



УДК 577.113.6:579(252.5+253.4)

## КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ кДНК, КОДИРУЮЩИХ ВАРИАБЕЛЬНЫЕ УЧАСТКИ ЛЕГКОЙ И ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПЕЙ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА

© 1995 г. А. И. Пасхин\*, Т. Н. Головина, В. А. Несмеянов, В. Г. Коробко

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 26.08.94 г.

С помощью обратной транскрипции мРНК из клеток мышечной миеомы LNKВ-2, продуцирующей моноклональные антитела против интерлейкина-2 человека, и последующей полимеразной цепной реакции получены фрагменты ДНК, кодирующие вариабельные участки легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина. Полученные фрагменты были клонированы в векторе рGEM7-Zf(+) и затем секвенированы. Аминокислотная последовательность N-концевых участков обеих цепей иммуноглобулина была подтверждена микросеквенированием фенилтиогидантоиновым методом.

*Ключевые слова:* иммуноглобулин  $G_1$ ;  $F_v$ -фрагменты; клонирование в *E. coli*; кДНК; обратная транскрипция.

Несмотря на большое количество исследований по проблеме узнавания биомолекул, она все еще остается нерешенной. Одна из наиболее привлекательных для ее решения моделей представляет собой взаимодействие антитело-антиген из-за высокой специфичности образования и прочности такого комплекса. При этом широко используемым методом исследования структурной топографии таких комплексов является рентгеноструктурный анализ (см. обзор [1]), однако в этом случае остается неясным, в какой степени в процессе кристаллизации имеют место конформационные изменения компонентов системы антиген-антитело. В принципе спектроскопия ЯМР высокого разрешения может дать ответ на этот вопрос благодаря высокой чувствительности к локальным изменениям конформации. В то же время использование метода ЯМР ограничено из-за большой молекулярной массы молекулы антитела (~150 кДа). Применение методов генотехники сделало доступным получение вариабельных фрагментов антител  $F_v$  меньшей молекулярной массы (~25 кДа), которые сохраняют способность высокоспецифического связывания с антигеном [2 - 4] и поэтому могут быть использованы для изучения взаимодействия антиген-антитело с помощью спектроскопии ЯМР [5].

Ранее В.Е. Луневым с сотр. [6] был получен ряд моноклональных антител против рекомбинантного и природного интерлейкина-2 (IL-2) человека. Одно из них, LNKВ-2, относящееся к подклассу IgG<sub>1</sub>, представляло несомненный интерес для дальнейшего исследования, так как хорошо связывалось как с природным IL-2, так и с рекомбинантным белком. Кроме того, в экспериментах с синтетическими пептидами было показано, что иммуногенный эпитоп этого антитела локализован внутри аминокислотной последовательности 59 - 72 IL-2, а само антитело прочно связывается с этим пептидом [7].

В связи с этим мы предприняли исследование по клонированию последовательностей, кодирующих вариабельные фрагменты антитела LNKВ-2, с целью конструирования в дальнейшем плазмид, обеспечивающих биосинтез одноцепочечных мини-антител для физико-химического изучения. Для достижения поставленной цели мы выбрали подход, основанный на полимеразной цепной реакции с использованием дуплекса мРНК · кДНК в качестве матрицы [8 - 10]. Для этого из  $5 \times 10^6$  клеток гибридомы, продуцирующей антитела LNKВ-2, выделяли суммарную РНК методом экстракции кислым фенолом [11]. Полученную суммарную РНК непосредственно использовали в качестве матрицы для получения кДНК в реакции с обратной транскриптазой вируса птичьего миеобластома (AMV-ревертаза) и олигонуклеотидом (dT)<sub>12-18</sub>. После этого проводили амплификацию

\* Автор для переписки.

Сокращения: IL-2 - интерлейкин-2; IPTG - изопропилтио-β-D-галактопиранозид; X-Gal - 5-бром-4-хлор-3-индоксил-β-D-галактопиранозид.

