

严重时, 诱导细胞进入生长休止状态, 修复损伤, 以利于细胞功能的恢复; 损伤严重时则放弃修复, 使细胞进入死亡程序。因为对严重受损的细胞的修复不仅要消耗细胞的大量能量, 而且由于修复的出错率较大, 很有可能形成突变细胞, 成为肿瘤的潜在细胞, 危及整体的生存。这也是生命行为的高度有效性所决定的。这种信号转导体系和分子调节网络的存在, 使细胞损伤修复和程序性死亡成为一个问题的两个方面, 二者间的相互协调有利于生命的延续和进步, 其协调性的丧失则可能导致肿瘤发生等恶疾, 对这一体系的进一步认识和确证还需要大量的研究工作。

参 考 文 献

- 1 de Murcia G, de Murcia J M, Schreiber V. *BioEssays*, 1991; **13**: 445
- 2 Janakidevi K, Koh C. *Biochemistry*, 1974; **13**: 1327
- 3 Sugimura T, Miwa M. *Mol Cell Biochem*, 1994; **138**: 5
- 4 de Murcia G, de Murcia J M. *TIBS*, 1994; **19**: 172
- 5 de Murcia G, Schreiber V, Molinete M *et al.* *Mol Cell Biochem*, 1994; **138**: 15
- 6 Witmer M V, Aboul-Ela N, Jacobson M K *et al.* *Mutat Res*, 1994; **314**: 249
- 7 Fritz G, Auer B, Kaina B. *Mutat Res*, 1994; **308**: 127
- 8 Satoh M S, Lindahl T. *Cancer Res*, 1994; **54**: 1899s
- 9 Ding R C, Pommier V, Kang V H *et al.* *J Biol Chem*, 1992; **267**: 12804
- 10 Molinete M, Vermeulen W, Burkle A *et al.* *EMBO*, 1993; **12**: 2109
- 11 Satoh M S, Lindahl T. *Nature*, 1992; **356**: 356
- 12 Althaus F R, Hofferer L, Kleczkowska H E *et al.* *Mol Cell Biochem*, 1994; **138**: 53
- 13 Chatterjee S, Berger N A. *Mol Cell Biochem*, 1994; **138**: 61
- 14 Wang Z Q, Auer B, Stingl L *et al.* *Gene and Development*,

- 1995; **9**: 509
- 15 Nosseri C, Coppola S, Ghibelli L. *Exp Cell Res*, 1994; **212**: 367
- 16 Negri C, Bernardi R, Ricotti G C B A *et al.* *Carcinogenesis*, 1993; **14**: 2559
- 17 Kaufmann S H, Desnoyers S, Ottaviano Y *et al.* *Cancer Res*, 1993; **53**: 3976
- 18 Lazebnik Y A, Kaufmann S H, Desnoyers S *et al.* *Nature*, 1994; **371**: 346
- 19 Li P, Allen H, Banerjee S *et al.* *Cell*, 1995; **80**: 401

Poly (ADP-ribose) polymerase: Its Role in the Repairing of DNA Damages and Programmed Cell Death. Luo Ying, Sun Zhixian, Wu Zuze (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is a kind of enzyme which responsible for posttranslation modification of proteins. It exists in many eukaryotic cells and catalyzes poly ADP-ribosylation of nuclear proteins including histone H₁ and itself. When cells are damaged by toxic agents that induce DNA breakages, PARP molecules will bind to DNA breakage and their catalytic activity is activated. Then they modify their acceptor protein and trigger a set of cascade reactions. Thus PARP is a possible molecular sensor and transducer to initiate the signal transferring path for reacting to damages of the cell. The information which they passed may decide the fate of a cell; repair or death.

Key words poly (ADP-ribose) polymerase, DNA damage repair, programmed cell death

抗体库的发展及未来

王 学 王海涛

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 抗体库的出现为制备人源性单抗开辟了一条行之有效的途径。虽然该技术问世只有短短几年的

时间,但其筛选系统已有了很大的改进;现已能够快速地从抗体库中筛选出各种具有不同用途的抗体.从而克服了传统杂交瘤技术的某些局限性.文章就抗体库的发展及其应用前景进行了概述.

