

# 人 BLYS 基因克隆、表达和抗人 BLYS 单克隆抗体的制备

张志方<sup>1</sup>, 张春艳<sup>2</sup>, 潘敬运<sup>1</sup>, 林学颜<sup>2</sup>

(中山大学中山医学院 1. 生理学教研室, 2. 免疫学教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】研制抗人 BLYS 单克隆抗体, 以进一步探讨人 BLYS 与自身免疫性疾病的关系。【方法】将人 BLYS 基因克隆到融合蛋白原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 构建重组质粒 pGEX-4T-1/hBLYS, 用此重组质粒转化大肠杆菌 BL21, 加 IPTG 诱导大肠杆菌表达 GST-hBLYS 融合蛋白, 用此融合蛋白免疫 BALB/c 鼠, 取鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合, 用 ELISA 法筛选阳性克隆, 用免疫印迹和流式细胞仪进一步鉴定抗体的特异性。【结果】重组质粒双酶切结果和 DNA 序列测定以及表达蛋白 SDS-PAGE 电泳结果表明, pGEX-4T-1/hBLYS 重组质粒可以正确表达 GST-hBLYS 融合蛋白; ELISA、免疫印迹和流式细胞仪检测结果表明, 1c6 杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体可以特异性结合人 T 淋巴细胞膜表面 BLYS 的膜外区, 属于 IgG2b 亚类。【结论】所获得的单克隆抗体具有能够结合人 T 淋巴细胞上的 BLYS 特异性, 可用于研究人 BLYS 与自身免疫性疾病的关系。

**关键词:** BLYS; 抗体, 单克隆; T 淋巴细胞

中图分类号: R392.11; R331.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)03-0176-04

**Molecular Cloning, Expression of hBLYS and Preparation of Anti-hBLYS Monoclonal Antibody** ZHANG Zhi-fang<sup>1</sup>, ZHANG Chun-yan<sup>2</sup>, PAN Jing-yun<sup>1</sup>, LIN Xue-yan<sup>2</sup>. (1. Department of Physiology, 2. Department of Immunology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

**Abstract** 【Objective】To obtain monoclonal antibodies against human BLYS(B lymphocyte stimulator). 【Methods】The DNA fragment of hBLYS was cloned into pGEX-4T-1 plasmid, and transformed into E coli BL21. The expression of GST-hBLYS fusion protein was induced by IPTG in E coli BL21. This protein was used as antigen to immunize BALB/c mice. The splenocytes of immunized mice were fused with myeloma cells SP2/0 to produce hybridoma cell line which could secrete anti-hBLYS antibodies. The verification of antibodies specificity were characterized by ELISA, Western blot, and flow cytometry. 【Results】The cloned insert was identified by both sequencing analysis of recombinant pGEX-4T-1/hBLYS plasmid and double digestion of recombinant pGEX-4T-1/hBLYS plasmid with restriction enzymes *EcoRI* and *SalI*. The expression of recombinant GST-hBLYS fusion protein was confirmed by SDS-PAGE. The monoclonal antibody generated from hybridoma 1c6 was obtained with specificity for extracellular domain of hBLYS on human peripheral blood CD3<sup>+</sup> T cell activated by hIFN- $\gamma$ . The monoclonal antibody of hybridoma 1c6 belongs to IgG2b. 【Conclusion】The monoclonal antibody against hBLYS with high activity and specificity have been established successfully. It provides us a basis for further studies of relationship between hBLYS and autoimmune diseases.

