

抗胃癌抗体轻链可变区序列测定和三维结构建模

杨丽娟, 白玉杰, 药立波, 闫小君, 苏成芝

杨丽娟, 中国人民解放军总医院内分泌科 北京市 100853
白玉杰, 闫小君, 中国人民解放军第四军医大学基因诊断技术研究所
陕西省西安市 710032
药立波, 苏成芝, 中国人民解放军第四军医大学生物化学与分子生物学
教研室 陕西省西安市 710032
杨丽娟, 女, 山西省太原市人, 1963 年出生, 汉族, 1997 年第四军医大学博
士, 副主任医师, 副教授. 主要从事内科的基础和临床工作.
项目负责人: 杨丽娟, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院
内分泌科. zw4578@vip.sina.com
电话: 010-66937425 传真: 010-68168917
收稿日期: 2004-03-15 接受日期: 2004-04-13

Sequencing of light chain variable region antibody against human gastric cancer and modeling of its three dimensional structure

Li-Juan Yang, Yu-Jie Bai, Li-Bo Yao, Xiao-Jun Yan, Cheng-Zhi Su

Li-Juan Yang, Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, Beijing, China
Yu-Jie Bai, Xiao-Jun Yan, Institute of Gene Diagnosis Technology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Li-Bo Yao, Cheng-Zhi Su, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Dr. Li-Juan Yang, Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. zw4578@vip.sina.com
Received: 2004-03-15 Accepted: 2004-04-13

Abstract

AIM: To confirm the primary structure and to model the three-dimensional structure of the light chain variable region (V_L) antibody against human gastric cancer.

METHODS: The V_L gene was selected from the phage display library of antibody against human gastric cancer, sequenced and analyzed. The three dimensional structure of V_L was also modeled by computer homology modeling techniques.

RESULTS: The sequence of V_L was in agreement with the characteristics of the mouse antibody variable region. In addition, the three dimensional structure of V_L was modeled.

CONCLUSION: The primary structure and the three-dimensional structure of V_L are proved reasonable and reliable.

Yang LJ, Bai YJ, Yao LB, Yan XJ, Su CZ. Sequencing of light chain variable region antibody against human gastric cancer and modeling of its three dimensional structure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(8):1778-1780

摘要

目的: 确定抗胃癌抗体轻链可变区(V_L)的一级结构, 并建模

其三级结构.

方法: 从抗人胃癌噬菌体抗体库中筛选出 V_L 基因, 并进行序列测定和分析. 利用同源蛋白结构建模技术, 采用计算机辅助分子设计系统建模 V_L 的三维空间结构.

结果: 所获得的 V_L 序列符合鼠抗体可变区特征, 并成功构建了其三维空间结构.

结论: 所测得的 V_L 一级结构和构建的三维空间结构均有较高的可靠性.

杨丽娟, 白玉杰, 药立波, 闫小君, 苏成芝. 抗胃癌抗体轻链可变区序列测定和三维结构建模. *世界华人消化杂志* 2004;12(8):1778-1780

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1778.asp>

0 引言

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤. 我们利用噬菌体抗体库技术, 绕过杂交瘤技术, 获得了鼠抗人胃癌轻链可变区片段, 为今后胃癌的显像和导向治疗奠定了一定的基础. 然而, 由于其为鼠源性, 限制了其应用. 必须先进行人源化改造, 才能更好地应用于临床. 而进行人源化设计必须了解其三维结构. 因此本研究利用同源蛋白结构建模技术, 采用 MSI 公司开发的计算机辅助分子设计系统建模了 V_L 的三维结构.

1 材料和方法

1.1 材料 细菌菌株 *E.coli* TG1, 克隆及表达载体 pCA NTAB5E, 扩增 V_L 可变区基因引物及 RS Primer Mix 均为 Pharmacia 公司产品. 其他有关分子生物学试剂系华美公司和 Promega 公司产品. Insight II (2000) 软件包为 MSI 公司产品.

