

# 抗人前列腺素 D 合成酶嵌合抗体基因的构建

朱国华<sup>1 2</sup> , 陈德宇<sup>2</sup> , 许晓风<sup>1</sup> , 黄宇烽<sup>2</sup>

( 1. 南京师范大学生命科学学院 210097 , 江苏 , 南京 )

( 2. 南京军区南京总医院生殖遗传室 210002 , 江苏 , 南京 )

[ 摘要 ] 采用 RT-PCR 技术 , 从 1 株稳定分泌抗人 L-PGDS 单克隆抗体的鼠杂交瘤细胞中扩增抗体的可变区基因 , 得 2 个 V<sub>K</sub> 和 1 个 V<sub>H</sub> . 序列经 Igblast 比对分析 , 其中 1 个 V<sub>K</sub> 为鼠骨髓瘤细胞系内固有的无功能基因 ; 另一 V<sub>K</sub> 和 V<sub>H</sub> 具备鼠抗体可变区特征 , 为抗体功能基因 . 经双酶切 , 将抗体可变区功能基因分别与表达载体 pAG4622、pAH4604 中的人 IgG 相应恒定区相连 , 构建成抗人 L-PGDS 的人-鼠嵌合抗体基因 .

[ 关键词 ] 人 L-PGDS , 单克隆抗体 , 可变区基因 , 人-鼠嵌合抗体

[ 中图分类号 ] Q812 , [ 文献标识码 ] A , [ 文章编号 ] 1001-4616( 2005 )01-0098-05

## Constructing Human-mouse Chimeric Antibody Gene to L-PGDS

Zhu Guohua<sup>1 2</sup> , Chen Deyu<sup>2</sup> , Xu Xiaofeng<sup>1</sup> , Huang Yufeng<sup>2</sup>

( 1. School of Life Science , Nanjing Normal University , 210097 , Nanjing , China )

( 2. Laboratory of Reproduction and Genetics , Nanjing General Hospital of Nanjing Command PLA , 210002 , Nanjing , China )

**Abstract** The variable region genes of L-PGDS McAb are amplified from hybridoma cells by RT-PCR. After sequenced , one V<sub>H</sub> and two V<sub>K</sub> are obtained . But one of the V<sub>K</sub> is an aberrant V<sub>K</sub> transcript , derived from myeloma cell line . The other V<sub>H</sub> and V<sub>K</sub> are functional genes , for they are highly homologous to the variable region genes of murine immunoglobulin . Making use of enzymatic digestions , the V<sub>H</sub> and V<sub>K</sub> are joined to pAG4622 and pAH4604 to construct L-PGDS human-mouse chimeric antibody genes .

**Key words** human Lipocalin-type prostaglandin D synthase , monoclonal antibody , variable region genes , human-mouse chimeric antibody

## 0 引言

Lipocalin 型前列腺素 D 合成酶( Lipocalin-type prostaglandin D synthase , L-PGDS )主要分布于哺乳动物的中枢神经系统和雄性生殖器官 , 并分泌至脑脊液( CSF )、血清、精液、羊水、尿液等体液中 . L-PGDS 是一种双功能蛋白 , 除可催化前列腺素 H<sub>2</sub>( PGH<sub>2</sub> )转变为前列腺素 D<sub>2</sub>( PGD<sub>2</sub> ) , 且可运输亲脂/疏水分子<sup>[ 1 ]</sup> . 研究表明 , L-PGDS 与许多疾病密切相关 , 如 L-PGDS 不同程度地表达于卵巢癌、乳腺癌等组织<sup>[ 2 ]</sup> , 病毒性脑膜炎、脑脊膜瘤、椎管狭窄、脑栓塞等病人的 CSF 中 L-PGDS 呈明显偏高<sup>[ 3 ]</sup> .

本室以毕赤氏酵母表达的人 L-PGDS 为抗原<sup>[ 4 ]</sup> , 成功制备了兔抗人 L-PGDS 多抗和鼠抗人 L-PGDS 单抗( 待发表 ) . 但特异性鼠单抗具有异源性 , 应用于人体研究会引发人抗鼠抗体毒性反应等 . 本研究利用基因工程技术 , 构建抗人 L-PGDS 的人-鼠嵌合抗体基因 , 为后续嵌合抗体蛋白的表达及相应的基础临床研究奠定基础 .

