文章编号:1000-5404(2005)19-1911-04

论著

噬菌体抗体库技术制备胃癌单抗MGd1的抗独特型抗体

何凤田[1*],李蓉芬[1*],郑英如[2],高会广[1],吉 清[1],龚 薇[1],胡 颖[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042)

提 要:目的 获得胃癌单抗MGd1的噬菌体呈现型抗独特型抗体(抗-Id),为研制针对MGd1的抗-Id重组胃癌瘤苗创造条件。**方法** 分离经单抗免疫鼠脾脏的mRNA,经RT-PCR分别扩增抗体VH和VL DNA,进而连接形成ScFv DNA。将ScFv DNA与载体pCANTAB5E的连接产物转化于大肠杆菌TG1,经M13KO7挽救后获得噬菌体呈现型ScFv文库。以MGd1对文库进行4轮筛选后,随机挑取克隆经ELISA筛选呈现抗-Id ScFv的噬菌体单克隆,进而经竞争ELISA对其所属抗-Id类型进行初步鉴定。**结果** VH、VL和ScFv DNA分别约为340、320和750 bp。抗体ScFv文库经4轮筛选后,在随机筛检的40个克隆中得到17个呈现抗-Id ScFv的噬菌体单克隆。在17个克隆中,有3个呈现β或γ型抗-Id ScFv。**结论** 应用噬菌体抗体库技术成功制备了针对单抗MGd1的抗-Id ScFv,从而为筛选新的胃癌重组抗-Id瘤苗奠定了基础。

关键词:胃癌;单克隆抗体;抗独特型抗体;噬菌体;抗体库
中图法分类号:R392-33;R392.7;R735.2 **文献标识码**:A

Generation of anti-idiotypic antibody to monoclonal antibody MGd1 directed against gastric carcinoma by phage antibody library technique

HE Feng-tian[1*], LI Rong-fen[1*], ZHENG Ying-ru[2], GAO Hui-guang[1], JI Qing[1], GONG Wei[1], HU Ying[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Chongqing 400038, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To pave the way for developing recombinant anti-idiotypic antibody (anti-Id) vaccine of gastric carcinoma by generating phage-displayed anti-Id to monoclonal antibody MGd1 directed against the cancer. **Methods** Balb/c mice were immunized i.p. with MGd1 conjugated with KLH, and mRNA was isolated from the spleens of the immunized mice. VH and VL DNAs of the antibody were amplified separately by RT-PCR and assembled into ScFv DNAs with a linker DNA by PCR. The ScFv DNAs were ligated into the phagemid vector pCANTAB5E and the ligated sample was transformed into competent *E. coli* TG1. The transformed cells were infected with M13KO7 helper phage to yield phage antibody ScFv library. After four rounds of panning to the library with MGd1, the MGd1-positive clones were selected by ELISA from the enriched phages. The types of the anti-Id ScFv displayed on the selected phage clones were preliminary identified by competition ELISA. **Results** The VH, VL and ScFv DNAs were about 340 bp, 320 bp and 750 bp respectively. After four rounds of panning to the antibody library, 17 MGd1-positive phage clones displayed anti-Id ScFv were selected from 40 enriched phage clones, among which 3 displayed β or γ type anti-Id ScFv. **Conclusion** The successful generation of anti-Id ScFv to monoclonal antibody MGd1 by recombinant phage antibody library technology might lay a foundation for screening of novel candidate molecules for developing recombinant anti-Id vaccine of gastric carcinoma.

Key words: gastric carcinoma; monoclonal antibody; anti-idiotypic antibody; phage; antibody library

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200338)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30200338)

作者简介:何凤田(1966-),男,河北省高碑店市人,博士,教授,主要从事肿瘤分子生物学及分子设计与改建方面的研究。电话:(023)68752262
* 对本工作有同等贡献

收稿日期:2005-07-20;**修回日期**:2005-08-30

免疫网络学说认为抗独特型抗体(anti-idiotypic antibody,抗-Id)可作为抗原"内影像"来激发免疫应答。近年来,以此学说为依据的抗-Id瘤苗的研究方兴未艾,并已在某些肿瘤的防治中显示出一定的疗效[1~7]。抗-Id,甚至抗-Id的ScFv片段[8~10]可模拟肿瘤抗原,并打破机体对肿瘤的免疫耐受,从而激发抗瘤免疫。同时,以抗-Id为基础的瘤苗还具有制备经济、不易产生自身免疫反应、无肿瘤病毒感染危险、能模拟非蛋白抗原决定簇等优点。胃癌是一种高发病率和高死亡率的恶性肿瘤,关于能否用抗-Id对其进行有效防治,目前尚不明了。要对这一问题进行探讨,首先要获得胃癌抗独特型抗体。用传统的杂交瘤技术制备抗-Id十分困难,而噬菌体抗体库技术则使此问题简单化。本研究以胃癌特异性良好的单抗MGd1[11]免疫同系小鼠,构建噬菌体抗体ScFv文库并从中筛选针对MGd1的噬菌体呈现型抗-Id ScFv,以期为开展用重组抗-Id ScFv防治胃癌的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