Олионуклеотиды, использованные в качестве праймеров для амплификации

Шифр	Структура	Литература
ALT-1	ATGGAGTTGTGGTTAAACCTGGTT A C CG C C G TA	[13]
ALT-2	ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCT A C C TA	[13]
HFR-1	GAGGTCAAACCTGCAGCAGTCT C GC G G	[13]
HFR-2	CAGGTGCAGCTCCAACAACCCGGG G A GTGG GT G	[13]
H-CONST	ATCTCCACACACAGGAACCAGTGGATAGAC C GG	[12]
LFR-1	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAA T A C C A GA	[12 - 15]
L-CONST-1	GTTAGATCTCCAGCTTGGTCCC	[14]
L-CONST-2	ACTGGATGGTGGGAAGATGGA	[15]

дуплекса (условия – см. “Экспериментальную часть”) мРНК · κДНК при помощи *Taq*-ДНК-полимеразы с использованием праймеров, структура которых приведена в таблице.

Выбор праймеров сделан на основе анализа литературных данных [12 - 15] по оптимизации праймеров для амплификации последовательностей, кодирующих  $F_v$ -фрагменты иммуноглобулинов подкласса  $G_1$ . Олигонуклеотиды ALT-1, ALT-2, HFR-1, HFR-2 и H-CONST были предназначены для амплификации фрагментов, кодирующих тяжелую цепь, тогда как праймеры LFR-1, L-CONST-1 и L-CONST-2 предназначались для получения фрагментов κДНК легкой цепи. Нами были использованы все возможные комбинации прямых и обратных праймеров. При этом применение праймеров ALT-1 и ALT-2, воспроизводящих последовательность, кодирующую сигнальные пептиды, не привело к получению дискретных фрагментов ДНК. В случае тяжелой цепи успешная амплификация была достигнута при проведении реакции с праймерами HFR-2 и H-CONST; фрагмент κДНК легкой цепи был получен с использованием праймеров LFR-1 и L-CONST-2 (рис. 1). Следует отметить, что в некоторых случаях в результате амплификации получали два фрагмента, незначительно различающиеся по размеру.

Полученные в результате амплификации фрагменты отделяли от избытка праймеров при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле и затем клонировали по сайту *Sma*I в плазмиду pGEM-7Zf(+). Рекомбинантные клоны *E. coli* XL1-Blue отбирали при помощи цветной селекции на среде, содержащей X-Gal и IPTG. Выделенные из неокрашенных клонов плазмиды анализировали на величину вставки при помощи рестриктаз *Eco*RI, *Hind*III, *Bsp*I и *Msp*I. Плазмидные ДНК, содержащие подходящие по размеру вставки, подвергали дальнейшему анализу.

Нуклеотидную последовательность определяли методом Сэнгера, адаптированным для *Taq*-ДНК-полимеразы [16], на двухцепочечной ДНК в качестве матрицы с использованием  $5'$ - $^{32}$ P-меченых

