

参 考 文 献

- 1 Husain S S, Gurevich V, Lipinski B. Arch Biochem Biophys, 1983; 220: 31
- 2 Satoh M, Hosoi S, Miyaji H *et al.* Cytotechnology, 1993; 13: 79
- 3 Lenich C, Pannell R, Henkin J *et al.* Thromb Haemostas, 1992; 68: 539
- 4 Gurevich V, Pannell R, Broeze R J *et al.* J Clin Invest, 1988; 82: 1956
- 5 Xiao C Z, Huang Z C, Zhang Z G *et al.* Chin Med Sci J, 1994; 9: 203
- 6 Morita T, Kato H, Iwanaga S *et al.* J Biochem, 1977; 82: 1495
- 7 Hartree E F. Anal Biochem, 1972; 48: 422
- 8 Laemmli U K. Nature (Lond), 1970; 227: 680
- 9 李成文. 现代免疫化学技术, 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 71~75
- 10 张向明. 生物化学与生物物理进展, 1983; 3: 63
- 11 史 伟, 张彩英, 黄桂秋等. 生物化学与生物物理进展, 1990; 17: 376
- 12 Kohno T, Hopper P, Lillquist J S *et al.* Bio/Technology, 1984; 2: 628

Purification and Characterization of a Recombinant Pro-urokinase. Ye Jianxin, Xiao

Chengzu, Zhang Zhengguang (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China*).

Abstract The recombinant pro-urokinase expressed in CHO cells was purified. The purification procedure was based on the following steps: micro-pore glass chromatography, CM-15HR chromatography, Sephacryl S-200 gel filtration. The yield was 46% and the purification factor was 700-fold. Small amounts of contaminating urokinase were removed by Benzamidine-Sepharose 6B affinity chromatography. Analysis by SDS-PAGE showed that the purity of pro-urokinase was 90% and the molecular weight was 52 ku. The specific activity of the purified pro-UK was 51 220 U/mg of protein. The characters of the recombinant pro-UK were consistent with that of the natural pro-UK.

Key words pro-urokinase, purification, micro-pore glass, Benzamidine-Sepharose 6B

抗 D-双聚体单抗轻链可变区基因的克隆*

官孝群 张艳玲 李 勇 丁 皓 朱运松 宋后燕

(上海医科大学基础医学院, 上海 200032)

摘要 以分泌小鼠抗人纤维蛋白降解产物 D-双聚体单克隆抗体杂交瘤细胞株的 mRNA 为模板, 用小鼠免疫球蛋白轻链可变区基因的通用引物, 通过 RT-PCR 扩增基因, 与载体重组后, 经酶切鉴定和核苷酸序列分析, 证明克隆含抗 D-双聚体单抗的轻链可变区基因, 长度为 330 bp.

关键词 抗 D-双聚体单克隆抗体, 反转录聚合酶链反应, 轻链可变区基因克隆

数十年来的临床实践证明, 溶栓治疗能显著降低急性心肌梗塞死亡率, 是心肌梗塞有效的治疗方法. 然而, 这些溶栓药物的有效程度受到诸多因素的限制, 如出血倾向、再阻塞以及溶栓滞后现象^[1]等, 要提高溶栓效率, 应改变

目前使用的溶栓药物的结构, 改进它们的药代动力学性质, 增加它们与纤维蛋白亲和和特异性

*国家“863”计划资助项目 (863-102-11-6).

收稿日期: 1995-03-14, 修回日期: 1995-09-20

等,因此我们将在选择性溶栓方面作系列报道.

溶栓药物与抗人纤维蛋白单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)或双效特异性单克隆抗体(bispecific monoclonal antibody, bsMcAb)直接交联,可以提高与血栓结合的亲和力;但由于单抗或双效抗体为异源蛋白,其免疫原性强,不宜临床应用^[2];如果能分离编码纤维蛋白单抗的可变区基因,与人源恒区基因重组于同一表达载体,表达嵌合蛋白,产物的免疫原性就会显著降低;若上述嵌合基因再与纤溶酶原激活物基因重组,则表达的融合蛋白与纤维蛋白亲和力增强,从而提高溶栓特异性和溶栓效力,即形成选择性溶栓药物.

纤维蛋白为血栓的主要基质,溶栓药物溶解血栓的本质,是促使血栓中不溶性的纤维蛋白多肽水解,生成可溶性的纤维蛋白降解产物(FDPs),D-双聚体(D-dimer)和E片段为终产物^[3],其中D-双聚体的水平有重要的临床意义,我室为此构建了分泌抗D-双聚体单抗细胞株^[4],该单抗只作用于D-双聚体的一个决定簇,能与D-双聚体、纤维蛋白反应,不与纤维蛋白原反应,故可用于导向溶栓的研究.