鼠抗人胃癌单抗MGd1由第四军医大学消化病研究所提供;KLH、福氏完全和不完全佐剂均为Sigma公司产品;鼠ScFv构建、表达及检测试剂盒均为Amersham Biosciences公司产品;mRNA分离试剂盒、T4 DNA连接酶、*Sfi* Ⅰ和*Not* Ⅰ限制性内切酶均为Promega公司产品;*Taq* DNA聚合酶购自Applied Biosystems公司;HRP标记的山羊抗小鼠IgG为华美公司产品;KATO Ⅲ细胞株由日本引进,可高水平表达MGd1结合抗原。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫 参照文献[12]制备单抗MGd1(Ab1)与KLH的交联物,用交联物免疫BALB/c小鼠:初次和二次免疫时辅以福氏完全佐剂,第3次免疫时辅以福氏不完全佐剂。前3次免疫均间隔1周。然后每隔2周单独用交联物加强一次免疫,直至第56天。取脾脏前3 d,再单独用交联物加强一次免疫。各次免疫均采用腹腔注射,每只小鼠每次使用交联物100 μg。取眼球静脉血,分离血清,检测其中抗-抗体(Ab2)的滴度。

1.2.2 ScFv DNA的克隆 取Ab2滴度高的小鼠的脾脏,经一步酚法提取总RNA[13],利用mRNA分离试剂盒分离mRNA。按ScFv DNA构建试剂盒说明,以mRNA为模板,反转录合成cDNA第1链,以第1链为摸板,按程序1[即(94 ℃ ×1 min,55 ℃ ×2 min,72 ℃ ×2 min) ×30个循环]进行PCR,扩增VH和VL cDNA。将VH和VL cDNA及Linker DNA三者以等摩尔混合后,经程序2[即(94 ℃ ×1 min,63 ℃ ×4 min) ×7个循环]进行聚合填充反应,形成ScFv DNA。然后加入带限制酶切位点的引物,执行程序1,使聚合的ScFv DNA得到扩增并在5′端引入*Sfi* Ⅰ位点,3′端引入*Not* Ⅰ位点。

1.2.3 噬菌体抗体ScFv文库的构建 按ScFv表达试剂盒说明,用限制性内切酶*Sfi* Ⅰ和*Not* Ⅰ切割ScFv DNA,纯化后连入噬粒载体pCANTAB5E,连接产物转化于大肠杆菌TG1。将转化产物涂于SOBAG平皿上,30 ℃培养至长出克隆并计算克隆总数。刮下细菌,用2×YT-AG稀释至$D(600)=0.3$,37 ℃摇1 h,加入辅助噬菌体M13KO7,再摇1 h,离心弃上清,沉淀用2×YT-AK培养基重悬后,37 ℃摇过夜,离心取上清,加入0.2体积的含20% PEG8000和2.5 mol/L NaCl的溶液沉淀噬菌体,将沉淀悬浮后过滤除菌,此即噬菌体抗体ScFv文库。

1.2.4 以MGd1淘选噬菌体抗体ScFv文库 按ScFv表达试剂盒说明,将除菌的噬菌体与封阻液作用15 min后,加入包被有MGd1并经封阻的细胞培养瓶中,于37 ℃孵育2 h,弃去瓶中液体并充分洗涤后,加入对数期大肠杆菌TG1,于37 ℃摇1 h,取培养液入三角烧瓶中,加入氨苄、葡萄糖及M13KO7,同上摇1 h后,离心弃上清,沉淀用2×YT-AK重悬后摇过夜,离心取上清,经PEG/NaCl沉淀噬菌体,将沉淀悬浮后过滤除菌。此时完成了1轮淘选和富集。如此进行4轮淘选和富集。当行第4轮淘选时,在加入对数期大肠杆菌TG1并振摇培养1 h后,取部分菌液按不同稀释度涂于SOBAG平板上,30 ℃培养至长出单克隆。