1.2 方法 抗人胃癌单链抗体基因文库及噬菌体表面呈现文库的构建和筛选见文献[1]. 从 4 °C 贮存的阳性克隆菌种取 100 μ L 接种于 25 mL 含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 SOC 培养液中, 30 °C 振荡培养过夜, 碱裂解法大量制备噬菌粒 DNA, 经 FPLC Hi Trap Q 柱纯化, 经 EcoRI, Hind III 双酶切鉴定后, 作为测序模板, 用 S3 和 S6 引物从基因两端测序. 将所测得的 DNA 序列在 Internet 上进行同源性比较和氨基酸序列的推导及同源性分析. 通过 www.ncbi.nlm.nih/BLAST 网利用 BlastP² 软件搜索蛋白质晶体结构数据库 (PDB), 获得 V_L 的同源蛋白, 利用 Insight II (2000) 软件, 选择 homology 程序包, 经过同源蛋白结构叠加以确定 SCR 区和 Loop 区, 以该同源蛋白为模板对

V_L 的主链、侧链进行结构建模. 建模获得的 V_L 初始结构利用Discover程序包, 应用CVFF力场, 通过最陡下降、共轭梯度、牛顿力学对初始模型进行分子力学优化及常温分子动力学动态模拟, 获得 V_L 的三维结构的能量最低构象. 所有工作均在SGI Indigo 2工作站上完成.

2 结果

2.1 抗人胃癌 V_L 基因序列的测定及同源性分析 用S3和S6引物从基因两端测序, 测出的核苷酸序列. 将基因序列与基因数据库(EMBL+genbank+DDBJ)中已知的基因做同源性分析. 其同源序列均为鼠Ig Vk基因(图1), 与之同源性最高的为S61341(Score 1074).

2.2 氨基酸序列的推导分析 V_L 基因长度为321 bp, 系一开放读框, 可编码107个氨基酸, 序列中有明确的4个FR区和3个CDR区, 以及抗体结构所必须的特征性两个恒定半胱氨酸残基, 表明其结构符合鼠Ig轻链可变区的氨基酸序列特征(图2).

```

Query:   10 CTCACTCAGTCTCCAACCGCCATGGCTGCATCTCCCGGGGAGAAGATCACTATCACCTGC   69
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:   91 CTCACCCAGTCTCCAGCACTCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC   150

Query:   70 AGTGCCAGTCAGACATACAACCTTAGTAATGTGGTACCAACAGAAGTCAGGGACCTCTCCT   129
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:  151 AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAAGATCCTCCCCC   210

Query:   130 AAACCTGGATTATATAGGACATCCAATCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGC   189
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:  211 AAACCTGGATTATATCATCAATCCAATCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC   270

Query:   190 AGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATTGGCACCATGGAAGCTGAAGATGTTGCC   249
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:  271 AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCC   330

Query:   250 ACTTACTACTGCCAGCAGAGTAGTACTTTACCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTG   309
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:  331 ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTG   390

Query:   310 GAAATAAAACCG   321
          ||||| |||||
Sbjct:  391 GAAATAAAACCG   402
  
```

图1 V_L 基因序列同源性分析结果.

```

D I K L T Q S P T A M A A S P G E K I T I T C S
          |
A S Q T Y N L V M W Y Q Q K S G T S P K P W I Y
  _____CDR1_____
R T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L
  _____CDR2_____
T I G T M E A E D V A T Y Y C Q Q S S T L P F T
                              _____CDR3_____
F G S G T K L E I K P
  
```

图2 V_L 氨基酸序列推导.



图3 模板蛋白1FVB和目标蛋白 V_L 的序列比对图.

2.3 三维结构的同源建模 以 V_L 序列为探针, 用Fasta3程序在PDB库中搜索 V_L 的同源蛋白. 模板蛋白为免疫球蛋白(PDB号: 1FVB), 和目标蛋白 V_L 二者具有76.4%的序列相似性. 把1FVB和 V_L 进行叠加, 共有6个SCR区, 5个Loop区. 如图3所示. 用模板蛋白1FVB结构的C α 原子坐标确定了 V_L 主链构象并完成了侧链安装, 组装出完整的 V_L 三维结构. 对建模的 V_L 三维结构在CVFF力场下, 经过最陡下降、牛顿力学等方法进行能量的分子力学优化, 获得能量最低构象. 该稳定构象为全- β 模式, N端5个反平行 β 片层, C端6个反平行 β 片层, N端2个高度保守的半胱氨酸残基形成1对二硫键结构. 如图4所示. 建模获得的 V_L 空间构象与1FVB晶体结构进行主链C原子的C α 迭合, 迭合后的均方根位移RMS=0.15 nm, 表明理论建模的 V_L 空间结构是可靠的. 应用Profile-3D对优化后的 V_L 三维结构进行理论评估. 结果显示, 建模结构中无不兼容的残基, 说明结构较合理, 而且优化后结构更合理.