基因工程技术的迅猛发展使得上述设想成为可能,以前从基因库中筛选可变区基因时间长,而且需要高效的探针;1989年, Winter等^[5]通过PCR技术首先从杂交瘤细胞株cDNA库中扩增相应抗体的可变区基因,缩短了筛选时间,加快了嵌合抗体和融合蛋白的研制周期,我们以杂交瘤细胞株mRNA为模板,利用RT-PCR技术,迅速扩增并克隆了抗D-双聚体单抗的轻链可变区基因.

1 材料和方法

1.1 细胞株

分泌小鼠抗人纤维蛋白降解产物D-双聚体(D-dimer)单克隆抗体杂交瘤细胞株DW₁₀由本室丁皓等^[4]研制,单克隆抗体为IgG1亚型,重量链为 γ 型,轻链为 κ 型.

1.2 寡聚脱氧核苷酸引物

用于扩增免疫球蛋白轻链可变区的两个引

物由美国Oligo Etc Inc合成,它们的序列分别为V_HFR1引物(5' CA GGA TCC GGA ATT CAG ATG CTG ACC CAG TCT CCA GTA 3' 38 MER)和J_HFR4引物(5' TA TTA GAT CTC GAG CAG CTT GGT GCC CCC CC GAA 3' 35 MER),在这两个引物中分别引入限制性内切酶BamH I、EcoR I和Bgl II的识别顺序以及起始和终止密码. Oligo (dT)₁₂₋₁₈购自Boehringer Mannheim公司.

1.3 试剂

异硫氰酸胍、限制性内切酶、连接酶、琼脂糖等,购自GIBCO BRL公司, Taq DNA Polymerase购自中国科学院上海植物生理研究所, cDNA Synthesis Kit购自Boehringer Mannheim公司. Sequenase^R Kit (Version 2.0)购自美国生化试剂公司. 其他试剂均为国产分析纯.

1.4 RNA的提取和分离

参照David等^[6]报道的方法.

1.5 质粒DNA的制备

参照Sambrook等^[7]报道的方法.

1.6 从琼脂糖凝胶中分离回收DNA片段

参照顾银良等建立的方法^[8].

1.7 cDNA第一链的合成

参照David^[6]报道的方法制备总RNA和Poly (A⁺) RNA,按照cDNA Synthesis Kit说明,用下列体系,合成第一链: 4 μ l 溶液1 (第一链合成缓冲液), 1 μ l 溶液2 (核糖核酸水解酶抑制剂), 2 μ l 溶液3 (4种脱氧核糖核酸混合物), 1 μ l J_HFR4引物 (50 μ mol/L, 7 μ l 灭菌双蒸水, 2 μ l Poly (A⁺) RNA (2 μ g), 2 μ l 溶液5 (AMV逆转录酶, 5 U/ μ l), 总体积为20 μ l, 42 $^{\circ}$ C反应1.5 h后置冰浴.

1.8 RT-PCR扩增轻链可变区基因

PCR反应在复旦大学制造的FR-300 DNA扩增仪中进行. 在100 μ l的反应体系中, 含第一链反应物5 μ l, 引物V_HFR1和J_HFR4各50 pmol, dNTPs各0.2 mmol/L, 10 $\times$ PCR扩增缓冲液10 μ l, 用100 μ l石蜡油封住样品液面, 95 $^{\circ}$ C水浴保温10 min, 加入2.5单位Taq

DNA 聚合酶。样品按下列顺序在 PCR 仪中扩增: 94℃ 变性 60 s, 55℃ 退火 60 s, 72℃ 延长 90 s, 15 个循环后加入 2.5 单位 Taq DNA 聚合酶, 30 个循环后, 72℃ 维持 300 s。扩增完成, 取 10 μ l 反应物进行 1.6% 琼脂糖凝胶鉴定扩增产物。

1.9 可变区基因克隆的构建和鉴定

采用图 1 方案构建可变区基因克隆。pUC18 载体用 BamH I 和 Hinc II 消化, 分离 2.7 kb 的片段; 扩增的 DNA 经 Klenow 酶催化补平末端, 用 BamH I 消化, 分离约 330 bp 片段。将这两片段连接, 用 CaCl_2 转化法导入大肠杆菌 JM83 中; 重组克隆用 BamH I 和 Bgl II 双酶消化, 鉴定是否含有插入片段; 含有插入片段的克隆进行序列分析。

