature*, 1959; **184**: 1648
- 2 Köhler F, Milstein C. *Nature*, 1975; **256**: 495
- 3 Orlandi R, Fussow D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 3833
- 4 Huse W, Sastry L. *Science*, 1989; **246**: 1275

- 5 McCafferty J, Griffiths A, Einter A *et al.* *Nature*, 1990; **88**: 4363
- 6 Kang A, Barbas C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 4363
- 7 Winter G, Milstein C. *Nature*, 1991; **349**: 293
- 8 Hoogenboom G, Griffiths, Johnson K *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1991; **19**: 4133
- 9 Steele E, Taaylor L, Both G. *Today's Life Science*, 1991; **2**: 28
- 10 Babbs C F, Bain J D, Hickstra D M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 4557
- 11 Gram H, Marconi L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 3576
- 12 Herlitz SKeonin K. *Gene*, 1990; **91**: 143
- 13 Fowler R, Schapper R. *J Barc*, 1986; **167**: 130
- 14 Takeuchi Y, Nagomo T. *J Virol*, 1988; **63**: 3900

目前最高分辨率的电泳 ——固相 pH 梯度等电聚焦

郭尧君 郭强*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 固相 pH 梯度等电聚焦是国际上 80 年代的新型电泳技术。利用一系列具有弱酸和弱碱性质的丙烯酰胺衍生物滴定时, 在滴定终点附近形成的 pH 梯度并参与丙烯酰胺的共价聚合, 从而形成固定的不随环境电场等条件变化的 pH 梯度。该方法具有比传统载体两性电解质等电聚焦更高的分辨率、更大的上样量, 可用于分析和制备相近 *pI* 的蛋白质, 多肽等。

关键词 等电聚焦, 固相 pH 梯度, 载体两性电解质

30 多年前瑞典科学家 Svensson-Rilbe^[1,2] 建立了等电聚焦 (isoelectrofocusing, IEF) 的理论和 Vesterberg^[3] 合成了能在凝胶中形成多种范围 pH 梯度的载体两性电解质 (carrier ampholyte, CA) 后, 等电聚焦技术由于它的高分辨率已被世界上农、林、牧、副、渔、医、法医等领域的成千上万个生化实验室广泛使用^[4]。常规电泳由于仅仅根据在碱性缓冲液中蛋白质荷负电的多少进行分离, 分辨率受到了限制, 即使采用带有分子筛效应的梯度凝胶也难以将荷负电差别不大和分子量相差不多的蛋

白质分子分开, 而 IEF 是根据蛋白质的等电点的不同在一个连续的、线性的、稳定的 pH 梯度中进行分离, 只要在凝胶中的 pH 梯度范围足够窄, 便可将等电点相近的蛋白质分开。目前有两种 pH 梯度可供选择, 一种是前面所述的 CA pH 梯度, 大多在 2 个 pH 或大于 2 个 pH 范围, 个别范围可达 1 个 pH, 分辨率一般为 0.01pH, 另一种便是本文要介绍的由 Gasparic

* 合肥中国科技大学生物系 88 届毕业生。

DNA double helix, antisense inhibit translation or transcription. Both strategies can be applied to control the expression of oncogenes and growth factors in tumor cells. Here, the application of antisense was reviewed in cancer research briefly. a. Inhibition of oncogene and growth factor expression to suggest their function in tumor cells. b. Discrimination between proto-oncogene and activated oncogene. c. Problems and approaches in antisense gene therapy.

Key words antisense, oligodeoxynucleotide, tumor

Thermogenesis in Brown Adipose Tissue and Its Regulation. Ye Zucheng, Cai Yipeng. (Dept. of Biology, Peking University, Beijing 100871). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (2): 135

Brown adipose tissue (BAT) is a kind of facultative-thermogenic organ, especially important in small mammals. The key element in BAT heat production is the uncoupling protein (UCP), a unique protein located in the inner membrane of BAT mitochondria. Thermogenic stimulation of this tissue opens the UCP's proton channel, results in a proton short-circuit, thus bypasses the relatively small amount of ATP synthetase present in BAT mitochondria resulting in a severalfold accelerated oxidative metabolism. The structural and functional state of BAT is regulated by many factors, such as norepinephrine, thyroid hormone, insulin, pH, and food, environmental temperature etc.

Key words brown adipose tissue, uncoupling protein, proton channel, facultative thermogenesis, norepinephrine

A New Era in Production of Monoclonal Antibodies. Zhang Zhiwen, Zou Changjiang. (De-

partment of physiology, Beijing Medical University, Beijing 100083). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (2): 139

Construction of complex antibody libraries that expressed soluble antibody fragments on the surface of fd-phagemid with high screening efficiency subjected to rounds of *in vitro* mutations. The individual antibody gene can then be affinity matured by emulating the process that occurs in B-cells *in vivo*. The affinity matured antibody fragments are selected for their ability to bind antigen after phage recovery. This novel recombinant DNA methods may replace the technology of using mice and hybridoma for the selection and production of antibodies.

Key words antibody fragment, surface display vector, affinity maturation

A Current Break Through Electrophoresis Technique with Supermost Resolution: Immobilized pH Gradients Isoelectrofocusing. Guo Yaojun, Guo Qiang. (Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (2): 143

The mentioned immobilized pH gradients isoelectrofocusing is a electrophoresis technique developed in 80' s. An approximate linear pH gradient is generated by titrating weak acidic and basic acrylamide derivatives which then covalent bound into the polyacrylamide matrix. The pH gradient is stable and independent of electric field fluctuation. The present method provides higher resolution and larger loading capacity comparing with conventional carrier ampholyte isoelectrofocusing. It can analyse and purify protein with only minor *pI* difference.

Key words isoelectrofocusing (IEF), immobilized pH gradient (IPG), carrier ampholyte