关键词 抗体库,单克隆抗体,噬菌体抗体

自1989年国外首次报道基因工程抗体库技术以来,该技术已有了长足的发展.它得益于用PCR方法设计一组引物扩增出全套免疫球蛋白可变区基因,以及从大肠杆菌分泌有结合功能的免疫球蛋白分子的成功.

1 抗体库技术的发展

1989年,Huse等^[1]将扩增的L链片段和H链片段分别克隆到以 λ Zap II改建的表达载体中,构建成L链库和H链库,然后将两个库随机重组形成了组合抗体库.由于在V基因的5'末端有外分泌信号序列,所表达的Fab可分泌到细菌体外.Caten等^[2]和Persson等^[3]从随机文库中分别筛选到了抗流感病毒血凝素的鼠抗体和抗破伤风类毒素的人抗体.

Barbas III等^[4]于1991年报道了噬菌体抗体库技术.该技术使抗体的表达、扩增和筛选更为有效.在丝状噬菌体(M13、Fd)外壳蛋白基因的信号肽序列与编码成熟蛋白序列之间插入外源基因,并不影响其表达系统.外源蛋白融合在噬菌体外壳蛋白的N端,所表达出来的这一外源蛋白可以自发折叠成天然状态,可恢复其生物活性,不形成包涵体.外壳蛋白的N端带有外源蛋白呈现在活噬菌体的表面,可与外源配体结合(如抗原-抗体反应),以活噬菌体的形式高效率地筛选、富集、克隆和繁殖目的基因.通过重复“吸附-洗脱-扩增”这一过程,可以轻易地筛选容量达 10^8 以上的抗体库.它克服了随机组合文库的随机性强、库容量大、真核和原核筛选系统机率低、不易获得特异性抗体等的缺点.

1994年Duenas等^[5]报道了一种改良的筛选系统,他们将辅助噬菌体M13K07中的P^{III}蛋白基因切除掉,使其不具有感染宿主菌的能力,必须借助在噬菌粒中所表达的P^{III}蛋白C端的98个氨基酸与抗体片段所形成的融合体

感染宿主菌,这样只有带融合蛋白的噬菌体才具有感染能力,这要比以前所报道的筛选系统^[4]在淘洗时富集阳性克隆的数量大得多.

噬菌体抗体库具有如下几个特点:

a. 噬菌体抗体库可以代表“天然(native)”抗体库.可从未经免疫的人外周血B细胞中提取mRNA,反转录成cDNA链,用PCR方法扩增人的H、L片段,重组构建成人的天然抗体库.从这类抗体库中已报道筛选到十几种不同的特异性单链抗体或Fab片段.

b. 从库中可以获得不同亲和力的抗体.通过合理地应用g^{III}(每个噬菌体有3~5个拷贝)与g^{II}(多达2700个拷贝)两种载体来获得不同亲和力的抗体.g^{III}可用于筛选亲和力较高的抗体,g^{II}则用于筛选亲和力较低的抗体.此外,还可以利用PCR错配技术和“链更替”技术来提高抗体亲和力,有报道说这可以提高亲和力20~30倍^[6].

c. 可以从噬菌体抗体库中直接筛选出特异性的抗体,其方法简单易行,实验周期大大地缩短.

在构建噬菌体抗体库时,目前进行转化所用的方法为电穿孔法,其所需仪器昂贵,转化效率同化学法相比虽然提高了许多,但在实际应用中尚未达到令人满意的程度(只有1%质粒DNA转化进去).

