抗变形链球菌 SA Ⅰ/Ⅱ单抗重链可变区基因克隆及序列分析

文立亚 闫 岩 尹 文 吴兴安 姜绍淳 马文煜

摘要 **目的**: 从抗变形链球菌 SA Ⅰ/Ⅱ单抗杂交瘤细胞系 $2B_{12}F_6$ 中扩增克隆重链可变区基因。**方法**: 采用 PCR 技术和基因工程技术, 扩增杂交瘤细胞系 $2B_{12}F_6$ 的重链可变区基因并克隆入载体 pUC18, Sanger 双脱氧链末端终止法测定核苷酸序列。**结果**: 重链可变区基因全长 360 bp, 编码 118 个氨基酸, 其框架区与发表的小鼠重链可变区基因序列有 70% 的同源性, 符合鼠重链可变区基因的结构特征。**结论**: 抗变形链球菌 SA Ⅰ/Ⅱ单抗杂交瘤细胞系 $2B_{12}F_6$ 重链可变区基因的获得是构建抗变形链球菌 SA Ⅰ/Ⅱ基因工程抗体的基础。

关键词 变形链球菌 单克隆抗体 可变区基因 核苷酸序列

目前对于抗变形链球菌表面蛋白抗原Ⅰ/Ⅱ(surface protein antigen Ⅰ/Ⅱ, SA Ⅰ/Ⅱ)单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)用于防龋的实验研究已证实该McAb可抑制变形链球菌在牙齿表面的粘附[1,2], 这说明McAb用于防龋值得探讨。但是鼠McAb在人体应用时产生的人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA)导致的过敏反应又限制了McAb的应用[3]。随着DNA重组技术的发展, 应用基因工程技术可改建鼠McAb从而克服鼠McAb在人体产生的副作用。有关抗变形链球菌SA Ⅰ/ⅡMcAb基因工程抗体的构建目前在国内尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 细胞培养[4]

抗变形链球菌MT6R SA Ⅰ/ⅡMcAb杂交瘤细胞株 $2B_{12}F_6$ 按杂交瘤细胞培养规则调整细胞数至 1×10^5 个细胞。

1.2 细胞总RNA提取[5]及cDNA合成

培养细胞离心后悬浮于 10 mmol/L TE200 μl, 置冰浴 5 分钟, 加入 5%NP-40 5 μl, 两次间隔 5 分钟, 再加入 10 mmol/L TE 200 μl, 2×RES-1 400 μl 及等体积酚/氯仿-异戊醇抽提, 离心吸上层液相再反复抽提 1 次, 吸上层液相于 Eppendorf 管中, 加 1/10 μl 3M NaAc 和 1 倍- 20℃无水乙醇混匀, 置- 70℃ 20 分钟, 离心弃上清后再用- 20℃ 70% 乙醇洗涤 1 次, 37℃干燥, 沉淀物溶于 12 μl DEPC 处理的灭菌超纯水中, 取 1 μl 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外光灯下观察结果。按照逆转录试剂盒要求合成 cDNA 第一链。

1.3 PCR扩增及PCR扩增产物补平、回收

在 50 μl 反应液中含超纯水 25 μl, 10×Taq 缓冲液 4 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μl, 10 mmol/L 4×dNTP 2 μl, 引物各 2.5 μl, 95℃变性 5 分钟后加 Taq DNA 聚合酶 5 μ, 然后按 94 5℃变性 50 秒, 60℃褪火 50 秒, 72℃延伸 60 秒, 循环 35 次后 72℃继续延伸 5 分钟, 取 10 μl 反应物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。经抽提干燥的 PCR 产物中加入: 超纯水 16 μl, 10×Klenow 缓冲液 2 μl, 4×dNTP 1 μl, Klenow 酶 1 μl 混匀, 置 37℃3 小时后经 2% 琼脂糖凝胶电泳回收补平后的 PCR 产物, 并行常规抽提, 干燥, - 20℃保存备用。

1.4 $2B_{12}F_6$ VH 基因的克隆

用平端连接法将上述 PCR 产物与 pUC18 载体连接, 转化入感受态大肠杆菌 JM 109, 随机挑选菌落提取质粒用 HindⅢ和 EcoR Ⅰ双酶切, 筛选阳性克隆, 进一步经三组酶切鉴定。

1.5 序列分析

用双脱氧末端终止法测定序列。按照测序试剂盒说明进行。

阳性克隆菌种液按 1∶100 接种于 50 ml 2×YT 培养液中, 37℃摇床培养 15 小时, 抽提及纯化质粒后经变性, 褪火及 α-P^{32} 标记反应, 电泳 2 小时凝胶置- 20℃放射自显影 24 小时后行序列分析。