**Key words:** BLYS(B lymphocyte stimulator); antibody, monoclonal; T-lymphocytes

B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator, BLYS)是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)家族的一个新成员, 含有 285 个氨基酸残基, 属 II 型跨膜蛋白。BLYS 主要由 T 细胞和树突状细胞产生, 其受体仅表达于 B 细胞膜表面。动物实验证明, BLYS 的主要作用是促进生发中心 B 细胞增生和延长成熟 B 细胞存活。BLYS 过度表达可导致自身免疫性疾病, 例如系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)等。抗鼠 BLYS 抗体可阻断 BLYS 分子与其受体结合, 缓解模型鼠 SLE 症状<sup>[1~3]</sup>。目前, BLYS 与自身免疫性疾病关系的研究仅限于动物实验, BLYS 与人自身免疫性疾病关系的研究尚处起步阶段, 正成为自身免疫性疾病诊

断和治疗领域研究的一个新热点。本实验中, 我们在已经扩增出 hBLYS 基因的基础上, 构建含有全长 hBLYS 基因的原核表达载体, 获得 BLYS 表达产物, 并免疫动物以制备抗 hBLYS 单克隆抗体, 以期用于研究 hBLYS 与自身免疫性疾病关系, 为研制诊断和治疗自身免疫性疾病的制剂打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒和菌株

pGEX-4T-1 质粒为 Pharmacia 公司产品; 大肠杆菌 BL21 为本校免疫学教研室保存菌株。

### 1.2 动物及细胞系

昆明鼠(雌性, 6~8 周龄)和 BALB/c 纯系鼠

收稿日期: 2002-01-15

作者简介: 张志方(1964-), 男, 河南平顶山人, 副教授, 博士研究生。

(雌性,6~7周龄)购自中山大学实验动物中心;鼠骨髓瘤细胞SP2/0,购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

### 1.3 试剂

各种DNA限制性内切酶、T4 DNA连接酶、标准分子量蛋白等购自上海生工生物工程有限公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成;异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的兔抗鼠IgG购自DAKO公司;HAT、HT、PEG、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG购自Sigma公司。

### 1.4 方法

1.4.1 pGEX-4T-1/hBLyS表达质粒的构建 选用谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione *S*-transferase, GST)融合蛋白表达载体pGEX-4T-1,将载体和hBLyS基因(含有EcoRI和Sal I酶切位点,文章待发表)经EcoRI和Sal I双酶切后,从琼脂糖凝胶回收酶切产物, T4连接酶连接反应18℃,16h,构建重组质粒pGEX-4T-1/hBLyS。

1.4.2 大肠杆菌的转化及重组质粒的酶切鉴定 制备感受态大肠杆菌BL21细胞,加重组质粒和对照质粒置冰浴30min,40℃热休克90s,再冰浴2min;转入LB培养基中,37℃45min摇菌培养后,将菌液铺于含有氨苄青霉素的LB固体培养基上,37℃过夜,次日观察菌落,并挑取6个菌落培养后,提取质粒经EcoRI和Sal I双酶切,通过限制性内切酶图谱分析和重组质粒DNA序列测定,鉴定目的基因是否插入感受态细胞。

1.4.3 GST-hBLyS融合蛋白的诱导表达 将含有pGEX-4T-1/hBLyS质粒的菌株放入含氨苄青霉素的2×YTG培养基中37℃过夜摇菌培养,次日按1:100稀释培养过夜的菌液转种,培养2h,菌液OD<sub>600</sub>=0.4~0.6时,加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG)至终浓度为0.2mmol/L,未加IPTG诱导的菌液作为对照,继续培养4h后,离心收集菌体进行SDS-PAGE分析。选择阳性菌株大量诱导和纯化GST-hBLyS融合蛋白。

1.4.4 免疫动物 将GST-hBLyS融合蛋白0.5mL(2g/L)作为抗原与等量的完全福氏佐剂混合乳化,取3只6~7周龄的雌性健康BALB/c小鼠同时用GST-hBLyS融合蛋白进行免疫。细胞融合前第3天,用GST-hBLyS融合蛋白100μL进行加

强免疫。

1.4.5 细胞融合 取SP2/0细胞和加强冲击免疫后的鼠脾细胞悬液于50mL离心管中,按常规方法进行细胞融合并加入含HAT的RPMI-1640完全培养基,铺有饲养层细胞的24孔细胞培养板,每孔1mL,在体积分数5%CO<sub>2</sub>、37℃条件下培养。在融合后第10天,检测培养上清中的特异性抗体。

