

植物细胞的程序化死亡

张莹 丁明孝

(北京大学生命科学学院细胞生物学与遗传学系 100871)

细胞程序化死亡(programmed cell death, PCD)是多细胞生物体中一些细胞所采取的一种由自身基因调控的主动的死亡方式。与细胞增殖一样,作为细胞生命活动的一个重要组成部分,PCD的研究越来越受到生物学家的重视。

1972年, Kerr、Wyllie 和 Currie 将他们观察到的一种与细胞坏死(Necrosis)形态特征截然不同的细胞死亡的现象,称之为细胞凋亡(Apoptosis)。其主要特征为:细胞核、细胞质凝缩(condensation),染色质边缘化(margination),DNA降解(fragmentation),凋亡小体(apoptotic body)的形成,并且在动物体内不引起炎症反应。

一般认为,PCD与Apoptosis是同义词,但有的科学家认为,严格地讲两者之间是有区别的,Apoptosis是形态学的概念,而PCD则是功能上的概念,并不是所有程序化死亡的细胞都表现为细胞凋亡^[1]。

已有的实验证据表明,细胞程序化死亡与细胞分裂周期这一对立统一的生命活动,在动物的有机体的发育过程,维持体内器官、组织、细胞数目的相对平衡以及内环境的稳定过程中起着决定性的作用。此外,细胞凋亡也常常作为机体对不良环境的自我性保护反应,并与很多病理过程有关。

那么,在植物细胞中是否存在程序化死亡现象,其特征与机制又与动物细胞是否相同呢?1994年, J. Greenberg 等在《Cell》杂志上发表了一篇题为“Programmed Cell Death in Plant”的文章,提出了在植物细胞中也同样存在PCD现象,并且发现它与动物细胞存在很多相似之处。本文拟从植物细胞PCD的基本特征,发生机制及其可能的生物学意义等方面

做一些扼要介绍。

一、植物细胞程序化死亡的基本特征

植物细胞PCD主要发生在正常的细胞分化过程(differentiation process)中^[2];在受到某些不致病的病原体(avirulent pathogen)侵染而发生的过敏反应(Hypersensitive Reaction, HR)中,也会导致一些细胞迅速死亡。死亡的细胞在感染区域及其周围形成病斑(lesion),从而防止病原体的扩散并产生某种信号激活宿主抗病机制(host defense mechanism),进而诱导产生长期的整个植株的对广谱病原体的抗性(systemic resistance to a broad spectrum of pathogens)。这种整个植株的抗性被称为获得性系统抗性(systemic acquired resistance, SAR)^[3]。此外,某些突变株(mutant):如玉米(maize)、大麦(barley)、番茄(tomato)和拟南芥(Arabidopsis)的突变株可在没有病原体侵染的条件下自发形成病斑^[4]。

1. PCD的形态学特征

染色质凝集与细胞核解体是动物细胞PCD的主要形态特征。

1986年, Eleftheriou 以小麦根尖为材料,研究原生韧皮部筛管细胞的分化过程中,首次报道了细胞核的解体过程^[5];随着筛管细胞的伸长,细胞核纵向拉伸,染色质在核的边缘聚集,并形成高电子密度的团块,在染色质聚集部位的外层核膜膨大,核间隙明显增大,最后细胞核形成叶状突起,连同包在其中的染色质团块,与细胞核主体分离。在此阶段,核外膜上的核糖体先行消失,说明核糖体的消失早于核

膜膨大。这一过程与动物细胞凋亡小体形成早期的过程颇为类似。

R. Mittler 等在研究豌豆根尖发育时,进一步观察到在原生木质部导管细胞分化过程中的 PCD 现象^[6]: 随着原形成层的分生组织产生的细胞的伸长, 次生细胞壁形成的同时, 细胞骨架发生重排(reorganization), 高尔基体增生(proliferation), 然后细胞开始自溶, 首先是细胞质出现球状小体, 然后被运送到液泡中降解。这一过程与动物细胞凋亡小体的形成过程更为相似, 唯一不同的是动物细胞的凋亡小体通过质膜出芽, 最终被邻近细胞所吞噬, 而不是进入液泡中降解。

