

家蚕细胞和虫体产生抗人小细胞肺癌抗体*

杨冠珍¹ 吴祥甫¹ 刘 健² 张中华²

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

‡上海肿瘤研究所 上海 200032)

摘 要 用重组昆虫病毒表达系统,在家蚕细胞和虫体表达了抗人小细胞肺癌人-鼠嵌合抗体。重组病毒 rNPVL2, rNPVH17 及双重组病毒 rNPVLH19 感染的家蚕细胞和虫体血淋巴中都检测到抗体分子的表达。双重组病毒的双基因共表达部分产物可装配。ELISA 分析表明抗体重轻链基因共表达产物具有比单基因表达产物高得多的与小细胞肺癌细胞免疫结合功能。

关键词 小细胞肺癌嵌合抗体,双重组家蚕病毒,基因表达

分类号 R730.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0041-45

重组昆虫杆状病毒表达系统(Baculovirus expression system BES)由于它的高表达效率及表达后加工等特点而被越来越广泛地运用,已有几百种蛋白在 BES 中表达^[1]。用 BES 进行多价外源基因的共表达和表达后装配成有生物活性的多肽也已有不少成功的报道^[2-4]。杆状病毒表达系统一个主要特点是可利用虫体系统作为生物反应器,家蚕虫体是一个优良的外源基因表达宿主。一般来说外源基因体内表达量比细胞系统要高成百倍^[1]。

抗体由 2 条重链 2 条轻链装配而成四聚体。重轻链又分可变区和恒区,可变区与抗原结合,恒区则起细胞识别效应功能^[5]。近年来多有选用重组昆虫病毒表达系统表达鼠单抗,人-鼠嵌合抗体和有活性的抗体片段报道^[6-8]。我们已报道了功能性抗乙肝病毒表面抗原人-鼠嵌合抗体在昆虫 Sf 细胞中重轻链单独表达和装配型共表达^[9,11],及小细胞肺癌抗体轻链基因的表达^[11]。本文报道用重组昆虫病毒表达系统,在家蚕细胞和蚕体中共表达抗人小细胞肺癌人鼠嵌合抗体重轻链双基因。表达产物具有与小细胞肺癌细胞免疫结合功能。

1 材料和方法

1.1 材料

家蚕细胞(*Bombyx mori* BmN)由本研究室传代培养。家蚕核型多角体病毒 BmBac-PAK 为本组研制的可线性化修饰病毒。蚕种新四元由中国农科院蚕业研究所提供。

质粒 pAcUW3 由 Robert Posses 博士馈赠^[12]。抗人小细胞肺癌抗体可变区基因由上

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目资助(No. 863-102-11-02-03)

收稿日期:1998-02-16,修回日期:1998-06-27。

海肿瘤研究所克隆^[13]。工具酶 Lipofectin, 碱性磷酸酶标记的抗兔 IgG 及其底物 NBT/BCIP, 昆虫细胞培养基 TC100 及胎牛血清均为 BRL GIBCO 公司产品。人 IgG 由生化所张祖传教授馈赠。Vector Laboratory 公司的 VECTASTAIN ABC 药盒用于免疫结合功能检测。

1.2 方法

1.2.1 昆虫细胞的培养和重组病毒的分离：按文献 11, 14 进行。

1.2.2 转移载体构建：人鼠嵌合抗体基因结构^[11], 含抗体轻链基因的转移载体 pBacL2 见图 1A。将人-鼠嵌合抗体重链基因构建在质粒 pAcUW3 *Bam*HI 位点, 使其在核多角体蛋白基因 *Ph* 启动子控制下, 获得转移载体 pAcH17, 见图 1B。嵌合抗体轻链基因再构建到 pAcH17 的 *Bgl*II 位点, 使轻链基因由 P10 启动子调控, 获得含重轻链双基因, 双启动子转录方向相反的双重重组转移载体 pAcLH19, 见图 1C。

