

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-HuCh) 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 单链小鼠细胞株 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。

由 Yes Biotech Lab, Ltd. 叶庆炜博士 和本所
徐永华教授提供。

3. PCR 引物

引物设计参照^[4,7], 稍加改动。

VHBACK: 5'-AGGTC (G) A (C) AA (G) CTGCAGC (G) AGTCA (T) GG-3'
Pst I

JHFOR: 5'-TGAGGAGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG-3'
BstEII

VKBACK: 5'-GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA-3'
Sac I

VKBACK II: 5'-GATG (A) TTGAGCTCAC (T) C (G) CAAA (G) CTC (G) CACT (C) C-3'
Sac I

JKFOR: 5'-GTTTGATCTCGAGCTTGGTGCC-3'
Xho I

Hu CKFORNot: 5'-GACTTGGCGCGCAGACTCTCCCTGTGAAGCTCTT-3'
Not I

4. cDNA 合成与扩增^[8]

以抗 PSA 杂交瘤细胞株 526 总 RNA 为模板分

别用引物 JHFOR 和 JKFOR 以引物 延伸法 (primer extension) 合成抗体轻、重链 V 区第一链 cDNA。反

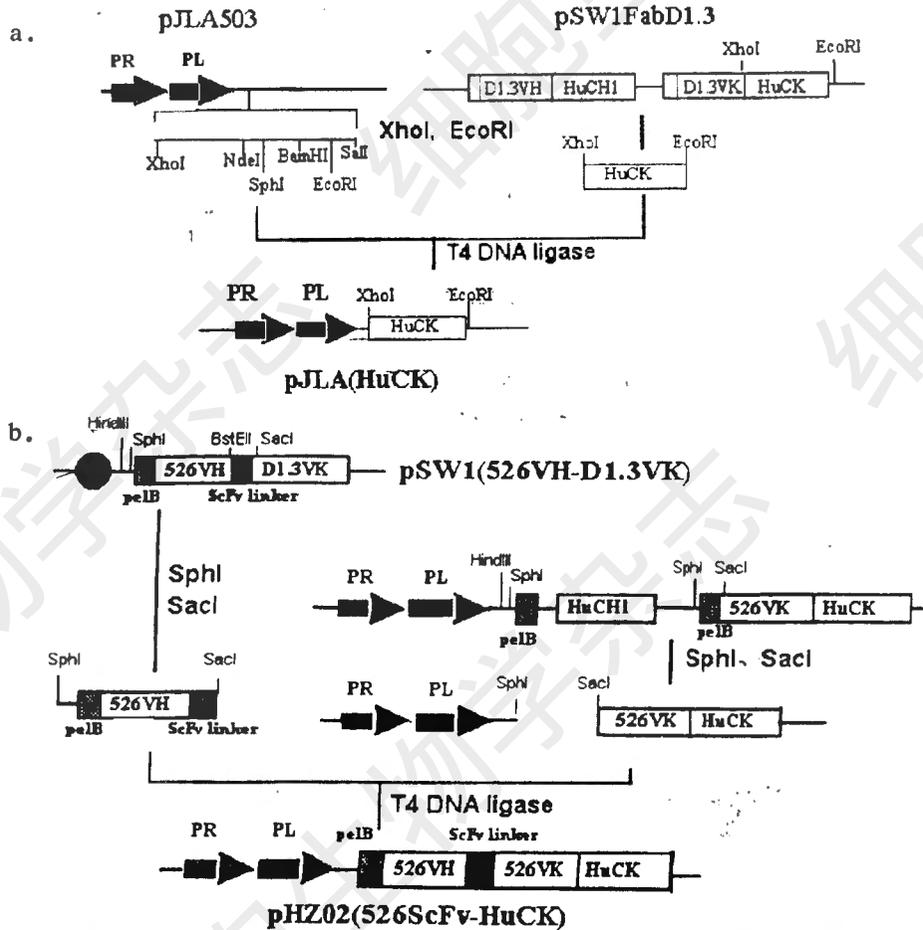


图 1 抗 PSA 单链抗体表达载体 pHZ 02 (526 ScFv-HuCK) 的构建

应体积 20 μ l, 包括 10 μ l (约 10 μ g) 细胞总 RNA, 4 μ l 5 \times RT buffer(GIBICO BRL), 2 μ l 0.1 mol/L DTT, 2 μ l 5 mmol/L dNTPs, 1 μ l(25 pmol)引物, 56 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟后冷却至室温加入 1 μ l MMLV 反转录酶 (200 U/ μ l, BRL), 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。产物经乙醇沉淀并溶于 20 μ l 水中。