在导管细胞的分化过程中, 细胞核的结构和 DNA 含量均发生明显变化, 首先细胞核体积膨大, DNA 含量增加, 当次生壁形成以后, 细胞核体积开始缩小, 形成叶状突起, 染色体凝集, 最后, 核仁消失, 所余核质不易被着色, 细胞核仍是细胞中最迟消失的细胞器之一。

然而, Ron Mittler 和 Eric Lam 在研究由过敏反应诱导的细胞死亡时, 却没有观察到细胞染色体的凝缩与细胞核解体, 但是在细胞核某些区域核物质明显降解。

最近, 在关于植物正常发育过程中 PCD 的研究中又出现了一个新的系统, 这就是在性别决定过程中生殖器官的败育。在大多数形成单性花的植物中, 最初原始的雄蕊群和雌蕊群都是存在的, 但由于其中的一个在成熟之前发生了发育停滞和退化, 最终形成了单性花。在发育过程中, 某个生殖器官发生退化的时期在不同的物种中不尽相同: 例如, 原始雄蕊在玉米中很早就脱落了, 在女娄菜属(*Silene*)中则在发育中期, 而在芦笋(*Asparagus*)雌花中要到绒毡层形成的晚期。这说明在败育器官的发育过程中存在几种不同的阻遏发育的形式。玉米花朵中发生败育的细胞首先发生空泡化, 然后细胞质消失。细胞死亡的区域与其他将来发育成生殖器官的活细胞可以明显区分开, 并且

在界面处没有新的细胞分裂, 说明死亡的细胞是由于发生了 PCD, 而不是由于与正在发育的器官产生隔离造成的^[7]。

2. DNA 的降解

核内 DNA 降解是动物细胞 PCD 的典型特征。

1995 年, Mittler 和 Lam 利用 DNA 断裂原位杂交的方法, 证明了在导管细胞核解体之前, 核内 DNA 发生断裂(fragmentation)^[8], 表明可能有类似动物细胞凋亡时核酸内切酶活化的相似机制导致植物细胞核内 DNA 的降解。1996 年, H. Wang 等用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记方法(TUNEL), 证明在洋葱(onion)根冠的最外 1—3 层细胞中存在 DNA 的降解现象^[8]。另外, 在维管组织的分化过程, 及转基因引发的或者病毒诱导的植物细胞死亡中, 也发现了核内 DNA 的降解现象^[4]。

在动物细胞凋亡过程中, DNA 往往断裂成约 180 bp 及其整倍数大小的片段, 经琼脂糖凝胶电泳呈现 DNA 梯。1995 年, R. Mittler 等在以烟草为材料进行研究时发现, 当 TMV 感染引起的过敏反应时, 虽然可检测到 DNA 的降解但从未观察到 DNA 梯^[1]。当用微球菌核酸酶处理烟草细胞的核染色质时, 出现了典型的 DNA 梯, 说明在过敏反应引起的细胞死亡过程中所发生的 DNA 降解方式或程度可能与典型的动物细胞凋亡不同。在动物细胞的 PCD 中也存在不形成梯的 DNA 降解途径^[1]。然而, 1996 年, H. Wang 等在以番茄为材料研究过程中发现, 在经 AAL 毒素(一种由 *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* 分泌的二氢鞘氨醇类似物的真菌毒素, 是番茄 *Alternaria* 茎黑腐病的基本化学决定因素)处理的番茄原生质体以及小叶中, 不仅检测到了 TUNEL 阳性的细胞, 而且在琼脂糖电泳上呈现 DNA 梯, 并且可被 Ca^{2+} 增强、 Zn^{2+} 减弱^[8]。1996 年, D. Ryerson 和 M. Heath 在以豇豆(cowpea)为材料研究时发现, 从被锈菌感染的抗性植株叶片

提取的DNA经琼脂糖电泳显示出DNA梯,而被锈菌感染的易感植株叶片则没有DNA梯的出现。而且,用氰化钾(KCN)处理后,DNA电泳检测到了DNA梯的出现,而用其他化合物,如CuSO₄、H₂O₂、NaN₃等处理后,则没有DNA梯。因此,在动物及植物细胞的程序化死亡过程中核DNA降解虽属PCD细胞的特征之一,但其机制还有待进一步的研究。

