

华夏英才基金学术文库

重 组 抗 体

沈倍奋 陈志南 刘民培 主编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

重组抗体技术使制备人源化抗体和人源抗体成为可能,而这是其他常规的多克隆或单克隆抗体制备方法所不可能做到的。本书共分为 22 章,向读者介绍了四个方面的技术:抗体库技术,包括组合抗体库、噬菌体抗体库、细菌和酵母展示的抗体库、核糖体展示的抗体库及其抗体库的筛选技术;重组抗体基因的改造和表达,包括抗体亲和力成熟、抗体人源化改造和稳定性改造,以及抗体基因在原核、酵母、昆虫、哺乳动物细胞、植物及转基因动物中的表达;重组抗体效应功能的提高,涉及抗体与同位素、药物、毒素结合的“导向药物”、双特异性抗体、抗体-酶融合蛋白、免疫细胞因子及细胞内抗体;抗体特异性分析和鉴定,主要介绍抗体的分离和纯化、抗体标记技术、抗体亲和力测定、抗体的抗原表位分析、抗体基因测序和结构模建,以及常用的抗体鉴定技术,如 ELISA、免疫组化、FACS 分析、免疫沉淀和 Western blot 等。

本书涵盖了当前重组抗体制备和改造中的大部分技术,因此对从事抗体研制的技术人员、生物技术公司及有关专业的大专院校师生均有一定参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

重组抗体/沈倍奋,陈志南,刘民培主编.—北京:科学出版社,2005
(华夏英才基金学术文库)

ISBN 7-03-014638-7

I. 重… II. ①沈…②陈…③刘… III. 抗体-重组-研究 IV. R392.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 134455 号

责任编辑:莫结胜 彭克里 席 慧 / 责任校对:包志虹

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 5 月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2005 年 5 月第一次印刷 印张:36 3/4 插页:2

印数:1—3 000 字数:723 000

定价:67.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

《重组抗体》编委会

主 编 沈倍奋 陈志南 刘民培

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

包国强 陈 伟 董红霖 冯健男 冯 强

郭 宁 韩 骅 蒋建利 黎 燕 李 玲

李学彦 李亚雄 李 郁 梁米芳 刘雪梅

刘志刚 米 力 蹇爱荣 秦卫松 商 澎

邵宁生 孙志伟 王骊丽 王贤辉 解志刚

邢金良 杨 勇 于继云 于清宏 张思河

前 言

抗体是机体防御系统的重要分子,用于识别和清除外来入侵物。为了尽可能地与各种外来物发生相互作用,免疫系统需要产生无数种特异性的抗体分子。不同抗体的全套遗传信息被储存在淋巴系统的 B 细胞中。1975 年杂交瘤技术问世,人们能够制备具有很好特异性的单克隆抗体,但这些抗体在用于人类疾病治疗时,由于单抗的异源性,会产生人抗鼠抗体反应(HAMA),同时由于抗体分子大,较难穿透血管屏障达到靶部位,而且抗体本身的效应功能有限,往往不能达到预期的杀伤靶细胞的目的。

在过去的十多年中,分子生物学的进展大大促进了抗体片段的基因操作——重组、鉴定、连接。重组抗体的基因操作不仅加深了人们对免疫球蛋白结构和功能的理解,而且通过基因融合、基因突变、重组基因表达发展了大量可用于研究、诊断和治疗的工程抗体,特别是加速了人源化抗体和人源抗体的开发,同时通过基因操作可以获得常规技术不能得到的抗体形式,使之更适合于治疗和体内诊断。到 2004 年初经美国 FDA 批准的抗体药物已有 17 种,其中 80% 是重组抗体。目前正在进行临床试验的抗体药物有几百种,因此重组抗体作为药物有很广阔的前景。

本书介绍了当前重组抗体研究领域中的主要技术及发展趋势,包括抗体基因克隆,抗体库构建和筛选,抗体人源化改造和稳定性改造,抗体亲和力成熟,抗体效应功能提高及与抗体分析、鉴定等相关的技术,如抗原表位分析、抗体结构建模、抗体标记等,使人们对重组抗体的认识进一步深入。由于参与本书编写的人员较多,各部分在风格上不尽统一,有时同一目标可以用不同的方法,本书尽量采用常用可行的方法,有些地方为了方法的连续性,难免有些重复。我们的初衷是想提供一本既有一定理论,又有较强操作性的书,但重组抗体技术发展十分迅速,概念、理论和方法都在不断更新,难免有所遗漏。

本书在编写过程中得到了很多同志的支持和帮助,在此表示衷心感谢。感谢华夏英才基金资助本书的出版,感谢冯健男教授、秦卫松博士和郝付因在插图的收集和全书的审校上所做的大量工作。由于编者水平所限,本书可能存在疏漏和错误之处,恳切希望读者和同道们指正。

作 者
2004 年 8 月

目 录

前言

绪论	1
第一节 抗体分子的结构与功能	1
第二节 抗体多样性产生的分子机制	5
第三节 重组抗体的发展概况	14
主要参考文献	17
第一章 抗体基因的克隆	18
第一节 杂交瘤或脾细胞中抗体基因或片段的 PCR 克隆	18
第二节 二步克隆法	32
第三节 抗体基因的 RACE 克隆法	42
主要参考文献	48
第二章 组合抗体库	51
第一节 生物来源的抗体库	51
第二节 半合成抗体库	63
第三节 全合成抗体库	72
主要参考文献	85
第三章 天然噬菌体抗体库构建和筛选技术	88
第一节 天然噬菌体抗体库概述	88
第二节 噬菌体表面展示系统	90
第三节 选择感染性噬菌体与双向选择系统	93
第四节 Cre-LoxP 基因重组系统和高容量抗体库	94
第五节 高效噬菌体抗体与抗体库的高效选择	95
第六节 噬菌体表面展示与高亲和力抗体	96
第七节 天然噬菌体抗体库构建和筛选的实验方法	97
主要参考文献	116
第四章 核糖体展示技术	118
第一节 核糖体展示原理及特点	118
第二节 核糖体展示的抗体库类型及构建	126
第三节 核糖体展示技术具体操作实例	136
主要参考文献	141

第五章 其他展示技术用于抗体库的构建	144
第一节 细菌表面展示技术	144
第二节 酵母展示技术	155
第三节 质粒展示技术	168
主要参考文献	174
第六章 抗体库的筛选	177
第一节 概述	177
第二节 抗体库的经典筛选法	179
第三节 细胞筛选法	186
第四节 组织筛选法	190
第五节 体内筛选法	191
第六节 蛋白质芯片筛选法	193
第七节 选择性感染筛选抗体库	194
第八节 结语	195
主要参考文献	196
第七章 抗体亲和力成熟	199
第一节 利用链置换和定点突变提高抗体亲和力	199
第二节 CDR 步移法提高抗体亲和力和特异性	212
第三节 结语	215
主要参考文献	215
第八章 抗体人源化改造	217
第一节 概述	217
第二节 嵌合抗体	217
第三节 人源化抗体	222
主要参考文献	242
第九章 重组抗体的稳定性改造	246
第一节 概述	246
第二节 重组抗体的稳定策略	246
第三节 dsFv 的设计、构建和表达	249
第四节 重组抗体及其融合蛋白的表达	250
第五节 细菌包含体内重组抗体的纯化及复性	250
主要参考文献	253
第十章 抗体表达	255
第一节 原核表达	255
第二节 哺乳动物细胞表达	259
第三节 酵母表达	270

第四节	昆虫表达	277
第五节	植物表达	282
第六节	转基因动物表达	288
	主要参考文献	292
第十一章	转基因小鼠产生人源抗体	295
第一节	概述	295
第二节	小鼠操作的一般规则	296
第三节	小鼠抗体基因的敲除	300
第四节	人 Ig 转基因小鼠的建立	314
	主要参考文献	320
第十二章	免疫结合物	321
第一节	抗体-放射性核素结合物	321
第二节	抗体-化疗药物结合物	325
第三节	免疫毒素	330
第四节	酶前体药物	333
	主要参考文献	339
第十三章	双特异性抗体	342
第一节	化学工程 BsAb	342
第二节	细胞工程 BsAb	344
第三节	基因工程 BsAb	347
第四节	双特异性抗体在肿瘤诊断和治疗中的应用	354
第五节	结语	357
	主要参考文献	357
第十四章	抗体融合蛋白	359
第一节	概述	359
第二节	抗体-酶融合蛋白	359
第三节	抗体融合蛋白用于基因靶向性传递	363
第四节	发展前景	369
第五节	结语	369
	主要参考文献	370
第十五章	免疫细胞因子	372
第一节	免疫细胞因子的发展背景	372
第二节	免疫细胞因子的构建策略	373
第三节	抗体-细胞因子融合蛋白的表达系统	380
第四节	几种类型的免疫细胞因子	382
第五节	免疫细胞因子的构建及表达的操作方案	388

第六节 结语	395
主要参考文献	396
第十六章 细胞内抗体	397
第一节 概述	397
第二节 单链抗体在细胞内不同部位表达的载体	397
第三节 scFv 片段在细胞内不同部位的表达	399
第四节 实验方案	399
主要参考文献	405
第十七章 抗体的分离和纯化	406
第一节 概述	406
第二节 盐析	407
第三节 离子交换层析法	412
第四节 亲和层析法	418
主要参考文献	426
第十八章 抗体标记	430
第一节 酶标记技术	430
第二节 荧光素标记技术	435
第三节 放射性核素标记技术	442
主要参考文献	451
第十九章 抗体亲和力测定	452
第一节 概述	452
第二节 电泳条带迁移法	452
第三节 竞争 ELISA 法	456
第四节 表面等离子共振法	457
第五节 噬菌体抗体片段亲和力的石英晶体微天平测定法	459
主要参考文献	462
第二十章 抗体的抗原表位分析	464
第一节 用 SPOT 法合成的肽定位抗原表位	464
第二节 随机肽库定位抗原的表位	470
第三节 用基因片段文库定位抗原表位	477
主要参考文献	486
第二十一章 抗体基因测序和结构模建	487
第一节 抗体基因测序	487
第二节 抗体结构模建	493
主要参考文献	509

第二十二章 抗体鉴定技术	510
第一节 ELISA	510
第二节 免疫组织化学	516
第三节 流式细胞术	529
第四节 免疫沉淀	536
第五节 蛋白质印迹	543
主要参考文献	555
附录 1 常用的数据	557
附录 2 试剂	560