分别取 3 μ l 轻、重链 cDNA, 用轻链引物 VKB-ACKII, JKFOR 和重链引物 VHBACK, JHFOR 进行 PCR 扩增, 50 μ l 反应体积含 5 μ l Taq DNA polymerase 10 \times buffer (Promega), 2 μ l 5 mmol/L dNTPs, 正反向引物各 25 pmol。94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟共 35 个循环。

5. 抗 PSA 单链抗体温度诱导表达载体 pHZ 02 (526 ScFv-HuCK) 的构建^[4]

如图 1a 所示 首先将人轻链恒定区基因 (HuCK) 插入到 pJLA 503 中, 用 XhoI 和 EcoRI 从 pSW 1 Fab D 1.3 中切下 HuCK 片段, 从限制位点 XhoI 和 EcoRI 处插入到 pJLA 503 中, 得到 pJLA(HuCK)。

然后如图 1b, 所示, 先用 526 VH PCR 扩增片段替换 pSW 1 FabD 1.3 VH 基因, 再用 HindIII 和 Sac I 从重链替换后的 pSW1 ScFv(D 1,3) 中切下包括 PelB-526 VH-ScFvlinker 的 500 bp 的片段, 将该片段从 HindIII 和 Sac I 位点插入到 pHZ 01 (526 VK-HuCK) 中, 即构建成抗 PSA 单链抗体表达载体 pHZ02 (526 ScFv-HuCK)。

6. 526 单链抗体片段在大肠杆菌中的表达^[2]

重组 pHZ 02 (526 ScFv-HuCK) 转化的阳性菌株接种于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素(Amp)的 2YT 培养基 (2YT-Amp) 中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 按 1% 的量接种到新鲜的 2YT-Amp 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 继续培养至 OD_{600nm} = 0.5, 升温至 42 $^{\circ}$ C, 热诱导 4 小时。收集菌体用 1/5 初始体积的冰冷的 ddH₂O 低渗破开菌体, 4 $^{\circ}$ C 离心。上清液即为周质(periplasm)样品。沉淀悬于 1/5 初始体积的 PBS 中, 超声波破碎细胞, 离心去掉沉淀, 上清为可溶性胞质(cytoplasm)部分。

7. SDS-PAGE 及 Western-blotting 分析

参照^[9]的方法, 取 1 ml 温度诱导培养物离心, 收集菌体, 悬于 100 μ l 水中, 再加入 100 μ l 的 SDS 样品缓冲液, 取 10 μ l 上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 胶浓度为 12%, 用考马斯亮蓝染色。

Western-blotting:

SDS-PAGE 电泳后, 蛋白转移到硝酸纤维膜上, 用 HRP 偶联的羊抗人-IgG(Fab 特异)抗体(SIGMA)

进行酶标显色, DAB+H₂O₂。

8. ELISA 分析

分别用鸡丙种球蛋白(F γ G, 本实验室制备)、卵白蛋白(OVA, 东风试剂厂), 溶菌酶(HEL, SIGMA)、破伤风类毒素(TT, 上海生物制品所)和 PSA (叶庆炜博士惠赠)作为抗原, 各 20 μ g/ml 包被酶标板, 用表达产物的周质和胞质两部分分别作为一抗, 用 HRP 偶联的羊抗人-IgG(Fab 特异)抗体作为二抗进行 ELISA 测定, 底物为 3', 3,5',5-四甲基联苯胺(TMB)H₂O₂。

结 果

1. 可变区基因的扩增

以抗 PSA 杂交瘤细胞株 526 总 RNA 为模板, 分别用引物 JHFOR 和 VHBACK, 以及 JKFOR 和 VKBACK II 经 RT-PCR 扩增, PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测见到 350 bp 左右的 VH 和 320 bp 的 VK 特异扩增条带, 用引物 JKFOR、VKBACK 进行 RT-PCR 扩增得到 200 bp 左右的扩增条带, 用 HuCKFORNot、VKBACK 扩增得到 500 bp 左右的条带, 用