核苷酸序列分析按 Sequenase[®] Kit (Version 2.0) 说明书进行。

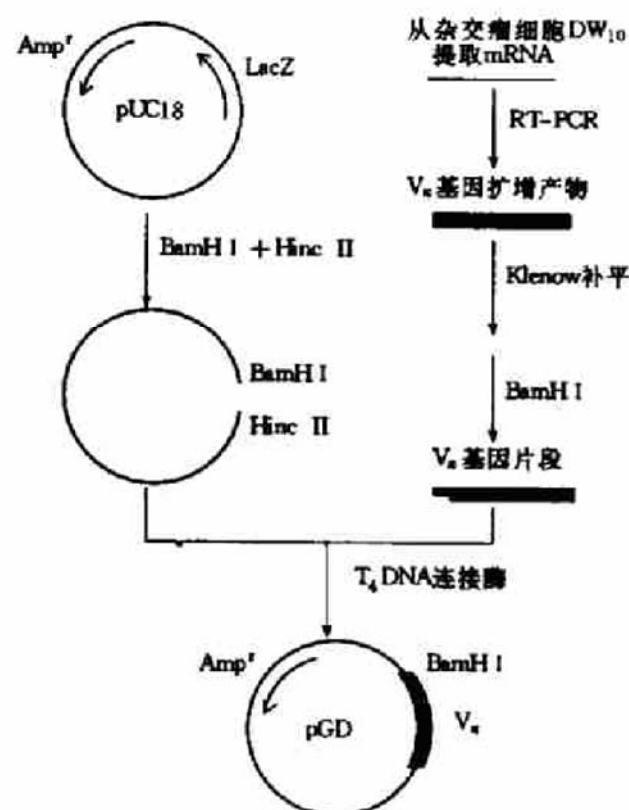


图 1 质粒 pGD 的构建图谱

2 结 果

2.1 RT-PCR 反应产物的鉴定

我们用 RT-PCR 扩增抗 D-双聚体单抗的

轻链可变区基因, PCR 反应产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定(图2), 电泳图谱中可观察到很清晰的约 330 bp 的条带, 符合轻链可变区基因的长度。

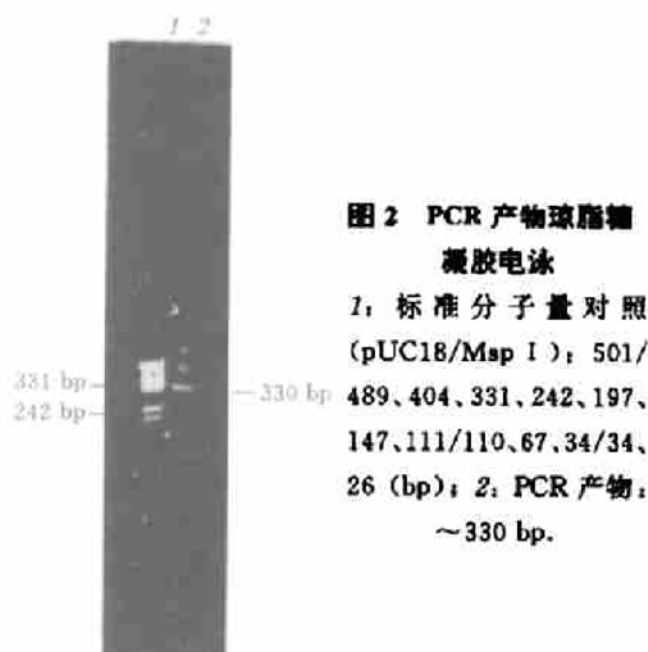


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

1: 标准分子重量对照 (pUC18/Msp I): 501/489、404、331、242、197、147、111/110、67、34/34、26 (bp); 2: PCR 产物: ~330 bp。

2.2 可变区基因克隆构建和核苷酸序列分析

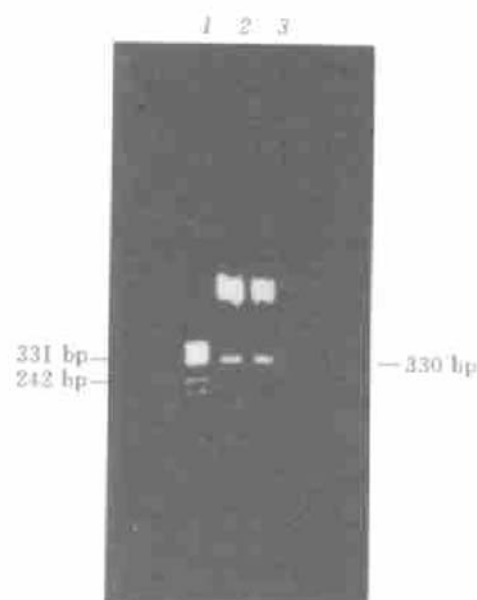


图 3 质粒 pGD 的 (BamH I + Bgl II) 酶切图谱

1: 标准分子重量对照 (pUC18/Msp I): 501/489、404、331、242、197、147、111/110、67、34/34、26 (bp); 2: 1 号克隆: 0.33 kb、2.7 kb; 3: 2 号克隆: 0.33 kb、2.7 kb。