1.4.6 阳性克隆的筛选及克隆化 分别包被GST-hBLyS融合蛋白和GST蛋白作为抗原,然后加入杂交瘤细胞的培养上清(含杂交瘤细胞分泌的抗体),用酶联免疫吸附测定(ELISA)法筛选阳性克隆。选择与GST-hBLyS融合蛋白呈阳性反应且与GST蛋白呈阴性反应的杂交瘤细胞作为阳性细胞克隆,连续3次亚克隆培养,直至单克隆化。

1.4.7 抗体的特异性鉴定和免疫学特性分析 ①ELISA:按常规ELISA方法。②免疫印迹(Western blot):按常规免疫印迹方法。③流式细胞技术(flow cytometry, FACS):从人外周血分离单个核细胞,经人IFN-γ激活3d后,实验组加单克隆后的杂交瘤细胞的培养上清,对照组加含体积分数10%胎牛血清的RPMI-1640培养液,4℃孵育1h,用常规FACS方法测定所制备的抗体(FITC标记)与单个核细胞、CD3<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的结合情况。④抗体效价测定:包被GST-hBLyS融合蛋白做抗原,用ELISA测定培养上清和腹水的效价:用0.01mol/L PBS倍比稀释培养上清和腹水,同时设立阴性对照孔(只加PBS)和阳性对照孔(只加1.4.4中免疫鼠的血清)。所检测的培养上清为单克隆杂交瘤细胞的培养上清,所检测的腹水为BALB/c鼠腹腔注射单克隆杂交瘤细胞后诱导生成的腹水。⑤抗体亚类测定:采用双向免疫扩散方法测定抗体类别。

## 2 结果

### 2.1 pGEX-4T-1/hBLyS重组质粒的构建和鉴定

取构建的pGEX-4T-1/hBLyS质粒转化菌进行扩增后,抽提质粒DNA进行酶切鉴定,经10g/L的琼脂糖凝胶电泳,可见经EcoRI和Sal I双酶切后,质粒DNA成为两个片段,分别为4.9kb的pGEX-4T-1和858bp的hBLyS基因片段,与理论值相符(图1)。

### 2.2 重组质粒DNA序列测定

重组表达质粒测序结果显示(图2),重组质粒中所含目的基因片段与国外报道的hBLyS cDNA序列完全一致<sup>[1]</sup>;分析阅读框架,证明该重组质粒已正向插入目的基因,提示该重组表达质粒能正确表达

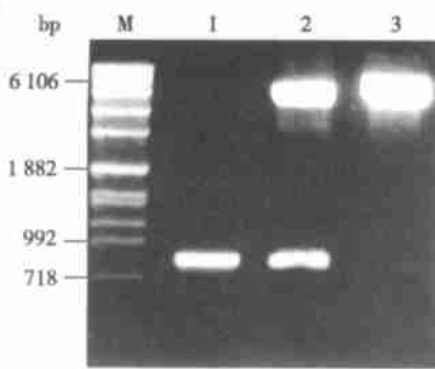


图1 重组质粒 pGEX-4T-1/hBLyS 的酶切分析

Fig 1 Restriction map of recombinant plasmid (10 g/L agarose gel electrophoresis)

- M: lambda DNA/EcoRI (BstEII) marker; 1. RT-PCR products;  
2. recombinant plasmid pGEX-4T-1/hBLyS digested by EcoRI and Sall;  
3. plasmid pGEX-4T-1 digested by EcoRI

GST-hBLyS 融合蛋白。

### 2.3 GST-hBLyS 融合蛋白的诱导表达和大量纯化

含重组质粒 pGEX-4T-1/hBLyS 的菌株经 IPTG 诱导后, 进行 100 g/L SDS-PAGE 分析, 结果表明, 相对分子质量  $M_r=58\ 000$  (融合蛋白) 处有明显的蛋白质表达条带; 未经 IPTG 诱导的重组质粒 pGEX-4T-1/hBLyS 在 58 000 处无条带显示; 空质粒 pGEX-4T-1 经 IPTG 诱导后, 在  $M_r=26\ 000$  (GST 蛋白) 处有明显的蛋白质表达条带 (图 3)。说明 pGEX-4T-1/hBLyS 在宿主菌 BL21 中表达了重组 GST-hBLyS 融合蛋白。

