

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)07-0643-04

鼠源性抗 HBV-TP 可变区抗体基因的克隆及原核表达

高萍¹, 万晓蓉², 林芳³, 张惠中³(第四军医大学唐都医院:¹ 妇产科,² 中心实验室, 陕西 西安 710038, ³ 解放军 94370 部队卫勤办, 山东 济南 250023)

Cloning and expression of mouse anti-HBV-TP monoclonal antibody light chain and heavy chain variable gene fragments

GAO Ping¹, WAN Xiao-Rong², LIN Fang³, ZHANG Hui-Zhong³¹Department of Obstetrics & Gynecology, ²Center of Clinical Research, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China, ³No. 94370 Unit of Chinese PLA, Jinan 250023, China

【Abstract】 AIM: To amplify and express the light and heavy chain variable gene fragments of mouse anti-HBV Terminal protein (HBV-PT) monoclonal antibody. **METHODS:** Light and heavy chain variable gene fragments of mouse anti-HBV-PT monoclonal antibody were amplified by RT-PCR using cell total RNA purified from antibody producing hybridoma cells (E3), and further cloned into pGEM-T vector, which were then sequenced. The correct fragments were then inserted into PBV220 plasmid to construct prokaryotic expression vector. The inserts were expressed under 42°C condition and the expression products were identified by Western blot. **RESULTS:** E3Amb light and heavy chain gene fragments consisted of 363 bp and 375 bp of nucleotides encoding 121 and 125 amino acid residues respectively. The amino acid sequences of both variable regions were in agreement with the characterization of the amino acid present in the mouse Ig variable region. The Western blot result further confirmed these expression products as mouse antibody origin. **CONCLUSION:** The light and heavy chain variable gene fragments of mouse anti-HBV-PT antibody are successfully cloned and expressed. These variable gene fragments of the antibody can be used for further immunotherapy studies of HBV infected patients.

【Keywords】 anti-HBV-TP; antibody; hybridoma

【摘要】 目的: 扩增鼠源性抗 HBV 末端蛋白(HBV-PT)

收稿日期 2005-01-05; 修回日期 2005-03-04

通讯作者: 张惠中. Tel. (029)83377470 Email. hzhong@public.xa.cn

作者简介: 高萍(1963-), 女(汉族), 山西省太原市人. 主管技师.

Tel. (029)83377717 Email. hzhong@public.xa.cn

mAb 轻、重链可变区(V_L , V_H)基因, 构建 sFv 原核表达载体并于大肠杆菌中表达. 方法: 从鼠源抗 HBV 末端蛋白杂交瘤细胞(E3)中提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以鼠源简并性引物 PCR 扩增抗体的 V_L 和 V_H 基因, 克隆到 pGEM-T Easy 载体, 测序并对其结构进行分析. 选择序列正确的克隆, 分别构建 V_L 及 V_H 的 PBV220 原核表达载体, 42°C 诱导表达, Western blot 鉴定表达产物. 结果: 经测序证实, 所克隆的 V_L 基因为 363 bp, V_H 基因为 375 bp, 两者序列与鼠抗体的同源性均大于 80%. 构建了鼠抗 HBV-PT 抗体基因 V_L 及 V_H 的 PBV220 原核表达载体, 并在大肠杆菌中获得表达. 表达产物经 SDS-PAGE 及 Western 印迹分析与羊抗鼠 IgG 产生特异反应. 结论: 抗 HBV 末端蛋白轻、重链可变区基因的克隆及表达为进一步探讨 HBV 感染患者的免疫治疗奠定了基础.

