

• 实验研究 •

人源抗-HBs Fab 表达系统的转换与效果

Modification of human anti-HBs Fab expression system and the results

韩焕兴^{1*}, 陆慧琦¹, 郑大勇², 叶伟民¹, 朱 烨¹, 罗荣城²

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 南方医科大学南方医院肿瘤科, 广州 510515)

[摘要] **目的:**重新克隆抗-HBs Fab 基因于 pBAD 载体, 改变诱导方式与表达条件, 提升原核表达人源抗体片段的经济性与实用性。**方法:**经 3 次基因扩增, 分步克隆, 将 Fd、Lc 与 pBAD/Lc 基因先后插入到 pBAD 载体中, 形成单载体双启动、定向表达形式。筛选双重插入菌落, 阿拉伯糖诱导表达, PAGE 和 Western 印迹鉴定抗-HBs Fab 的表达效果。**结果:**酶切克隆载体, 琼脂糖电泳证实 Fd 和 pBAD/Lc 基因的正确插入; PAGE 可见明显的相对分子质量近 50 000 的蛋白区带, Western 印迹显示该区带确为 Fab; HBsAg 特异印迹表明表达产物具有抗原结合活性。**结论:**比较原 pComb3 表达系统, 改变后的 pBAD 表达系统明显提高了抗-HBs Fab 的表达量(可达 70 mg/L)并保持了抗体活性, 为该抗体的批量制备与临床应用提供了条件。

[关键词] 抗-HBs Fab; pBAD 载体; 基因表达

[中图分类号] R 575.1

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)12-1338-02

乙型肝炎的防治仍是一项长期艰巨的任务。大量资料表明抗 HBV 抗体在病毒性肝炎的防治中有明显的效果^[1], 此外, 对肝脏移植过程中的供体器官处理, 对孕妇乙肝患者生产过程中的婴儿保护有肯定的价值, 病原特异性抗体尚能起到生物导向作用, 对抗体介导其他成分治疗有应用潜力。

应用生物技术原核表达人源抗-HBs Fab 最早源于 Zebedee SL, 此后国内外相继有多处制备人源生物工程抗-HBs Fab 和 ScFv 的报道^[2,3]。迄今为止, 所有抗-HBs Fab 的制备均采用组合抗体文库技术, 应用 pComb3 载体, IPTG 诱导表达, 一直处于实验研究阶段。

pBAD 载体克隆目的基因用阿拉伯糖诱导表达是商业生物制剂生产中应用较多的形式, 其特征是非诱导态控制严格, 诱导剂价格低廉, 同时载体本身载有 poly-His 和 c-myc 标签, 大大方便了克隆表达产物的纯化。本研究旨在原 pComb3 表达抗-HBs Fab 的基础上, 分别克隆抗-HBs 的 Fd 和轻链基因于 pBAD 中, 再将 pBAD-轻链复合体插入到已克隆有 Fd 的载体中, 形成双启动子、双肽分别表达, 菌体质周腔定向分泌自行组装的方式制备活性抗体片段, 探索抗-HBs Fab 制备的经济和实用形式, 为批量制备与临床应用提供条件。

1 材料和方法

1.1 载体、菌株与试剂 抗-HBs Fab 的 pComb3 表达系统为本实验室自建^[4], pBAD 载体与宿主菌 TOP10 购自 GENE 公司, PCR 扩增系统试剂系 Qiagen 产品, 所用内切酶、连接酶均购自 New England Biolab, HRP 标记羊抗人 IgG Fab 购于 Sigma, Pharmacia Mini 蛋白电泳系统, 余常规试剂均为分析纯。

1.2 Fd 与 λ 轻链的扩增 pComb3/抗-HBs Fab 质粒的制备参见文献^[5]。根据 pBAD 载体的要求与 Fab 基因结构分别设计下列引物: Fd 链 Forward 5'-TG AAG CTG CTC AGA TCT GGG, Backward 5'-TTA CTA AGA TCT TTT GTC

ACA ACA TTT GG; λ 轻链 Forward 5'-ATG GCC GAG CTC CAG CCT G, Backward 5'-TT AAC TCT AGA ACT ATG AAC。按下列反应分别扩增 Fd 与轻链: 模板 DNA 100 ng, Fd 或轻链引物 10 μmol, preMix (含 dNTP 和 *Tac* 酶), 加双蒸水至 50 μl, 扩增条件为: 94℃ 2 min, 35 个循环, 依次为 94℃ 1 min 62℃ 45', 72℃ 1 min, 最后一个循环延伸时间为 2 min。

