

E. coli XL1-Blue was transformed with pHB-FAP, and induced with IPTG. The HBsAg banding ability and the alkaline phosphatase catalytic activity were detected by using ELISA in the induced bacterial supernatant thus indicat-

ing that the anti-HBsAg-alkaline phosphatase bifunctional antibody was expressed successfully in *E. coli*.

Key words anti-HBsAg Fab, alkaline phosphatase (AP), bifunctional antibody

从肿瘤病人少量外周血淋巴细胞克隆抗体基因^{*}

胡志伟 李小玲 蔡小红 朱建高 周国华 孙去病

(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 建立杂交瘤单抗亲和层析纯化抗原、体外抗原致敏淋巴细胞和 RT-PCR 克隆人抗体基因的技术. 将亲和层析纯化的大肠癌相关抗原 CA-Hb3 经 SDS-PAGE 和免疫印迹鉴定后, 与 IL-2 和丝裂原于体外致敏大肠癌病人 10 ml 外周血淋巴细胞 (PBL), 出现淋巴母细胞化和集落形成现象. 致敏 PBL 的总 RNA 比未致敏 PBL 的量增加了 2.5 倍. 致敏后 RT-PCR 扩增的人抗体 VH-CH1 (IgG) 和 VL-CL (κ) 基因的量比未致敏者多 1.3 倍. 该技术可将鼠源杂交瘤单抗人源化.

关键词 抗原, 肿瘤, 人抗体基因, 反转录反应, 聚合酶链反应

杂交瘤单抗绝大多数为鼠源性, 不适于人体内应用. 噬菌体抗体库技术^[1,2] 将其人源化^[3]后可用于体内诊断和治疗^[4]. 但目前构建抗体库所需外周血较多, 有的多达 500 ml^[5], 而且 PBL 未经抗原致敏所产生的抗体亲和力不高. 国内外尚无应用抗原体外致敏 PBL 构建抗体库的报道. 本研究拟用抗原体外致敏法, 结合 PCR 进展, 探讨用少量血克隆人抗体基因的技术, 同时为我室的大肠癌杂交瘤单抗 Hb3^[6]人源化奠定基础.

1 材料与方法

1.1 大肠癌相关抗原 CA-Hb3 的提取和纯化

用 Triton X-100 及^[6]正丁醇^[7]粗提大肠癌组织及 HRT-18 细胞株粗抗原, 再过偶联 Hb3 的 Sepharose 4B (Pharmacia) 亲和柱纯化 CA-Hb3, 以 SDS-PAGE 及免疫印迹鉴定其纯度. 以 Hb3 夹心 ELISA 检测其抗原性.

1.2 病人淋巴细胞分离和培养

用间接 ELISA 选择一个血清抗 CA-Hb3

抗体阳性的病人. 采 10 ml 肝素抗凝血. 淋巴细胞分离液分离 PBL. 用 DMEM 培养基 (含 10% FCS) 重悬 PBL 至细胞数为 10⁶ 个/ml, 总数为 10⁷. 采用体外致敏法培养^[8], 即第 0 天加入纯化的 CA-Hb3, rhIL-2 (Sigma) 和美洲商陆丝裂原 (PWM, Sigma) 至终浓度分别为 0.5 mg/L, 200 U/ml 和 10 mg/L, 置 37℃ 5% CO₂ 培养, 第 5 天按上述浓度再加 rhIL-2 和 PWM. 共培养 7 天. 观察 PBL 生长和克隆扩增.

1.3 PBL 的总 RNA 提取及 mRNA 纯化

收集培养的 PBL, 用 TRIzol 试剂 (Life Technologies) 提取总 RNA, 用试剂盒 (Pharmacia Biotech) 纯化 mRNA, 测 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 鉴定其纯度及浓度. 对照为同一病人, 取 10 ml 外周血分离 PBL, 不经 CA-Hb3 体外致敏, 直接提取总 RNA.

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39670306).