2 结 果

作者单位: 100091 北京市海淀区黑山沪总后 309 医院口腔科(文立亚), 西安市第四军医大学微生物学教研室(闫 岩, 尹文, 吴兴安, 姜绍淳, 马文煜)

2 1 提取细胞总 RNA

1 μl 提取物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，在紫外光灯下显示 28 S 和 18 S 条带清晰，无基因组 DNA 污染，降解的 RNA 量较少。

2 2 PCR 扩增 VH 基因

10 μl 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后显示扩增产物长度为 360 bp，非特异性带少(图 1)。

2 3 阳性克隆的鉴定

筛选出的阳性克隆再次经三组酶切鉴定，表明筛选出的阳性克隆含有插入的外源性 DNA 片段(图 2)。

2 4 序列分析

$2B_{12}F_6$VH 基因核苷酸和氨基酸序列经放射自显影后可见 VH 基因片段和 Kabat 抗体基因库中的小鼠抗体重链Ⅱ(A)组有较高的同源性，其特点是：①基因长度为 360 bp，序列两端含有 PCR 引物及正确的酶切位点；②第 2 位和第 96 位含有维持抗体结构所必需的半胱氨酸，而且位置正确；③其框架区与发表的小鼠 VH 序列有 70% 以上的同源性，并符合鼠 VH 的结构特征；④所克隆的 VH 基因可编码 118 个氨基酸(图 3、4)。

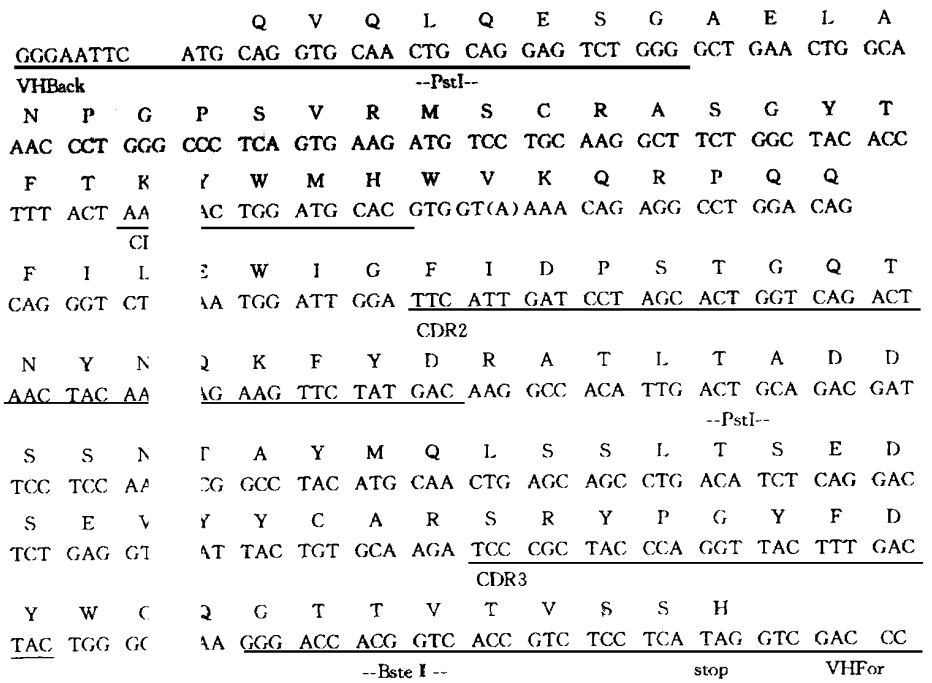

图 4 $2B_{12}F_6$VH 基因核苷酸序列与相应氨基酸序列
(PCR 引物，CDR 区用下划线标出)

3 讨 论

基因工程抗体的研究已涉及医学界多个学科，如应用鼠人嵌合抗体对阻断乙肝母婴传播及在意外感染时被动免疫[6] 的研究以及抗肾综合征出血热病毒基因工程抗体的研究[7] 等。

本实验应用的 PCR 引物的 5' 端引物相应于鼠 Ig 重链保守的第一框架区(FR_1)N 末端核苷酸序列，而 3' 端引物与 J 区序列互补，引物两端含有限制性内切酶 PstⅠ和 BsteⅡ，可方便地将克隆的 VH 基因切下并克隆到含小鼠 Ig 启动子及前导序列的载体中，以便在真核系统中表达。$2B_{12}F_6$ 单抗 VH 基因经序列分析表明该 VH 基因和 Kabat 抗体基因库中小鼠抗体重链Ⅱ(A)组有较高的同源性。

综上所述，所获得的 $2B_{12}F_6$VH 基因是完整的具有功能性的，这为构建各种基因工程抗体和进一步用于免疫防龋途径的探讨奠定了基础。

(本文图 1～3 见中心插页 2)

