

抗 HBsAg 单链 Fab 抗体基因酵母表达载体的构建^{*}

邓 宁¹, 粟宽源², 王章¹, 杨 林¹, 龙紫新¹

(1. 中山大学生物医药中心 // 生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 空军广州医院传染病研究中心, 广东 广州 510602)

摘 要: 采用重叠 PCR 技术, 以抗乙肝表面抗原 (HBsAg) IgG 铰链区基因为 Linker 将 Fab 抗体基因的重链和轻链连接起来, 构成单链 Fab 基因。通过测序鉴定, 克隆的单链 Fab 基因与理论上的完全一致, 并成功构建含完整单链 Fab 基因的毕赤酵母 (*P. pastoris*) 表达载体。

关键词: 重叠 PCR; 单链 Fab; 酵母表达载体; 载体构建

中图分类号: Q782 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 04-0067-03

近年来抗体工程技术得到了迅猛的发展, 各种人源性基因工程 Fab 抗体及小分子抗体的研制成功为制备特异性人源单克隆抗体提供了一种安全有效的途径。乙型肝炎病毒是一种危害人类最严重的病毒性传染病之一。人源性抗 HBsAg Fab 抗体不仅克服了异源性问题, 且穿透力极强, 具有较高的抗原特异性和亲和力。无论来源于单抗的 Fab、还是重组的 Fab 片段, 都具有全抗体相同的抗原结合活性, 且糖基对抗原抗体的结合没有影响^[1]。因此, 抗乙肝表面抗原的人源性抗体 (Fab) 在临床上有防治乙型肝炎病毒的应用前景, 如用于预防新生儿乙型肝炎病毒的垂直传播和制备治疗性乙肝疫苗等^[2]。本文采用从噬菌体抗体库筛选出来的人源性抗 HBsAg Fab 抗体基因^[3], 用抗 HBsAg IgG 铰链区基因为 Linker, 通过重叠 PCR 的方法将 Fab 的 L 链和 H 链融合起来成为单一的链, 即单链 Fab (Single chain Fab) 基因, 然后构建了含单链 Fab 基因的酵母表达载体。为进一步的研究抗 HBsAg Fab 的生物学特性及其表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和试剂

含抗 HBsAg Fab 基因的质粒 pCom 3H (噬菌体抗体库来源) 由空军医院肝病研究所提供; 酵母表达载体质粒 pPICZα-A 购自 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 Top10F' 本实验室保存; Vent DNA 聚合酶、dNTP 购自基因有限公司; 核酸相对分子质量 marker、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶等购自宝生物有限公

司; ZeocinTM 抗生素购自 Ivitrogen 公司; DNA 抽提纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。

1.2 引物设计及序列测定

根据引物的设计的一般原则, 设计出 Fab 基因 H、L 链的上下游引物。

H 链上游引物为 Primer1:

5'-CGGAATTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT-3',

下游引物为 Primer2:

5'-TGTCACAAGATTGGGCTGCTAGTTTGTGACAA
GATTGGG-3',

它同时与 Linker 上游互补。

L 链上游引物为 Primer3:

5'-CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGGAATTGTGT
TGACCCAG-3',

它同时与 Linker 下游互补。

下游引物为 Primer4:

5'-GCTCTAGACTAACACTCTCCCTGTGTA-3'。

序列测定由上海生工生物工程公司完成。

1.3 抗 HBsAg Fab 的 H、L 链基因的扩增及 H、L 链的融合

Fab H、L 链基因的扩增按照常规 PCR 法, 而将 H 链和 L 链基因融合成一条完整的链则参照文献 [4] 所述方法进行。

1.4 载体构建

参照文献 [5] 所述的方法进行。

1.5 表达载体鉴定

用 *Eco*RI 和 *Xba*I 双酶切鉴定 pPICZαA HL 表达载体。

* 收稿日期: 2002-01-22

基金项目: 广州市科委重点攻关资助项目 (97-Z-65-05)