收稿日期: 1996-08-20, 修回日期: 1997-01-13

1.4 反转录反应 (RT) 合成 cDNA

分别用总 RNA 和 mRNA 进行 RT: a. 体外致敏和未致敏 PBL 的总 RNA, 采用 cDNA Cycle 试剂盒 (Invitrogen) 作 RT, 观察抗原和细胞因子等致敏 PBL 对扩增其抗体基因效率有无影响; b. 致敏 PBL 的 mRNA, 分别用禽成髓细胞瘤病毒 (AMV, Invitrogen)、Moloney 鼠白血病病毒 (M-MLV) 和 Superscriptase (Life Technologies) 三种反转录酶作 RT, 比较这三种反转录酶合成抗体基因 cDNA 的效率. 其中 M-MLV 的 RT 又设三管, 分别含 oligo (dT)、oligo (dT) + 随机引物和随机引物, 观察这两种引物的 RT 效率有无差别. AMV 的 RT 程序为 42 °C 60 min, M-MLV 和 Superscriptase 的 RT 为 37 °C 60 min.

1.5 PCR 扩增抗体基因

分别以上述 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 VH-CH1 (IgG) 和 VL-CL (κ) 抗体基因. 所用引物^[9]: a. VH-CH1 (IgG) 5' 端引物 GAG GTG CAG CTG KTG SAG TCT GS, 3' 端引物 GTC CAC CTT GGT GTT GCT GGG CTT; b. VL-CL (κ) 5' 端引物 GA W RTT GTG MTG ACK CAG TCT CC, 3' 端引物 AGA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT. 其中 R = A 或 C, W = A 或 T, S = T 或 G, M = A 或 C, K = T 或 G. 在 50 μ l 反应体积中, 含上述 2 μ l cDNA 模板, dNTPs 浓度分别 20、50、100、150 和 200 μ mol/L, 引物分别为 10、20、30 和 40 pmol, 以选择最佳 PCR 反应条件. 用 200 μ l 薄壁管 (Bio-Rad) 于 PCR 仪 (Bio-Rad) 进行反应. 分别采用标准 PCR 和改良的 Touchdown PCR 程序^[9, 10], 后者为: 94 °C 30 s, 退火 1 min, 74 °C 1.5 min, 其中退火温度以每步降 1 °C, 从 65 °C 降至 56 °C (I), 或 55 °C 降至 46 °C (II), 每个退火温度循环 3 个周期, 共 30 个周期, 之后连接一个以 55 °C (I) 或 45 °C (II) 为退火温度的前述 PCR, 10 个周期, 最后 74 °C 延伸 10 min. 取 1/10 体积的反应体积以 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物. 电泳照片经计算机图像分

析软件处理.

2 结 果

2.1 CA-Hb3 纯化

粗抗原经 Hb3 亲和层析纯化后, 电泳显示一条蛋白质带, 分子质量约 50 ku (100 °C 变性 3 min) 或 27 ku (100 °C, 5 min). 该蛋白质经免疫印迹检测, 与 Hb3 结合, 证明确为 CA-Hb3. 夹心 ELISA 亦证明纯化的 CA-Hb3 能与 Hb3 结合, 且其浓度 (4.5~75 mg/L) 越大, 相应的 A_{405} 值越高, 呈直线相关关系 ($r = 0.9907$).

2.2 PBL 分离和培养

10 ml 外周血分离得 1.0×10^7 PBL 细胞, 培养 7 d 后, 细胞数 0.98×10^7 . 第 0 天时, 细胞较小较圆; 第 3 天, 出现胞体增大的淋巴母细胞; 第 5 天, 细胞较稀疏, 出现多个克隆, 偶见大的淋巴母细胞; 第 7 天, 细胞又较密集, 更多更大克隆出现, 仍可见淋巴母细胞 (图略).

2.3 总 RNA 提取和 mRNA 纯化

10 ml 血的 PBL 经 CA-Hb3、IL-2 和 PWM 体外致敏 7 d 后, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA 约 25 μ g, 1% 甲醛变性和普通琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整. 未经体外致敏的 10 ml 血 PBL 总 RNA 为 10 μ g. 显示抗原致敏后总 RNA 量增加了 2.5 倍.