绪 论

抗体是体液免疫应答的主要效应分子,存在于血液和组织液中。它们能特异性结合或识别入侵的病原微生物,因此构成机体防御系统的重要组成部分。具有抗体活性或化学结构上与抗体相似的球蛋白称为免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)。抗体属于蛋白质,它具有蛋白质的一般性质,即不耐热,能被多种蛋白酶水解,蛋白质变性剂亦能使抗体失活。

第一节 抗体分子的结构与功能

一、抗体分子的基本结构

所有抗体分子都有相似的结构,都由两条相同的重链(heavy chain, H 链)和两条相同的轻链(light chain, L 链)组成 4 条肽链的对称结构,轻、重链链内和链间分别借助二硫键相连(图 0-1)。轻链分子质量约 25kDa,而重链分子质量为 50kDa 左右。轻链有两个型:kappa (κ)链和 lambda (λ)链。一个抗体分子只能具有两型轻链中的一种,它们的比例在不同物种是不同的,小鼠抗体的 κ/λ 是 20/1,而人抗体中该比例为 2/1。重链有五类: μ 、 δ 、 γ 、 α 、 ϵ 链。五类重链决定了抗体的类别(class):IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。其中有些类别还可再分亚类,例如,人 IgG 有四个亚类:IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄; IgA 有两个亚类:IgA₁ 和 IgA₂。小鼠 IgG 也有四个亚类:IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b} 和 IgG₃。

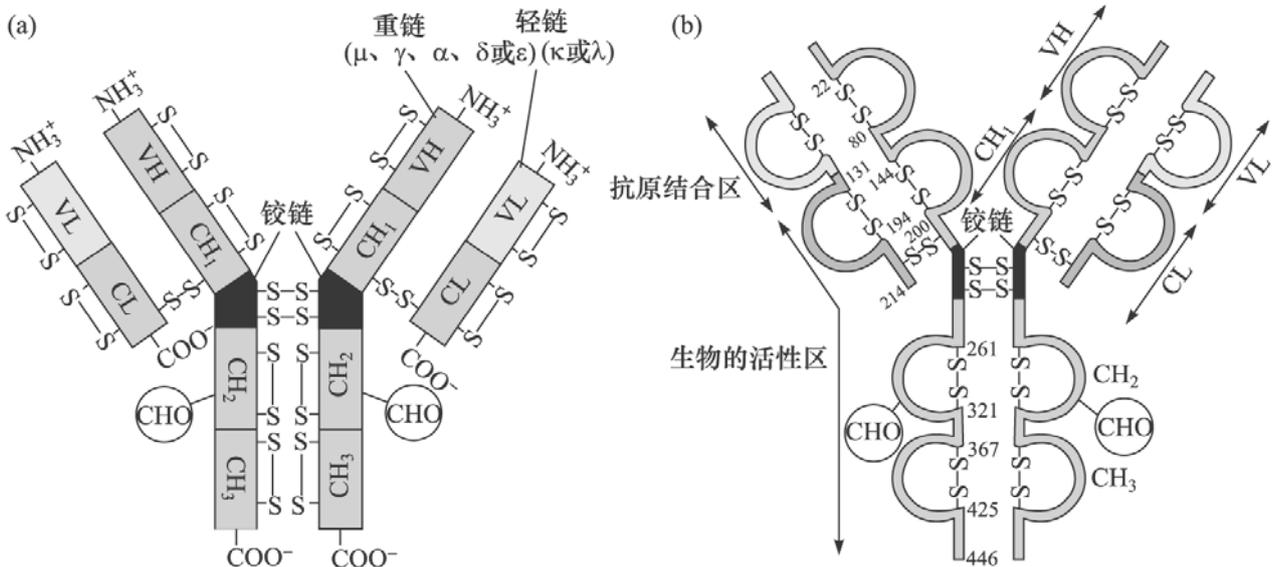


图 0-1 抗体分子结构

二、抗体分子的精细结构

分析抗体分子的氨基酸序列后发现:肽链在氨基端序列变化很大,而其余部分变化不大,因此,将变化大的区域称为轻链或重链可变区,它们占轻链的 1/2、重链的 1/4;肽链上变化不大的区域称为轻链或重链恒定区,恒定区占轻链的 1/2、重链的 3/4(图 0-1)。它们的氨基酸数量、种类、排列顺序及含糖量都比较恒定,同一物种、同一类别的 Ig 恒定区氨基酸只有少数差别,但不同物种或不同类别的 Ig 则差别很大。可变区与抗原识别有关,决定抗体识别的特异性,而恒定区参与免疫应答,具有许多重要的生物学功能。

轻、重链可变区分别由 110 个左右氨基酸组成,其中有些区域的氨基酸残基变化较可变区的其他部位更大,如轻链第 24~34、50~56、89~97 位和重链第 31~35、50~65、95~102 位。这些区域称为高变区(hypervariable region, HVR),由于高变区是抗体与抗原表位直接接触的部位,因此又称为互补决定区(complementarity-determining region, CDR)。可变区中的非高变区,其氨基酸组成与序列变化相对较少,这些氨基酸残基组成可变区稳定的立体结构,即框架结构或支架结构(framework region, FR),它们夹持着 CDR,可变区的 3 个 CDR 分别被 FR1、FR2、FR3、FR4 隔开。根据 Kabat 库的资料,抗体分子各区段的氨基酸编号见表 0-1。

表 0-1 抗体分子轻、重链可变区氨基酸顺序的编号

V 区	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
H	1~30	31~35	36~49	50~65	66~94	95~102	103~113
L	1~23	24~34	35~49	50~56	57~88	89~97	98~107

抗体的 4 条肽链中,不管是可变区还是恒定区都由折叠的球状结构域(domain)组成,每个结构域约由 110 个氨基酸残基组成。除了可变区外,IgG、IgA、IgD 的重链恒定区均由 3 个球状结构域组成,分别为 CH₁、CH₂、CH₃;IgM 和 IgE 重链恒定区由 4 个球状结构域组成,即多一个 CH₄。各结构域的功能不同,一般 CH₁ 是遗传标志所在区,CH₂ 是补体结合位点所在区,CH₃ 能与细胞表面的 Fc 受体结合,行使抗体的功能。各类人免疫球蛋白的特性见表 0-2。

在重链 CH₁ 尾部和 CH₂ 头部,位于 209~240 位,有一个约 30 个氨基酸残基组成的柔性的铰链区(hinge region),其中脯氨酸含量较高,并有 2~5 个链间二硫键。铰链区的主要功能是调节抗体可变区上抗原结合部位与相应的抗原表位匹配,促进抗原-抗体结合,此外也有利于 Ig 分子构象变化,暴露补体结合位点。至此,完整抗体分子结构如图 0-1 所示。

表 0-2 各类人免疫球蛋白的特性

Ig 类别	分子质量 /kDa	正常血清水平 / (mg/ml)	体内半寿期/天	激活经典补体途径	通过胎盘	成熟 B 细胞膜上	结合吞噬细胞的 Fc 受体	黏膜转运	诱导肥大细胞脱颗粒
IgG ₁	150	9.0	23	+	+	-	++	-	-
IgG ₂	150	3.0	23	+/-	+/-	-	+/-	-	-
IgG ₃	150	1.0	8	++	+	-	++	-	-
IgG ₄	150	0.5	23	-	+	-	+	-	-
IgA ₁	150~600	3.0	6	-	-	-	-	++	-
IgA ₂	150~600	0.5	6	-	-	-	-	++	-
IgM	900	1.5	5	+++	-	+	?	+	-
IgE	190	0.0003	2.5	-	-	-	-	-	+
IgD	150	0.03	3	-	-	+	-	-	-

在研究抗体分子结构的过程中发现有些部位很容易被蛋白酶水解。已知木瓜蛋白酶在一定条件下可将 IgG 裂解成 3 个单独的片段,其中 2 个片段完全相同,分子质量约 45kDa,由带轻链的重链 VH-CH₁ 片段组成,这些片段仍具有结合抗原的能力,称为抗原结合片段(即 Fab)。第三个片段含有 γ 重链的 CH₂ 和 CH₃,该片段由于较易被结晶,因此称为结晶片段(即 Fc)。用胃蛋白酶代替木瓜蛋白酶裂解 IgG 分子,在 CH₂ 区域被切断,产生一个大片段和一些小片段。大片段由两个 Fab 和连接的铰链区组成,是双价的,能同时结合两个表位,因而能起沉淀和凝集反应。

三、抗体分子的立体构型

各类 Ig 的 X 射线晶体衍射分析显示,其分子的折叠基本相似。免疫球蛋白的结构域折叠成一种特有的紧密的结构称为免疫球蛋白折叠(immunoglobulin

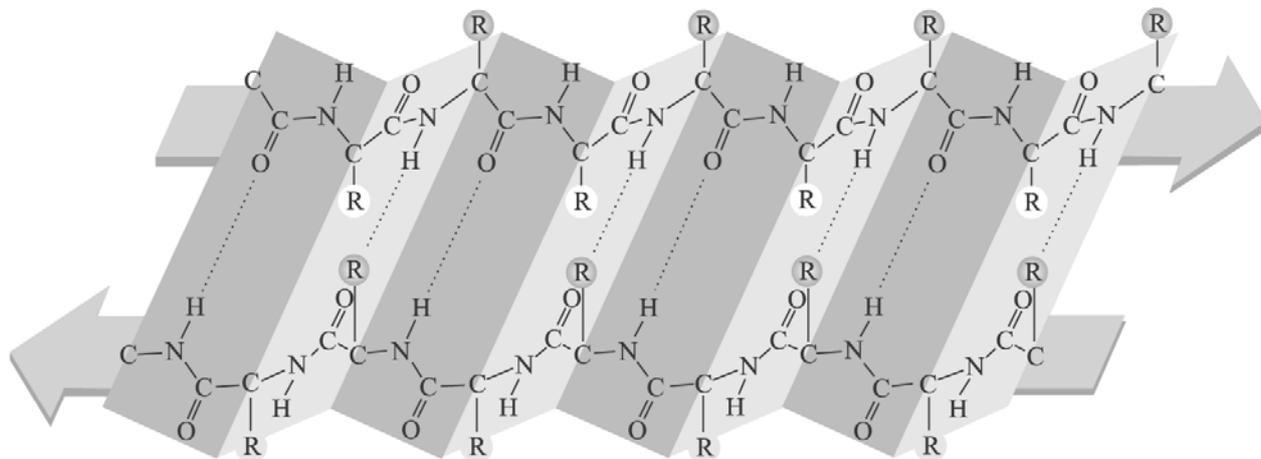


图 0-2 β 片层结构

免疫球蛋白多肽链来回折叠成多股,属于 β 折叠结构,其走向与分子结构的长轴平行,相邻的两条 β 链为反向平行,形成 β 片层, β 链间由氢键相连,氨基酸侧基垂直于片层平面

fold)。这种结构由两个 β 折叠片层(β -sheet)组成,每个片层含有反向平行的 β 链,它们由不同长度的 loop 相连,片层内部的 β 链通过氢键将一个链上的氨基与相邻链的羧基相连,此外亲水性氨基酸与疏水性氨基酸交替排列于片层平面的垂直方向。疏水性氨基酸向内,亲水性氨基酸向外。两个 β 片层间通过疏水相互作用和二硫键稳定(图 0-2 和图 0-3)。