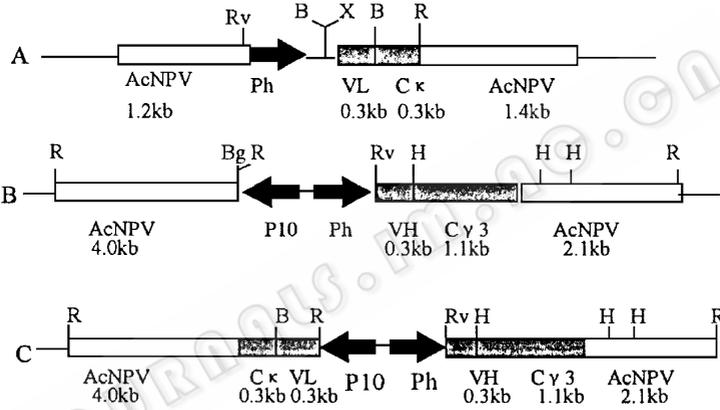


图 1 转移载体结构模式图

Fig. 1 The schematic diagram of transfer vectors

A. Light-chain gene transfer vector pBacL2

B. Heavy-chain gene transfer vector pAcH17

C. Dual recombinant transfer vector pAcLH19

□ AcNPV sequences, ► Promoters, VL VH Variable region, Cγ3 Cκ human constant region,

B. *Bam*HI; Bg. *Bgl*III, H. *Hind*III; R. *Eco*RI; Rv. *Eco*RV; X. *Xba*I

1.2.3 嵌合抗体基因的表达：用重组病毒 rNPVL2, rNPVH17, rNPVH19 分别感染家蚕细胞, 27℃ 培养 3d 后收集细胞, PBS 悬浮的细胞加含或不含 β-巯基乙醇的 2X 样品缓冲液, 100℃ 变性 3min, 作 12% SDS-PAGE。用重组病毒感染五龄起眠家蚕, 桑叶喂养 2~5d, 收取蚕血淋巴, PBS 1:3 稀释后同样条件作 12% SDS-PAGE 分析。Western blot 按文献 11 进行。

1.2.4 免疫结合活力测定：按 Vector Laboratory 产品说明书稍作改动。小细胞肺癌细胞裂解液包被 96 孔培养板, 1% BSA 室温 30min 封闭, 加不同稀释度液氮冻融 3 次的蚕血淋巴液 100μL, 4℃ 结合过夜。以下步骤同说明书。

2 结果和讨论

2.1 转移载体

如图 1 所示 A、B、C 3 个载体,它们分别含抗人小细胞肺癌人鼠嵌合抗体轻链基因,重链基因,以及重轻链双基因。通过部分 DNA 序列分析证明外源基因与启动子连接处序列正确,转录方向亦正确。轻链基因的人源恒区为 C_κ 链,重链基因的人源恒区为 C_{γ3} 链。

2.2 抗人小细胞肺癌嵌合抗体在家蚕细胞 BmN 中的表达

以上 3 个载体分别与 Bsu36I 酶切线性化的 BmBacPAK 病毒 DNA 借助 Lipofectin 试剂共转染家蚕细胞,获得重组病毒 rNPVL2, rNPVH17, rNPVLH19。Southern 杂交证明它们分别含抗体轻链基因,重链基因及重轻链双基因(数据略)。用重组病毒感染家蚕细胞 3d 后收集细胞,用 Western blot 分析表达产物。图 2 显示 Western blot 结果。轻链产物分子量约为 24kD,重链产物约为 58kD,与对照人 IgG 基本相同。在双基因共表达情况下,BmN 细胞中不仅产生了抗体轻链,而且产生了抗体重链。轻链产物出现 2 条,推测是从编码基因的第 2 个 ATG 开始翻译的结果^[11]。重轻链产物之间还出现多余的区带,可能是重链降解的产物^[8]。在不存在 β-巯基乙醇的非还原性电泳条件下,双基因共表达时,可见除了重轻链产物外,还有大分子免疫杂交区带,应为重轻链装配后的产物。但装配不完全,并有异常二聚体存在。这现象与报道基本一致^[4,10]。

2.3 抗人小细胞肺癌抗体在家蚕虫体中的表达

将重组病毒 rNPVL2, rNPVH17, rNPVLH19 分别注射五龄起眠家蚕,不同感染时间收集血淋巴,作 Western blot 分析。图 3 可以看出,对照正常血淋巴和非重组病毒感染的血淋巴都未给出免疫阳性结果,而重组病毒感染 4~5d 后,表达产物明显增加。参照标准阳性对照 IgG 的量,通过计算机 GDS 8000 扫描,计算出家蚕血淋巴中表达的人鼠嵌合抗体重链约为 250μg/蚕(按每条蚕 0.4mL 血淋巴计算)。