【关键词】 抗 BV-TP 抗体 杂交瘤

【中图分类号】 R73 **【文献标识码】** A

0 引言

乙型病毒性肝炎(乙肝)是由 HBV 感染所引起的、波及全球的传染性疾病, 该病易于慢性化, 并与肝癌的发生密切相关. 对乙肝的防治工作仍是医学界的一大棘手问题. 目前, 有关乙型肝炎的治疗方法主要以干扰素等抗病毒药物为主. 为探讨 HBV 末端蛋白单链抗体在相关肝脏疾病诊治中应用意义, 我们应用鼠源抗 HBV 末端蛋白杂交瘤细胞 PCR 扩增抗体的轻、重链可变区基因, 构建 sFv 的原核表达载体并对表达产物进行了鉴定.

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠杂交瘤细胞系为本室制备, 该细胞可分泌抗 HBV 末端蛋白 mAb^[1], 常规培养于 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中. 扩增鼠源性抗体轻、重链可变区(V_L , V_H)基因的 PCR 引物合成于上海生物工程有限公司, 序列如下 5'端引物为 V_L FOR : 5'-AG(TA)T(CG)CT)GAGCTC (GC)TA) (GC)AC)T(GC)AC(CA)CAG(AT)CTCCA-3', V_H FOR P2 : 5'-AGTTCGGAGCTCGT(TG) (GT)TGAC (GT)CAG(GC)AC) (AG)TC)C(TC)-3'; 3'端引物为 V_L BACK : 5'-GCGCCGTCTAGAATTAAC ACT-CATTCCTGTTGA-3'; V_H BACK : 5'-ACCGCCGGATC-

GACCGCCACCCGAGCCACCGC-3'。逆转录酶及 PCR 所用试剂均为 Gibco 公司产品, pGEM-T 载体为 Promega 公司产品, 羊抗鼠 IgG Fab 抗体为 Nordic Immunology 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞总 RNA 提取及 RT-PCR 取 3×10^6 杂交瘤细胞, TRIzol 法提取细胞总 RNA (Promega Inc kit 及实验指南)。以细胞总 RNA 为模板进行 cDNA 第一链的合成。3.5 μ L RNA, 2 μ L 5x 逆转录缓冲液, 1 μ L Oligo(dT12), 70 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 冰浴 2 min, 加入 1 μ L 100 mmol/L DTT, 1 U 10 mmol/L dNTP, 1 μ L RNase inhibitor, 0.5 μ L Moloney 鼠白血病病毒逆转录酶 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。以 cDNA 第 1 链为模板, PCR 扩增抗体 V_L 及 V_H 基因。PCR 反应体系: 模板 cDNA 5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 5 μ L, 5 μ mol/L 引物 5 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 μ L, 加水至 50 μ L; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 反应 35 个循环。15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物。

1.2.2 PCR 产物的克隆及鉴定 上述 PCR 产物于 15 g/L 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离后, 切取 360 bp 大小左右的条带, Wizard Miniprep 柱 (Promega Inc Kit) 回收纯化, 取 0.3 ~ 0.5 μ g 回收的 PCR 产物与 100 ng pGEM-T 载体进行连接反应, 16 $^{\circ}$ C 连接 16 h, 连接产物分别命名为 pGEM-T/ V_L 及 pGEM-T/ V_H 。转化 JM109 感受态细菌并经蓝白筛选挑取阳性克隆进行扩大培养。提取重组质粒进行 EcoR I 酶切鉴定重组子, 同时进行序列测定及分析。

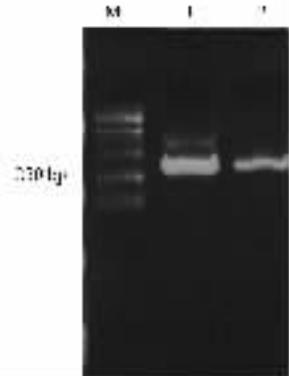
1.2.3 原核表达载体的构建及表达 将测序证实正确的 pGEM-T/ V_L 及 pGEM-T/ V_H 质粒分别用 EcoR I 和 BamH I 双酶切后回收小片段, 与经相同内切酶消化处理的 pBV220 载体质粒连接后转化 DH5a 菌株, 提取重组质粒 DNA, 以 EcoR I 和 BamH I 酶切鉴定, 将得到有插入片段的正确克隆命名为 pBV220/ V_L 及 pBV220/ V_H 。将含有 pBV220/ V_L 及 pBV220/ V_H 表达质粒的重组菌接种于 LB 培养基中 30 $^{\circ}$ C 活化过夜, 次日按 1:50 的比例转接于 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养至 $A_{600\text{nm}} = 0.6$, 转至 42 $^{\circ}$ C 培养 6 h, 离心收集菌体, 超声破碎后离心获得包涵体, 做 SDS-PAGE 分析, SDS-PAGE 以考马斯亮蓝染色、脱色。