1.3 pBAHBs-Fd 和 pBAHBs-Lc 的克隆 载体质粒分为 2 组, 一组用 *Xho* I 和 *Bgl* II 双酶切, 另一组用 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切, 1% 的琼脂糖电泳回收载体 DNA。Fd PCR 产物和 Lc PCR 产物用相同于克隆载体的双酶切, 酶的用量为 30 U/μg, 酚氯仿重复抽提、乙醇沉淀法纯化出 PCR 产物, 按载体: 插入片段 1: 5 的比例 16℃ 连接过夜。以连接产物转化感受态 TOP10, 取单菌落用 LB 增菌, 质粒 DNA 制备同上, 酶切电泳法筛选插入阳性菌落。

1.4 pBAHBs-Fab 载体的构建

1.4.1 pBAD/Lc 片段的制备 此片段是指 pBAD 启动子和 Lc 片段, 而非完整的轻链表达载体, 制备的目的是在 Fd 重链载体中再插入另外一个 pBAD 启动子和 Lc 片段, 形成双启动子、双肽定向表达的单载体结构。分别增菌 pBAD-Fd 和 pBAD-Lc 阳性克隆, Mini-prep 提取质粒 DNA, 用 pBAD-Lc 两端引物 (Forward: 5'-GAA TTC AAA CCA ATT GTC CAT ATT GC, Backward: 5'-TT AAC TCT AGA ACT ATG AAC) 扩增出 pBAD/Lc 片段。

1.4.2 pBAHBs-Fab 克隆 *Eco*R I 和 *Xba* I 分别酶切 pBAHBs-Fd 载体和 pBAD/Lc 扩增产物, 连接后转入感受态 TOP10 菌株供双重插入筛选。

1.5 pBAHBs-Fab 阳性克隆的筛选与鉴定

1.5.1 克隆载体的酶切鉴定 取转化菌落, LB 增菌过夜,

[基金项目] 上海市科委基金(004319208)。

[作者简介] 韩焕兴(1954-), 男(汉族), 硕士, 教授。

*Corresponding author. E-mail: hanhuanxing@sohu.com

常规法制备质粒 DNA, *Not* I 单酶切双重插入的载体, 以同样酶切无插入 pBAD 载体为对照, 琼脂糖电泳观察结果; *Xho* I 与 *Xba* I 双酶切, 用 Marker 显示电泳结果。

1.5.2 阳性克隆的诱导表达 取上述鉴定结果为正确插入的克隆, 增菌至 D_{600} 为 1.4, 加入终浓度为 0.02% 的阿拉伯糖诱导表达, 28~30℃ 过夜。次日, 按反复冻融法制备菌液上清, 10% 的 PAGE 经 Coomassia blue 染色显示。

1.5.3 Western 印迹和抗原特异 Dot 印迹鉴定抗-HBs Fab 的正确表达 PAGE 步骤同上, 电泳毕, 按半干转印法转印分离条带于硝酸纤维素膜上, 与 HRP 标记抗-Fab 反应后, 以 DAB 显色。

2 结果

2.1 Fd 与 λ 轻链的基因扩增 Fd 与 Lc 的基因长度约为 0.7 kb, pComb3 与 Fab 均为明确的结构, 因而引物设计与 PCR 针对性强, 图 1 示两条肽链基因的扩增结果。

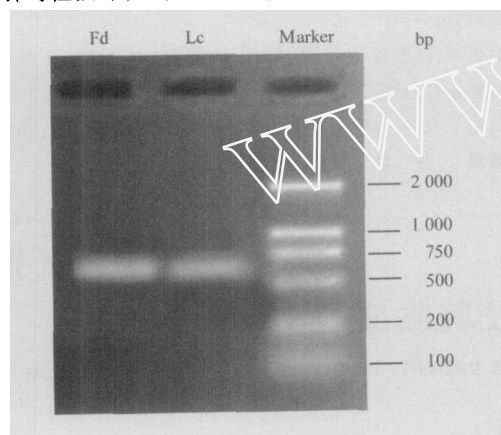


图 1 Fd 和 Lc 基因扩增

2.2 pBAD-单链克隆载体的鉴定 一次克隆后的 pBAHBs-Fd 与 pBAHBs-Lc 经酶切后电泳证实, 因载体与插入产物均为双酶切, 又是粘末端相连, 正确克隆的概率很高, 图 2 显示 Fd 与 Lc 的正确克隆。