最近,又有新的质粒称为Polycos问世^[7],它是具有噬菌体 λ 包装识别序列COS位点串联(多聚体)的噬菌粒.它可以通过 λ 噬菌体体外包装和 λ 噬菌体粒子感染将噬菌粒转入大肠杆菌细胞中.为了满足 λ 噬菌体包装的需要,Polycos载体进行限制性内切酶酶切形成线性分子,这些线性载体单体与插入DNA连接,产生载体/插入片段串联体. λ 噬菌体包装提取物随机地选择COS位点,然后沿着DNA分子直至超过38 kb和小于51 kb

之间再遇到 COS 位点时, 这之间的 DNA 片段都被包装到 λ 噬菌体粒子内部. 感染大肠杆菌后, Polycos 串联体表达 M13 的 P^{II} 蛋白, 该蛋白在 M13 的复制起始位点切开切口, M13 滚环式复制, 包装成线性噬菌体粒子. Polycos 载体省去了需要电穿孔进行噬菌粒转化, 且 λ 噬菌体包装感染效率相对较高.

2 抗体库的应用

人体中至少有 10^7 种 B 细胞, 有人估计能达 10^{30} 种 B 细胞, 每种 B 细胞即为一个克隆. 一种抗原决定簇能特异地激活一个或一个以上的 B 细胞, 并使其产生相应抗体. 在构建抗体库时, 转化效率一般在 10^7 以上, 从理论上说抗体库基本上能反应出人体所产生抗体的全貌. 所以抗体库的应用是很广泛的, 难怪有人称其为“万能库”.

2.1 在疾病诊断及疫苗中的应用

1990 年, Folgori 等^[8]利用人的乙型肝炎病毒表面抗体 (HBsAb) 阳性和阴性血清中的 IgG 筛选多肽库 (peptide library), 获得了 HBsAb 的类似物, 用该类似物免疫小鼠, 使小鼠产生中和乙型肝炎病毒的中和抗体. 多肽库与抗体库原理大致相同. 这说明应用抗体库可以得到与某种疾病抗原特异性反应的多肽而无需预先知道该抗体的抗原. 原则上, HBsAb 的模拟法完全可以应用在其他疾病上, 例如, 针对传染病, 可用抗体库中该病特异性噬菌体表位 (phagotope) 来分析每个病人的免疫应答, 以确定每个患者之该病特异性的“免疫指纹 (immunofingerprint)”. 这对不知道病因的疾病也能分析其特异性噬菌体表位, 代表未知病因的免疫指纹, 作为某种抗体存在的标志.

最吸引人的就是这一技术用来研究自身免疫疾病. 有人认为自身免疫疾病大多都是由于病毒引起的, 但缺乏令人信服的证据, 应用抗体库可鉴别出与该病特异性抗体反应的噬菌体表位, 而该表位又对抗原模仿得特别逼真, 这样可以大大提高鉴别是抗病毒抗体还是自身抗体的能力. 当然也就拓宽了诊断和预后的应用

范围.

用抗原类似物诱导病毒中和抗体的成功^[8], 给疫苗的研究开发提供了一条崭新而有效的途径, 特别是为那些目前人工尚不能制备以及提纯较为困难的保护性抗原指明了方向.

2.2 在疾病治疗中的应用

把从人的组合文库中筛选出来的抗呼吸道合胞病毒 (RSV) 的 Fab 片段直接导入已感染的小鼠肺中, 使小鼠体内 RSV 滴度降低, 最后完全清除^[9]. 还有报道说鼠源的单链抗体能中和培养细胞中的森林脑炎病毒粒子^[10]. 总之, 这都说明从抗体库中筛选出来的 Fab 片段和单链抗体都能够中和病毒、清除病毒粒子. 这就扩大了利用抗体治疗传染病的范围, 用被动免疫治疗各种传染病比主动免疫来得迅速且针对性强. 在治疗方面, 多克隆抗体要比单克隆抗体更有效. 可将抗不同表位的单抗混合在一起, 制成制剂, 可直接用于治疗. 这类抗体兼有多抗和单抗的优点, 其应用前景十分光明.

对于变态反应, 可以生产出与患者 IgE 竞争性结合变应原的 Fab 样分子.