3. 其它生物化学成分的变化

(1) 细胞壁的修饰 过敏反应可引起醇不溶性的自发荧光物质在细胞壁上的累积、光镜下可见栅栏薄壁细胞组织间出现自发荧光。这种自发荧光在衰老的细胞或用干冰处理的发生坏死的细胞中均不存在^[3,4]。

(2) camalexin 的积累 camalexin 是一种植物抗菌化合物,在与抵御疾病有关的PCD的细胞中camalexin含量增高,而在正常或衰老组织中则较低^[3]。

(3) 与植物防御机制有关的基因转录产物包括PAL 1, LOX 1, GST 1等,通常在过敏反应过程中高水平表达^[3]。

(4) 活化抗病体系

a. 合成与发病相关的蛋白质(pathogenesis-related proteins, PR proteins),包括PR 1, BGL 2(PR 2), PR 5等^[3]。

b. 水杨酸(salicylic acid, SA)的积累: SA是获得性系统抗性(SAR)的信号物质之一^[3],并且是SAR所必须的^[9]。研究表明,高浓度的SA可抑制过氧化氢酶的活性,从而加强该部位的氧化作用^[9]。

c. 产生对各种病原体的广谱抗性(resistance to a variety of pathogens)^[3]。

(5) 氧化作用骤增(oxidative burst)

在感染部位发生过敏反应的同时,会出现一个瞬时的活性氧的大量合成,因此推测氧化作用骤增可能是诱发过敏反应的信号^[3]。而且,在氧化作用骤增的初期,发现有过氧化氢迅速生成,于是推测氧化作用骤增产生的机制可能与哺乳动物NADPH氧化酶系统相似^[9]。

(6) AGP在细胞表面的聚集 1995年, T, Shindler, R. Bergfeld 和 P. Schopfer 在研究玉米胚芽鞘发育过程中,发现在发生程序化死亡的细胞的质膜及细胞壁最内层有阿拉伯半乳糖蛋白(Arabinogalactan Protein, AGP)的积聚,并推测AGP可能参与削弱细胞基质间的相互作用,从而使细胞发生PCD^[10]。

(7) 离子泄漏 在过敏反应过程中死亡的细胞都伴随有离子泄漏的升高,这一点在凋亡的动物细胞中没有发现^[11]。

(8) PCD可被高温抑制 在含有N基因的烟草栽培品种中, TMV感染后,病斑的形成及宿主防御反应的活化都可被高温抑制,因此抗病毒的品系在30℃下可被TMV感染,降到22℃后出现病斑^[4]。这种PCD过程可被高温抑制的现象在动物细胞中也有报道。

在研究植物细胞的PCD过程中,一些作者将过敏反应时细胞的特异变化与PCD联系起来,并从中总结出以上的一些生化特征。然而,也有一些学者持不同的观点,例如,用KCN处理刀豆细胞后可检测到DNA梯的出现,而用CuSO₄和H₂O₂这样能够在细胞内产生大量活性氧的化合物处理后,反而不形成DNA梯^[11]。并且,在一些动物细胞凋亡初期所发生的突发的氧化过程已经被实验证明不是apoptosis所必需的。同时,对于过敏反应是否属于PCD的一种形式的问题也还有待于进一步的研究。

二、与植物细胞程序化死亡有关的基因

植物细胞程序化死亡的研究起步较晚,但目前已发现如下一些与之有关的基因。

1. DAD 1 基因同系物(homolog of defender against apoptotic cell death gene)

DAD 1基因是小鼠基因组中对细胞生存十分重要的一个基因,它被定位于第14染色体,在水稻中也找到了相似的基因。DAD 1基

因与水稻(*O. sativa*)中的相似的基因在核酸序列上的同源性为64%，与仓鼠(*Hamster*)、线虫(*C. elegans*)和人类(*Human*)的同源性分别为94%、65%和91%^[12]。

2. *sus* 基因(*suspensor gene*, 胚柄基因)