1.2.4 Western blot 检测 pBV220/ V_L 及 V_H 表达蛋白 SDS-PAGE 电泳后, 将表达产物电转移至硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜于 50 g/L 脱脂奶 PBS 中 37 $^{\circ}$ C 封闭 90 min, 加羊抗鼠 IgG Fab 抗体 (Nordic Immunology, Inc), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 充分漂洗 (10 min \times 3

次), 加辣根过氧化物酶标记的驴抗羊 IgG, 37 $^{\circ}$ C 作用 40 s, PBS 充分漂洗, 化学荧光法 (ECL) 显色, 观察结果。

2 结果

2.1 mAb V_L , V_H 基因扩增 应用针对鼠抗体 V_L , V_H 基因引物, 从产生抗 HBV 末端蛋白杂交瘤细胞系 E3 中扩增出两条约 400 bp 左右的 DNA 片段 (Fig 1), 其 DNA 片段的大小与预期鼠源性抗体 V_L , V_H 基因大小一致。

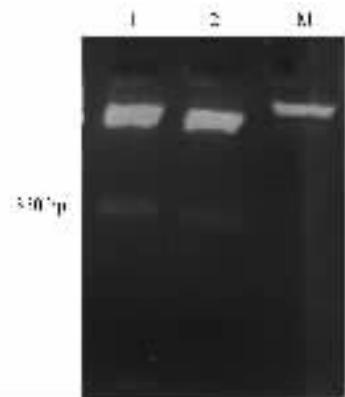


M: PCR marker; 1: Light chain gene; 2: Heavy chain gene.

Fig 1 RT-PCR amplification of E3 mAb light and heavy chain variable gene fragments

图 1 E3 mAb V_L , V_H 基因 RT-PCR 扩增结果

2.2 PCR 扩增产物的克隆及鉴定 琼脂糖凝胶电泳并分别回收上述 V_L , V_H 基因 PCR 扩增产物, 分别与 pGEM-T Easy 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 得到数 10 个白色转化菌落。挑选白色菌落, 提取质粒 DNA, 经 EcoR I 酶切鉴定插入片段, 可得到 400 bp 左右大小的插入片段 (Fig 2)。



1 pGEM-T/ V_H ; 2 pGEM-T/ V_L ; M PCR marker.

Fig 2 EcoR I enzyme digestion of recombinant pGEM-T/ V_L 及 pGEM-T/ V_H plasmid

图 2 重组 pGEM-T/ V_L 及 pGEM-T/ V_H 质粒 EcoR I 酶切鉴定

2.3 PCR 产物测序 V_L 基因由 363 碱基组成, 编码 121 氨基酸, V_H 基因由 375 碱基组成, 编码 125 氨基酸, V_L , V_H 基因测序结果表明为开放读框, 与 GeneBank 中已发表的序列比较未发现与其序列相同的基因, 说明其为新发现的基因序列。

V_L

```
AGATGCGAGCTCCACATGACCCAGACTCCAGACATT
GAGCTCACCCAGTCTCCATCCATAAGTGCATCTGGG
GAGAAGGTCACCATCACCTGCCACAAGTATAACCAA
ATACTATGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCC
AGACTTTTCATTTATAGATCCATCCTGGCATGTGGAG
TCCCTACACGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGAGAGCTC
ATACACTCAGACTATCAGCATGCACGAAGTTGCTTA
CTATTGTCAGCAGGGGACTAGTAGCCCAGGACGCC
GTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGAT
GCGGCCTCAACAGGAATGAGTGTTAATTCTAGACGG
CGCTAA
```