2.3 在肿瘤诊断和治疗方面的应用

利用肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原筛选抗体, 用于肿瘤的诊断, 免疫成像定位, 并有助于对肿瘤标志物的研究. 肿瘤特异性抗体可选择性识别和杀伤肿瘤细胞, 由抗体结合区与病毒或化疗药物相融合而制成“导向药物”, 能有效地特异性摧毁肿瘤.

最近, Goodson 等^[11]用肽库筛选出与尿激酶受体结合的配体, 据说人肿瘤细胞的侵入机率与结合受体的尿激酶正相关^[12].

2.4 药物设计中的应用

传统药物的发现过程是对活细胞和动物模型进行筛选, 费时、费工, 而某些疾病由于没有适当的动物模型, 而限制了对其治疗药物的发现. 肽库和抗体库的出现, 可用于医学上感兴趣的受体筛选出相应的配体, 利用受体与配体结合的结构信息, 结合其他技术用于药物设

计和生产。例如,在目前条件下研究具有较大毒性细菌脂多糖的结构是很困难的,甚至是不可能的,利用抗体库技术制备出来的抗体完全可以模拟其生物活性构型。由于抗体片段是由多肽构成的,在体内不稳定,不能直接用作药物进行治疗,但可以利用较稳定的与其构型相同或相似的芳香族化合物来代替之^[13],用作药物的生产和临床治疗。相信这一领域将会有大的突破。

2.5 在其他方面的应用

2.5.1 催化抗体:从80年代后期发展起来的抗体的一种新用途。抗体库的出现扩大了各种途径催化酶的生产,现已制备具有酯酶和分解多肽的蛋白酶性质的抗体酶^[14]。在临床治疗上,也将会利用抗体酶技术催化灭活病原,如选择性地摧毁病毒壳蛋白、分解肿瘤抗原以及清除血块(blood clots)^[14]等。

2.5.2 双功能抗体:抗体片段同其他多肽融合形成双功能抗体,使抗体具有新的特性,如与酶、细菌毒素、植物毒素、T细胞受体区域和白介素等^[15]融合。

2.5.3 切割DNA:最近,有报道^[16]指出人的自身抗体Fab片段具有切割超螺旋质粒DNA的能力。从患有系统红斑狼疮的人血清中提取纯化抗体,用番木瓜酶酶切制备成Fab。该抗体片段能够切开质粒pUC19。利用抗体库制备出来的抗体完全可以模拟这一功能,并可以制备出切割各种核酸的抗体酶,这就为基因治疗开辟了又一条新的途径。

2.6 植物表达系统的应用

在植物体内可以表达完整有活性的抗体分子且能糖基化,通过有性杂交途径可以遗传给后代^[17],这样可大大地降低抗体生产成本,也许有一天,人们只要直接食用植物,就可以预防和治疗某些疾病。

目前,人们在某些植物病害(特别是真菌病害和某些病毒病害)面前束手无策,要减轻和预防这些病害的危害,每年要花费大量的人力物力,使用超量的农药。全套抗体库的建立和发展,从中筛选出目的基因并导入植物,使

之表达出抗微生物或中和毒素的抗体,以及能够分解病原的抗体酶,有可能成为抗病育种的一条新途径。预示着在不远的将来人们可能真正地食用无公害食品,为保护大自然、维护生态平衡做出人类应有的贡献。

抗体库技术问世只有短短几年,根据其实际需要的不同还有许多问题尚待解决。

首先,这一基因工程抗体都是在*E. coli*中表达的Fab片段或单链抗体,但对于治疗来说,具有Fc片段的全抗体分子半寿期较长(一个月以上),效果要比抗体片段好得多。但要生产具有Fc片段的全抗体分子尚需进一步研究,并且需要真核表达系统^[18]。