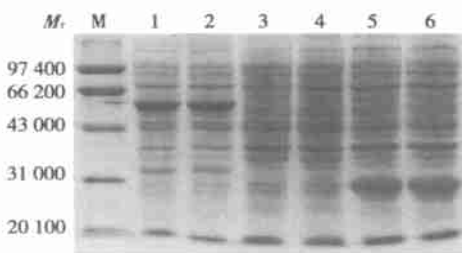


图3 大肠杆菌 BL21 中 pGEX-4T-1/hBLyS 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig 3 Analysis of expressing products of GST-hBLyS fusion protein in *E. coli* BL-21 by SDS-PAGE

M: protein marker; lane 1~2:  $M_r=58\ 000$  GST-hBLyS expression products in lysate of *E. coli* BL-21 induced by IPTG; lane 3~4: lysate of *E. coli* BL-21 cells; lane 5~6:  $M_r=26\ 000$  GST expression products in lysate of *E. coli* BL-21 induced by IPTG

### 2.4 抗 hBLyS 单克隆抗体的制备

用适量纯化的 GST-hBLyS 融合蛋白免疫

BALB/c 鼠, 将鼠脾细胞和杂交瘤细胞进行融合; 挑选阳性克隆并连续克隆 3 次, 得到 5 株分泌抗 hBLyS 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 7a4、1c6、7c3、1g2 和 1g4。

### 2.5 抗 hBLyS 单克隆抗体的特异性鉴定

2.5.1 ELISA 法 5 株杂交瘤细胞株培养上清均与 GST-hBLyS 融合蛋白反应, 与 GST 蛋白无反应。说明 5 株单克隆抗体是针对 hBLyS 蛋白的单克隆抗体。

2.5.2 Western blot 分别用 GST-hBLyS 融合蛋白和 GST 蛋白作为抗原, 经 Western blot 鉴定, 结果在  $M_r=58\ 000$  处有一抗原-抗体结合的条带, 在  $M_r=26\ 000$  处无特异性条带 (图 4)。进一步证明 5 株杂交瘤细胞株所分泌的单克隆抗体可结合 GST-hBLyS 融合蛋白, 但不与 GST 蛋白反应, 是特异性针对 hBLyS 的单克隆抗体。

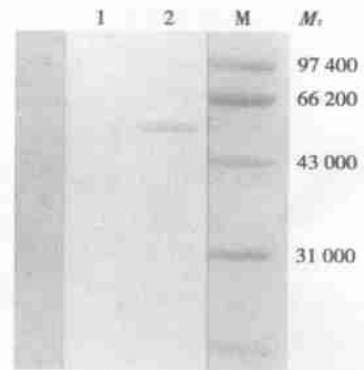


图4 抗体特异性的 Western blot 分析

Fig 4 Western blot analysis of the antibody specificity

lane 1:  $M_r=26\ 000$  GST expression products; lane 2:  $M_r=58\ 000$  GST-hBLyS expression products

2.5.3 FACS 检测 用 IFN- $\gamma$  激活的人外周血单个核细胞作为抗原, 与 5 株杂交瘤细胞的培养上清孵育 1 h, 做 FACS 单标检测, 结果显示 1c6 细胞株分泌的单抗能与激活的人外周血单个核细胞结合, 结合率为 6.7% (对照组为 1.9%)。用 IFN- $\gamma$  激活的人外周血单个核细胞作抗原, FACS 双标结果显示, 1c6 细胞株分泌的单抗能与激活的人外周血 CD3<sup>+</sup> T 细胞结合, 主要为 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T 细胞 (图 5)。说明 1c6 细胞株分泌的抗体是特异性针对 T 细胞表面 hBLyS 分子。