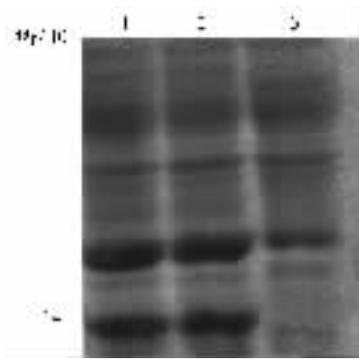
V_H

```
AGTTCCGAGCTCGTGGTACTCAGGCATCCCAGGTG
CAGCTGCAGGAGTCAGGGTCTGTGCTGAGGCCAGCG
AAGTCTGGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTCCT
GGATGCACTGGCGAAGCAGAGCCCTGGACAGGGC
CTTGAGTGGATTGGACAGATACATCCTAATAGTGGT
AATACCTACAATGAGAGGTTCAAGGGCAAGGCCACA
CTGACTGTATACACATCCTCCAGCACAGCGGATCTC
AGACTGACATCTGAGGATGCGGTCTATTACTGTGCA
AGATCGGGGAATAACGTCTGTTTTACTGCCAAGGC
ACGGTCAACGCTCTCCTCAGCGGTGGCTCGGGTGGCG
GTCGATCCGGGCGGTAA
```

2.4 V_L , V_H 基因原核表达载体的构建及表达 将测序正确的 pGEM-T/ V_L 及 pGEM-T/ V_H 质粒分别用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切并回收酶切片段, 插入 PBV220 表达载体, 相同酶切结果显示表达载体构建成功。将正确的重组菌在 30℃ 活化过夜, 经 42℃ 诱导表达。SDS-PAGE 可见 M_r 14 000 蛋白条带 (Fig 3), 进一步用 Western blot 实验证实了所表达蛋白为鼠源性抗体蛋白 (Fig 4)。

3 讨论

HBV 虽为 DNA 病毒, 但必须经过 RNA 中间体的逆转录复制^[2]。最初的研究表明, 这一过程需要病毒 *core* 基因及 *pol* 基因参与^[3]。HBV-*pol* 基因编码 4 种蛋白, 自 N 端起分别为末端蛋白 (terminal, PT), spacer, 末端蛋白 (reverse transcriptase, RT) 及 RNA



1 : V_L expression product ; 2 : V_H expression product ; 3 : Blank control.

Fig 3 PAGE electrophoresis result

图 3 蛋白电泳结果(考马斯亮蓝染色)

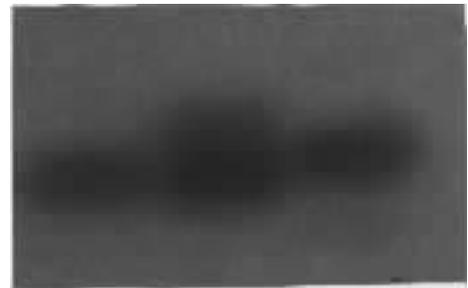


Fig 4 Western blot result

图 4 蛋白印迹杂交结果

酶 (RNaseH)。Feitelson 等^[4]及 Lega 等^[5]分别对 HBV-*pol* 抗体及抗原在乙肝患者血清中存在意义与 HBV 感染血清学其他指标之间的关系进行了比较性研究, 他们的结果均表明 HBV-*pol* 抗原及抗体可在多数 HBV 感染患者血清内出现, 尤其是它们可以出现于其他 HBV 血清学指标均为阴性的 HBV 感染的个体血清中, 提示这一指标在某些病例中可能是唯一反应 HBV 感染或体内 HBV 低水平复制的重要标记物, 同时也是病毒复制过程中的关键因素, 因此有效阻断该蛋白的功能可望为 HBV 生物治疗提供新的手段。