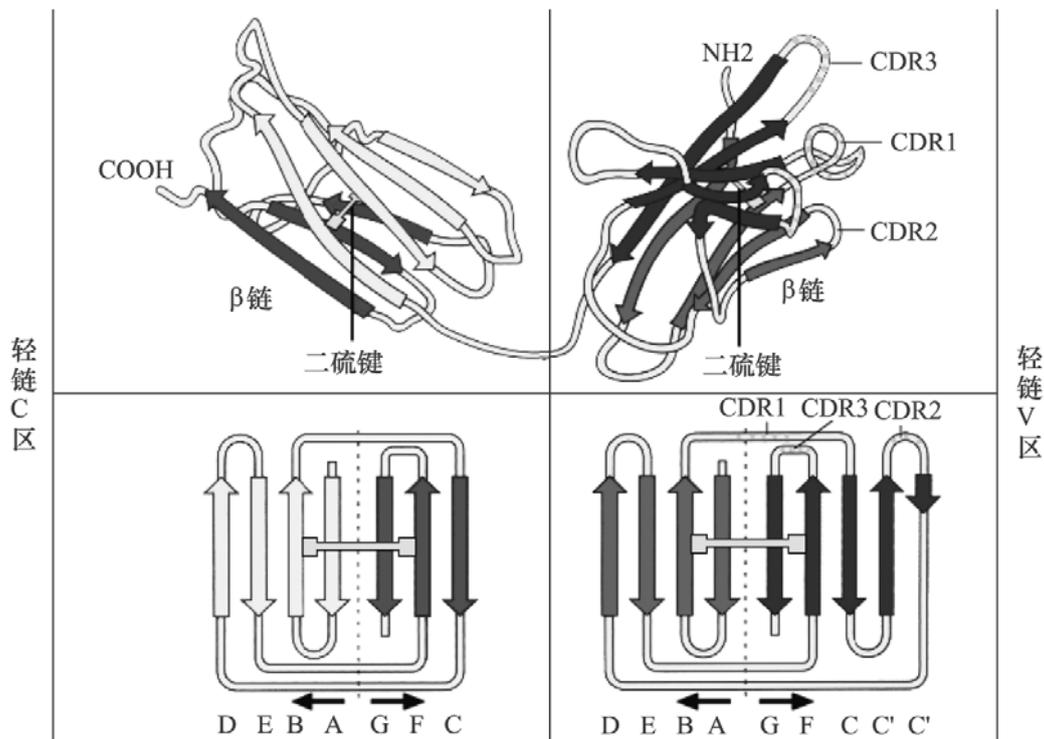


图 0-3 免疫球蛋白轻链可变区和恒定区的折叠图

每个结构域由两个 β 片层经链内疏水相互作用和二硫键联系在一起。组成每个片层的 β 链显示不同灰度的颜色。其中高变区为 CDR1、CDR2、CDR3(图上半部), β 片层打开后的单个 β 链和连接环(joining loop)间的关系显示在图的下半部分,可见,可变区较恒定区多两条 β 链

四、抗体分子介导的效应功能

当外来的病原微生物入侵机体,机体产生相应的抗体,只有在少数情况下抗体与抗原结合后,可对机体直接提供保护作用,如中和毒素或病毒。前者是通过阻断毒素与敏感宿主细胞表面的受体结合,或封闭毒素的活性部位,使其不能发挥毒性作用;后者是阻止病毒吸附于易感靶细胞上,而降低病毒的传染性。但大多数情况下需要调动机体的效应功能去清除和杀死病原体,一般当抗体的可变区结合抗原时,重链恒定区与其他蛋白质、细胞或组织相互作用,产生体液反应的效应功能,并非所有类型的抗体都有同样的效应功能。抗体分子介导的效应功能大都是通过 Fc 段引起的,因此它与抗体的类及亚类有关。现将抗体的主要效应功能做一介绍。

(一) 调理作用(opsonization)

IgG 类抗体与颗粒性抗原(如细菌)结合后,其 Fc 段与吞噬细胞,如巨噬细胞、嗜中性粒细胞表面的 Fc 受体(FcR)结合,促进吞噬细胞对抗原的吞噬作用。单个 FcR 和单个抗体的 Fc 相互作用是非常弱的,几个抗体的 Fc 与同一个靶细胞同时结合,则产生非常强的相互作用,引发一系列信号通路的激活,使抗原-抗体复合物被吞噬。

(二) 激活补体

人类的 IgM 和大部分 IgG 抗体亚类(IgG₁、IgG₂、IgG₃)能通过经典途径激活补体,在 IgG 中结合补体的能力依次为 IgG₃ > IgG₁ > IgG₂ > IgG₄,实际上后两者激活补体的能力很弱。抗体只有与抗原结合成复合物后才能有效地激活补体,当抗原抗体结合后,抗体铰链区发生构型改变,使 Fc 段的补体结合部位暴露,补体成分 C1 与之结合,并被激活,导致补体其他成分,如 C1r、C1s、C4、C2 的连续激活,形成具有酶活性的 C3 转化酶,后者进一步酶解 C3 并形成 C5 转化酶,裂解 C5,然后开始通过 C6、C7、C8、C9 的序贯结合形成攻膜复合体(membrane attack complex, MAC)。补体激活后产生多种生物效应:细胞裂解、免疫黏附及调理作用、促进炎症反应和免疫调节作用。

(三) 抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)

抗体与靶细胞表面的抗原结合后,可通过其 Fc 段与巨噬细胞和 NK 细胞、中性粒细胞等细胞膜上带有 FcγR 的杀伤细胞相结合,由 FcγR 传递激活信号,通过这些激活的细胞释放 TNF、IFN-γ 等细胞因子,促进对靶细胞的杀伤作用。其中以 NK 细胞为主,它带有 FcγRIII,这是一种低亲和力受体,只能与结合于细胞表面抗原的 IgG 结合,不能结合循环中的单体 IgG。

第二节 抗体多样性产生的分子机制

人和小鼠编码抗体重链和 κ、λ 轻链的基因位于不同的染色体上,见表 0-3。

表 0-3 人和小鼠抗体基因的染色体定位

基因	重链	κ 轻链	λ 轻链
人	14q32	2p12	22q11
鼠	12F1	6c2	16

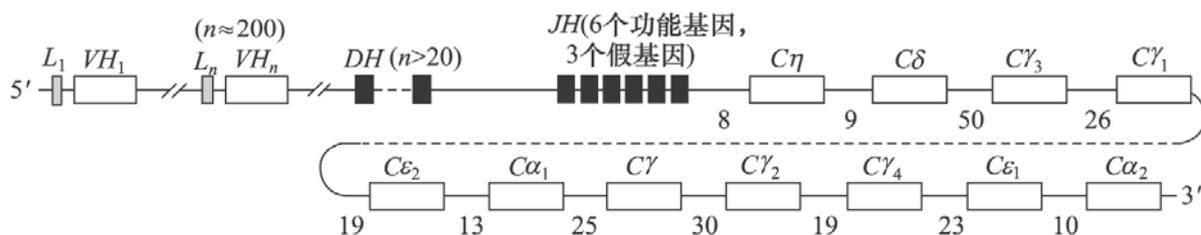
一、重链基因组、 κ 轻链基因组和 λ 轻链基因组结构

人重链基因组包括:先导序列基因(leader sequence, L)、可变区基因(variable region, VH)、多样性基因(diversity, D)、连接基因(joining, JH)和恒定区基因(constant region, CH)。它们之间被非编码的 DNA 隔开(图 0-4)。每个 VH 基因片段的 5'端有两个 L 基因,它们分别编码先导肽 N 端约 15 或 16 个氨基酸和 C 端 4 个氨基酸。先导肽的主要功能是引导重链穿越内质网,进入内质网腔,穿膜后先导肽被酶水解。人重链基因组中有百余个 VH 基因片段,共分 7 个亚群,其中无功能的假基因(pseudogene)占 $1/2 \sim 2/3$;具有可读框(open reading frame, ORF)能进行重排、转录和表达的功能性 VH 基因片段约 50 个左右。人的 D 基因片段接在 VH 基因片段之后,在 JH 基因群的 5'端,其特点是序列和长度多变。 D 基因片段编码 5~9 个氨基酸,人类约有 30 个功能性 D 基因片段。Ig 基因重排时 DH 与 JH 首先重组,再进行 $VH-DH-JH$ 重组。 $VH-DH$ 连接处、 D 基因片段及 $DH-JH$ 连接处编码的肽段构成 VH 的 CDR3。人类有 9 个 JH 基因片段,其中 3 个为假基因,6 个是有功能的,编码 15~17 个氨基酸,构成 VH 的 FR4。恒定区基因片段位于 JH 基因的 3'端,但它们之间有约 1000 多个碱基的间隔,其中有增强子等调控元件。人类有 11 个恒定区基因,其中 2 个为假基因,9 个功能性 C 基因,从 5'端起为 μ 、 δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 、 $\alpha 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 4$ 、 ϵ 及 $\alpha 2$ 。除 δ 基因外,其他 8 个基因的 5'端都有一段非编码的特殊序列,称为转换区(switch region, S), S 区是重组酶识别的部位,在 Ig 的类别转换中起重要作用。每个恒定区基因由 4~6 个外显子组成,它们分别编码相应的恒定区功能域。

人类 κ 轻链基因组由 3 个分离的基因片段组成,即 $V\kappa$ 、 $J\kappa$ 和 $C\kappa$ 基因(图 0-4)。 $V\kappa$ 基因编码 κ 轻链可变区 1~95 位氨基酸,在基因组上约有 80 个左右,其中约 40~50 个 $V\kappa$ 基因是有功能的。 $J\kappa$ 基因片段有 5 个,恒定区 $C\kappa$ 基因为 1 个。 $V\kappa$ 与 $J\kappa$ 基因片段重组后编码 κ 链可变区,其中第 26~32、48~55 位氨基酸为 CDR1 及 CDR2 区, $V\kappa$ 与 $J\kappa$ 基因连接处编码 CDR3。 $J\kappa$ 与 $C\kappa$ 基因间也有增强子序列。