作者简介: 邓宁 (1965-), 男, 副教授, E-mail: dengning2000@sina.com.cn

2 结 果

2.1 单链 Fab 基因克隆

以质粒 pComb 3H 为模板, 用引物 Primer1 和引物 Primer2 扩增的 Fab 抗体 H 链基因, 以质粒 pComb 3H 为模板用引物 Prime3 和 Primer4 扩增出 Fab 抗体的 L 链基因 (图 1), 以扩增出的 H、L 链为模板, 应用重叠 PCR 方法, 以抗 HBsAg IgG 铰链区为 Linker 将 Fab 的 H、L 链基因连接起来, 构成完整的单链 Fab 基因片段 (图 2)。序列测定结果与预期的序列相比, 除了 H 链的第 105 和第 304 位碱基发生同义突变外, 其余序列与原始序列完全一致。

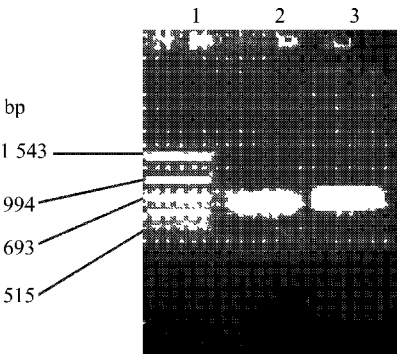


图 1 Fab 抗体 H 和 L 链基因的扩增
Fig. 1 The PCR amplification of H chain and L chain of anti-HBsAg Fab fragment
1 PCR 相对分子质量标记; 2 L 链; 3 H 链

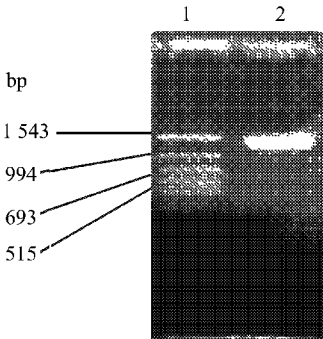


图 2 连接 Fab 抗体 H 和 L 链基因的重叠延伸 PCR
Fig. 2 The overlap PCR to connect H chain and L chain of anti-HBsAg Fab fragment
1 PCR 相对分子质量标记; 2 融合的单链 Fab 链

2.2 pPICZαA-HL 表达载体的构建

用 *EcoR*I 和 *Xba*I 双酶切单链 Fab 基因, 插入到载体质粒 pPICZαA 的 *EcoR*I 和 *Xba*I 的切口上构建成表达载体 pPICZαA-HL (图 3)。用 *EcoR*I 和 *Xba*I 双酶切构建的表达载体 pPICZαA-HL, 可得到一条大小与 pPICZαA 相同的片段及 1.4 kb

大小的单链 Fab 片段, 表明含完整单链 Fab 基因的表达载体质粒构建成功 (图 4)。

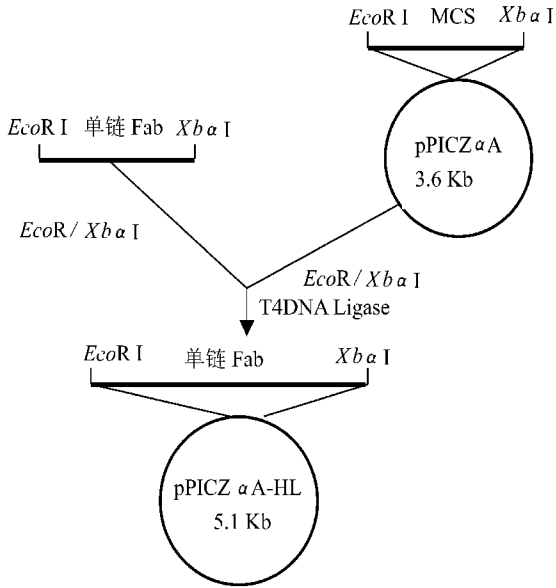


图 3 表达载体 pPICZαA-HL 的构建
Fig. 3 Construction of expression vector pPICZαA-HL

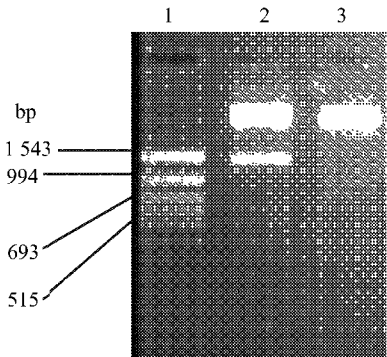


图 4 表达载体 pPICZαA-HL 的双酶切鉴定
Fig. 4 The characterization of pPICZαA-HL digested by *EcoR*I and *Xba*I
1 PCR 相对分子质量标记;
2 表达载体 pPICZαA-HL 的 *EcoR*I 和 *Xba*I 双酶切片段;
3 空载体 pPICZαA 的 *EcoR*I 和 *Xba*I 双酶切片段