胚柄(*suspensor*)是植物形态发生过程中最早分化的短命的结构。在大多数被子植物中,胚柄在早期发育过程中为胚提供营养和生长调控因子。在拟南芥中,正常情况下胚柄由一列6~8个细胞组成,并在鱼雷期发生程序化死亡,不出现于成熟种子中。而在*sus*基因的突变株(*sus 1*, *sus 2*, *sus 3*)中,隐性突变体干扰胚胎形态发生并形成不正常的大胚柄,在正常形态发生晚期贮存在胚中的蛋白质和脂体也同样出现在因突变形成的大胚柄中^[2]。

sus 基因被定位在1号染色体上。

3. *twn* 基因(*twin gene*, 孪生基因)

与*sus*基因相似,在拟南芥的*twn*突变株的种子中包含有两个或更多的能发芽并发育成熟植株的胚。*Vernon*和*Minke*认为,次生胚是由初生胚的胚柄发育而来,这说明胚柄细胞具有潜在的发育为胚的能力,而*twin*基因则有可能在胚细胞中编码一种抑制胚柄发育的信号物质,或者在胚柄细胞中编码一种物质能接收抑制信号并抑制胚柄细胞的再分化,随后发生PCD^[2]。

4. *Ts 2* 基因(*tasselseed 2 gene*, 雄穗结籽基因)

玉米的*tasselseed 2*突变株能够在雄穗中不正常地形成雌花。*Ts 2*基因已经通过转座子标记的方法被克隆出来,并在野生型雌蕊细胞的亚种群中表达。*Ts 2*基因编码一种与羟类固醇脱氢酶相似的蛋白质,因此有人推测*Ts 2*基因可能在酶的作用下产生一种“自杀”分子^[7]。

5. *acd 2* 基因(*accelerated cell death gene*, 促细胞死亡基因)

拟南芥的*acd 2*突变株可以在没有病原体侵染的情况下自发形成病斑,并表现出典

型的过敏反应症状,其中包括细胞壁的自发荧光,抗菌力增强,与抗病有关的基因的转录,信号分子水杨酸及抗菌化合物的积累等,因此推测*acd 2*基因可能参与过敏反应PCD的负调控^[3]。*acd 2*基因定位于第4染色体,在*ap 2*和*rps 2*基因座位附近,并接近合成*camalexin*的基因。

其具体作用方式可能是ACD2蛋白与诱导过敏反应的信号传导途径中某化合物相互作用,或者是ACD2基因产物与植物细胞的某种信号产物相互作用,从而防止其错误活化过敏反应的途径。这种可以活化过敏反应途径的信号推测是活性氧,因为它是在过敏反应过程开始时形成氧化作用骤增,而ACD2蛋白可能参与保持细胞内活性氧的适当平衡。

另外,在玉米、大麦(*barley*),及拟南芥中还发现了与*acd 2*基因功能相似的基因,分别命名为*les*、*mlo*、*lsd*,统称为R基因(*resistance gene*)^[9]。

6. *bO* 基因(*bacterio-opsin gene*)

*bO*是一种细菌视蛋白,将其转入烟草细胞后可表达光驱动的质子泵,由于它使用与高等植物光合作用不同波长的光线,从而增强这些植物的光合作用能力,但*Mittler.R*等在研究中发现,转入*bO*基因的烟草细胞表现出与过敏反应病斑十分相似的现象,包括颗粒状物质的积聚、细胞壁加厚和自发荧光物质的聚集,以及细胞结构的降解。并且在没有病原体侵染的条件下,多重抗病机制(*multiple defense mechanism*)活化,包括PR蛋白的高水平表达,SA的积累等,进而对某些病毒和细菌病原体表现出高抵抗力,并比野生型烟草具有更强的抑制TMV在感染的叶片内复制的能力。而且发现有核内DNA的降解现象。另外,有趣的是,当对质子泵通道蛋白中某个特定的氨基酸进行定点突变后,转基因烟草便失去了形成病斑及抵抗病原体侵染的能力^[4]。