人类 λ 轻链也有 3 个基因编码,即 $V\lambda$ 、 $J\lambda$ 和 $C\lambda$ (图 0-4)。 λ 轻链基因的结构与 κ 链不同,具有多个 $C\lambda$ 恒定区基因,每个 $C\lambda$ 基因有其自己的 J 基因片段,形成 $J-C$ 结构, $J\lambda$ 和 $C\lambda$ 之间有插入序列,这种 $J\lambda-C\lambda$ 结构共 7 个,其中 4 个有转录功能。根据测序结果发现有百余个 $V\lambda$ 基因,但只有 30 多个为功能性基因,共分 10 个亚群,其余均为假基因。 $V\lambda$ 与 $J\lambda$ 重组后形成有功能的 λ 轻链基因,它们编码的功能区与 $V\kappa$ 相似,有 CDR1、CDR2 及 CDR3。

重链定位于14号染色体



κ 链定位于2号染色体



λ 链定位于22号染色体

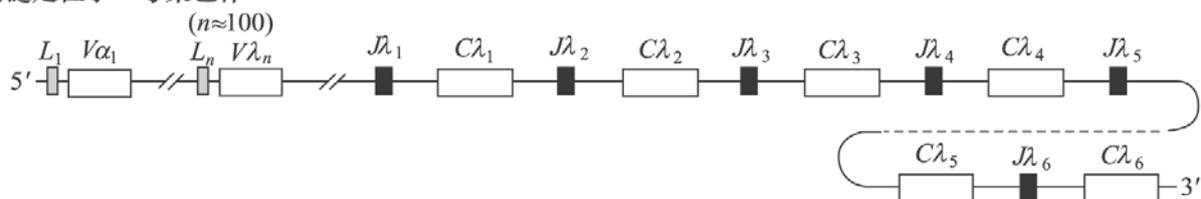


图 0-4 人 Ig 重链、轻链基因结构

二、抗体基因片段的重排及其机制

所有细胞的胚系基因组中都有 Ig 基因,但只有骨髓干细胞向 B 淋巴细胞方向分化成熟时,才发生免疫球蛋白基因的重排,使在不同染色体上的、由非编码序列隔开的 V、D、J 基因片段组合在一起,成为有功能的基因,编码抗体的不同功能域。

(一) 可变区基因重排

在 B 细胞发育过程中重链可变区基因首先重排,然后是轻链可变区基因。最后每个 B 细胞只含有一个功能性重链可变区 DNA 序列和一个轻链可变区 DNA 序列,每个这样的 B 细胞产生一种特异性抗体。重链可变区基因重排包括两个独立的过程,首先是 D-J 重排,一个 D 基因片段与一个 JH 基因连接起来,然后进行 V-DJ 重排(图 0-5),重排的基因编码完整的重链可变区。

轻链可变区基因由 V-J 重排完成,任何一个 Vκ 或 Vλ 基因与某个 Jκ 或 Jλ 基因经基因重排连在一起,成为有功能的可变区基因(图 0-5),编码轻链可变区。

(二) 可变区基因重排的机制

免疫球蛋白基因重排是通过一组酶的催化作用而完成,这一过程包括:识别重组信号、切断以及修复 DNA 等。在每个胚系 V、D 和 J 基因片段的两侧存在独特的重组信号序列(recombination signal sequence, RSS)。V 基因的 3'端、J 基因的

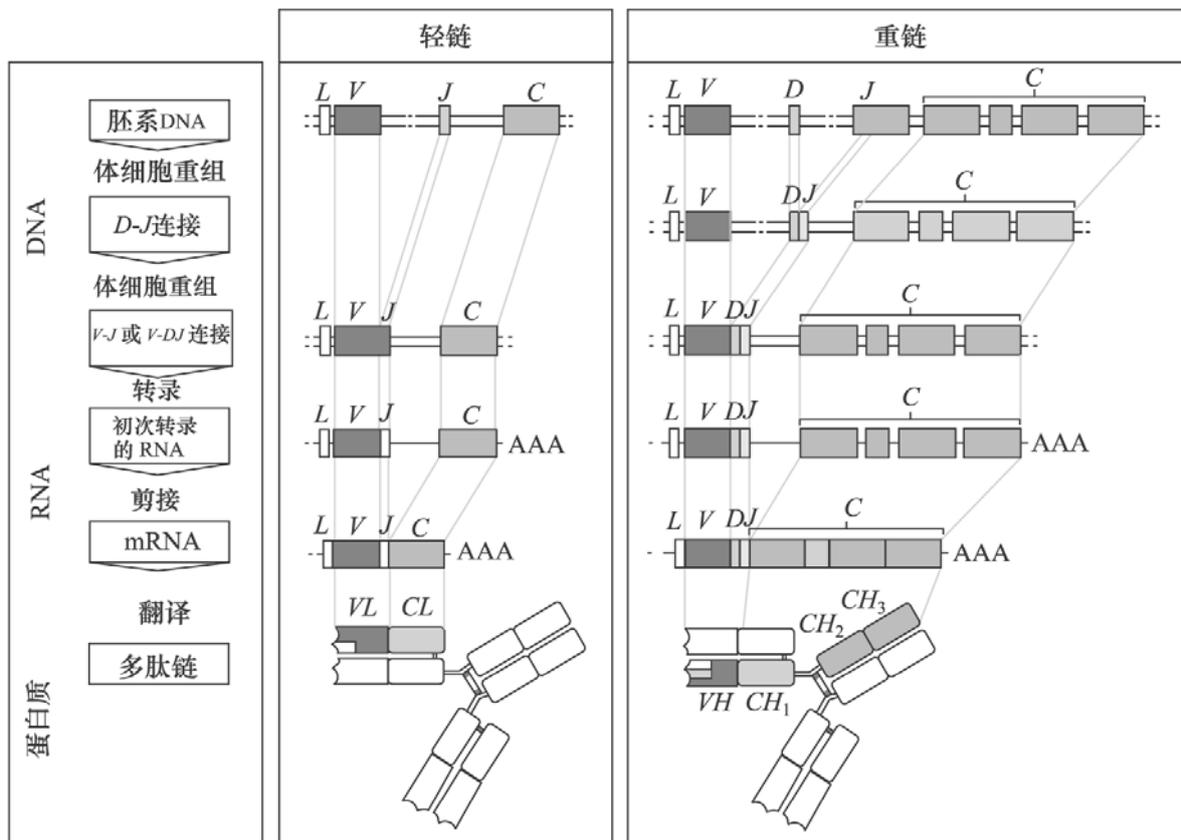


图 0-5 免疫球蛋白重、轻链基因重排

5'端和 *D* 基因的两侧都有 RSS 信号,每个 RSS 包括一个七核苷酸的七聚体(heptamer)和一个富含 AT 的九核苷酸的九聚体(nanomer),其序列分别为[CA-CAGTG]和[ACAAAACC],七聚体和九聚体之间是一段非保守序列,即 12bp 或 23bp 的间隔序列(spacer)。插入的 12bp 和 23bp 序列分别相当于 DNA 螺旋的一个回转和两个回转,所以也称它们为 one-turn 和 two-turn[图 0-6(a)]。这种“七聚体-间隔序列-九聚体”的结构就称为重组信号序列。在重组酶作用下,带有 12bp 间隔序列 RSS 的基因片段只能与带有 23bp 间隔序列的片段相结合,这种现象称为“12-23”规则,它保证了片段的正确连接。

在重链 *VH* 片段 3'端和 *JH* 片段 5'端都具有带 23bp 间隔序列的 RSS,而 *DH* 片段 5'和 3'端都是带 12bp 间隔序列的 RSS[图 0-6(b)]。根据“12-23”规则,*VH* 片段不能与 *JH* 片段相连,因此其顺序为 *DH-JH* 相连,然后 *VH* 与已连接好的 *DH-JH* 相连,最后形成 *VH-DH-JH* 连接形式。对于轻链 *VL* 片段,*Vκ* 基因 3'端带有 12bp 间隔序列的 RSS,而 *Jκ* 基因 5'端带有 23bp 间隔序列的 RSS,因此只能 *Vκ* 与 *Jκ* 相连。在 λ 轻链中则相反,*Vλ* 基因 3'端带有 23bp 间隔序列的 RSS,而 *Jλ* 基因 5'端带有 12bp 间隔序列的 RSS,结果只能 *Vλ* 基因与 *Jλ* 基因相连(图 0-6b)。

V-(D)-J 重组发生在 RSS 和编码序列之间,由重组酶催化。1990 年 David Baltimore 首次报道了两个重组激活基因(recombination-activating gene, RAG)