随着现代分子生物学和免疫的发展, 基因工程抗体的诞生为病毒感染性疾病及恶性肿瘤的诊断和治疗带来了新的方法和手段。该方法的优势在于单链抗体分子量小、穿透力强、较好保持抗原亲和性及特异性、免疫原性低、体内半衰期短, 易与效应分子相连构成多种新功能的抗体分子^[6,7]。

我们应用已经获得的鼠源性分泌抗 HBV 末端蛋白的杂交瘤细胞 (E3), 提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA 并以鼠源简并性引物 PCR 扩增抗体的 V_L 和 V_H 基因, 经测序证实, 所克隆的 V_L 基因为 363 bp, V_H 基因为 375 bp, 两者序列与鼠抗体的同源性均大于 80%。同时应用 PBV220 质粒构建了原核表达载体并在大肠杆菌中成功获得表达。表达产物经 SDS-PAGE 及 Western 印迹分析与羊抗鼠 IgG 产生特异

反应. 实验结果为进一步探讨 HBV 感染患者的免疫治疗奠定了基础.

【参考文献】

- [1] 赵玉红, 高萍. 抗 HBV 末端蛋白杂交瘤细胞系的建立及其单克隆抗体鉴定[J]. 第四军医大学学报[J], 2003 24(11): 1000-1001.
Zhao YH, Gao P. Establishment of anti-HBV terminal protein antibody producing hybridoma cell lines and characterization of their monoclonal antibodies[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2003 24(11): 1000-1001.
- [2] Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate[J]. Cell, 1982 29(8): 403-415.
- [3] Wang GH, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus

acts as a protein primer for viral DNA synthesis[J]. Cell, 1992; 71(11): 663-670.

- [4] Feitelson MA, Millman I, Duncan GD, et al. Presence of antibodies to the polymerase gene product(s) of hepatitis B and woodchuck hepatitis virus in natural and experimental infections[J]. J Med Virol, 1988 24(2): 121-136.
- [5] Lege L, Resti M, Rossi M, et al. Hepatitis B virus: New markers and their immunology[J]. Pediatr Med Chir, 1993 15(1): 5-10.
- [6] Werge TM, Baldaari CT, Telford JL. Intracellular single chain Fv antibody inhibits Ras activity in T-cell antigen receptor stimulated Jurkat cells[J]. FEBS, 1994 351(1): 393-396.
- [7] Montano X, Jimenez A. Intracellular expression of the monoclonal anti-ras antibody Y13-259 blocks the transforming activity of ras oncogene[J]. Cell Growth Differ, 1995 6(2): 597-605.

编辑 王小仲

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2005)07-0646-01

出血热误诊为上呼吸道感染 1 例

秦彬¹, 马克泰², 田苏斌², 贾战生³ (¹ 西安科技大学医院检验科, 陕西 西安 710054, ² 西安陆军学院军事共同教研室, ³ 第四军医大学唐都医院感染科)