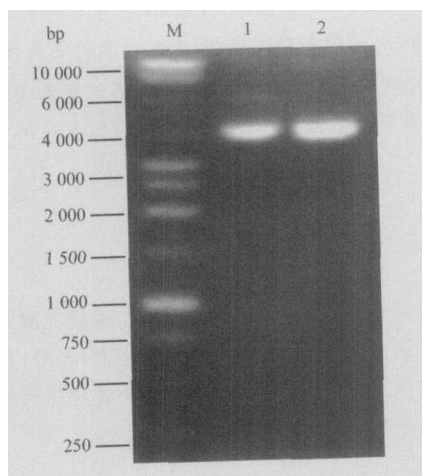


图 2 单链插入的 pBAD 载体
M: Marker; 1: Fd 插入; 2: Lc 插入

2.3 pBAHBs-Fab 的克隆与筛选 图 3 示 pBAD 启动子与 Lc 序列插入到 pBAHBs-Fd 后, 酶切质粒 DNA 的电泳结果, 两次插入后 pBAHBs-Fab 的全长近 6 kb, 插入与否极易鉴别。

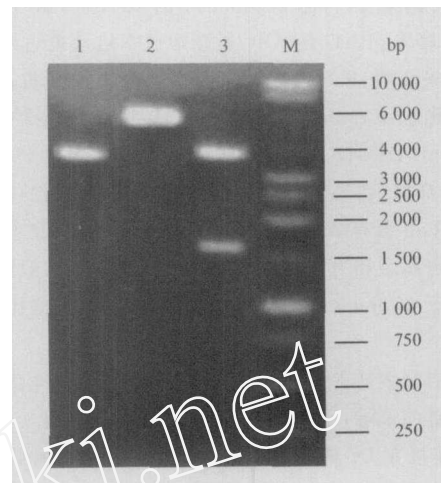


图 3 双链插入的 pBAD-Fab

M: Marker; 1: Fd 单链插入; 2: Fab 双链插入;
3: 双链插入载体的 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切

2.4 阳性克隆的阿拉伯糖诱导表达 Fd 与 Lc 在菌体内自行组装, 以二硫键连接。在进行双启动子双肽克隆后能否完成组装是一个重要环节。PAGE 结果显示, 表达的 Fab 相对分子质量近 50 000, 是 Fd 与 Lc 的相对分子质量之和, 表明已完成组装, 形成一完整的抗体片段。

2.5 表达产物的 Western 印迹检测 以酶标抗 Fab 显示, 证实在 PAGE 中相对分子质量近 50 000 处的区带确为 Fab。图 4 示 Western 印迹结果。

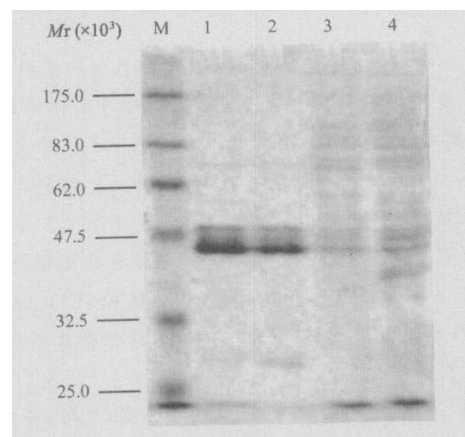


图 4 HBs Fab 表达产物的 Western 印迹

M: Marker; 1, 2: 纯化的蛋白; 3, 4: 阳性克隆表达上清

3 讨论

人源生物工程抗体片段的突出优势是临床应用, 所以高活性、高表达是关键所在, 只有达到上述效果的表达系统才有实际价值。原核表达抗体片段已有报道, 诸多研究表明用 *E. Coli* 的质周腔定向多肽表达能够满足 Fab 的活性要求, 双启动子表达、定向分泌亦能达到正确组装的目的, 但迄今

尚未有用作商品生产进展到临床应用的资料,其中表达系统的优化,使之更实用、更经济、更适于批量生产是关键。

pBAD 是原核表达系统中较理想的表达载体,本室经系列 PCR、克隆后,将原 pComb3 中的抗-HBs Fab 中的 Fd 与 Lc 基因移入 pBAD 载体中,重新形成双启动表达方式。初步实验结果表明,Fab 的表达量及活性都有明显提高,经济性也大大优于 pComb3 表达系统,已具备批量制备的条件。

在 pBAHBs-Fab 的克隆过程中,涉及 3 次 PCR、3 步克隆、3 次筛选,在理论上,PCR 过程中会有碱基的错配,重新克隆的 Fab 会有结构与活性上的差别,借助亲和力和筛选可作为选择更高亲和力和力株的手段。本研究制备的 pBAHBs-Fab 的活性优于 pComb3 表达产品,是否与此有关尚待比较测序加以证实。