三、与植物 DNA 降解有关的核酸酶

1. 核酸内切酶

核酸内切酶是核酸代谢中一种重要的酶类, 现已发现至少有两种分子量分别为 18 kDa 及 30 kDa 的核酸内切酶参与动物细胞凋亡的过程。在研究由 bO 基因产物和 TMV 诱导的细胞死亡中, 也发现有几种植物核酸内切酶的活化^[4]。R. Szmidzinski、G. Wilczynski 和 J. Szopa 在南瓜 (*Cucurbita pepo*) 种子中分离到一种分子量为 22 kDa 的核酸内切酶, 这种酶对变性 DNA 的水解特异活性比对天然 DNA 高 1.5 倍, 对 RNA 则没有活性。它将 DNA 降解为 3'-p-核苷酸, 并优先降解 A-T 键, 该酶可被二价离子活化, 例如 Mg^{2+} (3.0 mmol/L), Ca^{2+} (5.0 mmol/L) Mn^{2+} (0.5 mmol/L), 并可被 EDTA (50 mmol/L) 抑制而完全失活, 现已克隆该酶的 cDNA (900 b.p.) r 4, 并发现 r 4 与生物素结合蛋白具有高度同源性。杂交结果表明该酶的基因约为 1.4 kb^[13]。

2. NUCI, NUCII, NUCIII

1995 年, Ron Mittler 和 Eric Lam 在研究转入 bO 基因的烟草及 TMV 诱导的带有 N 基因的烟草的过敏反应中, 分离到三种与过敏反应有关的 DNA 酶: NUCI, [100.5 kD; NUCII, 38 kD; 和 NUCIII, 36 kD^[1]。这三种酶在植物细胞程序死亡启动 24—72 小时后被活化, 核内 DNA 的降解恰好也发生在这段时间, 而在启动后的 6 和 12 小时, 没有发现 DNA 酶的活化和 DNA 的降解现象。这些结果表明植物细胞由病原体诱导的细胞程序死亡伴随有 DNA 酶的活化, 这些 DNA 酶的活化与核 DNA 的降解有关。然而, 核酸酶的活化并非导致细胞死亡的直接原因, 而仅是过敏反应诱导的细胞程序死亡过程的一个相关事件。在衰老、坏死以及 TMV 感染的含有 N 基因的正常烟草细胞中并没有发现上述几种与过敏反

应有关的 DNA 酶的活化。

当用水杨酸处理烟草细胞后, 发现确实出现了 PR-1a 蛋白的积累, 但却没有引起过敏反应及核酸酶的活化。这说明核酸酶的活化与细胞程序化死亡密切相关, 但与外部 SA 的作用及 PR-1a 蛋白的产生相对独立。

NUCI、NUC II 和 NUC III 均可以降解单链或双链 DNA, 并都可以被 EGTA 或 EDTA 抑制, 如加入 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 时, NUC I 的活性可恢复, 但 NUC III 的活性只有在加入 Ca^{2+} 时才能被恢复, 而 NUC II 的活性则不能被 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 恢复, 并且 Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} 都不能使 NUC II 和 NUC III 的活性恢复。已知在动物细胞中与 PCD 有关的核酸酶的活性可被 Zn^{2+} 抑制, 经研究发现, 以上这三种酶的活性也都被 1 mmol/L 以下的 Zn^{2+} 抑制, 但 10 μ mol/L 以下的 Zn^{2+} 则对这三种酶的活性没有影响。

迄今为止, 人们还不清楚核酸酶究竟是 PCD 过程所必须的, 还是仅仅用于降解细胞死亡后的物质, 也不清楚核酸酶活性的增高是由于已经存在的酶的活化还是合成了新的核酸酶。但有一点是清楚的, 即核酸酶的活化是细胞程序死亡过程中或细胞死亡以后降解核 DNA 所必需的。

四、过敏反应可能的调控途径及其与细胞 PCD 的关系

很多不致病的病原体侵染宿主后诱发过敏反应。在这一过程中, 对病原体的识别引发了某些细胞的死亡并在感染位点周围形成一个病斑, 从而阻止病原体感染的进一步蔓延。同时, 一些实验结果证明, 在过敏反应中, 宿主细胞的死亡是由于启动了某个特定的由植物细胞自身基因编码的细胞死亡程序。因此有些人认为这也是一种细胞程序性死亡过程。

过敏反应过程中细胞的死亡与动物细胞的细胞凋亡在很多方面其特征颇为相似, 但明显区别于细胞坏死。见下表^[4];