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

Trizol 试剂、RT-PCR kit 和 pGEM-T 载体购自 Promega 公司 ; 限制性内切酶 *EcoR* V、*Sal* I、*Nhe* I 购自

收稿日期 : 2004-08-20 .

基金项目 : 中国人民解放军九五计划生育基金资助项目( 军计生 98 - 04 ) .

作者简介 : 朱国华 , 女 , 1979— , 硕士研究生 , 主要从事细胞生物学专业的学习与研究 . E-mail : zhugh0601@ etang . com

通讯联系人 : 许晓风 , 1957— , 教授 , 博士生导师 , 主要从事细胞生物学的教学与研究 . E-mail : xuxiaofeng@ njnu . edu . cn

BioLabs 公司、Taq + pfu DNA 聚合酶购自 MBI 公司,Sp2/0 细胞、大肠杆菌 JM109、HB101 本室保存,表达载体 pAG4622、pAH4604 均由海军总医院王琰教授惠赠。

1.2 分泌抗人 L-PGDS 单抗杂交瘤细胞株的筛选

以人睾丸 L-PGDS 完全抗原腹腔注射 Balb/c 小鼠,多次免疫后取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 在 PEG 的作用下融合。约两周后,采用间接 ELISA 筛选出强阳性分泌抗体的杂交瘤细胞克隆,有限稀释、扩大培养,并用 Western blot 鉴定抗体的特异性。

1.3 寡核苷酸引物的设计

合成一组自抗体前导序列和 V-C 交界处的简并引物,扩增单克隆抗体的可变区基因。具体引物序列如下。其中扩增 V<sub>K</sub> 的 5'端引物 5 个:LL1~LL5,扩增 V<sub>H</sub> 的 5'端引物 4 个:VHL1~VHL4,扩增 V<sub>K</sub>、V<sub>H</sub> 的 3'端引物都仅 1 个: MVK 和 MVH。且在 V<sub>K</sub>、V<sub>H</sub> 的 5'端引物中均引入 EcoR V 酶切位点,在 MVK、MVH 中分别引入 Sal I 和 Nhe I 酶切位点。

5' Primers for VL Signal peptide	5' Primers for VH signal peptide
LL1: GGGGATATCCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTAT	VHL1: GGGGATATCCACCATGGRATGSAGCTGKGTMATSCCTCT
LL2: GGGGATATCCACCATGGATTTTCAAGTCAGATTTTCAG	VHL2: GGGGATATCCACCATGRACTTCGGGYTGAGCTKGGTTTT
LL3: GGGGATATCCACCATGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA	VHL3: GGGGATATCCACCATGGCTGCTCTGGGGTGCTCTTCT
LL4: GGGGATATCCACCATGKCCCCWRCTCAGTYCTKGT	VHL4: GGGGATATCCACCATGATRGTTGTTAGTCTTCTGTRCCTG
LL5: GGGGATATCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG	
3' Primer for V <sub>K</sub> spanning C <sub>K</sub> and J <sub>K</sub> 1,2&4	3' Primer for V <sub>H</sub> spanning CH1 and JH
MVK: GGATACAGTTGGTGCAGTCGACTTACCTTTKATTTCARCTT	MVH: GACHGATGGGGSTGYGTGCTAGCTGMRGAGACDGTGA

1.4 抗人 L-PGDS 单抗 V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> 基因的 RT-PCR 扩增

先从 1 × 10<sup>7</sup> 个稳定分泌抗人 L-PGDS 抗体的杂交瘤细胞中提取总 RNA,再以 RT-PCR 法扩增 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 基因。50 μL 反应体系:10 × PCP buffer 5 μL,10 mol/L dNTP 1 μL,μDNA 模板 1.3 μL,上、下游引物各 1.3 μL 及 pfu 酶 0.3 μL。PCR 反应条件:94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,共进行 35 个循环,然后 72℃ 保温 10 min。