图4 以1FVB晶体结构为模板同源建模获得的目标蛋白 V_L 的三维空间结构.

3 讨论

小分子抗体具有分子小,免疫原性弱,穿透力强易于进入实体瘤周围的微循环,血清和全身廓清快,无肾脏蓄积作用,肿瘤显像时清晰度高,可作载体与药物、同位素、毒素等结合之优点^[3],在肿瘤的诊断和治疗方面有极高的理论和应用价值.我们从已构建的抗人胃癌V_L基因,经序列测定及同源性分析表明其结构符合鼠Ig轻链可变区的氨基酸序列特征,为今后的基因工程改造奠定了基础.

由于其为鼠源性,必须先进行人源化改造,才能更好地应用于临床.而进行人源性设计必须了解其三维结构.人们通过对类似蛋白质空间结构的对比发现,蛋白质的三维结构较其一级序列更为保守.氨基酸残基序列有50%相同的蛋白质,约有90%的C α 原子偏差不超过0.3 nm,均方根偏差约0.1 nm,氨基酸的残基替换通常发生在蛋白质表面回折区域.蛋白质主链结构,特别是疏水中心的结构受序列变异的影响很小^[4].因

此,用类似蛋白来预测目标蛋白的空间构象是比较可靠的.我们利用MSI公司的Homology软件包,同源建模了用噬菌体抗体库技术获得的抗人胃癌抗体V_L结构域的三维空间结构.经过分子力学和分子动力学优化,Pro-file-3D的合理性评价,提示所获得的V_L结构域的三维结构有较高的可靠性,这为今后的进一步实验提供了依据和指导.

4 参考文献

- 1 杨丽娟,苏成芝.抗人胃癌全套单链抗体基因噬菌体表面呈现文库的构建、初步筛选及鉴定.第四军医大学学报 1998;19:22-24
- 2 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-3402
- 3 Colcher D, Birs R, Roselli M, Hardman KD, Johnson S, Pope S, Dodd SW, Pantoliano MW, Milenic DE, Schlom J. In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1191-1197
- 4 Blundell TL, Sibanda BL, Sternberg JM, Thornton JM. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* 1987;326:347-352

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库.该库收录自1995-2004年,国内生物医学期刊1191种发表的各类基金资助论文摘要155115条,其中国家基金资助的论文为70167条(45.23%),其他基金资助的论文为84948条(54.76%).

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索,高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助),期刊搜索(A-Z排序).
论文排序: 期刊论文数,点击论文数.

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜,陈主初,田芳,肖志强,贺智敏,关勇军,李峰,何春梅,袁建辉.鼻咽癌中染色体

3p21区域一个表达下调的EST的鉴定.癌症 2003年;22(1):1-5

鼻咽癌中染色体**3p21**区域一个表达下调的EST的鉴定

贺修胜,陈主初,田芳,肖志强,贺智敏,关勇军,李峰,何春梅,袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目(39970287,30000188)

背景与目的:研究显示鼻咽癌细胞3p14-25存在高频率杂合性丢失位点.本研究拟寻找与筛选染色体3p21区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag,EST),为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础.方法:充分利用网上的生物信息资源,采用定位查找ESTs,对ESTs进行同源性比较分析、筛选;运用逆转录PCR(reverse transcription-PCR,RT-PCR)方法,检测ESTs在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达;并用Northern blot杂交方法,检测EST在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况.结果:在3p21区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的EST(N31985),在60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及47.06%(16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有EST(N31985)表达下调,与正常鼻咽上皮组织相比较,差异有统计学意义($P<0.05$).结论:染色体3p21区域EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调,提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)