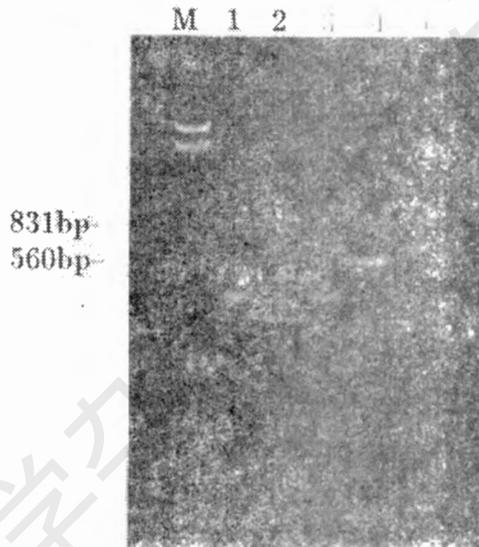


图 2 526 可变区基因的扩增

M. λ /HindIII, EcoRI。

1. 526 VH (amplified with VHBACK, JHFOR).
2. 526 VK (amplified with VKBACK, JKFOR).
3. 526 VK (amplified With VKBACK II, JKFOR).
4. 526 κ (amplified with VKBACK, HuCKFORNot).
5. 526 κ chain (amplified with VKBACKII),

HuCKFORNot、VK BACK II 扩增得到 620 bp 的片段(图 2)。

2. 单链抗体表达载体的构建

按照图 1, 所示方法构建单链抗体表达质粒 pHZ 02(526 ScFv-HuCK), 通过 PCR 与酶切分析证明其插入与拼接方向正确。

3. 抗 PSA ScFv-HuCK 的表达

从图 3 可见, pHz 02(526 ScFv-HuCK) 转化大肠杆菌的温度诱导表达产物经 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 在分子量 35KD 左右的位置显示出了明显的单链抗体表达产物条带。

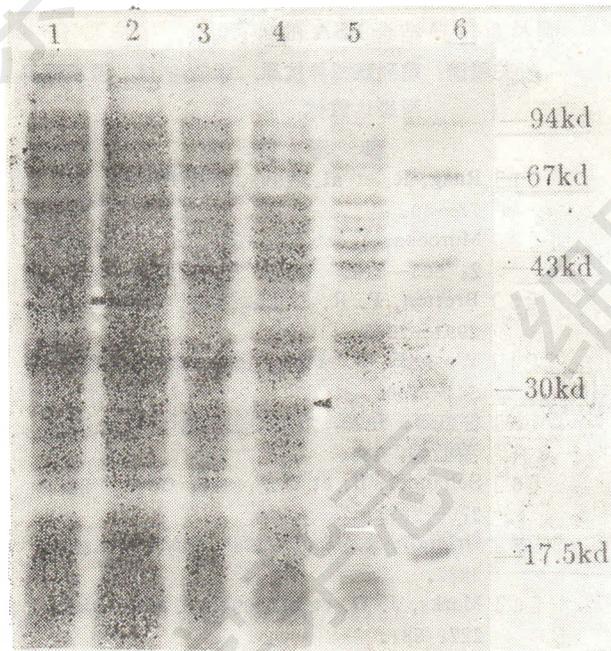


图 3 细菌表达产物 SDS-PAGE 电泳

1. pHZ 02 (526 ScFv-HuCK), 箭头所指为 ScFv-HuCK 的位置。
2. Control, pHZ 02(526 ScFv-HuCK) without induction.
3. Control, pJLA 503.
4. pHZ 01(526 Fab).
5. Control, XL 1-Blue.
6. molecular weight marker.

图 4、行 2. 显示 pHZ 02(526 ScFv-HuCK) 温度诱导表达产物经 western-blotting 分析在 35 Kd 处有明显能被抗人 IgG (Fab 特异) 抗体识别的产物 ScFv-HuCK 条带, 而对照 pJLA 503 的温度诱导培养产物则没有这个条带, 表

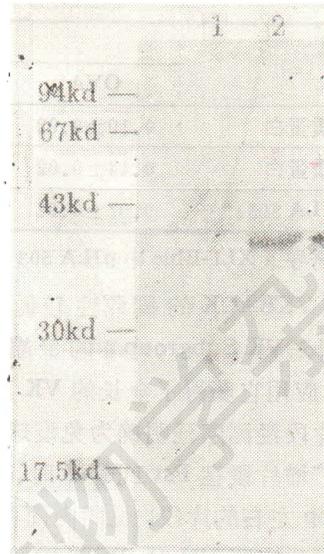


图 4 526 单链抗体细菌表达产物 western-blotting 分析

1. Control, pJLA 503 with temperature induction.
2. pHZ 02(526 ScFv-HuCK).

明有单链抗体表达产生。

4. 细菌表达 526 单链抗体片段的抗原结合活性检测

表 1 (见下页) 显示在周质和胞质内的 526 ScFv-HuCK 片段能与 PSA 特异结合, 而与 F γ G、OVA 和溶菌酶则反应很弱。说明在细菌中表达得到的单链抗体具有特异的抗原结合能力。