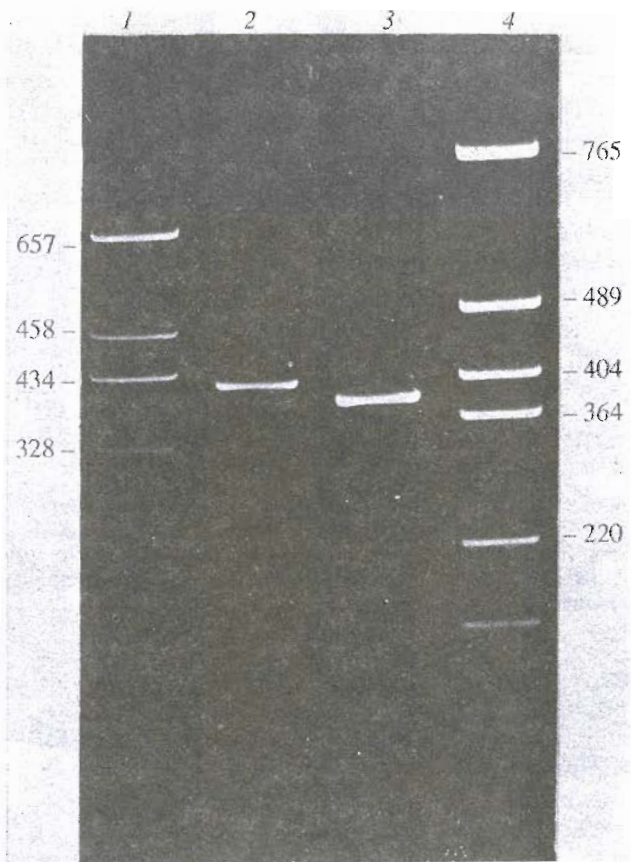


Рис. 1. Электрофорез в 5% полиакриламидном геле продуктов амплификации κДНК, кодирующей  $F_v$ -фрагменты цепей антитела LNKB-2. (1) *Bsp*I-гидролизат плазмиды pGEM-7Zf(+); (2) продукт амплификации κДНК тяжелой цепи; (3) продукт амплификации κДНК легкой цепи; (4) *Msp*I-гидролизат плазмиды pGEM-7Zf(+).



Рис. 2. Нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующих переменные фрагменты тяжелой (а) и легкой цепей (б) иммуноглобулина, секретируемого гибридомой LNKB-2, и соответствующая ей аминокислотная последовательность. Жирным шрифтом показаны экспериментально определенные N-концевые последовательности обеих цепей. Подчеркнуты последовательности нуклеотидов, обусловленные структурой праймеров, использованных при амплификации.

стандартных праймеров для секвенирования. Было проанализировано 5 независимых клонов, полученных после амплификации с праймерами, специфичными для легкой цепи, и 6 клонов, содержащих вставки кДНК тяжелой цепи. Результаты определения нуклеотидной последовательности представлены на рис. 2. Полученные последовательности, фланкированные амплификационными праймерами, содержат единственную протяженную рамку трансляции. Анализ последовательностей с помощью пакета программ "DNA-star" показал высокую степень сходства клонированных фрагментов ДНК с фрагментами генов, кодирующих иммуноглобулины мыши.

Это позволяет сделать вывод, что клонированные нами фрагменты на самом деле кодируют переменные части цепей антитела LNKB-2. Интересно, что некоторые клоны тяжелой и легкой цепей содержали перед 5'-праймером инвертированную последовательность константного праймера. Этим, по всей видимости, объясняется появление второго, незначительно отличающегося по размеру, продукта амплификации (см. выше).

Для того чтобы убедиться в правильности сделанных нами выводов, мы провели препаративное выделение и очистку моноклонального антитела, продуцируемого гибридной миеломой



Рис 26.

LNKB-2 [6]. Затем получили отдельные цепи иммуноглобулина при помощи электрофореза в денатурирующем ПААГ в присутствии тиогликолевой кислоты, после чего осуществили перенос на поливинилидендифторидную мембрану для анализа N-концевой аминокислотной последовательности. В результате определили последовательность 16 N-концевых остатков тяжелой цепи и 18 аминокислот легкой цепи. Сравнение экспериментально определенной аминокислотной последовательности с выведенной из нуклеотидной показывает полное их совпадение, начиная с девятого аминокислотного остатка (последовательность первых восьми остатков предопределена амплификационными праймерами).

Таким образом, установлена аминокислотная последовательность F<sub>v</sub>-фрагментов монокло-

нального антитела LNKB-2 против IL-2 человека и кодирующая ее последовательность кДНК. Это открывает возможности для конструирования на основе клонированных фрагментов одноцепочечных мини-антител.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (Boehringer, Германия), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]rATP, обратную транскриптазу вируса птичьего миеобластома (AMV-ревертаза) и ингибитор РНКазы RNasin (Amersham, Англия); IPTG и X-Gal (Serva, Германия); эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*, *HindIII*, *SmaI* и *Taq*-ДНК-полимеразу производства фирмы Fermentas (Литва); рестриктазы *MspI* и *BspI* производства НПО "Вектор" (Новосибирск);

полинуклеотидкиназа и ДНК-лигаза фага Т4 выделены в лаборатории химии генов модифицированным методом [17].

Бактериальный штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), *F'* *proAB*, *lacI<sup>q</sup>ZAM15*, *Tn10*) – разработка фирмы Stratagene (США); плазида pGEM-7Zf(+) фирмы Promega (США).

Олигонуклеотиды, перечисленные в таблице, а также стандартные праймеры для секвенирования синтезированы в лаборатории химии генов М.С. Щепиновым; олигонуклеотид (dT)<sub>12-18</sub> – препарат фирмы Amersham (Англия).