2.4 RT-PCR

2.4.1 Touchdown PCR 与标准 PCR 扩增 VH-CH1 (IgG) 和 VL-CL (κ) 基因: Touchdown PCR 及标准 PCR (dNTPs 终浓度 200 μ mol/L, 引物 50 pmol) 扩增的 VH-CH1 (IgG) 和 VL-CL (κ) 基因为 710 bp, 三种 PCR 产量没有明显差异, 但 Touchdown 程序可扩增更大的基因. 用 Touchdown PCR II 进行以下实验.

2.4.2 Touchdown PCR 的最适条件: 以 Touchdown PCR II 扩增 VL-CL (κ) 基因时, dNTPs 的最适终浓度为 200 μ mol/L, 引物最适量为 20 pmol.

2.4.3 反转录反应中 AMV, M-MLV 和 Superscriptase对扩增抗体基因的影响: 三种反转录酶扩增抗体基因的效率无明显差别.

2.4.4 RT 中 oligo (dT) 引物和随机引物对扩增抗体基因的影响: RT 中所用引物对扩增抗体基因没有影响.

2.4.5 体外致敏或未致敏 PBL 的总 RNA 对扩增抗体基因的影响: 从致敏和未致敏 PBL 提取总 RNA, 以 M-MLV 合成 cDNA, 再以此 cDNA 为模板, 用 Touchdown PCR II 程序扩增 VH-CH1 (IgG) 和 VL-CL (κ) 基因, RT、PCR 条件一致. PCR 产物电泳样品量相同, 显示从致敏 PBL 中扩增的抗体基因量多于未致敏者 (图略), 图像分析表明, 抗原等体外致敏使 VH-CH1 (IgG) 和 VL-CL (κ) 基因产量均提高 1.3 倍.

3 讨 论

大肠癌病人血清中含抗 CA-Hb3 抗体, 表明该病人曾被大肠癌抗原致敏, 因此其 PBL 再经 CA-Hb3 体外致敏, 就出现再次应答: 淋巴瘤细胞化和克隆形成. 由此构建的抗体库, 更易筛出高亲和力和高特异性的噬菌体抗体. 而且致敏后 PBL 的总 RNA 提高了 2.5 倍. 进一步用 RT-PCR 技术, 以总 RNA 扩增 VH-CH1 (IgG) 和 VL-CL (κ) 基因, 从产量上看, 致敏的比未致敏的多 1.3 倍, 说明体外致敏 (CA-Hb3, IL-2, PWM) 使 PBL 增加了抗体 mRNA 丰度, 因而使从少量血 PBL 中克隆特异性和亲和力高的抗体基因成为可能, 可以避免抽大量血, 符合我国国情, 并有利于将来筛选高特异性的噬菌体抗体. 因此, 应用杂交瘤单抗亲和层析纯化抗原、体外抗原致敏淋巴细胞和 RT-PCR 技术克隆人抗体基因的技术将可普遍用于现有鼠源单抗的人源化, 有极大的应用前景.

参 考 文 献

1 Ward E S, Gussow D, Griffiths A D *et al.* Binding activities of a repertoire of immunoglobulins secreted from *Escherichia*

coli. Nature, 1989, **341**: 544~ 546

2 Huse W D, Sastry L, Iverson S A *et al.* Generation of a large combinatorial library of immunoglobulin repertoire in phage lamda. Science, 1989, **246**: 1275~ 1281

3 Winter G, Milstein C. Marmade antibodies. Nature, 1991, **349** (24): 293~ 299

4 Glassy M C. Production methods for generating human monoclonal antibodies. Hum Antibod Hybridoma, 1993, **4** (4): 154~ 165

5 Marks J D, Hoogenboom H R, Bonnert T P *et al.* Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol, 1991, **222**: 581~ 597

6 李小玲, 周国华, 孙去病等. 用单克隆抗体检测结直肠癌病人血清中肿瘤相关抗原的研究. 中国现代医学杂志, 1995, **5** (4): 65~ 66

7 郭 珊, 郭淑云, 温淦升. 正丁醇提取的宫颈膜表面抗原. 中国病理生理杂志, 1993, **9** (1): 40~ 43

8 Lenardo M J. Interleukin 2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis. Nature, 1991, **353**: 858~ 860

9 Cai X H, Garen A. Antimelanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: Selection of specific antibodies from single chain Fv fusion phage libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92**: 6537~ 6541

10 Don R H, Cox P T, Wainwright B J *et al.* 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res, 1991, **19** (14): 4008

Cloning Human Immunoglobulin Genes from Peripheral Blood Lymphocytes After *in vitro* Immunization. HU Zhiwei, LI Xiaoling, CAI Xiaohong, ZHU Jiangao, ZHOU Guohua, SUN Qubing (Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078, China).