2.4 虫体表达的嵌合抗体免疫结合功能测定

为检测在家蚕虫体中重轻链共表达的嵌合抗体是否具有免疫结合功能,我们用小细胞肺癌细胞裂解物包被 96 孔酶标板,虫体表达的嵌合抗体为一抗,酶标记抗人 IgG 为二

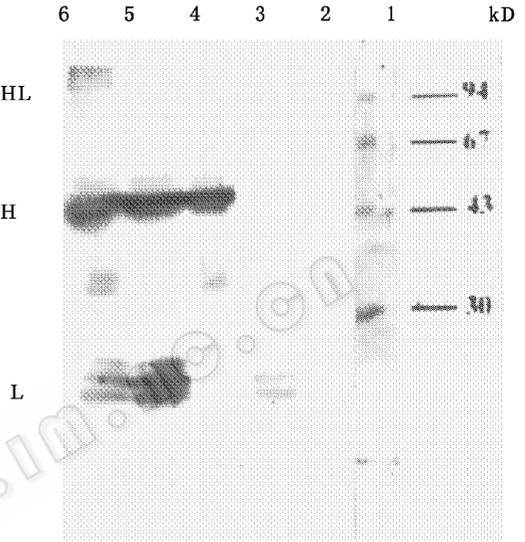


图 2 重组病毒感染的家蚕细胞表达的嵌合抗体免疫印迹分析

Fig. 2 Immunoblotting analysis of expressed chimeric antibody in BmN cells infected with recombinant viruses

1, Protein MW standards; 2, BmBacPAK; 3, Recombinant virus rNPVL2; 4, Recombinant virus rNPVH17; 5, 6, Dual recombinant virus rNPVLH19; Sample were reduced in 2~5 and unreduced in 6

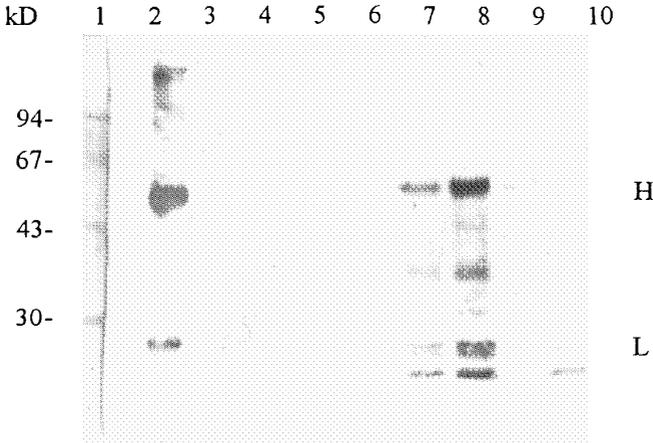


图 3 家蚕虫体表达的嵌合抗体免疫印迹分析

Fig.3 Western blot analysis of chimeric antibody expressed in silkworm larvae

1. Protein molecular weight standards ; 2. Human IgG ; 3. Uninfected hemolymph ; 4. BmBacPAK. 5~8. Dual recombinant virus rNPVLH19 infected hemolymph 2 to 5 days post infection ; 9. Recombinant virus rNPVH17 ; 10. Recombinant virus rNPVL2

抗 进行 ELISA 测定 结果见图 4。可见蚕体表达的重轻链单基因均具有一定的结合功能 ,但双基因共表达的产物与小细胞肺癌细胞免疫结合活力高得多。非重组病毒 Bm-BacPAK 感染的家蚕血淋巴对照则无任何结合活力。

我们获得了人-鼠嵌合抗体重轻链双基因在重组昆虫病毒系统中的共表达。但抗体分子装配不完全 ,且存在异常聚合现象。对异源四聚体蛋白体内组装机理尚不清楚 ,用其他系统表达抗体分子存在诸如表达量低 ,产物不稳定性及不能装配完整抗体四聚体等问题使应用受限制^[8]。我们利用重组昆虫病毒表达效率高且多基因共表达等特点研究抗体分子的表达 ,对基因工程抗体在医学研究和临床应用前景具有一定意义。