**Выделение суммарной РНК** проводили из  $5 \times 10^6$  клеток гибридной миеломы LNKВ-2 [6]. К суспензии клеток в 1 мл буфера А, содержащего 25 мМ цитрат натрия (рН 7.0), 4 М гуанидинтиоцианат, 0.5% саркозил и 0.1 мМ меркаптоэтанол, последовательно при умеренном перемешивании прибавляли 0.1 мл 2 М ацетата натрия (рН 4.0), 1 мл фенола, насыщенного водой, и 0.2 мл смеси хлороформ–изоамиловый спирт (49 : 1). Смесь интенсивно перемешивали 20 с, затем выдержали 15 мин при 0°C и центрифугировали 20 мин при 10000g. К водной фазе прибавляли 1 мл изопропанола. Через 1 ч при –20°C осадок РНК отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 10000g. Осадок растворяли в 0.3 мл буфера А и РНК осаждали равным объемом изопропанола. Осадок центрифугировали, промывали 80% этанолом и растворяли в 50 мкл стерильной воды. Качество полученных препаратов РНК проверяли электрофорезом в 1.2% агарозном геле.

**Обратная транскрипция/амплификация.** Раствор 5 - 10 мкг РНК из предыдущего опыта в 40 мкл буфера, содержащего 120 мМ трис-НСl (рН 8.3), 12 мМ MgCl<sub>2</sub>, 150 мМ KCl и 10 пмоль (dT)<sub>12-18</sub>, нагревали 5 мин при 90°C, затем медленно охлаждали до 20°C, после чего прибавляли 5 мкл 100 мМ дитиотреита, 20 ед. ингибитора РНКазы RNazin, дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты до концентрации 1 мМ и 20 ед. обратной транскриптазы. Смесь инкубировали 1 ч при 42°C, фермент инактивировали прогреванием в течение 5 мин при 90°C, депротеинизировали фенольной экстракцией и нуклеиновую кислоту осаждали этанолом. Для последующей амплификации использовали 1/10 часть полученного материала. Полимеразную цепную реакцию проводили в 100 мкл раствора, содержащего 16.6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 мМ трис-НСl (рН 7.5), 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 6.7 мкМ EDTA, по 50 пмоль каждого праймера, 200 мкМ dNTP и 2 - 5 ед. акт. ДНК-полимеразы *T. aquaticus*. Амплификацию (35 циклов) проводили на приборе фирмы Perkin-Elmer Cetus (США). Каждый цикл состоял из денатурации матрицы (94°C, 1 мин), отжига олигонуклеотидов (62°C, 1 мин) и достройки цепей ДНК (72°C,

1 мин). Продукты реакции выделяли при помощи электрофореза в геле легкоплавкой агарозы.

**Нуклеотидную последовательность определяли** методом дидезокситерминаторов, адаптированным для *Taq*-ДНК-полимеразы [16], с использованием 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилированных стандартных праймеров и двухцепочечной плазмидной ДНК в качестве матрицы. Для элонгации цепи использовали стандартные "буквенные" смеси в буфере для полимеразной цепной реакции как в предыдущем опыте. Обычно проводили 8 - 10 циклов, состоящих из денатурации (94°C, 1 мин), отжига (56°C, 1 мин) и элонгации (72°C, 1 мин). Разделение продуктов реакции и автордиографию осуществляли стандартным методом [16].

**Определение N-концевой аминокислотной последовательности.** Моноклональные антитела LNKВ-2 очищали как описано в работе [6]. 50 - 70 мкг очищенных антител растворяли в буфере, содержащем 125 мМ трис-НСl (рН 6.8), 4% SDS, 20% глицерина и 10% 2-меркаптоэтанола, нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 мин и подвергали электрофорезу 12% ПААГ в денатурирующих условиях [17] на приборе SE250 Mighty Small II Vertical Slab Gel Unit (Hoeffer, Германия). В электродный буфер катодной камеры добавляли тиогликолят натрия до концентрации 0.176 мМ. По окончании разделения белки электрофоретически переносили на мембрану PVDF Immobilon Transfer (Millipore, США) [18]. Перед переносом мембрану смачивали сначала метанолом, а затем буфером для переноса. Перенос проводили в 25 мМ бикарбонате натрия на приборе Semi-Dry Electrobloetter A (Ancos, Дания) при силе тока 0.8 мА/см<sup>2</sup> в течение 2 ч при 22°C, после чего белки на мембране окрашивали 5 мин 0.1% Ку-масси R-250 в 50% метаноле, избыток красителя 15 мин отмывали 50% метанолом. Затем мембрану высушивали и вырезали полоски, соответствовавшие легкой и тяжелой цепям антител. Полоски помещали в реакционную камеру аминокислотного секвенатора Applied Biosystems 470A (США), анализ фенилтиогидантоиновых производных аминокислот проводили на анализаторе Applied Biosystems 120A (США).