Abstract A strategy for cloning human immunoglobulin genes with antigen *in vitro* immunization and RT-PCR was established. Colorectal carcinoma-associated antigen CA-Hb3 were purified through a monoclonal antibody Hb3-Sepharose 4B affinity column and analyzed by SDS-PAGE and Western blot. Peripheral blood lymphocytes (PBL) from 10 ml blood of a patient with colorectal carcinoma were immunized with CA-Hb3, rhIL-2 and pokeweed mitogen. The lymphoblast-like cells and colonies

could be seen after immunization. The amounts of total RNA from the immunized PBL are 2.5 times more than that from the non-immunized. Human immunoglobulin, VH-CH1 (IgG) and VL-CL (κ), genes were amplified with RT-PCR with the above total RNA or mRNA as templates. The products of human immunoglobulin genes from the immunized PBL

are 1.3 times more than that from the non-immunized. This strategy would be used for humanizing mouse-original monoclonal antibodies.

Key words antigen, neoplasm, Gene, human immunoglobulin, reverse transcription reaction, polymerase chain reaction

鼠脑微透析液痕量氨基酸的激光诱导荧光检测*

韩慧婉 马明生 熊少祥 刘国淦

(中国科学院化学研究所, 北京 100080)

摘要 使用自制微透析探针和活动体位生化取样装置以及自行组装的毛细管电泳-增强型电荷耦合器件-激光诱导荧光系统, 对鼠脑透析液中的痕量氨基酸以异硫氢酸荧光黄 (FITC) 进行柱前衍生后进行了分离和检测。鼠脑海马 CA₃ 区微透析液中游离氨基酸的浓度为 $10^{-8} \sim 10^{-6}$ mol/L, 并将其用于学习与记忆的研究, 为无损研究活体脑内神经递质和其他痕量生物物质的动态变化提供了一种新方法。

关键词 微透析, 激光诱导荧光检测, 毛细管电泳, 氨基酸, 学习

在研究学习与记忆、针刺麻醉、运动行为, 药物药理和毒理作用以及某些神经系统疾病等对大脑高级神经活动的影响时, 越来越多的研究者开始采用兼具生化采样和脑内给药双向功能的微透析技术。因为传统的静态取样法只能测定细胞内外液混合的组织匀浆成分, 而这种新技术可以单纯采集细胞外液, 为研究神经系统中起重要作用的神经递质及其他细胞外成分的动态变化提供了可能。这种整体水平的在位、动态生化检测技术同时还具有无损伤、快速和连续取样等特点, 可以在实验动物自由活动状态下取样, 有可能成为生化取样的常规方法。微透析样品可采用电化学、高效液相色谱 (HPLC) 或毛细管电泳 (EC) 法进行检测。采用荧光衍生法可扩大检测范围并提高灵敏度。使用质谱学方法, 可以方便地进行样品的定性。目前被研究过的透析液组分主要是单

胺类和少数氨基酸^[1~5]。由于微透析样品成分复杂、生物活性物质含量极少 ($\mu\text{mol} \sim \text{pmol}$), 且采样量少 (一般为 μL 级), 因而迫切需要发展更灵敏的分析和检测方法, 为此建立了毛细管电泳-激光诱导荧光检测系统 (CE-LIF)。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效毛细管电泳-激光诱导荧光检测系统由氩离子激光器、增强型电荷耦合器件 (IC-CD) 等组成^[6,7]。江湾 I-C 型脑立体定位仪为上海第二军医大学产品。SB-2 型和 MD-1001 型针管式微量注射泵, 分别为北京星达公司和美国 BAS 公司产品。操作学习装置按照传统

* 国家自然科学基金资助项目 (29675053)。

收稿日期: 1996-09-20, 修回日期: 1997-01-27