4 参考文献

1 Lehner T, Caldwell J, Smith R. Local passive immunization by monoclonal antibodies against *Streptococcal* antigen Ⅰ/Ⅱ in the prevention of dental caries. Infect Immun 1985, 50(3): 796～799

2 文立亚, 岳松龄. 单克隆抗体对变链球菌粘附的影响. 牙体牙髓牙周病学杂志, 1995, 5(10): 9～10
3 董志伟, 王 琰. 基因工程抗体. 生物工程进展, 1992, 增刊: 53～58
4 Cowley JVC, Colona MJ, Vazquez J, et al. Sepecific amplification of rearanged immunoglobulin variable region genes from mouse hybridoma cells. Hybridoma, 1990, 9(5): 407～417
5 Burne A, Chen YM, Penders JEC. Analysis of gene expression in *Streptococcus mutans* in biofilms in vitro. Adv Dent Res, 1997, 11(1): 100～109
6 李以莞, Clyde W, Shearman. 抗 HBSAg 鼠/人嵌合抗体基因构建、表达及鉴定. 中国医学科学院学报, 1990, 12(5): 318～324
7 闫 岩, 汪美先, 许志凯. 单克隆抗体 3D8 可溶性单链抗体的表达. 单克隆抗体通讯, 1995, 11(1): 62～63

(1998-08-04 收稿)

Cloning and Sequencing of Variable Region Gene of Heavy Chain of Monoclonal Antibody Against SA Ⅰ/Ⅱ of *Streptococcus mutans*

Wen Liya
Department of Oral Medicine of 309 Hospital, Beijing
Yan Yan, Ying Wen, Wu Xingan, et al
Department of Microbiology, the Fourth Military Medical University

Abstract

Objective: To clone and sequence a immunoglobulin variable region of heavy chain (VH) from a mouse hybridoma $2B_{12}F_6$, which produce monoclonal antibody against SA Ⅰ/Ⅱ of *Streptococcus mutans*. **Methods**: The immunoglobulin variable region gene of heavy chain of $2B_{12}F_6$ was amplified and cloned into pUC18 by using PCR technique and gene engineering technique, and then the gene sequence was analyzed by Sanger's method. **Results**: The VH gene segment was 360 base pairs in length and coded 118 amino acids, and the homology of framework of VH gene and mouse VH gene published was 70%, which accorded with the feature of mouse VH gene. **Conclusion**: The VH gene gained from $2B_{12}F_6$ could provide the possibility of construction of gene engineering antibody against SA Ⅰ/Ⅱ of *Streptococcus mutans*.

Key words: *Streptococcus mutans* monoclonal antibody variable region gene DNA sequence

去骨引导埋伏尖牙异位萌出一例

刘永钦

上颌尖牙的错位萌出常以唇向错位居多, 而于同侧中切牙位的异位萌出较少见。条仓均等[1] 曾报道三例。笔者曾以去骨引导生长期埋伏尖牙于同侧中切牙位萌出成功一例。现报告如下。

患儿张某某, 女, 12 岁 2 个月, 要求拔除错位的左上中切牙。检查: 一般情况良好。颜面外观见上唇稍不对称, 上唇中线旁左侧略突起。口内见┴1唇向错位, 且旋转 180°, 牙冠蜗牛状畸形, 以舌面为轴心卷曲, 咬合时与下前牙无接触。1┤与┴2之间隙呈上宽下窄梯形, 近中切角间距约 8 mm。1┤近中切角与中线重叠, ┴2及乳尖牙牙位正常, 无松动。余牙健康. 排列顺序正常, 关系良好。上前牙区 X 线咬合片示: ┴1畸形, ┴3埋伏阻生, 斜横于┴2及Ⅲ之上方, 与两牙根影无重叠, 牙冠向内下方, 牙冠末端距门齿孔左缘约 5 mm, ┴3冠影与┴1影重叠, ┴2和┴3牙周膜清晰, 根尖无破坏。处理: 局麻下顺利拔除┴1, 术中在┴1牙槽窝根尖区腭侧见小部分┴3牙冠。用牙槽窝刮匙小心去除┴3牙冠周围菲薄牙槽骨, 暴露┴3牙尖、边缘嵴及部分牙冠唇面。常规压迫止血。半年后复诊, 检查发现┴3已于┴1牙位萌出, 咬合时┴3舌轴嵴与 $\overline{|12}$ 有点状接触, 上唇中线旁左侧较丰满。

参考文献

1 条仓均, 大木叶孝宣, 岩崎智之ら. 犬齿萌出时に上颚中切齿の位置に诱导. 排列しち症例. 日本口腔科学会杂志, 1989, 38(4): 1091

(1998-05-28 收稿)

作者单位: 610200 四川省双流县第一人民医院