3 讨 论

目前基因工程抗体的研究主要集中在 Fab 抗体和单链抗体的原核表达^[6]及动物细胞表达^[7]。原核表达多以包涵体的形式表达, 其变性复性非常繁琐, 得率极低; 由于复性不易形成天然构象, 抗原结合能力有很大的降低, 而且产物极不稳定。在动物细胞和昆虫细胞中也有表达^[7,8], 但表达量低, 且细胞培养成本高, 不适合大规模生产。甲醇酵母是一个理想的外源基因表达载体, 其表达的蛋白几

乎不含内毒素^[9], 它自身很少有蛋白分泌到培养上清中。其分泌外源蛋白的能力可达所有分泌蛋白的 90%以上, 在培养上清中稳定, 酵母可多拷贝表达, 其表达量是大肠杆菌的 100 倍以上^[10]。本文选用毕赤酵母系统的目的是尽量保持单链 Fab 抗体的免疫原性不变, 采用人源性抗 HBsAg IgG 铰链区基因作为 Linker, 将该 Fab 抗体的重链和轻链基因融合成单一链的单链 Fab 基因, 并插入到载体上, 构建单链 Fab 抗体基因表达载体为进一步研究其生物学特性和在酵母中高效表达奠定了基础。

参考文献:

[1] ZEBEDEE S L, BARBAS C F, HOM Y L, et al. Human combination antibody libraries to hepatitis B surface antigen [J] . J Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 3175—3179.

[2] WE YM, XU X H, HU D C, et al. Hepatitis B vaccine and anti HBs complex as approach for vaccine therapy[J] . Cancer, 1995, 16(3) : 155.

[3] 高辉, 高磊, 任宗玲, 等. 一株人源性抗 HBsAg 抗体 Fab 片段的筛选及序列分析[J] . 细胞与分子免疫学杂志, 1998, 14(2): 155—157.

[4] MELANI C, FIGIN M, NICASIA D, et al. Targeting of interleukin2 to human ovarian carcinoma by fusion with a single-chain Fv of antifolate receptor antibody[J] . Cancer Res, 1998, 58(18) : 4146—4154.

[5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第 2 版)[M] . 北京: 科学出版社, 1999.

[6] 毛春生, 宋宏彬, 李季枝, 等. 抗 HBsAg 抗体 Fab 段在大肠杆菌中的高效表达与复性[J] . 免疫学杂志, 1999, 15(4) : 229.

[7] 陈晓穗, 朱迎春, 王欲晓. 抗 HBsAg 人 IgG 表达载体的构建及其在 CHO 细胞中的表达[J] . 中国免疫学杂志, 2000, 16(5) : 248—251.

[8] KANG C Y. Baculovirus for expression of foreign genes[J] . Adv Virus Res, 1988, 35: 177.

[9] NOVICK P, FERRO S, SCHEKMAN R. Oder of evends in the yeast secretary pathway[J] . Cell, 1981, 25: 461—469.

[10] JANOWICZ Z A, MELBER K, MERKELBACH A, et al. Simultaneous expression of the S and L surface antigen of hepatitis B and fomation of mixed particle in methylotrophic yeast Hansenula polymorpha[J] . Yeast, 1999, 7: 431—433.

The Construction of Expression Vector of
Anti HBsAg Single Chain Fab Gene in *Pichia pastoris*

DENG Ning¹, SU Kuan yuan², YANG Lin¹, WANG Xun zhang¹, LONG Qing xin¹

(1. The Biopharmaceutical Center, Sun Yat sen(Zhongshan) University, Gunagzhou 510275, China;

2. The Infectious Disease Research Centrer, Guangzhou Air Force Hospital, Guangzhou 510602, China)

Abstract: The H chain and L chain gene of anti HBsAg fab were connected to construct single chain fab gene using overlap PCR techniques. The sequence of the single chain Fab gene in the vector was the same as the designed one's. The single chain Fab gene was successfully constructed into expression vector.

Key words: overlap PCR; single chain Fab; yeast vector system; construction of vector