

- based study [J]. *Infect Dis*, 2002 186(11) 1565-1574.
- [5] Cuzick J, Terry G, Ho L, et al. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1* and DQB1* alleles and cervical cancer in British women [J]. *Br J Cancer*, 2000 82(7) 1348-1352.
- [6] Wang SS, Wheeler CM, Hildesheim A, et al. Human leukocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical neoplasia: Results from a population-based study in Costa Rica [J]. *Infect Dis*, 2001; 184(10) 1310-1314.
- [7] Krul ET, Schipper RF, Schreuder GT, et al. HLA and susceptibility to cervical neoplasia [J]. *Hum Immunol*, 2000 60(3) 337-342.
- [8] Beskow AH, Josefsson AM, Gyllensten UB. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer *in situ* [J]. *Int*

J Cancer, 2001 93(6) 817-822.

- [9] de Araujo Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil [J]. *Mutat Res*, 2003 544(2-3) 375-383.
- [10] Odunsi K, Ganesan T. Motif analysis of HLA class II molecules that determine the HPV associated risk of cervical carcinogenesis [J]. *Int J Mol Med* 2001; 8(4) 405-412.
- [11] Beskow AH, Josefsson AM, Gyllensten UB. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer *in situ* [J]. *Int J Cancer*, 2001 93(6) 817-822.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)24-2266-01

人源抗 HBs 基因工程抗体在 *E. coli* 中的高效表达与折叠

刘雪林^{1,2}, 唐晓敏¹, 宋宏彬¹, 李申龙¹, 徐德忠²

(¹军事医学科学院疾病预防控制中心, 北京 100039; ²第四军医大学预防医学系流行病学教研室)

【关键词】HbsAg Fab 段 表达 复性
【中图分类号】Q784 【文献标识码】B

1 材料和方法

1.1 表达质粒的构建 从含有人源性抗 HBsAg 抗体 Fab 段基因的噬菌体^[1]中扩增出重链 Fd 片段, 上游引物 5'cggaattcatatggt(G)aaactgctg(C)gaa(G)cagctctg'cggaattcattaa(T)g(C)ag(A)gtc(T)ttgtcacag(A)gac(T)ttt(G)gg t(C)t(C)caacttc3', 从上述噬菌体中扩增出轻链基因, 上游引物 5'cggaattcatatgga(G)ctg(C)gtt(G)atgac(C)cagctctcagacacc3'和下游引物 5'cggaattcattaacat(C)tca(T)cc t(C)ct gttgaa gctcttc3'。为便于亚克隆和满足表达的要求, 在上游引物的 5'端引入 NdeI 酶切位点(下划线处, 并含起始密码子 ATG), 下游引物引入 2 个终止密码子(TAA TGA)和 EcoRI 酶切位点。将 PCR 产物分别克隆于 pGEM-T 载体(Promega 公司), 再以 NdeI 和 EcoRI 酶切, 与相应酶切的表达载体 pET-20b(Novagen 公司)连接, 构建成表达质粒 pETFd 和 pETL。上述质粒均经酶切鉴定, 并经序列分析证明构建正确。

1.2 Fd 片段链和 L 链表达 将表达质粒 pETFd 和 pETL 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)挑单菌落接种于 2 mL LB 培养液(羧苄青霉素 100 mg/L)37°C 振荡过夜。第 2 日分别取 30(L 菌液)转种于 2 mL LB 培养液(羧苄青霉素 100 mg/L)中 37°C 振荡培养 3~4 h 至 A_{600nm} 为 0.6~1.0, 加 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L 继续培养 3 h 以诱导外源程序蛋白的表达。诱导后的菌液 6000 r/min 离心 10 min, 上清加等量 2×上样缓冲液, 沉淀(菌体)加适量 1×上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 6000 g 离心 1 min。取上清 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 脱色后观察结果。SDS-PAGE 凝胶在双薄层扫描仪(Shimadzu, CS-930)检测蛋白表达含量。

1.3 包涵体蛋白的分离和复性 取 50 mL 诱导表达的菌液 6000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 5 mL 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 2 mmol/L EDTA 悬浮, 加溶菌酶至 100 mg/L 及

0.5 mL 10 mL/L Triton X-100 30°C 水浴 15 min。置冰上, 超声液粉碎细胞 4°C 6000 g 离心 15 min。上清为可溶性蛋白, 取 50 μL 加等量 2×上样缓冲液, 沉淀为不可溶蛋白, 加 100 μL 1×上样缓冲液, SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 脱色后观察结果。包涵体蛋白复性参照文献[2]报道的方法进行。

1.4 免疫印迹 取 25 μL 初步纯化浓缩的蛋白溶液与等量的 2×上样液混合(加 β-巯基乙醇), SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜(NCM)30 g/L 脱脂奶封闭, 加兔抗人 Fab 段抗体, 再与碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 抗体反应, BCIP-NBT 显色。

1.5 活性检测 取 25 μL 初步纯化浓缩的蛋白溶液及其稀释液与等量的碳酸盐缓冲液混合, 包被 ELISA 板孔(每样品包被 4 孔)4°C 过夜, 30 g/LBSA 封闭, 加入适当工作浓度的 HRP-HBsAg, 以底物邻苯二胺显色, 测 A_{490nm} 值, 并计算 4 个孔的平均值。

2 结果

2.1 Fd 段和 L 链蛋白的表达 SDS-PAGE 检测可见, Fd 段和 L 链表达质粒转达化 BL21(DE3)后, 均能够表达外源蛋白, 其表观分子量约 25 ku(Fd)和 27 ku(L), 并且都是以包涵体形式表达, 密度扫描检测 Fd 段和 L 链蛋白的表达量分别约为 48% 和 53%。免疫印迹实验显示, 两种蛋白均可与抗人 Fab 段抗体反应, 证明为人源抗体。

2.2 Fab 蛋白复性 Fd 段和 L 链包涵体经 GuHCl 溶解后, 等量混合加入复性缓冲液中于 10°C 折叠 36 h。SDS-PAGE 检测可见 Fd 段和 L 链蛋白在 50 ku 处折叠形成一个新的蛋白, 该蛋白带经 β-巯基乙醇处理则重新消失。薄层扫描显示 50 ku 的复性蛋白占总蛋白的 28%。

2.3 复性蛋白具有结合 HBsAg 的活性 复性的蛋白溶液与酶标 HBsAg 反应后 A_{490nm} 平均为 0.712, 说明表达蛋白复性后对 HBsAg 有一定抗原结合活性。

3 讨论 我们将抗 HBs 抗体的轻链和 Fd 段基因分别置于 pET-20 b 质粒中, 转化大肠杆菌后, 获得了高效表达, 表达产量分别为 48% 和 53%。Fd 段和 L 链蛋白在折叠液中复性, 形成的复性蛋白对 HBsAg 有一定结合活性, 说明基因工程抗体大肠杆菌包涵体表达的技术路线是可行的。但是复性效率比较低, 需要进一步研究改进复性条件, 提高复性比例。

【参考文献】

- [1] 邓宁, 粟宽源, 王恂章, 等. 人源性抗 HBsAg 抗体 Fab 段在酵母中的表达 [J]. 生物工程学报 2002 18(5) 546-550.
- [2] Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, et al. Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody fab fragment against hepatitis B surface antigen [J]. *J Med Virol*, 1999 58(4) 338-345.

编辑 王睿

收稿日期 2004-11-05; 修回日期 2004-12-01

作者简介: 刘雪林(1963-), 男(汉族), 河南省辉县人, 副主任医师, Tel. (010) 66933342 Email. lxuelin@sohu.com