要想把抗体用于临床治疗及其他实际需要,如何提高产量降低成本是需要深入研究的又一重大课题。如果不考虑Fc片段,只需要生产Fab或单链抗体时,利用*E. coli*培养,其表达量介于10~1000 μg/L之间,利用细胞高密度发酵能达到200 mg/L^[19]。但这对于大量制备抗体来说费力费时且成本还是比较高的。最近有报道说利用酵母*Pichia pastoris*在摇瓶中培养可产生100 mg/L单链抗体^[20],如果利用高密度培养,其产量可增加10~100倍。我们实验室也正在研究利用这一酵母高效表达系统制备Fab片段。

虽然,抗体库技术还存在着尚待解决的问题,但它可以不经过杂交瘤途径甚至不需要免疫就能够制备单克隆抗体,因而我们深信,经过广大科技工作者的不懈努力,在不远的将来抗体库技术有可能取代传统的杂交瘤途径生产目的单克隆抗体。

参 考 文 献

- 1 Huse W Q, Sastry L, Iveson S A *et al.* Science, 1989; 246: 1275
- 2 Caten A J, Koprowski H. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 6450
- 3 Persson M A, Caothion R H, Burton D R. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 2432
- 4 Barbas III C F, Kang A S, Lerner R A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 7978

- 5 Duenas M, Borrebaeck C A K. *Bio/Technology*, 1994; **12**: 999
- 6 McCafferty J, Griffiths A D, Winter G *et al.* *Nature*, 1990; **384**: 552
- 7 Altling-Mees M A, Short J M. *Gene*, 1993; **137**: 93
- 8 Folgori A, Tafi R, Meola A *et al.* *EMBO J*, 1994; **13**: 2236
- 9 Crowe J E, Murphy B R, Chanock R M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 1386
- 10 Jiang W R, Bonner T R, Venugopal K *et al.* *Virology*, 1994; **200**: 21
- 11 Goodson R, Doyle M V, Kaufman S E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 7129
- 12 Pardo L, Baliesteros J S, Osman R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 4009
- 13 Kenan D J, Tsai D E, Keene J D. *Techniques*, 1994; **19**: 57
- 14 Zouali M, Hansen D E. *TIBTECH*, 1994; **12**: 73
- 15 Morrison S L. *Ann Rev Immuno*, 1992; **10**: 239
- 16 Gololodov G V, Chernova E A, Schourov D V *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; **92**: 254
- 17 Hiatt A C, Cafferkey R, Bowdish K. *Nature*, 1989; **342**: 76
- 18 Burton D R, Barbas III C F, Lerner R A. *Science*, 1995; **13**: 255
- 19 Pack P, Kujau M, Schroeck V *et al.* *Bio/Technology*,

1993; **11**: 1271

- 20 Ridder D R, Schmitz R, Legay F *et al.* *Bio/Technology*, 1995; **13**: 255

The Development and Future of Antibody Library. Wang Xue, Wang Haitao (*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China*).

Abstract The development of antibody library has opened an effective way to produce human monoclonal antibodies. Although the antibody library technology came out only a few years ago, its selection system has been improved greatly, and now monoclonal antibodies with various uses can be screened from antibody libraries rapidly. This technology eliminates some limitations of traditional hybridoma methods. The development and future of antibody library was reviewed.

Key words antibody library, monoclonal antibody, phage antibody

运用差异展示分离特异性表达的基因

孙 涛 刘雪丰

(中国医学科学院实验动物研究所, 北京 100021)

摘要 在高等生物中含有约 100 000 个不同的基因, 其中仅有 15% 的基因在任何个体细胞中均表达. 因此分离特异的目的基因便显得十分重要. 差异展示是通过部分扩增 mRNA 的逆转录产物、经测序胶电泳, 分离到差异性表达的基因. 它与消减杂交相比是分离特异表达基因的更有效的手段. 虽然这种方法在实际运用中存在着这样或那样的困难, 但随着对这种技术的不断改进, 它将会有越来越广泛的用途.

关键词 差异展示, 分离, 特异表达的基因

分离特异的目的基因一直是人们关注的问题. 在高等生物中一般含有 100 000 个不同的基因, 而仅有约 15% 的基因是在任何个体细

胞中均表达的^[1]. 因此在胚胎发育中, 不同