### 2.6 抗体免疫学特性分析

①杂交瘤细胞分泌抗体的效价测定: 采用 ELISA (倍比稀释法) 测定 1c6 的培养上清和腹水的

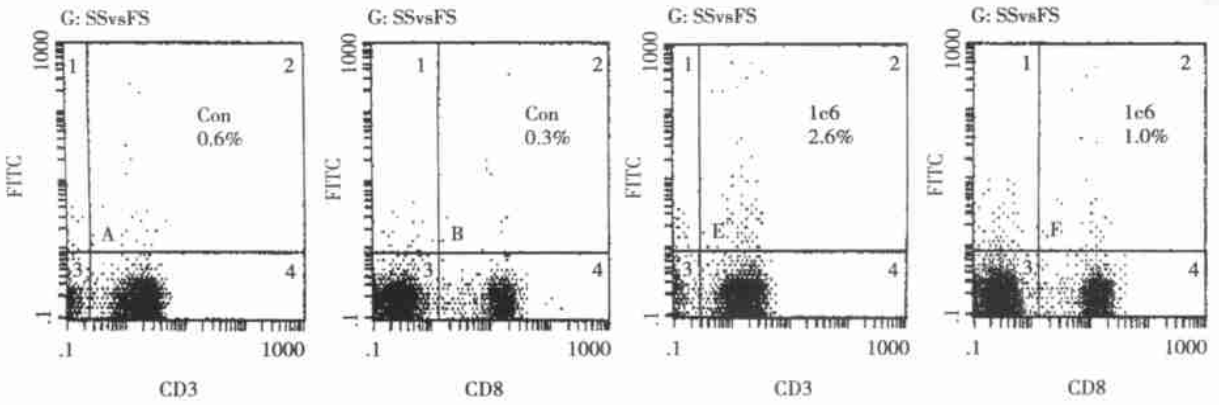


图 5 1c6 单克隆抗体与 CD3<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞结合的 FACS

Fig 5 Flow cytometric analysis of 1c6 monoclonal antibodies binding to hBLyS on human CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes activated by hIFN- $\gamma$

Con: control(RPMI 1640 medium with  $\varphi$ =10% fetal bovine serum); 1c6: culture supernatants of hybridoma 1c6(anti-hBLyS McAb labeled by FITC)

抗体效价(表 1)。②单克隆抗体亚类鉴定: 用培养上清做双向免疫扩散测定单抗的亚类(表 1)。

表 1 1c6 杂交瘤细胞株分泌的抗体的效价和亚类

Table 1 Titers and subtypes of monoclonal antibody from 1c6 hybridoma

Hybridoma	Titers of culture supernatants	Titers of ascites	Subtypes
1c6	1:3 200	1:25 600	IgG2b

### 3 讨论

BLyS 被不同的研究小组分别命名为 THANK (TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor  $\kappa$ B, and c-jun NH2-terminal kinase)<sup>[2]</sup>、TALL-1 (TNF and apoptosis ligand-related leukocyte-expressed ligand 1)<sup>[3]</sup>、 $\alpha$ TNF4<sup>[4]</sup>、TNFRSF19<sup>[5]</sup>、BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family)<sup>[6,9]</sup> 等。BLyS 的特异性在于其受体仅存在于 B 细胞膜上, 它对 B 细胞的增生和存活发挥重要调节作用。MacKay 等<sup>[7]</sup> 的实验结果表明, BLyS 转基因小鼠外周血 B 细胞数量增加, B 细胞存活时间延长, 血浆 IgM、IgG、IgA、IgE、IgD 显著增加, 5 个月小鼠出现肾免疫复合物沉积和蛋白尿。研究 BLyS 与人类自身免疫性疾病的关系, 探讨阻断 BLyS 与 B 细胞膜受体结合从而达到特异性抑制 B 细胞活化正成为治疗自身免疫性疾病新途径研究的热点<sup>[8~11]</sup>。我们构建重组质粒并表达 GST-hBLyS 融合蛋白, 用此