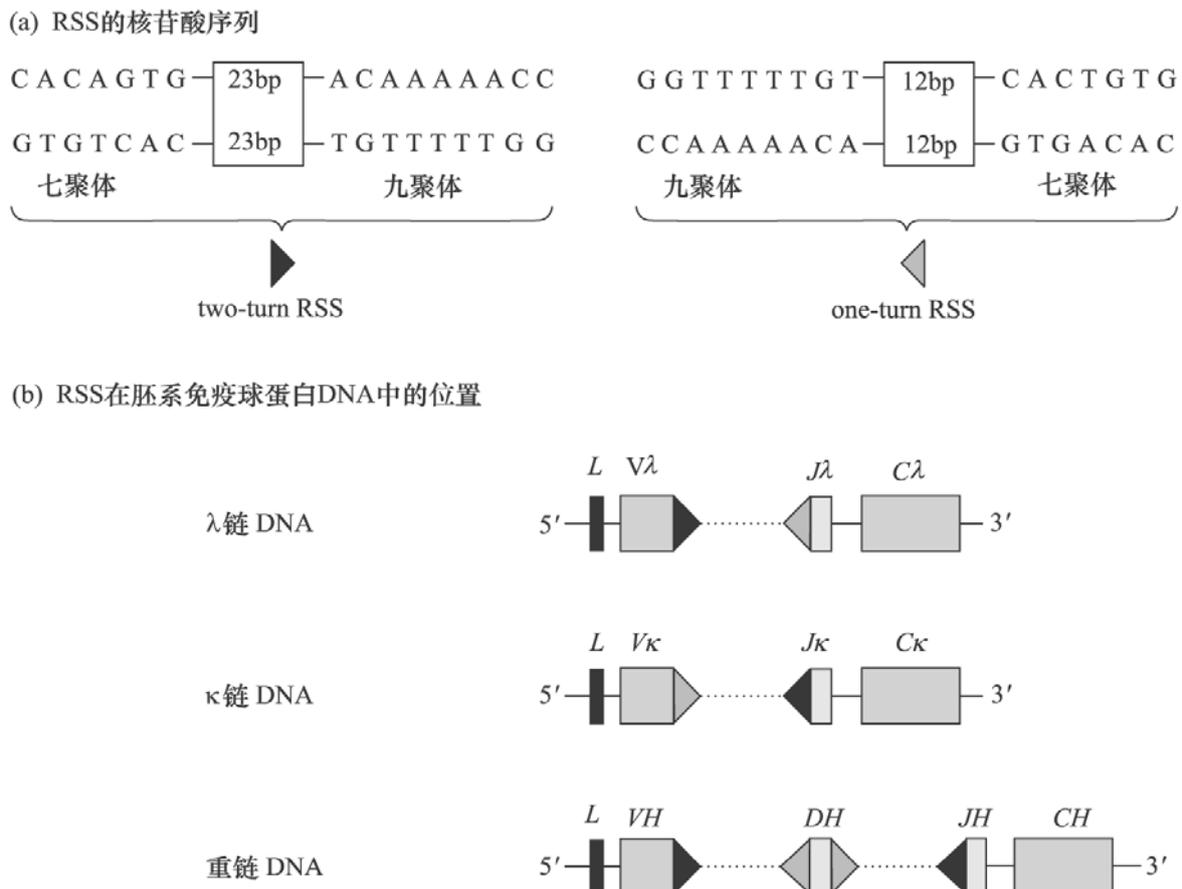


图 0-6 重组信号序列的组成和定位

- (a) 重组信号序列的组成——“七聚体-间隔序列-九聚体”结构；
 (b) 重组信号序列在免疫球蛋白胚系 DNA 上的定位

RAG1 和 *RAG2*, 它们编码的蛋白质介导了抗体可变区基因重排。此外, 还有不需要模板就能将核苷酸加到 DNA 单链断端的末端脱氧核苷酸转移酶(TdT 酶), 以及帮助修复 DNA 双链断端的多种酶。因此, 可变区基因片段的重组是由一系列重组酶参与的多步骤过程(图 0-7)。

在 *V-J* 连接时, 首先信号序列 RSS 被重组酶识别, 将两个 RSS 和与其相邻的编码序列(即基因片段)拉近, 然后基因片段和七聚体之间被切断, 从而使两个基因片段能相连。如果双方识别序列的位置方向是相对的, 则中间多余的序列就与七聚体相连形成一个环, 然后被切除[图 0-7(a)], 称为删除连接模式。大多数是这种情况, 如果双方的识别序列是在同一侧, 则通过倒转(inversion)的方式相连接, 也称为倒转连接模式, 中间多余的序列仍保留[图 0-7(b)]。

三、抗体的类别转换及其机制

抗原刺激 B 细胞后, 发生重链 DNA 重排, 由此产生的 *VH-DH-JH* 可与任何一个 *CH* 基因片段联合。但在 B 细胞发生过程中, 膜上最先表达的是 IgM, 以后

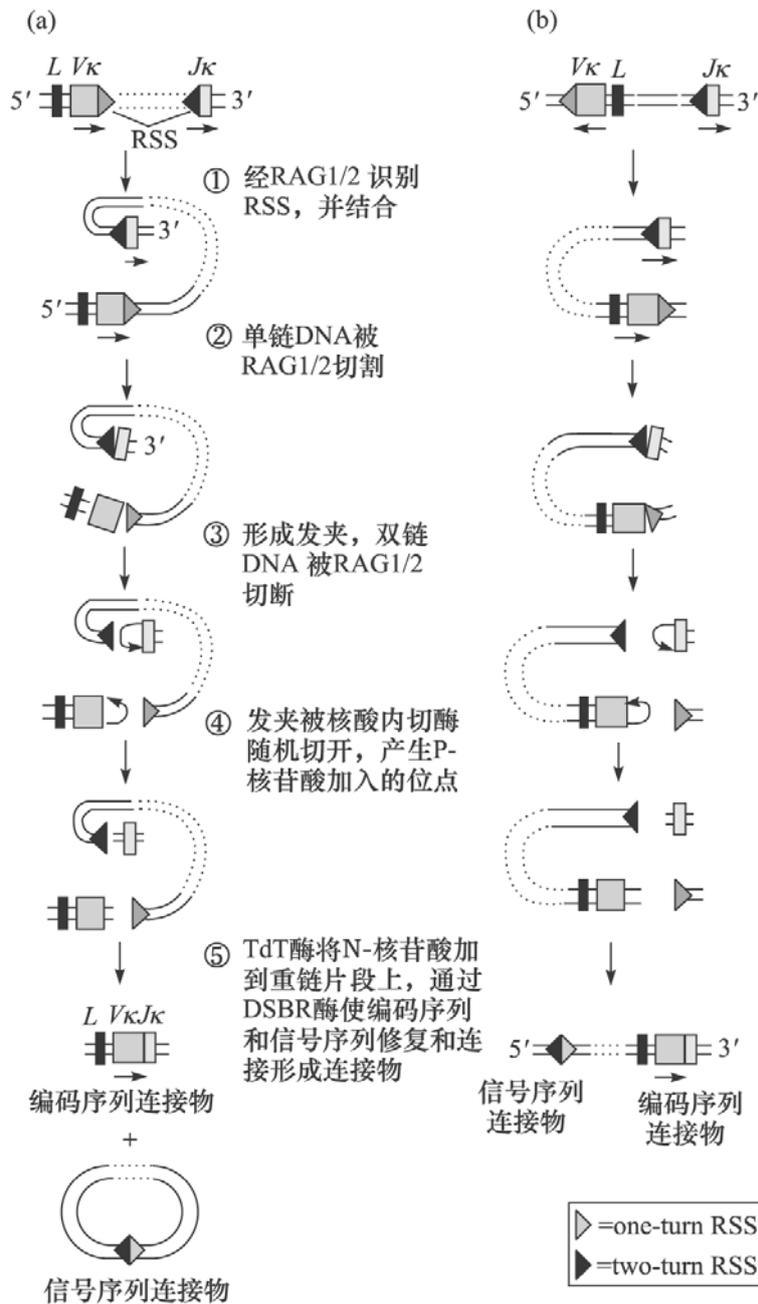


图 0-7 免疫球蛋白基因片段重组的模式图

(a) 删除连接模式; (b) 倒转连接模式

共表达 IgM 和 IgD, 在抗原激活 B 细胞后, 膜上表达和分泌的 Ig 类型会转换成 IgG、IgA、IgE 等其他类别或亚类。这种现象称为类别转换(class switch)或同种型转换(isotype switch)。这种现象只与重链恒定区有关, 因此不影响抗体的特异性, 但抗体的类别不同, 其生物效应也不同。类别转换过程中, 在编码 C 基因的 5' 端的内含子中, 除了 $C\delta$ 基因外, 都有一段重复性 DNA 序列称为转换区。这段重复序列在不同的 C 基因是不同的, 但都含有 [GAGCT] 和 [GGGGT] 序列。在类别转换时, 例如, 从 $C\mu$ 转换为 $C\gamma$ 时, $S\mu$ 和 $S\gamma$ 发生重组, 位于其间的 $C\mu$ 、 $C\delta$ 基因形成环状物后被切除(circular excision), 从 $C\gamma$ 转换成 $C\epsilon$ 时, $C\gamma$ 到 $C\epsilon$ 基因形成环状物被切除(图 0-8)。在 B 细胞中这种类别转换可以不止一次, 从而表达另一

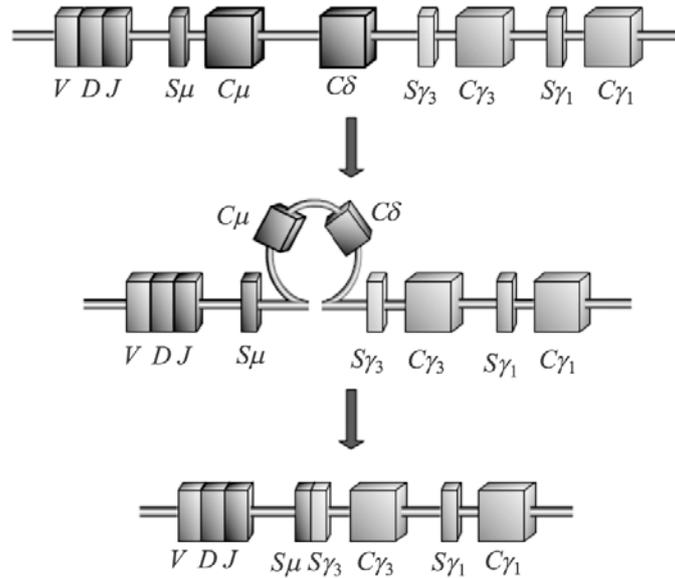


图 0-8 免疫球蛋白类别转换示意图

种 Ig 类别。

在 B 细胞发育过程中,从单表达 IgM 到共表达 IgM、IgD 并不发生基因水平的重组,而是不同的转录加工方式。一种方式是只转录到 μ 外显子,产生 μ 重链;另一种方式是转录终止在 δ 外显子,产生的转录物包括 μ 和 δ 。在 RNA 加工时切去 μ 外显子部分,因而只表达 δ 链。

各种类型的 Ig 都有膜型和分泌型两种,膜型 Ig 由胞外区、穿膜区和胞内区组成,可作为 B 细胞膜上的抗原受体。表达在膜上的 Ig 都是单体形式,分泌型 Ig 有多聚体形式。两种形式的 Ig 也是在转录加工中造成的。在编码 C 区的最后一个外显子之后,还有两个外显子,即 SC 和 MC,它们分别编码分泌型 Ig 的羧基端和膜型 Ig 的穿膜区、胞内区。通过 RNA 水平上的加工分别表达两种形式的 Ig。

四、抗体的等位基因排斥现象

B 细胞像所有的体细胞一样是二倍体,含有来自父母的两条染色体,但它只能表达来自一条染色体的重链和一条染色体的轻链。对于一个特定的 B 细胞,其两个同源染色体上编码重链或轻链的两个等位基因,其中之一得到表达,另一个就不再表达。这一现象称为等位基因排斥,保证了对抗原的特异性。图 0-9 是小鼠等位基因排斥模式图,一旦发生重链基因重排,如 μ 基因,则 μ 蛋白产物就防止了另一个重链等位基因的重排,继而开始轻链基因重排。小鼠的 κ 轻链基因重排在 λ 基因之前;在人类,一旦有效的重链基因重排发生, κ 或 λ 基因中的一个出现重排,产生的完整免疫球蛋白分子就抑制轻链基因的继续重排。如果一个等位基因发生无效重排,则另一个等位基因就开始重排。