1.5 V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub> 基因的克隆及序列分析

PCR 产物纯化后克隆入 pGEM-T Vector,并转化 E. Coli JM109。将经 PCR 和双酶切鉴定出的阳性克隆送上海博亚公司测序,并登录 Igbblast 数据库对所测定的序列进行比对分析。

1.6 抗人 L-PGDS 人-鼠嵌合抗体基因的构建

用 EcoR V + Sal I 和 EcoR V + Nhe I 分别双酶切 pGEM - T/VL 和 pGEM - T/VH,切下的 V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub> 片段再分别与表达载体 pAG4622 和 pAH4604 中的人 IgG 相应恒定区相连,得抗人 L-PGDS 轻、重链嵌合抗体基因。将含嵌合抗体基因的重组载体转化 HB101,抗性筛选后经 PCR 和双酶切共同筛选出含目的基因的阳性克隆。

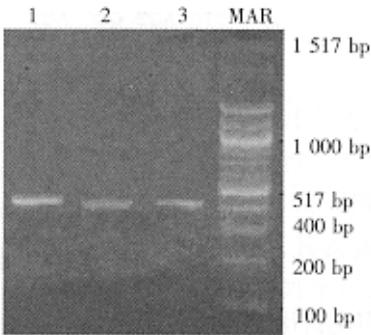
2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的筛选

获得 1 株稳定分泌抗人 L-PGDS 抗体的杂交瘤细胞。间接 ELISA 测所获抗体的亲和力为 2 × 10<sup>8</sup> L/mol,Western blot 结果显示该抗体能特异性识别人睾丸 L-PGDS 抗原(另文报道)。

2.2 抗人 L-PGDS 单抗 V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub> 基因的扩增

为了得到准确的可变区序列,我们将不同的 5'端引物分别与相同的 3'端引物配对扩增,最终轻链的 5'引物 LL1、LL5 和重链的 5'引物 HL4 均可扩增出相应的产物(图 1)。扩出的 PCR 产物均在 400 bp 左右(包括前导序列及 J 基因区)。由于所用的 5'端通用引物相互差



1. PCR product amplified by VHL4, 439 bp  
2. PCR product amplified by LL5, 416 bp  
3. PCR product amplified by LL1, 428 bp

图 1 抗人 L-PGDS 单抗可变区基因 RT-PCR 产物

别较大,提示我们从一株杂交瘤细胞中可能扩增出了 2 个 V<sub>K</sub> 和 1 个 V<sub>H</sub>. 为对其进一步鉴定,分别进行克隆、测序.

2.3 VL、VH 基因的克隆及序列分析

阳性克隆测序后分析,LL1 扩出的 V<sub>K</sub> 基因与 Carroll 等<sup>[6]</sup>所发表的鼠骨髓瘤细胞系内固有的无功能 V<sub>K</sub> 基因序列完全一致(图 2). 在其 FR<sub>1</sub> 区密码子 TAC 突变成了 TGC,即 Tyr 代替了抗体特征性的 Cys,抗原互补决定区 CDR2 直接与 J 片段相连,且连接处发生了 4 个核苷酸的缺失,从而导致阅读框移位,提前出现了 TAA 终止密码子.