表 植物细胞过敏反应、动物细胞凋亡和坏死在形态学和生理学方面的比较

特 征	过敏反应	细胞凋亡	细胞坏死
细胞皱缩	+	+	-
胞质凝集	+	+	-
线粒体的高度稳定性	+	+	-
核酸酶的活化	+	+	-
核内 DNA 的降解	+	+	-
DNA 梯的形成	+	+	-
凋亡小体的形成	-	+	-
被其他细胞吞噬	-	+	-

1996年, Mittler 和 Lam 提出了过敏反应中的可能途径: 当细胞识别了病原体产生的诱导物以后, 便合成了几种不同的细胞信号分子。这些分子活化了某个信号转导途径, 最终活化了植物抗病系统并发生细胞程序化死亡。某些负的或正的调控因子参与调控该途径^[14] (见图)。

五、小 结

从近年来的研究结果可以看到, 植物细胞也存在着程序化死亡, 并与动物细胞存在着很多共同之处:

1. 形态学方面: 主要是染色质的凝集和细胞核的降解。
2. 核内 DNA 断裂。
3. PCD 过程的启动过程都需要有新的蛋白质的合成。
4. 都具有 PCD 的负调控基因。
5. 植物和动物都利用细胞程序化死亡作为对不良环境的反应。

其不同之处是, 植物细胞程序化死亡具有以下几点特征:

1. 细胞壁的修饰。
2. Camalexin 的积累。
3. 系统抗病体系的活化。
4. 离子渗漏。

另外, 在研究中还发现有一种由 *Erwinia amylovorum* hrpn 基因编码的细菌蛋白 harpin^[15], 当感染其非宿主植物时, 可以刺激产生活性氧并诱导过敏反应的发生^[8], 因此科学家认为过敏反应的产生不是由 harpin 的直接的毒性作用而导致的, 而是由于触发了植物本身的死亡程序。

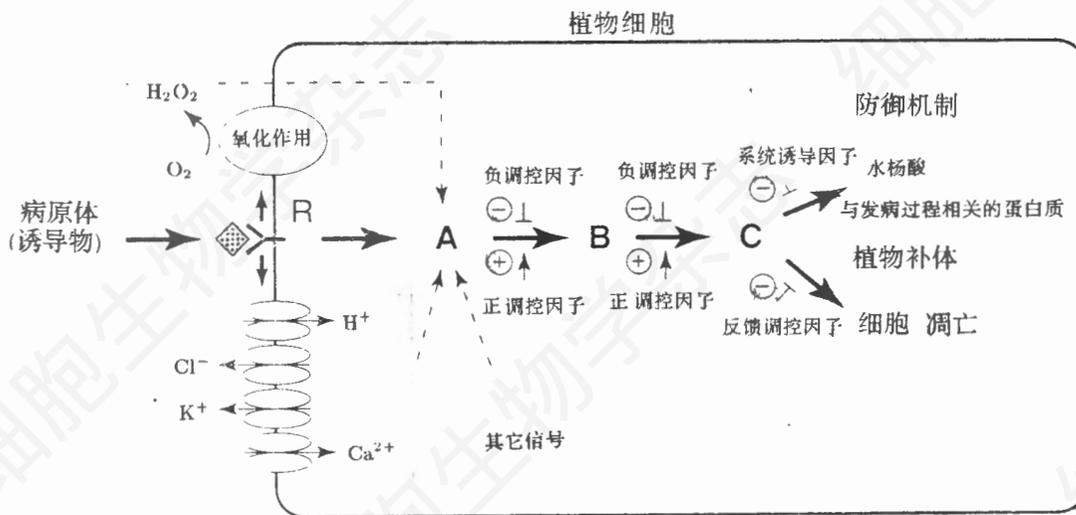


图 植物细胞与入侵病原体之间相互作用的模式图

病原体或病原体产生的诱导物(图左侧菱形块)被识别后, 产生几种不同的细胞信号(H₂O₂的生成、酸化作用和胞液中 Ca²⁺浓度的升高, 以及诱导物受体 R 对信号转导成分 A 的直接修饰)。这些信号活化了一条信号转导途径(A、B、C 分别代表假想途径中的中间步骤或成分), 最终活化了植物抗病机制并发生细胞程序化死亡。一些负的或正的调控因子可能参与调控这条途径^[14]。