【关键词】流行性出血热, 误诊, 上呼吸道感染

【中图分类号】R512.8 【文献标识码】B

1 病例报告 患者男 22 岁, 因间歇性全身乏力、肌肉酸痛 2 wk, 发冷 1 wk, 发热 4 d 入院. 曾在我院查 WBC $4.5 \times 10^9/L$, N 0.60, L 0.4, 体温波动在 38~40℃. 初步诊断“上呼吸道感染”, 用阿莫西林、VC 银翘片、清热解毒冲剂等治疗无效. 查体: T 38.9℃, BP 面性 12/8 kPa. 全身皮肤无出血点, 双眼球结膜轻度充血, 咽部充血, 软腭未见充血点, 心肺腹部未见阳性体征. 实验室检查: WBC $7.85 \times 10^9/L$, N 0.79, L 0.21, HGB 150 g/L, PCL $30 \times 10^9/L$, 尿蛋白 3.2 g/L, 流行性出血热抗体(+). 诊断: 流行性出血热. 入院后立即按照流行性出血热的治疗原则给予抗病毒、抗渗出、抗出血治疗. 具体包括卧床休息, 给予高热量, 多维生素, 易消化饮食, 维持水、电解质、酸碱及血浆渗透压平衡, 给予大剂量(5 g) Vit. C 和 Vit. E. 同时给予氢化可地松 100 mg/d 稀释后缓慢静脉滴注. 入院后 3 d 患者的尿量由 450 mL/d 增至 750 mL/d, 肌酐 204.6 $\mu\text{mol/L}$, BUN 13.3 mmol/L. 5 d 尿量增加至 4000 mL/d. 经综合治疗 10 d, 肌酐和 BUN 检查等正常, 痊愈出院, 随访 1 mo 未见异常.

2 讨论 国际上将流行性出血热(epidemic hemorrhagic fever, EHF)与流行性肾病(nephropathia epidemica, NE)等统称肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS). HFRS 是由布尼亚病毒科(bunyaviridae)汉坦病毒属(hantavirus)中某些病毒引起和由某些啮齿动物携带传播的一类自然疫原性疾病. 我国流行的是 EHF 是以黑线姬鼠和褐家鼠为其主要宿主和传染源, 其传播主要通过与其排泄物(尿、粪)分泌物(唾液)接触. EHF 起病急, 进展快, 病死率高, 早期诊断对降低病死率有着特殊的重要意义. EHF 临床上以发热、休克、充血、出血及急性肾功能衰竭为主要临床表现, 但通常不典型. 患者在就诊时处于病程变化的不同时期, 常以某一系统或某一器官的症状较为突出, 而典型症状并不明显, 又没有明显的感染因素, 容易造成误诊时间较长, 可达 3~4 wk^[1], 误诊率高达 2/3, 多数误诊为上呼吸道感染^[2]. 我们报道的病例误诊为 2 wk, 患者仅表现为全身乏力, 肌肉酸痛, 发冷发热, 临床表现不典型而误诊为上呼吸道感染. 另外此病例无明显接触史, 且自身感觉不重, 加上接诊医生经验不足, 对 EHF 这一传染病的发生发展等的认识不足而造成误诊^[3]. EHF 的诊断主要是应用 IgM 捕获 ELISA 法检测 EHF IgM 抗体, 治疗原则主要是采取综合性治疗^[4].

对于本例患者的误诊, 我们认为在 EHF 流行区域及流行季节提高对流行性出血热不典型病例的认识, 临床工作中掌握疾病的特点, 认真细致的检查是非常的重要. 同时要明确本病必须做到早发现、早休息、早治疗和就近治疗的原则. 针对各期的病理生理改变, 在各期到来之前采取预防性治疗和防治合并症的治疗, 特别是应抓好抗病毒治疗及液体疗法. 对重症患者务必尽早抗休克、预防出血及抗肾功能衰竭治疗.

【参考文献】

- [1] 王勤英, 赵和平, 甄宇鹏. 流行性出血热 10 例误诊原因分析[J]. 山西医科大学学报, 1997 28: 218-219.
- [2] 许敏. 广州地区流行性出血热特点与误诊原因分析[J]. 现代临床医学生物工程杂志, 2000 6: 49-50.
- [3] 郭利彬. 流行性出血热 20 例误诊分析[J]. 现代医药卫生, 2004 20(10): 903.
- [4] 唐丕斌, 龙静, 仪忠俊. 流行性出血热 37 例临床分析[J]. 疑难病杂志, 2004 3(2): 108.

编辑 许昌泰

收稿日期 2004-12-28; 修回日期 2005-01-10

作者简介 秦彬(1965-), 女(汉族), 辽宁省沈阳市人, 检验师. Tel. (029) 85583339 Email. QB1965@163.com