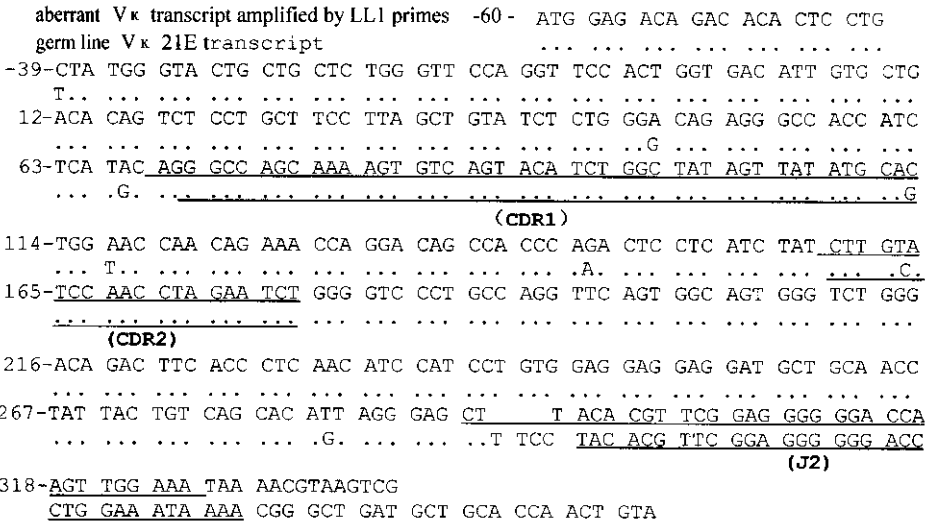


图2 引物 LL1 扩增出的无功能 V<sub>K</sub> 基因和正常 V<sub>K</sub>21 核苷酸序列

LL5 扩出的 VL 基因全长 345 bp,在其上、下游分别存在 57 bp 的前导肽序列和 24 bp J 基因区. VL 基因内无终止码,为一开放阅读框,共编码 115 个氨基酸(图 3). 序列中有明确的 4 个框架区(FRs)和 3 个互补决定区(CDRs),其中第 23、93 位氨基酸为抗体可变区特征性 Cys,表明 VL 的氨基酸序列符合鼠抗体可变区特征. 经 Igbblast 比对分析,与 VL 同源性较高的序列编码鼠 Ig<sub>K</sub> 轻链基因.

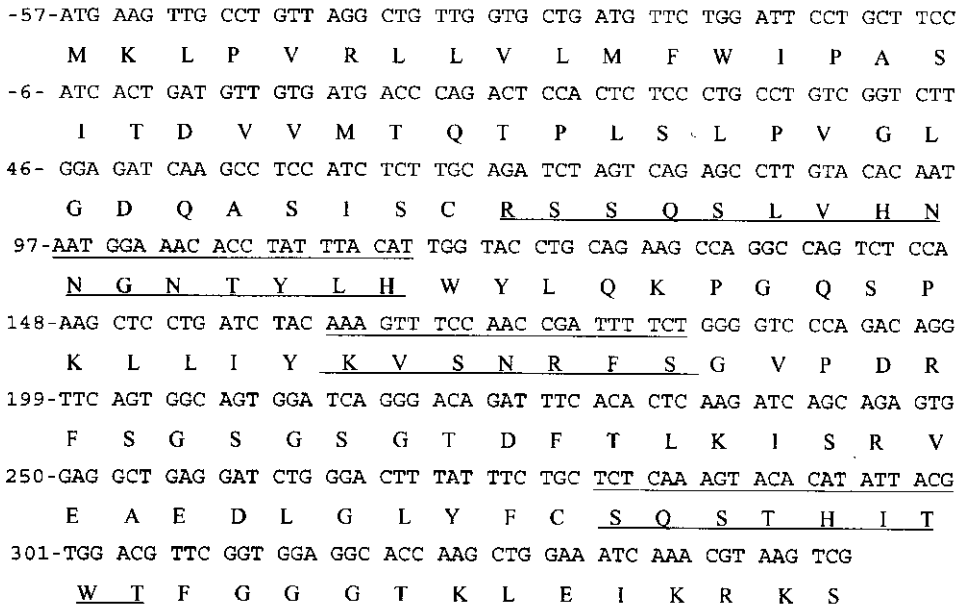


图3 引物 LL5 扩增出的抗人 L-PGDS 抗体轻链可变区基因,下划线处为 CDR 区

HL4 扩出的 VH 基因全长 348 bp,且在其上、下游也分别存在 54 bp 的前导序列和 27 bp J 基因区. VH 基因内为一开放阅读框,共编码 116 个氨基酸(图 4). 序列中亦有明确的 4 个 FRs 和 3 个 CDRs,其中第 22、96 位氨基酸为抗体可变区特征性 Cys,表明 VH 的氨基酸序列符合鼠抗体可变区特征. 并经 Igbblast 比