融合蛋白作为抗原, 既可增强抗原免疫原性, 又给筛选带来方便。在筛选时, 选择与 GST-hBLyS 融合蛋白反应而与 GST 蛋白无反应的特异性杂交瘤细胞株, 最后用激活的 T 细胞经 FACS 分析, 即可鉴定为特异性抗 hBLyS 分子的单克隆抗体。

pGEX-4T-1 为表达 GST 融合蛋白的原核高效表达载体, 带有强的 tac 启动子。构建的质粒中, SD 序列下游是 GST 基因, pGEX-4T-1 的多克隆酶切位点位于 GST 基因之后, 当基因进行表达时, 表达产物为 GST 和目的基因融合蛋白, 该表达系统可以克服转录与转录后水平对外源基因表达可能产生的不利影响。本实验构建 pGEX-4T-1/hBLyS 重组质粒, 用此重组质粒转化大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导表达 GST-hBLyS 融合蛋白。实验结果表明, 构建的重组质粒 pGEX-4T-1/hBLyS 经酶切鉴定和序列分析证实含有 hBLyS 基因; 融合蛋白相对分子质量  $M_r = 58\ 000$  (其中 GST 的  $M_r = 26\ 000$ , hBLyS 蛋白  $M_r = 32\ 000$ ), 与预期结果和国外文献报道相符<sup>[1]</sup>。

经免疫动物、细胞融合和连续克隆后, 采用 ELISA 法, 对所获得的杂交瘤细胞株进行特异性鉴定, 结果显示 5 株细胞的培养上清都只与 GST-hBLyS 融合蛋白反应, 而与 GST 蛋白无交叉反应, 说明 5 株杂交瘤细胞所分泌的抗体均为 hBLyS 特异性。Western blot 显示在  $M_r = 58\ 000$  部位有单一抗原-抗体反应条带, 在  $M_r = 26\ 000$  (GST 蛋白) 部位无条带出现, 再一次证明了 5 株杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体是针对 hBLyS 分子。为了鉴定

(下转第 207 页 to page 207)

本研究显示 CD<sub>54</sub>在成人 B-ALL 表达明显高于 T-ALL 表达,对于 AML, CD<sub>54</sub>在 M<sub>3</sub> 型中表达明显高于其它类型。这与新近他人<sup>[9]</sup>在儿童急性淋巴细胞白血病的结果相一致,说明 CD<sub>54</sub>表达与细胞类型有关。

本资料显示化疗后完全缓解组 CD<sub>54</sub>表达可升至正常范围。这提示有效的化疗药物可调节白血病细胞黏附分子表达,检测黏附分子 CD<sub>54</sub>改变可预示化疗疗效。

#### 参考文献:

- [1] Boyd A W, Dunn S M, Fecondo J V, *et al.* Regulation of expression of a human intercellular adhesion molecules during lymphohematopoietic differentiation [ J ]. *Blood*, 1989, 73(7): 1896.
- [2] 董秀珍, 罗绍凯, 洪文德, 等. 黏附分子 CD<sub>11a</sub>, CD<sub>11b</sub>, CD<sub>62L</sub>在恶性淋巴增殖性疾病的表达 [ J ]. *中国免疫学杂志*, 2000, 16(11): 211.
- [3] 傅宇阳, 何晓顺, 陈剑琳, 等. 外周血淋巴细胞 LAF-1 与肝移植急性排斥的关系 [ J ]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(3): 192.

- [4] Bendall L J, Kortlepe L K, Gottlieb D J, *et al.* GM-CSF enhances IL-2 activated natural killer cell lysis of clonogenic AML cell by up-regulating target cell expression of ICAM-1 [ J ]. *Leukemia*, 1995, 9(2): 677.
- [5] 黄耘, 李树浓, 罗学群, 等. 全反式维甲酸对急淋白血病骨髓基质细胞黏附能力的影响 [ J ]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(5): 369.
- [6] Molica S, Dattilo A, Mannella A, *et al.* Expression on leukemic cells and serum circulating levels of intercellular adhesion molecules-1(ICAM) in B-cell chronic lymphocytic leukemia; implications for prognosis [ J ]. *Leuk Res*, 1995, 19(8): 243.
- [7] Terol M J, Lopez-Guillermo A, Bosch F, *et al.* Expression of the adhesion molecule ICAM in non-hodgkin lymphoma: relationship with tumor dissemination and prognostic importance [ J ]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(1): 35.
- [8] 王江方, 张学光, 张毅, 等. 急性淋巴细胞性白血病细胞及其骨髓基质细胞黏附分子表达和黏附行为的探讨 [ J ]. *中国免疫学杂志*, 1996, 12(5): 290.
- [9] Mielcarek M, Sperling C, Schrappe M, *et al.* Expression of intercellular adhesion molecules 1(ICAM) in childhood acute lymphoblastic leukemia; correlation with clinical features and outcome [ J ]. *Br J Haematol*, 1997, 96(2): 301.