根据已知的研究成果,可以认为,与动物细胞类似在植物中也存在一条由基因控制的细胞死亡途径^[1]。当这些基因在发育过程中表达,或者细胞受到外界损伤,而这种损伤不足以引起细胞坏死(necrosis),但又可能引起可遗传的变异时,便触发了细胞的程序化死亡。这种机体发育和生存的基础,维持着生存与死亡之间微妙的平衡。

参 考 文 献

- [1] Mittler, R. et al., 1995, *The Plant Cell*, 7: 1951—1962.
 [2] Schwartz, B. W. et al., 1994, *Development*, 120: 3235—3245.
 [3] Greenberg, J. T. et al., 1994, *Cell*, 77: 551—563.
 [4] Mittler, R. et al., 1995, *The Plant Cell*, 7: 29—42.
 [5] Eleftheriou, E. P., 1986, *Journal of*

Ultrastructure and molecular structure research, 95: 47—60.

- [6] Mittler, R. et al., 1995, *Plant Physiol.*, 108: 489—493.
 [7] Jones, A. M. et al., 1996, *Trends in plant science*, 1(4): 114—119.
 [8] Wang, H. et al., 1996, *The Plant Cell*, 8: 375—391.
 [9] Jones, J. D. G., 1994, *Current Biology*, 4(8): 749—751.
 [10] Schindler, T. et al., 1995, *The Plant Journal*, 7(1): 25—36.
 [11] Ryerson, D. E. et al., 1996, *The Plant Cell*, 8: 393—402.
 [12] Apte, S. S. et al., 1995, *FEBS Letters*, 363: 304—306.
 [13] Szmidszinski, R. et al., 1994, *Acta Biochimica Polonica*, 41(2): 139—140.
 [14] Mittler, R. et al., 1996, *Trends in Microbiology*, 4(1): 10—15.
 [15] Bestwick, C. S. et al., 1995, *Plant Physiol.*, 108: 503—516.

研究工作

抗前列腺特异抗原的单链抗体的克隆和表达

管虹 叶敏

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

抗体的轻重链可变区 VH 与 VL 由一个小肽连接而成的单链抗体^[1](Single Chain Antibody, Single Chain Fv, ScFv), 据分析, 与抗体 V 区具有类似的空间结构, 也能形成抗原结合部位, 并能在细菌中表达。

抗体片段在大肠杆菌中的高效表达是基因工程抗体研究的一个重要问题。前后相链的 λ PRPL 启动子具有比单独 λ (PR 或 PL) 启动子与化学诱导启动子, 如 tac, trp 或 lac 启动子相比, 具有更高地促进外源蛋白表达的能力^[2], 而且 λ 启动子还能提供有效的表达水平的控制。本文构建了含有 λ PR 和 PL 启动子的温度诱导表达载体, 以提高单链抗体基因的表达效率。

前列腺特异抗原(Prostate Specific Antigen, PSA)是一种 34 kD 的丝氨酸蛋白酶, 其量在前列腺肿瘤病人体内明显上升^[3]。本研究

拟为高效表达抗 PSA 单链抗体建立基础。

材 料 和 方 法

1. 质粒和菌株

质粒 pSW 1 Fab (D 1.3) 为可诱导表达抗溶菌酶人-鼠嵌合 Fab 的重组质粒, 带有人 CH1 和 CK 基因, 具有 lacZ 启动子。pSW 1 ScFv(D 1.3) 带有 lacZ 启动子^[4], 可诱导表达抗溶菌酶单链抗体, 由英国剑桥 MRC 的 G. Winter 教授惠赠。质粒 pHZ 01 (526 VK-HuCk) 为本实验室构建^[5], 质粒 pJLA 503^[6], 大肠杆菌细胞株 XL 1-Blue, TG 1, DH 5 α , 本实验室保存。

2. 分泌抗 PSA 单抗小鼠细胞株 526 总 RNA

本课题是在本所研究生基金、所长基金及世界实验室(World Laboratory)资助下完成。

衷心感谢英国剑桥 MRC Greg Winter 教授以及叶庆炜博士和徐永华教授的大力支持。