对分析,与 VH 同源性较高的序列均为鼠免疫球蛋白重链可变区基因。

```

-54-ATG ATA GTG TTA AGT CTT CTG TAC CTG TTG ACA GCC ATT CCT GGT ATC CTG
      M   I   V   L   S   L   L   Y   L   L   T   A   I   P   G   I   L
-3-  TCT GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CCT GGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG
      S   D   V   Q   L   Q   E   S   G   P   G   L   V   K   P   S   Q
49-  TCT CTG TCT CTC ACC TGC TCT GTC ACC GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGT TAT
      S   L   S   L   T   C   S   V   T   G   Y   S   I   T   S   G   Y
100-TAC TGG AAC TGG ATC CGG CAG TTT CCA GAA AAC AGA CTG GAA TGG ATG GGC
      Y   W   N   W   I   R   Q   F   P   E   N   R   L   E   W   M   G
151-TAC ATA AGC TAC GAC GGT AGC GAT TAC TAC AAC CCA TCT CTC AAA AAT CGA
      Y   I   S   Y   D   G   S   D   Y   Y   N   P   S   L   K   N   R
202-ATC TCC ATC ACT CGT GAC ACA TCT AAG AAC CAG TTT CTC CTG AGG TTG AAT
      I   S   I   T   R   D   T   S   K   N   Q   F   L   L   R   L   N
253-TCT GTG AGT ACT GAG GAC ACA GCT ACA TAT TAC TGT GCA AAC TAC GGT AAT
      S   V   S   T   E   D   T   A   T   Y   Y   C   A   N   Y   G   N
304-AGC TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCC TCA
      S   F   A   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S

```

图4 引物 HL4 扩增出的抗人 L-PGDS 抗体重链可变区基因,下划线处为 CDR 区

## 2.4 抗人 L-PGDS 人-鼠嵌合抗体基因的构建

人-鼠轻、重链嵌合抗体基因的构建见示意图 5,经抗性筛选得含嵌合抗体基因的重组表达载体 pAG4622/VL 和 pAH4604/VH,分别双酶切鉴定如图 6。

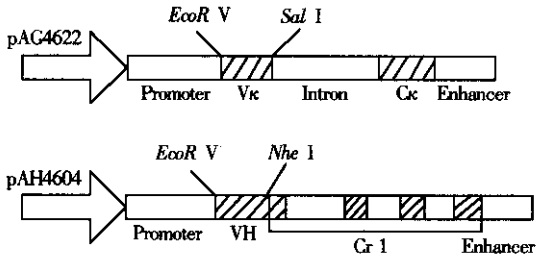
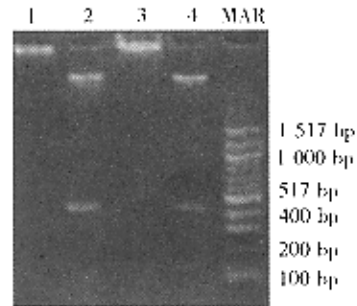


图5 构建人-鼠轻、重链嵌合抗体基因



1. recombinant pAH4604/VH ;
2. recombinant pAH4604/VH digested by *EcoR* V/*Nhe* I ;
3. recombinant pAG4622/VL ;
4. recombinant pAG4622/VL digested by *EcoR* V/*Sal* I

图6 重组表达载体 pAG4622/VL 和 pAH4604/VH 的双酶切鉴定

## 3 讨论

鼠单克隆抗体作为异源性蛋白在人体内可诱发人抗鼠抗体的毒性反应( HAMA ),并使 McAb 在体内消除加快,这严重影响了鼠单抗的临床研究与应用.鼠-人嵌合抗体部分地解决了这一难题.由于异源性 Ab 的免疫反应约 90% 是针对恒定区( C 区 ),要降低 McAb 的异源性,对其恒定区进行人源化是近年来基因工程抗体研究的一个热点。