1.2.5 ELISA筛检针对MGd1的呈现抗-Id ScFv的噬菌体单克隆 按ScFv检测试剂盒说明,从四轮淘选后涂布的SOBAG平板上挑取单克隆,接种于不同的含0.4 ml 2×YT-AG的试管中,30 ℃ 摇过夜。从各管中取40 μl饱和培养物到0.4 ml含有M13KO7的2×YT-AG中,37 ℃摇2 h。离心后用0.4 ml 2×YT-AK重悬细菌,37 ℃摇过夜。离心取上清,与1/4体积的2%脱脂奶粉作用15 min后,加入包被有MGd1并行封阻的96孔酶标板中,200 μl/孔,室温作用1.5 h,充分洗涤后,按200 μl/孔加入HRP标记的抗M13基因Ⅷ蛋白的单抗,室温作用1 h,充分洗涤后,用ABTS显色,于405 nm测定各孔A值。实验中以无关单抗包被另一块酶标板作为阴性对照。若A值大于对照A值的2倍,则判为阳性。

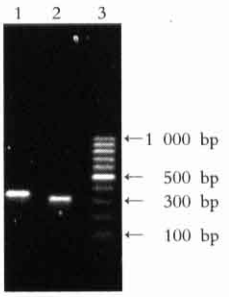
1.2.6 竞争ELISA鉴定各阳性抗-Id ScFv的类型 取生长良好的KATO Ⅲ细胞(该细胞高表达MGd1结合抗原),PBS洗涤后,按每孔4×10^5细胞加入96孔酶标板,离心使细胞均匀贴于孔底。弃去液体,干燥后,0.25%的戊二醛室温固定10 min。PBS洗3次后,室温下用PBS配制的10%脱脂奶粉封阻2 h。在此期间,用上述阳性克隆的噬菌体上清稀释MGd1至终浓度12.5 μg/ml,室温作用1 h。然后按50 μl/孔加入上述封阻过的酶标板中,室温作用1 h,用含0.1%吐温20的PBS洗涤5次后,按50 μl/孔加入HRP标记的山羊抗小鼠IgG,室温作用1 h,同法洗涤后,用TMB显色,450 nm测A值。实验设三复孔,以M13KO7稀释的单抗作对照。噬菌体抑制单抗与细胞结合的程度按下式计算:抑制率(%) = 1 -(实验孔A值/对照孔A值) ×100%。据竞争抑制实验结果初步判定各抗-Id ScFv的类型。

2 结果与讨论

2.1 ScFv DNA的克隆

如图1所示,RT-PCR扩增得到的VH和VL cDNA分别约为340和320 bp。如图2所示,PCR扩增得到

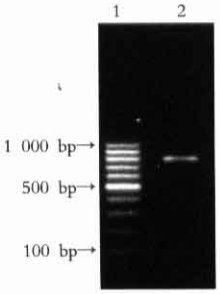
的 ScFv DNA 约为 750 bp。克隆 ScFv DNA 的关键步骤是 VH 和 VL cDNA 及 Linker DNA 三者的聚合填充反应。在此反应中,应确保三者为等摩尔混合,否则即使稍有差别,就会要么导致在琼脂糖凝胶电泳时无可见 ScFv DNA 出现,要么形成 450 bp 大小的 VH-Linker DNA 或 VL-Linker DNA 聚合体。从本实验中 ScFv DNA 的扩增结果(图 2)来看,聚合填充反应是成功的。



1: VH cDNA; 2: VL cDNA; 3: 100 bp DNA ladder

图 1　RT-PCR 扩增的 VH 和 VL cDNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1　Agarose gel electrophoretic profile of VH and VL cDNAs amplified by RT-PCR



1: 100 bp DNA ladder; 2: ScFv DNA

图 2　PCR 扩增的 ScFv DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 2　Agarose gel electrophoretic profile of ScFv DNAs amplified by PCR