讨 论

在扩增抗 PSA 抗体轻链 V 区基因时, 首先采用我们通常所用的 VKBACK 引物得到了大小在 200 bp 左右的特异扩增片段, 而非预期的 320 bp 左右的片段。后来用 CK 引物和 VKFOR 从恒定区扩增也得到了比通常长度小 100 bp 左右的扩增片段, 将这个 200 bp 的片段克隆测序, 与 Kabat 的抗体基因数据库进行比较, 发现它为属于抗体轻链 Subgroup II 的 VK 片段的一部分, 在这个亚类中在 108 bp—134 bp 之间的序列与我们通常所采用的 VKBACK 引物有 70% 以上的同源性, 而 Subgroup II

表1 526单链抗体与抗原的结合反应

| | O ₂ D 450 (X±SD) | | | |
|---------------|-----------------------------|------------------|-----------|-----------|
| | OVA | F _γ G | HEL | PSA |
| 周质蛋白 | 0.10±0.02 | 0.16±0.02 | 0.11±0.02 | 0.49±0.05 |
| 胞质蛋白 | 0.14±0.02 | 0.21±0.05 | 0.17±0.04 | 0.57±0.04 |
| 对照(pJLA 503)* | 0.07±0.01 | 0.10±0.02 | 0.08±0.02 | 0.08±0.02 |

* 温度诱导下 XLI-Blue 中 pJLA 503 表达的周质蛋白和胞质蛋白。

的 5' 端与 VKBACK 的同源性较低, 因此我们设计了针对 VK Subgroup II 的 5' 端引物 VK-BACK II, 应用它获得了全长的 VK 片段。轻、重链扩增片段经测序证明确为免疫球蛋白。

重链扩增片段在 Pst I 酶解时, 切成 100 bp 和 200 bp 左右的片段, 说明内部存在 Pst I 位点, 因而在克隆 VH 时 Pst I 酶切采用部分酶解, 以回收 300 bp 左右的条带。

为了便于用抗 Ig 抗体进行检测, 在研制单链抗体时, 我们将人轻链 C 区与抗 PSA 单链抗体融合表达, 在实际应用中可从 Xho I 于 Not I 位点将其切掉, 再经 T4 DNA 聚合酶补平自连就可表达真正的 ScFv。而从理论上讲, 加一段轻链恒定区片段并不影响它与抗原的结合。

我们在细菌中表达了抗原特异的抗 PSA 单链抗体, 为从细菌中高效表达有功能的抗体片段建立了一定的基础。

摘 要

本文克隆了抗前列腺特异抗原(PSA)单抗

526 的轻、重链可变区基因, 构建了在大肠杆菌中表达单链抗体的具有强启动子 PR 和 PL 的温度诱导型表达载体, 表达了抗前列腺特异抗原的单链抗体。表达产物经 ELISA 测定证明具有特异结合 PSA 的能力。

关键词: 前列腺特异抗原 单链抗体 温度诱导型表达载体

参 考 文 献

- [1] Raag, R. et al., 1995, *FASEB J.*, 9: 73-80.
- [2] Murooka, Y. et al., 1985, *J. Biotech.*, 2: 303-316.
- [3] Bretton, P. R. et al., 1994, *Cancer*, 74: 2991-2995
- [4] Ward, E. S. et al., 1989-*Nature*, 341: 544-546.
- [5] 曾虹等, 1995, 中国细胞生物学会 论文摘要汇编, 131.
- [6] Schauder, B. et al., 1987, *Gene*, 52: 279-283.
- [7] Orlandi, R. et al., 1989, *PNAS*, 86: 3833-3837.
- [8] Marks, J. D. et al. 1991, *J. Mol. Biol.*, 222: 581.
- [9] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning* Cold Spring Harbor Lab Press.

CLONING AND EXPRESSION OF ANTI-PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN (PSA) SINGLE CHAIN FV

ZAN Hong YE H Ming

(Shanghai Institute of Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT

We cloned the heavy chain and light chain variable region genes of anti-PSA antibody from mouse hybridoma 526, and constructed the temperature-inducible expression vector pHZ02, which contains two strong promoter PR and PL, for the expression of single chain Fv in *E. coli*. The single chain Fv was expressed. ELISA indicated that the expressed single chain Fv has specific binding activity to PSA

Key words: Prostate specific antigen (PSA) Single chain Fv Temperature inducible expression vector