PCR 技术的发展为获得 McAb 可变区基因提供了有效而简便的方法,但从何处起始设计引物,对所得工程抗体的性质具有直接的影响.目前不少研究者利用抗体第一骨架区氨基酸序列的保守性,设计一组可以有效扩增出 Ig 可变区基因的简并性引物.但由于引物的简并性及必要内切酶位点的引入,可造成个别位置氨基酸残基的改变.第一骨架区序列虽然不涉及 CDR 区,但却参与 CDR 平面的形成,其氨基酸序列的变化有可能对亲本抗体的特异性和亲和性产生一定的影响.本文所采用的是近年来国内外出现的,利用抗体前导肽的保守序列和 C 端的 J 基因设计而成的一组通用引物<sup>[5]</sup>.因抗体 V-J 交界处的 J 基因数量有限,该组引物中的 3' 引物现一般认为可对所有的 J<sub>κ</sub> 和 J<sub>H</sub> 进行扩增,而前导肽序列在真核细胞内的翻译加工时将被切除,其简并性将不会影响可变区蛋白的氨基酸序列.但抗体的前导肽序列有时变异较大,故

该组通用引物目前尚无 100% 的把握能将所有抗体的可变区基因扩增出来. 本文扩增出的抗人 L-PGDS 抗体的重、轻链可变区基因, 从序列碱基分析和同源性比对结果, 可认为是继国内外学者<sup>[6]</sup>利用此组引物扩增抗体可变区基因的又一成功报道.

一般认为, 分泌特异抗体的杂交瘤细胞中只有一种轻、重链功能基因. 我们从抗人 L-PGDS 鼠杂交瘤细胞中扩出了 2 个  $V_K$  和 1 个  $V_H$ . 后经序列分析证实, 也仅由 LL5 和 HL4 扩出的一对  $V_K$ 、 $V_H$  基因具有鼠免疫球蛋白的一系列特征, 为抗体功能基因. 这种现象也曾有学者报道过, 如 Knight 等<sup>[7]</sup>从鼠杂交瘤细胞中获得 3 个轻链基因, 骆训懿等<sup>[8]</sup>从分泌抗人 TNF- $\alpha$  鼠杂交瘤细胞中克隆出 2 个  $V_K$  和 2 个  $V_H$ . 但经序列分析或表达鉴定, 最终都只有一对  $V_K$ 、 $V_H$  是抗体的功能基因. 因此在从鼠杂交瘤细胞中克隆单抗功能基因时, 应注意多基因、非功能基因的存在情况.

总之, 本文成功扩增出抗人 L-PGDS 单抗的可变区序列, 并利用限制性酶切位点构建成相应的人-鼠嵌合抗体基因. 本工作为后续嵌合抗体蛋白的表达、临床相应疾病的诊断及 L-PGDS 蛋白的功能研究提供物质前提.

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 陈德宇, 黄宇烽, 周开亚. Lipocalin 型前列腺素 D 合成酶的结构、定位与特性[ J ]. 中华男科学, 2004, 10( 2 ) : 134—135.
- [ 2 ] Su B, Guan M, Zhao R, *et al.* Expression of prostaglandin D synthase in ovarian cancer[ J ]. Clin Chem Lab Med, 2001, 39( 12 ) : 1198—1199.
- [ 3 ] Hiraoka A, Arato T, Tominaga I, *et al.* Capillary electrophoretic analysis of beta-trace protein and other low molecular weight proteins in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases[ J ]. J Pharm Biomed Anal, 1997, 15( 9—10 ) : 1257—1258.
- [ 4 ] 高云, 黄宇烽, 夏欣一, 等. 人睾丸前列腺素 D 合成酶在毕赤氏酵母中的表达纯化及鉴定[ J ]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19( 6 ) : 757—758.
- [ 5 ] 李竞, 王琰, 李全喜, 等. 抗胃癌鼠单抗 3H11 V 区基因的克隆及人-鼠嵌合轻链的表达[ J ]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1997, 17( 3 ) : 227—228.
- [ 6 ] William L. Carroll, Eileen Mendel, Shoshana Levy. Hybridoma fusion cell lines contain an aberrant kappa transcrip[ J ]. Mol Immunol, 1998, 25( 10 ) : 991—992.
- [ 7 ] Knight D W, Trink H, Le J. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody[ J ]. Mol Immunol, 1993, 30 : 1443—1445.
- [ 8 ] 骆训懿, 王琰, 王欲晓, 等. 抗人 TNF- $\alpha$  单克隆抗体基因的克隆及鉴定[ J ]. 中华微生物和免疫学杂志, 1999, 19( 2 ) : 166—168.

[ 责任编辑: 孙德泉 ]