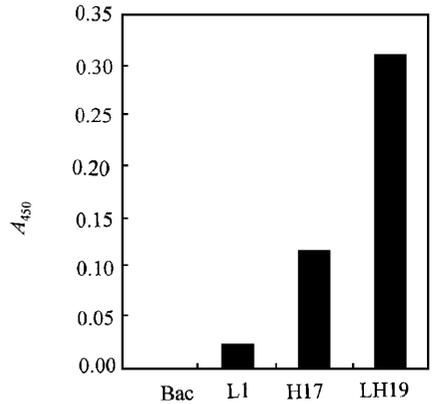


图 4 重组病毒感染的家蚕血淋巴表达的抗体对小细胞肺癌结合活力测定

Fig.4 Small cell lung cancer binding activity assay of antibody expressed in hemolymph infected with recombinant viruses
Bac. BmBacPAK ; L1. rNPVL2 ; H17. rNPVH17 ; LH19. rNPVLH19

参 考 文 献

- [1] K. Maramorosch , A. H. McIntosh. *Insect Cell Biotechnology* , 1994 , CRC Press , Florida.
- [2] A. S. Belyaev , P. Roy. *Nucleic Acids Research* , 1993 , **21**(5) : 1219 ~ 1223.
- [3] S. E. Delos , L. Montross , R. B. Moreland *et al.* *Virology* , 1993 , **194** : 393 ~ 398.
- [4] C. A. Hasemann , J. D. Capra , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1990 , **87** : 3942 ~ 3946.
- [5] G. Winter , C. Milstein. *Nature* , 1991 , **349** : 293 ~ 299.
- [6] K. N. Potter , Y. Li , J. D. Capra. *Intern. Rev. Immunol.* , 1993 , **10** : 103 ~ 112.
- [7] C. A. Hasemann , J. D. Capra. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* , 1991 , **2**(2) : 146 ~ 158.
- [8] J. Z. Pullitz , W. L. Kubasek , M. Duchene *et al.* *Bio/Technology* , 1990 , **8** : 651 ~ 654.
- [9] 余拥军 , 陈亚华 , 姜育蕾等. *生物化学与生物物理学报* , 1997 , **29**(5) : 463 ~ 468.
- [10] 余拥军 , 姜育蕾 , 杨冠珍等. *生物化学与生物物理学报* , 1997 , **29**(6) : 560 ~ 566.
- [11] 杨冠珍 , 吴祥甫 , 张文祥等. *生物化学与生物物理学报* , 1996 , **28**(6) : 653 ~ 658.
- [12] U. Weyer , R. D. Possee. *J. Gen. Virol.* , 1991 , **72** : 2961 ~ 2974.
- [13] 刘 健 , 潘志美 , 郭虹汾等. *生物化学杂志* , 1994 , **10**(3) : 264 ~ 269.
- [14] M. D. Summers , G. E. Smith. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cells Culture Procedures* , Texas , Texas A & M University , 1986.
- [15] U. Reis , B. Blum , B. V. Specht *et al.* *Bio/Technology* , 1992 , **10** : 910 ~ 912.

Chimeric Antibody Production in Silkworm Cells and Silkworm Larvae*

Yang Guanzhen Wu Xiangfu

(Shanghai Institute of Biochemistry , The Chinese Academy of Science , Shanghai 200031)

Liu Jian Zhang Zhonghua

(Shanghai Cancer Institute , Shanghai 200032)

Abstract By using recombinant Baculovirus expression system , the anti-human small cell lung cancer chimeric antibody had been expressed in *Bombyx mori* N(BmN) cells and silkworm larva. The chimeric antibodies which were produced in BmN cells , in larva infected with recombinant viruses rNPVL2 , rNPVH17 , and dual recombinant virus rNPVLH19 could be detected by Western blot analysis. The coexpression products of heavy- and light-chain genes in silkworm larva revealed more strong immune binding activity than single heavy or light chain gene expression.

Key words Small cell lung cancer , chimeric antibody , dual-recombinant virus , gene expression