Авторы выражают благодарность М.С. Щепинову (ИБХ РАН) за синтез олигонуклеотидов и О.Ю. Чертову (ИБХ РАН) за определение N-концевой аминокислотной последовательности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davies D.R., Padlan E.A., Sheriff S. // Ann. Rev. Biochem. 1990. V. 59. P. 439 - 473.
2. Riechmann L., Foote J., Winter G. // J. Mol. Biol. 1988. V. 203. P. 825 - 828.
3. Skerra A., Pluckthun A. // Science. 1988. V. 240. P. 1038 - 1041.

4. Better M., Chang C.P., Robinson R.R., Horwitz A.H. // Science. 1988. V. 240. P. 1041 - 1043.
5. Wright P.E., Dyson H.J., Lerner R.A., Riechmann L., Tsang P. // Biochem. Pharmacol. 1990. V. 40. № 1. P. 83 - 88.
6. Lunev V.E., Lukin Yu.V., Kazennykh N.V., Belyaev S.V., Zubov V.P., Nesmeyanov V.A. // Biomed. Sci. 1990. V. 1. № 1. P. 68 - 72.
7. Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Лунев В.Е., Немеянов В.А., Иванов В.Т. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 908 - 921.
8. Brenner C.A., Tam A.W., Nelson P.A., Engelman E.G., Suzuki N., Fry K.E., Larrick J.W. // BioTechniques. 1989. V. 7. № 10. P. 1096 - 1103.
9. Лебедеенко Е.Н., Берлин Ю.А. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. № 5. С. 586 - 588.
10. Jones S.T., Bendig M.M. // BioTechnology. 1991. V. 9. № 1. P. 88 - 90.
11. Chomczynsky P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. № 1. P. 156 - 159.
12. Orlandi R., Guessow D.H., Jones P.T., Winter G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 10. P. 3833 - 3837.
13. Coloma M.J., Larrick J.W., Ayala M., Gavilondo-Cowley J.V. // BioTechniques. 1991. V. 11. № 2. P. 152 - 156.
14. Chandhary V.K., Batra J.K., Gallo M.G., Willingham M.C., Fitzgerald D.J., Pastan I. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 3. P. 1066 - 1070.
15. Larrick J.W., Coloma M.J., del Valle J., Fernandez M.E., Fry K.E., Gavilondo-Cowley J.V. // Scand. J. Immunol. 1990. V. 32. № 2. P. 121 - 128.
16. Innes M.A., Myambo K.B., Gelfand D.H., Brown M.A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 24. P. 9436 - 9444.
17. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680 - 685.
18. Matsudaira P. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 21. P. 10035 - 10038.

## Cloning cDNA Encoding F<sub>v</sub>-Fragments of the Light and Heavy Chains of the Monoclonal Antibody against Human Interleukin-2

A. I. Pashkin\*, T. N. Golovina, V. A. Nesmeyanov, and V. G. Korobko

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

**Abstract** – DNA fragments coding for the variable fragments of the heavy and light chains of the immunoglobulin G<sub>1</sub> against human recombinant interleukin-2 were produced using reverse transcription of the total RNA isolated from the murine hybrid myeloma cell line LNKb-2 followed by amplification of the RNA-DNA duplexes with degenerated primers. The fragments obtained were cloned into the plasmid pGEM7-Zf(+) and their structures were determined. The fragments cloned were proved to encode the F<sub>v</sub>-fragments by sequencing N-termini of the light and heavy chains of the antibody.

*Key words:* immunoglobulin G<sub>1</sub>, F<sub>v</sub>-fragments, cloning in *E. coli*, cDNA, reverse transcription.

\* To whom correspondence should be addressed.