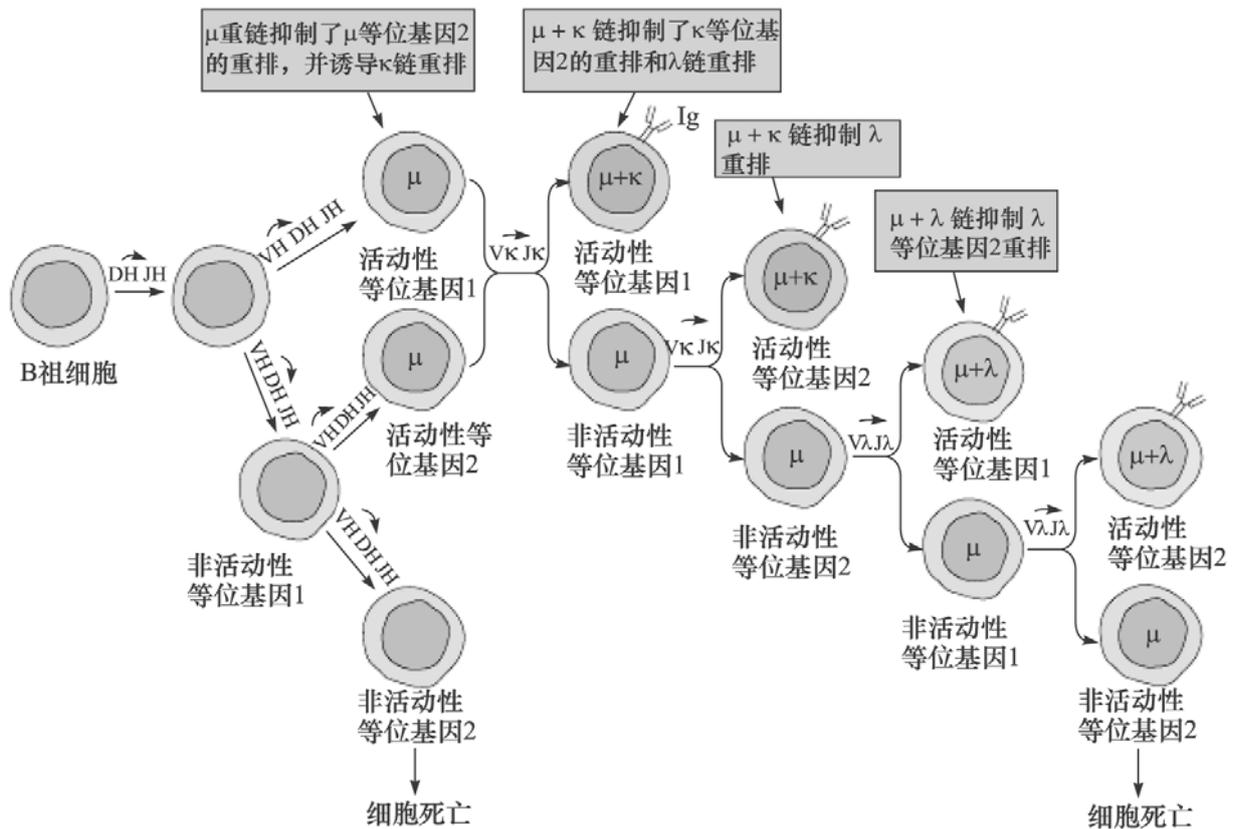


图 0-9 小鼠等位基因排斥模式

五、抗体多样性产生的机制

抗体多样性的原因除了自然界中存在千变万化的抗原分子及其表位,造成不同特异性的抗体外,还有以下几种造成抗体多样性的机制。

(一) 组合引起的多样性

主要是两种组合,即 V 区基因片段的组合和轻、重链之间的组合。由于胚系 Ig 基因库中有数以百计的 V 基因,以及众多的 D 基因、J 基因和 C 基因。在基因重排过程中,这些基因间存在极端多样性组合的可能。以人类重链可变区基因来说,如果有功能的 VH 基因片段为 51 个, DH 基因片段 27 个, JH 基因片段 6 个,则可能的排列组合是: $51 \times 27 \times 6 = 8262$ 种,表明有 8262 种重链可变区基因。人的 κ 轻链约有 40 个功能性 $V\kappa$ 基因片段,5 个 $J\kappa$ 基因片段,这样就有 200 种不同的 κ 轻链可变区基因。对 λ 轻链而言,约有 30 个 $V\lambda$ 基因片段和 4 个 $J\lambda$ 基因片段,组合成 120 种不同的 λ 轻链基因。加起来轻链可变区基因就有 320 种。轻、重链之间的组合为 $8262 \times 320 = 2\,643\,840$,约为 2.6×10^6 种不同特异性的抗体基因。实际上抗体的基因数略小于计算值,因为并不是所有的基因片段被使用的概率都一样,也不是所有 VH 都可以与 VL 匹配。

(二) 连接引起的多样性

在重排过程中, Ig 重链与轻链中 *V*、*D*、*J* 基因片的连接位点可有一定的变异范围, 有插入或缺失核苷酸的情况发生, 从而造成新的顺序, 增加了编码产物的多样性, 也称为连接引起的多样性。一种情况是在基因重排过程中, 在基因片段和七聚体之间切断时, 两个片段的断端各自连接形成发卡结构, 再被限制酶随机切开, 形成单链 DNA 末端。由于该 DNA 在双链时是互补的, 从而形成了回文结构 (palindrome) 的核苷酸序列, 称为 P-核苷酸 (P-nucleotide)。以后又通过 DNA 修补, 恢复双链并将断裂处连接, 而此回文序列被保留在可变区的序列中 [图 0-10 (a)]。另一种情况是通过末端转移酶 (TdT 酶) 将核苷酸加到发卡切断后的断端, 然后通过 DNA 修复将断端连接起来。这些加入的核苷酸称为 N-核苷酸 (N-nucleotide), 它们是非模板编码的 [图 0-10 (b)], 因此该区域称为 N 区 (N region)。由于加入的核苷酸数是随机的, 有可能破坏原有的可读框架, 从而导致无效重排, 大约有 2/3 的重排是无效的。

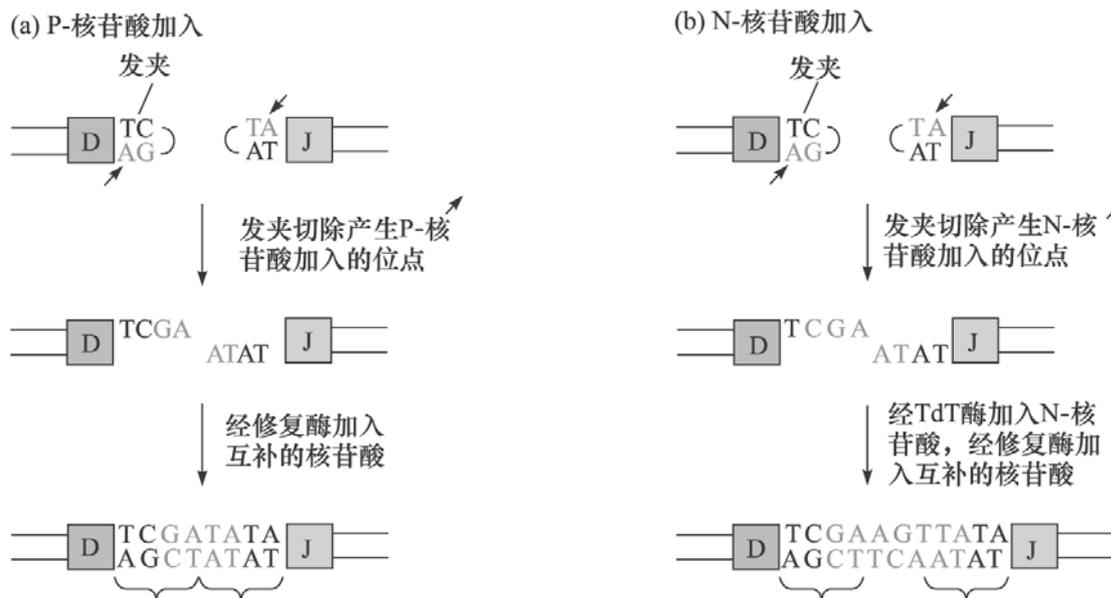


图 0-10 在连接时加入 P-核苷酸和 N-核苷酸

(三) 体细胞高频突变引起的多样性

体细胞高频突变是在已重排的可变区基因中发生, 而不是在胚系基因中发生。体细胞高频突变往往发生在抗原刺激后, 而且只在次级淋巴器官的生发中心, 主要是点突变。这种点突变的分布并非完全随机, 有热点位置。体细胞高频突变的频率约: 每代每个碱基为 10^{-3} , 比自发突变频率高 10 万倍。轻、重链可变区基因加起来约 600bp, 根据上述突变频率, 细胞每分裂一两次, 就会引入 1 个突变。突变后有些抗体分子的亲和力会高于原先的抗体分子, 因此, 在抗原刺激后发生体细胞

高频突变,引起亲和力提高,也称为抗体亲和力成熟现象(affinity maturation)。

由于上述各种机制造成抗体多样性,产生巨大数量的不同的抗体,估计抗体的多样性可达 10^{14} ,足以识别各种各样的抗原。

第三节 重组抗体的发展概况

20 世纪 70 年代中期 B 淋巴细胞杂交瘤技术问世,由此制备出的单克隆抗体是抗单个抗原决定簇的抗体,具有高度的特异性和均一性,且能大量制备,从而为抗体的研究和应用带来了突破。以抗体为载体耦联放射性同位素、毒素和药物的导向药物或“生物导弹”风靡全球。经过近十余年的研究和临床试验,人们发现这些“导弹”药物离真正的应用还有一段距离。抗体的临床应用结果反映出单克隆抗体药物存在的一些问题,主要有:①鼠源性抗体用于人体后产生人抗鼠抗体(HAMA 反应);②由于鼠单抗是异源蛋白,在体内很快被清除;③由于抗体相对分子质量较大,抗体分子到达靶部位的量不足;④抗体本身的效应功能不强等,使抗体治疗的效果不理想。但随着人们对抗体基因结构与功能的深入了解和分子生物学技术的发展及向各学科渗透,应用 DNA 重组和蛋白质工程技术可以按人们的意愿在基因水平上对抗体分子进行切割、拼接或修饰,重新组装成新型抗体分子,并可赋予抗体分子新的生物学活性。因此基因工程抗体比天然抗体具有更广阔的应用前景。