RT-PCR 扩增的基因片段与 pUC18 载体重组,阳性克隆的质粒经 BamH I 和 Bgl II 双酶消化,琼脂糖凝胶电泳中显示约 330 bp 的重组片段(图 3)。呈现上述特性条带的质粒进行 DNA 序列分析,图 4 显示 pGD-1 和 pGD-2 克隆的核苷酸序列分析结果。从已测定的克隆发

现,它们的序列完全相同,都含有轻链可变区基因的特征性结构和我们设计的识别序列(图 5),该基因长度为 330 bp,编码 109 个氨基酸,其中 27~36 位氨基酸为 CDR1,52~58 位氨基酸为 CDR2, 91~99 位氨基酸为 CDR3。

pGD-1 pGD-2

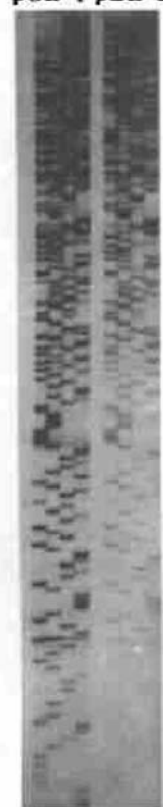


图 4 pGD-1 和 pGD-2 克隆的核苷酸序列分析结果

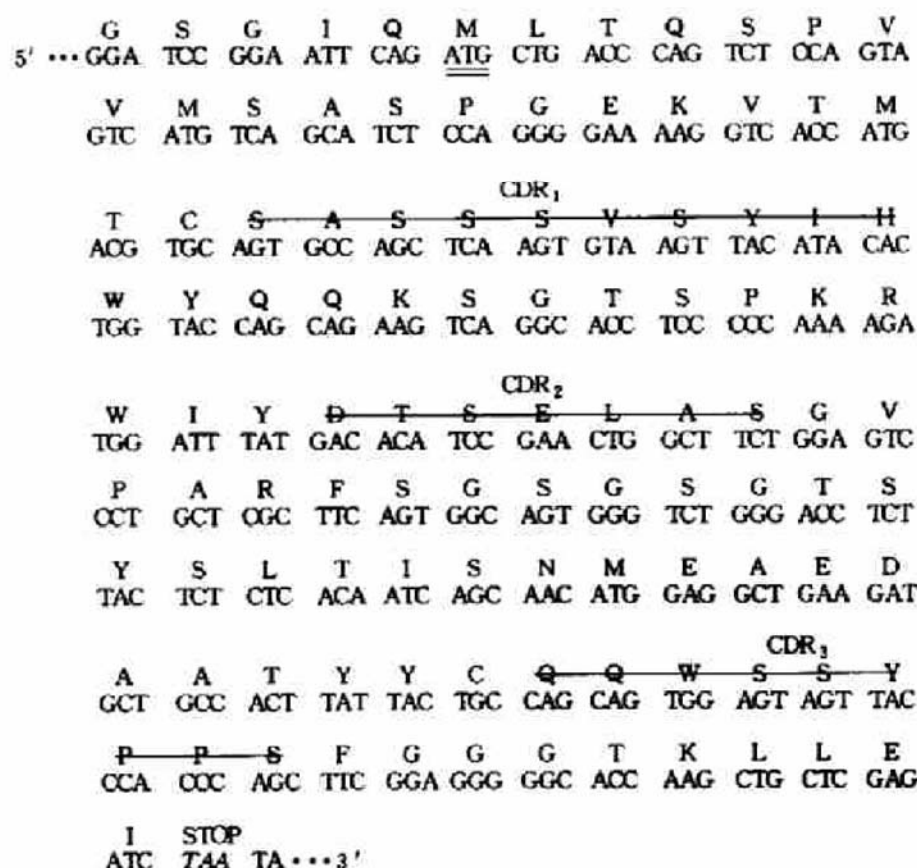


图 5 DW₁₀杂交瘤细胞株轻链可变区基因的核苷酸序列和氨基酸序列

3 讨 论

上述结果表明,位于免疫球蛋白轻链可变区基因 FR1 区和 FR4 区的一对通用引物 V_LRF1 和 J_LFR4,以 mRNA 为模板,通过 RT-PCR 合成 D-dimer 单抗可变区基因是可行的,它具有如下优点:a.以 mRNA 为模板并以 J_LFR4 为逆转录引物合成杂交链,消除了无关 RNA 的干扰,扩增基因效率高,特异性强。b.条件稳定,重复性好。