2.2　噬菌体呈现型抗-Id ScFv 克隆的筛选

将 ScFv DNA 与 pCANTAB5E 的连接产物转化于大肠杆菌 TG1,转化产物在 SOBAG 平板上长出的克隆总数为 7.9×10^6 克隆。转化克隆数量较多是保障后续噬菌体抗体库中 ScFv 有较丰富多样性的前提。转化菌经辅助噬菌体 M13KO7 感染后,获得重组噬菌体抗体 ScFv 文库。理论上讲,噬菌体抗体库技术可完全绕过人工免疫而筛到目的抗体,但前提是库容量足够大。鉴于抗-Id 难于获得,本研究以 MGd1 免疫的同系小鼠脾脏构建噬菌体抗体 ScFv 文库,旨在较小库容量的情况下提高筛选到目的抗-Id ScFv 的几率。以 MGd1 对所建噬菌体抗体 ScFv 文库进行 4 轮淘选后,随机挑取 40 个克隆经 ELISA 筛选出 17 个针对 MGd1 的呈现抗-Id ScFv 的噬菌体单克隆,阳性率为 42.5%,表明噬菌体抗体 ScFv 文库的构建和抗-Id ScFv 的淘选富集均是成功的。那么 ScFv 形式的抗-Id 能否代替抗-Id全分子来有效模拟初始抗原呢? 已有研究结果肯定地回答了这一问题[8~10]。这些已有研究结果表明:只要抗-Id ScFv 的组成及其功能域的排序理想,就足以模拟初始抗原来激发机体的抗瘤免疫应答。这一合理排序应为 VH 在上游,VL 在下游,其间藉一柔性序列[通常是(Gly4Ser)3]进行连接。鉴于此,本研究中所构建的 ScFv 也按上述顺序排列。

2.3　各阳性克隆的抗-Id ScFv 所属类型的初步判定

基于 KATO Ⅲ细胞高表达 MGd1 所识别的抗原,而目前又尚未获得相应抗原纯品,故实验中采用该细胞作为指示靶,来检测细胞上抗原与噬菌体抗-Id ScFv 竞争结合 MGd1 的情况,结果在 17 个抗-Id ScFv 阳性克隆中,能明显抑制单抗 MGd1 与细胞结合的有 3 个克隆,抑制率分别为 28%、34% 和 45%。抗-Id 包括 α、β、γ、ε 4 种类型,其中 α 和 ε 型不影响抗体与初始抗原的结合;β 和 γ 型虽都能抑制抗体与初始抗原的结合,但只有 β 型具有抗原"内影像"的作用,能够诱导机体产生针对始动抗原的免疫应答。上述抑制实验表明,能明显抑制 MGd1 与细胞上相应抗原结合的 3 个克隆所呈现的抗-Id ScFv 可能为 β 或 γ 型。总之,针对 MGd1 的噬菌体抗-Id ScFv 文库的建立和抗-Id ScFv 单克隆的获得,为尝试用抗-Id ScFv 进行胃癌防治研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Pritchard-Jones K, Spendlove I, Wilton C, *et al*. Immune responses to the 105AD7 human anti-idiotypic vaccine after intensive chemotherapy, for osteosarcoma[J]. Br J Cancer, 2005, 92(8): 1358 - 1365.

[2] Mosolits S, Markovic K, Frodin J E, *et al*. Vaccination with Ep-CAM protein or anti-idiotypic antibody induces Th1-biased response against MHC class I- and II-restricted Ep-CAM epitopes in colorectal carcinoma patients[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(16): 5391 - 5402.

[3] Chapman P B, Wu D, Ragupathi G, *et al*. Sequential immunization of melanoma patients with GD3 ganglioside vaccine and anti-idiotypic monoclonal antibody that mimics GD3 ganglioside[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(14): 4717 - 4723.

[4] Chapman P B, Williams L, Salibi N, *et al*. A phase II trial comparing five dose levels of BEC2 anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine that mimics GD3 ganglioside[J]. Vaccine, 2004, 22(21 - 22): 2904 - 2909.

[5] Reinartz S, Kohler S, Schlebusch H, *et al*. Vaccination of patients with advanced ovarian carcinoma with the anti-idiotype ACA125: immunological response and survival (phase Ib/II)[J]. Clin Cancer Res,

2004, 10(5): 1580-1587.

[6] Reinartz S, Hombach A, Kohler S, *et al*. Interleukin-6 fused to an anti-idiotype antibody in a vaccine increases the specific humoral immune response against CA125 + (MUC-16) ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63(12): 3234-3240.

[7] Diaz A, Alfonso M, Alonso R, *et al*. Immune responses in breast cancer patients immunized with an anti-idiotype antibody mimicking NeuGc-containing gangliosides[J]. Clin Immunol, 2003, 107(2): 80-89.

[8] Tripathi P K, Qin H, Deng S, *et al*. Antigen mimicry by an anti-idiotypic antibody single chain variable fragment[J]. Mol Immunol, 1998, 35(13): 853-863.