一、鼠抗体人源化及人源抗体制备技术

针对鼠抗体用于人体后产生 HAMA 反应,影响靶向性和疗效,以及异源蛋白在人体内被很快清除的问题。利用分子生物学手段和技术进行鼠抗体人源化。目前人源化的方法有多种,最早的人-鼠嵌合抗体就是将鼠抗体可变区基因与人抗体恒定区基因相连后得到的融合蛋白。它完整地保留了亲本鼠单抗的特异性和亲和力,同时大大降低了鼠单抗的异源性。已被美国 FDA 批准的抗 CD20 抗体 Rituximab(IDEC-C2B8)就是一个人-鼠嵌合抗体。将鼠抗体高变区的 3 个 CDR 移植到人抗体的相应部位,得到的人源化抗体称为重构抗体或改型抗体,其人源化程度超过 90%。但要保留亲本抗体的特性有一定困难,因为抗体与抗原结合时,虽然可变区的 CDR 起很大作用,但抗体骨架区的结构也会通过与 CDR 相互作用影响分子结构,因此成功的例子不多。近年来计算机建模技术的发展和蛋白质晶体结构数据的不断增加,使表面氨基酸残基“人源化”技术有可能用于抗体的人源化改造。不同种属间免疫球蛋白的同源性极高,尽管它们的轻链属于不同型别,其 CDR 的长度也不一致,但暴露于表面的氨基酸残基的位置和数量却很保守。这些表面残基的组成模式在种系内相当保守,而种系之间互不相同,这种差异是免疫原性的来

源。将鼠轻、重链可变区组成的 F_v 段表面暴露的骨架区氨基酸残基中与人 F_v 不同者改为人抗体中的氨基酸,使 F_v 的表面残基人源化,消除其免疫原性而不影响 F_v 的整体空间构象,从而保留其抗原结合部位的结构。表面残基人源化后的鼠单抗保留了亲本抗体的特异性和亲和力,降低了免疫原性。Protein Design Lab 公司的 CD3 抗体 HuM291 就是用类似方法进行人源化改造的抗体。

20 世纪 90 年代初,人们采用 PCR 方法克隆全套抗体重链和轻链可变区基因,并将它们重组到原核载体上,通过大肠杆菌直接表达有功能的抗体分子片段,再用抗原筛选与之结合的抗体克隆。这种抗体库技术使抗体的制备技术发生了质的飞跃。继而人们又利用噬菌体表面展示技术将抗体基因与丝状噬菌体外壳蛋白基因融合,使抗体片段表达于噬菌体表面,构建成噬菌体抗体库,用抗原筛选出表达相应抗体的噬菌体克隆,经扩增可获得大量抗体。抗体库技术的明显优点是:①扩大了筛选容量,用杂交瘤技术一般筛选能力在上千个克隆以内,而抗体库可筛选 10⁶ 以上克隆,有利于获得一些稀有抗体;②抗体库技术可直接克隆到抗体基因,避免了杂交瘤分泌抗体不稳定而丢失的危险;③所得抗体基因可进一步进行改造,以增加特异性和亲和力。利用噬菌体抗体库或合成抗体库技术人们可以直接获得人源抗体。但由于不能完全解决经免疫的人 B 细胞来源,所得抗体往往亲和力较低。在抗体库技术基础上,利用表位印模选择(epitope imprinted selection),也称作抗原导向选择技术,可以将鼠抗体转变为人抗体。该方法是将小鼠抗体重链可变区或轻链可变区基因与人抗体轻链可变区基因文库或重链可变区基因文库混合成为“鼠-人”抗体库。用抗原进行筛选,挑出有结合活性的克隆,该克隆由小鼠抗体的重链基因与人抗体轻链基因组成或小鼠抗体轻链基因与人抗体重链基因组成。再将由此得到的人轻链或重链可变区基因与另一条人抗体链(重链或轻链)可变区基因文库混合,构成人抗体库。再次用抗原进行筛选,所得与抗原结合的抗体克隆由人轻链、重链可变区组成,由此可得到特异性和亲和力与亲本鼠单抗相同的人单抗。

随着基因敲除技术的成熟,人们可以将小鼠免疫球蛋白基因组敲除(knock-out),将人免疫球蛋白基因组植入(knock-in)。这样的人源化小鼠用抗原免疫后就产生特异性人源抗体,而人抗体可直接从免疫动物的血清中纯化,或获得足够数量对抗原特异的 B 细胞,用于制备单克隆抗体或进一步用噬菌体抗体库技术制备出基因工程抗体。

二、改变抗体分子大小增强靶向性

抗体分子大小、与抗原结合价数直接影响抗体的穿透性、廓清率及在血池和靶部位的比例。用分子生物学手段可以获得完整抗体和各种抗体片段。有一定应用价值的抗体片段,例如,一个轻链可变区和一个重链可变区相连的单链抗体 scFv、

两个单链抗体相连的 diabody、两个单链抗体通过类似铰链区的接头与恒定区 C_H3 相连的 minibody。一般情况下,抗体分子越小越容易通过血管壁,但在血液中被清除的速度也快。完整抗体穿透性差,但在血液中的半衰期长,可达几十个小时。diabody 和 minibody 则介于单链抗体和完整抗体之间。以抗体在靶部位与血液中的比值(T/B)而言,diabody 和 minibody 明显高于完整抗体和单链抗体。T/B 比值的增高意味着抗体在靶部位浓度高,靶向性好。此外,由于 diabody 和 minibody 都是二价的抗体,它们与抗原的结合能力远高于单链抗体,目前认为是较理想的免疫显像或治疗用抗体形式。

三、增强抗体效应功能

由于天然抗体主要是通过调理作用、ADCC 或依赖补体的细胞毒效应起到杀伤靶细胞的作用。因此,天然抗体的细胞毒效应有限。下列几种途径可以增加抗体对靶细胞的杀伤。

(一) 免疫结合物(immunoconjugate)

免疫结合物是以抗体或抗体片段为载体连接放射性核素、药物或毒素构成。这些细胞毒性物质大大增强了抗体杀伤靶细胞的能力。抗体与放射性核素结合物的主要优点是不需要内化,并且由于射线作用有一定范围,因此可以克服抗原的异质性,而且可以根据需要选择相应的核素,进行免疫显像或治疗。抗体-药物结合物也不需要内化,有些可以产生旁效应,而且效应谱和毒性谱较清楚。抗体-毒素结合物也称免疫毒素,常用的毒素有白喉毒素、蓖麻毒素、相思豆毒素和假单胞杆菌外毒素,它们的作用机制清楚,细胞毒效应强。上述免疫结合物中有些已被 FDA 批准成为药物。

(二) 免疫细胞因子(immunocytokine)

免疫细胞因子是将抗体与细胞因子基因连接后表达的融合蛋白,抗体的特异性与细胞因子的有效免疫刺激活性有机结合起来。免疫细胞因子没有常规化疗的不良反应。因为它们的作用原理与化疗药物不同,后者主要是杀伤分裂细胞,因此分裂快的正常细胞也受到损伤。而免疫细胞因子能识别肿瘤细胞上的特异性抗原,因此避免了对其他组织细胞的伤害。通过细胞因子对免疫系统的激活,可以控制肿瘤转移和杀灭残留病灶。

(三) 双特异性抗体

双特异性抗体又称双功能抗体,是同一抗体的两个抗原结合部位分别针对两个不同的抗原,在结构上是双价的,而与抗原结合的功能是单价的。双特异性抗体

可以用化学交联、细胞融合和基因工程等方法获得。由于它可以同时与两种抗原发生反应,并使之交联,因而可介导标记物与靶抗原的结合,或使某种效应分子定位于靶细胞。此外,又由于它与抗原结合的单价性,不易引起靶抗原的调变,从而可提高抗体的某些生物学效应。双特异性抗体重链的可选择性使其 Fc 片段与 Fc 受体结合的能力明显减弱,减少了该抗体在体内的非特异性分布,双特异性抗体的这些特性使它在诊断和治疗上有广泛的应用前景。目前作为治疗肿瘤用的双功能抗体常采用抗肿瘤相关抗原(TAA)及抗 CD3 或抗 TAA 及抗 CD16。这类双特异性抗体在荷瘤动物模型中无论是抑瘤试验还是杀伤试验均获得良好结果。无论采用何种免疫活性细胞的效应分子,其杀伤均无 MHC 限制。这为临床应用提供了许多方便。目前已有一些双功能抗体在进行临床试验。

(四) 细胞内抗体(intrabody)

一般的抗体在细胞内合成后分泌到胞外,如果在抗体基因的 N 端或 C 端加入引导序列就能使抗体表达定位在亚细胞部位,如胞质、线粒体、内质网或细胞核部位。这种在细胞内合成并作用于细胞内组分的抗体称为细胞内抗体或内抗体。细胞内抗体可以提供一种其他方法不能做到的研究分子功能的方法。它可以在细胞内抑制病毒复制和抑制生长因子受体或癌蛋白表达,因此有作为基因治疗的应用前景。研究较多的是用细胞内抗体抑制人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)和抗肿瘤。

抗体作为治疗制剂最早用于病原微生物感染引起的疾病,现在已发展到抗肿瘤、抗移植排斥、抗血栓形成及自身免疫性疾病的治疗等方面。理论上讲,任何一种抗原都可以刺激机体产生相应的抗体,如果该抗原分子参与机体的生命活动或疾病的发病过程,则相应抗体可通过中和、拮抗、封闭、阻断等生物学效应起治疗作用。从目前抗体临床应用的情况来看,抗体作为治疗制剂用量较大,因此提高抗体表达量,降低生产成本等都是亟待解决的问题。此外,能否用小分子模拟抗体的作用也是值得研究的方向。

主要参考文献

- 周光炎. 2000. 免疫学原理. 上海: 上海科学技术文献出版社
- Roitt I, Brostoff J, Male D. 2001. Immunology. 6th edition. Orlando: Harcourt Publishers Limited
- Richard AG, Thomas JK, Barbara AO. 2000. Kuby Immunology. 4th edition. New York: Freeman WH & Co Publishers

(沈倍奋)