双启动表达 Fd 和 Lc 肽链,Poly-His 亲和纯化标签可置任一条链的末端,Fab 组装后经离子螯合柱纯化。鉴于 Poly-His 是连接在 Lc 基因 C1 段的 C 末端,对 Fv 的结构与功能应不会造成影响。至于亲和标签置于哪一条链后效果最佳也待进一步研究。本研究应用 pBAD 载体克隆表达人源抗-HBs Fab 并获理想结果,小批量发酵表达量约每升数十毫克,初步亲和力和估测提示该系统表达的抗体片段有极佳活性^[6],上述研究均为临床应用与开发奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Samuel D. Management of hepatitis B in liver transplantation patients[J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24(Suppl):1:55-62.
 - [2] Di Paolo D, Tisone G, Piccolo P, et al. Low-dose hepatitis B immunoglobulin given "on demand" in combination with lamivudine; a highly cost-effective approach to prevent recurrent hepatitis B virus infection in the long-term follow-up after liver transplantation[J]. *Transplantation*, 2004, 77(8):1203-1208.
 - [3] Yan JP, Ko JH, Qi YP. Generation and characterization of a novel single-chain antibody fragment specific against human fibrin clots from phage display antibody library[J]. *Thromb Res*, 2004, 114(3):205-211.
 - [4] 韩焕兴, Burioni R, Plaisant P, 等. 人抗 HBs Ag 单克隆抗体组合文库的建立[J]. *中国免疫学杂志*, 1996, 12(5):299-302.
 - [5] 范列英, 韩焕兴, 胡东平, 等. 人源性抗 HBsAg 单克隆抗体 Fab 片段的制备及其纯化[J]. *第二军医大学学报*, 1997, 18(4):334-336.
 - [6] 韩焕兴, 陆慧琦, 安峰, 等. 生物工程人源抗-HBs Fab 的抗原特异亲和力简易测定[J]. *免疫学杂志*, 2003, 19(3):221-223.
- [收稿日期] 2004-07-23 [修回日期] 2004-10-15
[本文编辑] 曹静

• 临床研究 •

肾移植术后 110 例淋巴细胞表型的检测及其临床意义

Clinical significance of determining lymphocyte phenotype in patients received renal transplantation

李莉^{1*}, 齐隽², 李先兴³, 张明², 张玲珍¹, 刘玉杉², 孔宪涛¹

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 长征医院泌尿外科; 3. 长征医院器官移植中心)

[摘要] 目的:探讨监测肾移植患者淋巴细胞亚群变化的临床意义。方法:110 例选自首次尸肾移植,肾功能在术后 1 周内恢复,免疫抑制剂使用统一方案。抗凝外周血以 CD3/CD25、CD4/CD45RA、CD8/CD28 和 CD95/CD95L 单克隆抗体标记,流式细胞术(FCM)分析它们在淋巴细胞中表达的变化与患者移植后时间、环孢素谷值(CsA-LT)浓度、肌酐(Cr)浓度、患者年龄、性别和排斥发生等的关系。结果:肾功能稳定的受者 CD4⁺/CD45RA⁺、CD8⁺/CD28⁺、CD28、CD25 和 CD95L 随术后时间延长、年龄增加和 CsA-LT 增高而减低。术后 3.5 年以上、年龄大于 55 岁和 CsA-LT 大于 400 ng/ml 者与术后 1.5 年以内、年龄 30 岁以下和 CsA-LT 200 ng/ml 以下者相比差异显著($P < 0.05$)。CD95 表达随年龄的增加、术后时间的延长逐渐增多,随 CsA-LT 的增加逐渐下降($P < 0.05$)。结论:CD4⁺/CD45RA⁺、CD8⁺/CD28⁺、CD28、CD25 和 CD95L 表达降低,CD95 表达增加是肾移植患者免疫系统稳定的表现,结合患者年龄、术后时间、CsA-LT 和肾功能检查可以作为免疫抑制剂应用和排斥监测的简便、可靠指标。

[关键词] 肾移植;淋巴细胞表型;环孢素;肌酐;移植排斥

[中图分类号] R 692

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)12-1340-03

移植后个体化的合理用药是移植界一直期盼的梦想,遗憾的是至今没有成熟、合理、可行的公式或使用原则在临床推广。国内外目前在免疫抑制剂的使用方面仍存在相当大的盲目性,患者免疫功能的变化是免疫抑制剂与宿主免疫反应综合作用的最终结果,它准确地反映移植排斥发生的可能性、免疫抑制剂应用的有效性、是否需要、是否过量和能否长期使用。因此,患者的免疫功能状态应当是免疫抑制剂应用最理想的监测“窗口”。为了从复杂的免疫反应和免疫调节网

络中寻找并确立准确可行的依据标准,本研究测定了 110 例肾移植患者的部分外周血淋巴细胞(PBL)表型,并分析了与之相关的因素,希望能够得到一些对个体化用药具有指导意义的免疫学指标。

[基金项目] 国家自然科学基金(30371360)。

[作者简介] 李莉(1960-),女(汉族),博士,副研究员。

*Corresponding author. E-mail:annyli38@hotmail.com