(编辑 黄小延)

(上接第 179 页 from page 179)

所得到的抗体能否与 hBLyS 分子膜外区结合,我们采用了流式细胞技术。结果显示,1c6 单克隆抗体能与激活的人外周血单个核细胞和 T 细胞结合(主要是 CD<sub>3</sub><sup>+</sup> CD<sub>8</sub><sup>-</sup> T 细胞),1g4 抗体与激活的人外周血单个核细胞和 T 细胞结合率高于对照组而低于 1c6,但 7a4、7c3、和 1g2 等 3 株细胞分泌的单抗不能结合激活的人外周血单个核细胞膜上的 BLyS。这提示 1c6 和 1g4 抗体所针对的抗原决定簇位于 hBLyS 分子的膜外区,而 7a4、7c3 和 1g2 细胞株所分泌抗体所针对的抗原决定簇位于 hBLyS 分子的膜内区或跨膜区。分析 1c6 抗体的免疫学特性分析表明,它属于 IgG2b,其在腹水中抗体的效价达到了 1:25 600。

综上所述,我们得到了 1c6 和 1g4 杂交瘤细胞株,它们可以分泌特异性结合 hBLyS 分子细胞膜外区的单克隆抗体,为下一步建立自身免疫性疾病的检测指标等奠定基础。

(本文图 2 见封 3 Fig. 2 Shown in inside back cover)

#### 参考文献:

- [1] Moore P A, Belvedere O, Orr A, *et al.* BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator [ J ]. *Science*, 1999, 285(5425): 260.
- [2] Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, *et al.* Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue

- that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase [ J ]. *J Biol Chem*, 1999, 274(23): 15978.
- [3] Shu H B, Hu W H, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens [ J ]. *J Leukoc Biol*, 1999, 65(5): 680.
- [4] Gross J A, Johnston J, Mudri S, *et al.* TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease [ J ]. *Nature*, 2000, 404(6781): 995.
- [5] Hu S, Tamada K, Ni J, *et al.* Characterization of TNFRSF19, a novel member of the tumor necrosis factor receptor superfamily [ J ]. *Genomics*, 1999, 62(1): 103.
- [6] Schneider P, MacKay F, Steiner V, *et al.* BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth [ J ]. *J Exp Med*, 1999, 189(11): 1747.
- [7] MacKay F, Woodcock S A, Lawton P, *et al.* Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations [ J ]. *J Exp Med*, 1999, 190(11): 1697.
- [8] Laabi Y, Strasser A. Lymphocyte survival: ignorance is BlyS [ J ]. *Science*, 2000, 289(5481): 883.
- [9] Waldschmidt T J, Noelle R J. Long live the mature B cell - a BAFFing mystery resolved [ J ]. *Science*, 2001, 293(5537): 2012.
- [10] Thompson J S, Bixler S A, Qian F, *et al.* BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF [ J ]. *Science*, 2001, 293(5537): 2018.
- [11] Schiemann B, Gommernan J L, Vora K, *et al.* An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway [ J ]. *Science*, 2001, 293(5537): 2111.