第一章 抗体基因的克隆

第一节 杂交瘤或脾细胞中抗体基因或片段的 PCR 克隆

一、基本原理

抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)基因分别由4个相对保守的骨架区(FR)和3个互补决定区(CDR)组成。FR呈 β 片层结构,碱基组成和排列顺序较保守。因此可从杂交瘤细胞或脾细胞提取 mRNA,反转录成 cDNA,根据 FR 碱基组成设计 PCR 合成扩增 VH 和 VL 基因的寡核苷酸引物,以及寡核苷酸的 linker 序列以获得 VH 和 VL 基因,并以 linker 连接 VL 的 C 端和 VH 的 N 端或连接 VH 的 C 端与 VL 的 N 端,建成抗体基因或基因片段。linker 长度以 12~25 个氨基酸组成较合适,其作用是使 VH 或 VL 自由折叠,暴露抗原结合点,也可减少蛋白酶的攻击,防止抗体聚集。linker 不影响抗体的二级结构,有助于恢复抗体的天然结合力,具有良好的稳定性和活力。

近年来,将噬菌体表面展示技术(phage display)应用于抗体筛选,可从周围血淋巴细胞直接提取 mRNA,绕过免疫和细胞杂交融合过程,从而可直接构建和筛选抗体基因。

二、发展方向

一旦可变区基因被克隆出来,抗体结构可被进一步工程化而产生具有较低免疫原性、提高亲和力和抗原特异性,以及稳定性增强的多种形式的抗体分子可变区。单链抗体(scFv)是由 VH 和 VL 通过 linker 重组并表达而成的一种小分子抗体,具有较好的抗原结合能力,且相对分子质量小、穿透力强、体内循环半衰期短及免疫原性低等特性。

在 scFv 基础上,现已发展了几种性能较好的小分子抗体。其中的双链抗体(dsFv)是在轻链可变区和重链可变区适当部位各引入一个半胱氨酸,形成一个二硫键固定的 Fv 段,其结合能力及稳定性均优于 scFv。二价小抗体(diabody)是将 scFv 中两个可变区的 linker 缩短,进而两个分子 VH 和 VL 之间形成双价小分子抗体,其结合性能优于单价分子。双特异微型抗体是将两种不同特异性的可变区基因交叉配对获得,具有制备简便、稳定高效、相对分子质量小的优点。

由杂交瘤技术或天然免疫库构建的重组抗体其应用前提是功能性免疫球蛋白

基因的可靠克隆。为实现这一目的,标准的噬菌体展示系统需要进一步的优化,包括表达效率和载体稳定性的提高,抗体基因融合表达的严格控制,可变区基因进行 PCR 扩增的引物应用,抗体分子的装配策略,单个稀有限制性内切核酸酶切割后的定向克隆。应用这一系统已成功获得在以前许多实验方法所不能获得的杂交瘤细胞抗体基因的可变区结构。

在抗体的构建中,在其 C 端可引入 c-myc 尾、组氨酸尾和脂类标签等,以有利于表达产物的检测和纯化;引入亮氨酸拉链、半胱氨酸及 α 螺旋等结构,可用于构建双价 scFv 分子;抗体基因与蛋白 A、蛋白酶、免疫毒素及与其他抗体基因连接,可构建具有新功能的杂合抗体基因。

三、方法要领

表达 scFv 的噬菌体抗体库的构建可采用重叠延伸拼接法(splicing by overlap extension, SOE),用 PCR 将轻链和重链可变区基因进行组合,这样可减少一次重组的过程。将抗原固相化后对抗体库进行 3~5 轮“吸附-洗脱-扩增”,以富集特异性噬菌体抗体;将最后一次富集到的噬菌体抗体感染细菌铺平皿,挑取部分集落制备抗体,并用 ELISA 对其进行鉴定,以筛选特异性的噬菌体抗体。若将获得的克隆载体切去 gIII 或 gVIII 后自连,转化细菌并进行培养,即可获得可溶性抗体片段。

(一) 抗体基因克隆时设计的一般原则

1) 保持抗体分子的可溶性。

2) 设计理想的 linker 序列。从理论上讲,理想的 linker 需保证 VH 和 VL 在表达系统中能等摩尔地产生,不干扰 VH 和 VL 的自由折叠,并使抗原结合位点处于适当构型,不引起分子动力学改变,尽可能减少蛋白酶攻击及防止 scFv 的聚集等。目前最常用的 linker 序列是由 Huston 等根据 X 射线晶体衍射分析的抗体可变区结构,以及计算机辅助分析的结果设计的,是具刚性结构的 15 肽序列 (Gly₄Ser)₃。应用此序列许多研究者已构建成多种 scFv 基因,并表达出具有活性的产物。此外,还可从已知三级结构的天然蛋白质获得的序列,如以轻链的折叠区序列、藻类蛋白序列等作为 linker 序列。

(二) linker 设计的注意事项

linker 的设计对抗体分子的亲和力有重要影响,其长度和性质不应干扰 VH 和 VL 的立体折叠,并且不对抗原结合部位造成妨碍。

1. linker 的长度

linker 的长度必须以不干扰正常功能区结构或功能区的接触为标准。lin-

ker 不应过短,至少应含 10 个氨基酸,过短可能干扰 VH 及 VL 的相互作用;但也不应过长,以免对抗原结合部位造成干扰。一般采用 15 个氨基酸(Gly₄Ser)₃57Å 的 linker,并已在许多 scFv 类似物及其融合蛋白中证实有效,当 linker 为 10~29 个氨基酸时,也可获得有活性的 scFv。同时这种 15 个氨基酸的 linker,不仅可连接 V 区的 C 端及 N 端,同时又可“拉紧”VH 及 VL 而不影响它们间的作用。VH-VL 异构体 N 端与 C 端的距离达 35Å, VH-VL 间 linker 的距离大约比一般抗体的 Fv 长 5~11Å。如果一个氨基酸单位长为 3.8Å,则大约 10 个氨基酸就可作为一个最小的 linker。

理想的 linker 长度也可参考有关的经验决定。研究表明,单链 T 细胞受体(sTCR) scFv 构建时可采用 23 个氨基酸的 linker,以克服 MHC 的限制性而与荧光素结合;或使用 25 个氨基酸的 linker 连接 V α 和 V β 功能区而构建成 2C sTCR scFv;而用 29 个氨基酸的 linker 同样可以构建具有活性的 V α -linker-V β -myc tag 融合蛋白。这些结果提示 sTCR 蛋白的构建似乎都参考了有关的经验,但其他免疫球蛋白超家族结合功能区的构建可能与 scFv 的不同,它可能需要大量而不同长度的 linker 及不同的顺序功能区。构建单链 MHC I 分子用 15 个氨基酸的 linker 连接可溶性 MHC I 分子的 α_3 功能区及 β_2 微球蛋白(β_2m),已成功建成 β_2m H-2D^d 重链($\alpha_1\alpha_2\alpha_3$),经转染 L 细胞可表达分泌有活性的单链 MHC I 分子。目前,在有关免疫球蛋白超家族 scFv 的设计时,是否有其标准的 linker 及组成尚无定论,但通过(Gly₄Ser)₃ linker 在单链 MHC 及 TCR-scFv 的成功应用,这为免疫球蛋白超家族 scFv 的设计提供了有益的参考。

2. linker 不能干扰功能区的折叠

目前较常用的 linker 就符合这种要求,它既可避免抗体侧链大于丝氨酸的羟甲基团,而且在没有与邻近 Fv 表面作用的侧链存在时,也有利于非结构构型的易曲性。另外,根据细胞胞内酶功能区片段设计的长 linker,其晶体结构也是高度易曲的。通过分析多肽桥的晶体结构,新设计的亲水性 linker,包含有甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸及带电残基。这些 linker 明显有助于与 V 区的相互作用而提高 scFv 的稳定性,但也可能减少 scFv 的产量。而且 linker 与邻近 V 区的作用过强也会干扰功能区的构型而改变其结合的特性。

3. linker 与功能区的融合对空间效应或电荷的影响

scFv 结合位点可能与 V 区的顺序明显相关。VH-VL 比 VL-VH 的亲合力高 10 倍以上,但 VL-VH 的表达量比 VH-VL 高 20 倍。

虽然 VH 及 VL 氨基酸残基都接近结合位点,但 VH 的 N 端更靠近折叠的 HCDR3 环。根据多克隆抗体结合位点推测,在与抗原的相互结合上,VH 的作用比 VL 大,所以 VH-VL 的顺序可以减少对 scFv 结合位点的干扰。但是,有的 VL

也可发挥同样甚至更为重要的抗原结合作用。

4. scFv 及效应功能区间隔序列可能有助其双功能的体现

在融合蛋白的设计中,效应功能区与 scFv 间隔序列的易曲性对融合蛋白的活性很重要,因为它具有在空间结构上固定末端的作用。linker 的活动受其长度及链末端的限制,并限制其他空间阻碍结合的位点。如果效应区融合到 scFv 氨基末端,间隔序列的设计就特别重要。因为该区非常接近结合位点,如 FB-scFv 融合蛋白,可选择一个合适的间隔序列使其融合的有效性得到提高。在 B3-scFv 及 PE40 细胞毒素功能区间插入不同的间隔,可改变其各自的再折叠率及最终 scFv-PE40 的产量。用铰链区作为间隔序列构建的 scFv-zeta 融合蛋白,可表现出 c-erbB2 结合活性;而未用铰链区的则无活性。这可能是由于铰链区富含脯氨酸,不易形成二级结构,并有相当的易曲性及亲水性,易于在 *E. coli* 中分泌表达出有功能的 scFv。

(三) 正确 PCR 引物的设计

1. 引物设计原则

采用 RT-PCR 法进行抗体基因克隆时,所设计的引物常可引起两端氨基酸序列的变异,但多数情况下未发现对抗体特异性和亲和力的影响。用变性的引物进行 PCR 扩增时,由于不匹配和错误,有可能导致点突变和缺失,产生无功能的抗体或抗体的片段。因此,在进行引物设计时应尽可能保持亲本抗体可变区序列的完整性和真实性。

在 scFv 基因中的 *VH* 和 *VL* 是由 linker 连接在一起的,其连接的方向可为 *VH-VL* 或 *VL-VH*,两种构建方式对抗体的特异性无明显影响,但可导致大肠杆菌分泌表达的不同。

2. 以 *VL*-(*G4S*)₃-*VH* 方向组装小鼠 scFv 片段所需设计的 PCR 引物

1) 轻链反向引物:

	5'端	<i>Sfi</i> I	标签	3'端	
反向	t tactcgcgcccagccggccatggcggaactacaaaG				
	5'端	标签	轻链可变区→	3'端	d
LB1	gccatggcgggaactacaaa	GAY	ATCCAGCTGACTCAGCC		2
LB2	gccatggcgggaactacaaa	GAY	ATTGTTCTCWC ^U CCCAGTC		4
LB3	gccatggcgggaactacaaa	GAY	ATTGTG ^M T ^M ACTCAGTC		8
LB4	gccatggcgggaactacaaa	GAY	ATTGTGY ^T TRACACAGTC		8