通用引物经 RT-PCR 扩增基因虽有微量杂带,但主带十分清楚,这可能与 D-dimer 杂交瘤细胞株 DW₁₀高效表达 IgG 有关。V_L核苷

酸序列分析中已清楚呈现 CDR1、CDR2 和 CDR3 结构,显示了免疫球蛋白可变区基因的特征^[5]。

DW₁₀杂交瘤 IgG 轻链可变区基因 V_L和人 IgG 轻链恒区基因 C_L重组于含 P_LP_R 启动子等调控元件的表达载体,并实现了鼠 V_L和人 C_L嵌合轻链基因在大肠杆菌中的表达,表达菌经温度诱导后,菌体裂解液用 SDS-PAGE 分析,可见嵌合轻链基因表达产物的分子量为 26 000,符合嵌合轻链基因表达产物的分子量的理论值。

嵌合轻链基因表达产物经初步纯化和复性后,能与抗 D-双聚体结合,用 SDS-PAGE 分

析, 可见表达产物与 D-双聚体复合物的条带, 分子量为 126 000, 我们将另文报道表达产物的分离、纯化复性及其与 D-双聚体结合的性能。

参 考 文 献

- 1 Collen D, Gold H K. In: Kubler W eds. Thrombosis in cardiovascular disease. New York: Marcel Dekker, 1989: 45~67
- 2 Collen D, Dewerchin M, Rapold H J *et al.* Circulation, 1990; **82**: 1744
- 3 Doolittle R F. Ann Rev Biochem, 1984; **53**: 195
- 4 丁 皓, 吴晓俐, 朱运松等. 上海医科大学学报, 1992; **19** (增刊): 38
- 5 Winter G, Orlandi R, Jones P T *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **86**: 3833
- 6 David T. Protocols and applications guide, 2nd. Wisconsin: Promega Corp, 1991: 127~130, 154
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1.25~1.38
- 8 宋后燕, 朱运松. 医用分子遗传学. 上海: 上海医科大学出版社. 1990: 213~214

Molecular Cloning of Kappa Variable Domain Against Human D-Dimer. Guan Xiaoqun,

Zhang Yanling, Li Yong, Ding Hao, Zhu Yunsong, Song Houyan (*School of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China*).

Abstract Using the mRNA prepared from hybridoma DW₁₀ secreted monoclonal antibody against human D-dimer as a template, the cDNA fragment encoding the V_K domain was amplified by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) with a set of universe primers that were on the FR1 region and FR4 region of V_K domain respectively. The RT-PCR product was ligated with pUC18. The result obtained from the restriction enzyme fragments and DNA sequencing showed that the length of the V_K was 330 bp, and the distinctive structures of the immunoglobulin CDR1, CDR2 and CDR3 of V_K gene appeared.

Key words anti-D-dimer McAb, RT-PCR, V_K gene clone

第四次全国钙与细胞功能专题学术会议征文通知

第四次全国钙与细胞功能专题学术会议将于 1996 年 10 月前后在江苏省南京市举行, 由解放军南京军区南京总医院全军医学检验中心承办。会议征稿范围为: 钙、钙调节蛋白与钙离子有关的细胞信号系统及细胞功能等方面的研究论文, 除特约稿件外, 均写成 1000 字左右摘要。来稿务必请用 B5 复印纸电脑打字成一页, 激光或深色色带打印, 老五号字体 (标题用三号字), 文题下为作者 (单位、邮政编码) 署名。打印时上边留 2.5 cm, 下边留 2.0 cm,

左边 (装订) 留 2.5 cm, 右边留 2.0 cm, 以利排版胶印。每篇文稿附稿件处理费 10 元。截稿日期: 1996 年 7 月 31 日, 收件人: 王咏梅, 地址: 南京市中山东路 305 号南京军区南京总医院全军医学检验中心, 邮政编码: 210002。会议将对研究生的会务和住宿费用予以优惠, 详细情况可来信联系。

[第四次全国钙与细胞功能专题学术会议筹委会,
南京军区南京总医院全军医学检验中心]