(编辑 张敏瑞)

人 BLYS 基因克隆、表达和抗人 BLYS 单克隆抗体的制备 (正文见第 176 页)

Molecular Cloning, Expression of hBLYS and Preparation of Anti-hBLYS Monoclonal Antibody (Text in page 176)

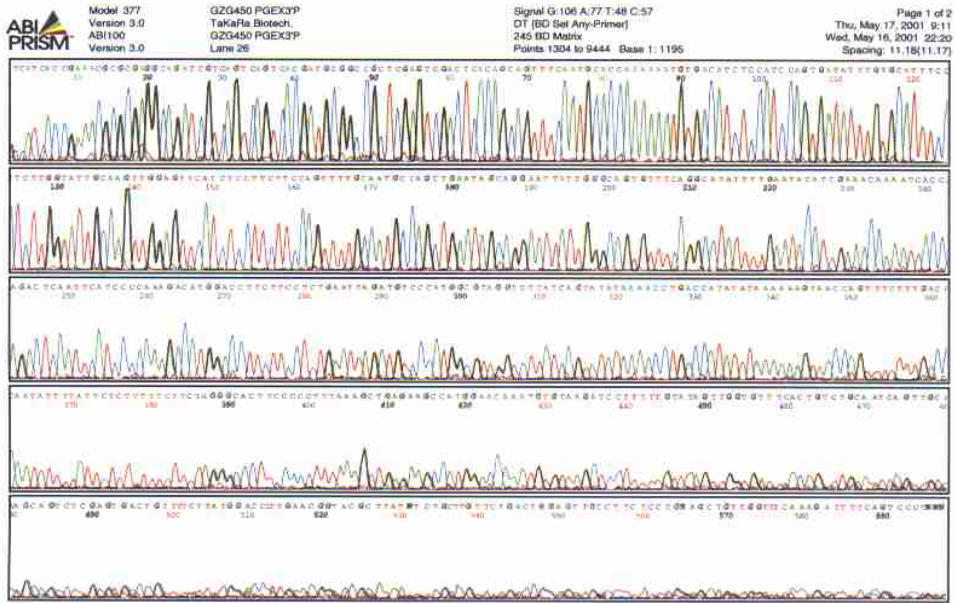


图 1 重组表达质粒 pG EX-4T-1/hBLYS 部分序列测定

Fig. 1 The partial Sequencing results of recombinant expression plasmid pGEX-4T-1/hBLYS

帕金森病猴模型脑多巴胺转运体 SPECT 显像 (正文见第 183 页)

The Dopamine Transporter SPECT Imaging in Hemiparkinsonian Monkeys' Brain (Text in page 183)

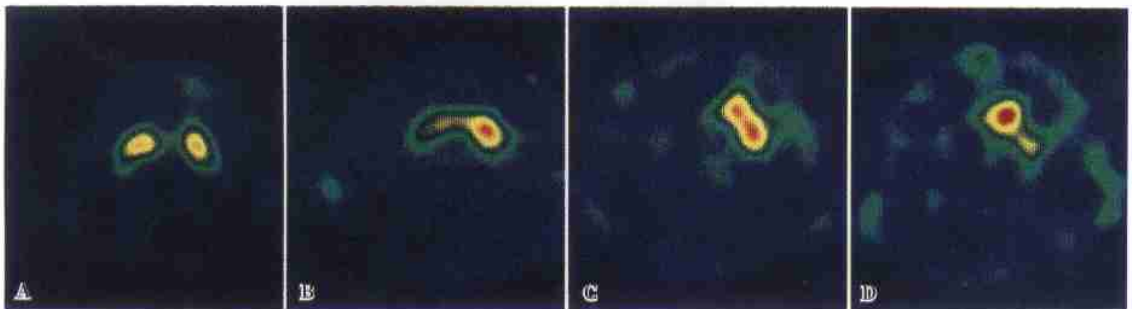


图 1 猴脑 DAT <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 SPECT 显像

Fig. 1 Dopamine transporter SPECT imaging in monkey's brain with <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1

A: Showing symmetry and accumulation of the specific radioactivity uptake in bilateral striatum in the normal monkey's brain; B: Showing decrease of the specific radioactivity uptake in right striatum in the brain of MPTP-infusion monkey not being the hemiparkinsonian model; C: Showing lack of the specific radioactivity uptake in right striatum in the brain of MPTP-lesioned hemiparkinsonian monkey; D: After 2 months administration of piribedil, the specific radioactivity uptake didn't recover in bilateral striatum in the brain of hemiparkinsonian monkey comparing with that before treatment