[9] Coelho M, Gauthier P, Pugniere M, *et al*. Isolation and characterisation of a human anti-idiotypic scFv used as a surrogate tumour antigen to elicit an anti-HER-2/neu humoral response in mice[J]. Br J Cancer, 2004, 90(10): 2032-2041.

[10] Cui H, Chang X H, Liu B, *et al*. The anti-tumor immune responses induced by a fusion protein of ovarian carcinoma anti-idiotypic antibody 6B11ScFv and murine GM-CSF in BALB/c mice[J]. Int J Gynecol Cancer, 2004, 14(2): 234-241.

[11] Fan Daiming, Zhang Xueyong, Chen Xitao, *et al*. Preparation and significance of monoclonal antibodies against the intestinal type of gastric carcinoma[J]. J Med Coll PLA, 1988, 3(4): 328-332.

[12] Bhattacharya-Chatterjee M, Chatterjee S K, Vasile S, *et al*. Idiotype vaccines against human T cell leukemia. Ⅱ. Generation and characterization of a monoclonal idiotype cascade (Ab1, Ab2, and Ab3)[J]. J Immunol, 1988, 141(4): 1398-1403.

[13] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-159.

(编辑 张大春)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)19-1914-01

迁徙性咽部异物致颈部包块1例

A case report of cervical mass caused by erratic foreign material

王智勇[1], 范文汉[2] ([1]重庆合川市人民医院耳鼻咽喉-头颈外科, 合川 401520; [2]第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科, 重庆 400038)

对我院2001年诊治的1例迁徙性咽部异物(鱼刺)导致颈部包块的患者进行回顾性分析,目的是总结经验,提高对该病的诊治。

1 资料与方法

患者女,55岁,诉"右颈部吞咽疼痛,右颈部包块3个月"。曾在外院抗炎治疗多次,疼痛稍缓解,但包块未消退,即于2001年3月29日入合川市人民医院耳鼻喉科。查体:心肺(-),神经系统未见异常,右胸锁乳突肌中1/3处自其后缘向后下方有一长约3.5 cm×0.3 cm条状硬包块,其上端表浅,位于皮下;下端较深,且有压痛,质硬,活动度较好,咽喉腔粘膜无充血及糜烂、窦道。

入院后诊断为"右颈部包块",于次日局麻下行"右颈部包块探查取出术"。2%利多卡因包块区局麻浸润下,于右胸锁乳突肌中1/3处该肌后缘,沿"包块"走形,向后下切开长约1 cm的皮肤切口,分离其下皮下组织,即暴露出其上端(较粗),见是一白色鱼刺,用血管钳夹住其上端头部,顺利拔除一长约3.0 cm×0.2 cm×0.1 cm光滑的鱼刺,缝合切口。术后第1天,换药时几乎无疼痛。追问病史:患者半年前吃鱼时,曾有被鱼刺卡住右咽喉史,偶有吞咽进食疼痛及异物感,之后咽异物感消退,而未引起重视。术后7 d拆线,切口愈合好。门诊随访1年半,无疼痛及异物感等表现。

2 讨论

咽及食道异物为常见病,但异物穿透咽、食道壁至腔外者少见,称迁徙性咽食道异物,亦称咽食道腔外异物,常易误诊、漏诊。若异物较深,治疗不及时,或刺伤重要器官,可造成致命的危险。迁徙性异物在体内迁移的程度及远近,常与异物的形状、肌肉的挤压等因素有关,如锋利针尖状异物、鱼刺等,在体内则易于迁移,多见于老年患者。患者误吞鱼刺等异物后,往往吞菜饭团,试图咽入胃内,结果导致腔壁损伤,异物迁移;异物本身引起局部感染或脓肿形成,亦可促使异物穿透腔壁迁移它处。迁徙性异物诊断较困难,应详细询问病史。该患者多有异物史,有吞咽进食后疼痛,发热及痰中带血史,怀疑者需做X线片及CT等进一步辅助检查。迁徙性异物一旦确诊,应及时取出。

关键词:咽部异物;颈部包块

中图法分类号:R766.8 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 蔡昌柱,萧仁吉,杨升明,等.迁移性咽和颈段食管异物4例[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2003,17(11):648-649.

[2] 毛晓梅,郑朝生,郑瑞容,等.咽及食管腔外异物24例临床分析[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2005,19(3):100-102.

(编辑 陈聪连)

作者简介:王智勇(1976-),男,重庆合川市人,主治医师,主要从事耳鼻咽喉-头颈外科方面的研究。电话:13883153558

收稿日期:2005-04-20;修回日期:2005-05-26