论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1032-03

人源脂多糖结合蛋白单克隆抗体的筛选及初步鉴定

邹 佳,葛晓冬,刘友生,杨艳丽 (第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 制备人源抗脂多糖结合蛋白(LBP)单克隆抗体,并对该抗体的效价进行初步鉴定。**方法** 以人脂多糖结合蛋白(human lipopolysaccharide binding protein, hLBP)为抗原,以人源噬菌体抗体库进行筛选,经5轮"吸附-洗脱-扩增"的富集反应后,筛选出3株抗人LBP阳性克隆株,抽提其质粒、切除*gene*Ⅲ、自身环化并电转入XL_1-blue后,以IPTG诱导分泌表达可溶性抗体,通过ELISA法测定抗体效价。**结果** 抗体库被浓缩8.16×10^4倍,获得3个与LBP结合能力较强的单克隆菌株,其中结合力最强者产生抗体活性为10^6。**结论** 成功获得针对人LBP的Fab抗体,经初步鉴定具有较高效价,为下一步研究该抗体功能奠定基础。

关键词: 人源LBP;噬菌体抗体库;单克隆抗体

中图法分类号: R341;R392-33;R392.11 **文献标识码:** A

Screening and identification of phage antibodies against human lipopolysaccharide binding protein

ZOU Jia, GE Xiao-dong, LIU You-sheng, YANG Yan-li (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain and identify monoclonal antibody against human lipopolysaccharide binding protein (LBP). Methods Three clones of antibody with better activity against human LBP were isolated after human antibody library screening by human LBP and 5 rounds of enrichment. After plasmid extracting, *gene*Ⅲ cutting, self-recircling and electric transforming, soluble Fab was expressed in *E. coli*. XL_1-blue by the induction of IPTG and its characteristics were determined. Results The positive antibody was concentrated to 8.16×10^4 folds and the highest activity of the three clones was 10^6. Conclusion Phage antibody against human LBP has been obtained successfully, which lays a solid foundation for researching its function.

Key words: human LBP; phage antibody library; monoclonal antibody

脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)是一种促进内毒素与效应细胞受体相结合的关键载体蛋白,在炎症反应过程中具有重要的作用。研究表明,LBP能显著促进脂多糖(LPS)与单核-巨噬细胞膜表面的CD14(membraneCD14, mCD14)结合,继而与细胞膜上的CD14和血清中的可溶性CD14(solubleCD14, sCD14)形成LPS/LBP/CD14复合物[1],该复合物以某种方式激活跨膜受体TLR4-MD2,经NF-Kappa B途径,激活单核巨噬细胞,启动细胞内信号传导通路,从而促进炎症的发生、发展,导致肝、肺、肾等重要脏器发生严重损害[2]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400426);第三军医大学校科研基金资助项目(2005)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400426) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2005)

作者简介:邹 佳(1980-),女,江苏省镇江市人,硕士研究生,主要从事内毒素血症方面的研究。电话:13896143990
通讯作者:刘友生,电话:(023)68757431

收稿日期:2006-03-10;修回日期:2006-03-30

为进一步探索内毒素的阻断途经及LBP在人体内的变化规律,本研究用噬菌体抗体库技术对本课题组构建的噬菌体抗体库进行筛选,得到针对人LBP的单克隆抗体并初步鉴定筛选结果,为进一步研究该抗体功能活性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂来源

人源性抗LBP噬菌体抗体库由本课题组构建[3]。辅助噬菌体VCSM13及Pet-30a(+)载体、大肠杆菌XL_1-blue由本课题组保存。人LBP及羊抗人IGg $F(ab)_2$购自Rockland公司;*Nho* Ⅰ/*Spe* Ⅰ酶及DNA连接试剂盒均购自TaKaRa公司。四环素(Tet)、氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)均购自Sigma公司。

1.2 辅助噬菌体的扩增

挑新鲜单克隆XL_1-blue于10 ml SB(Super-Bertani medium)中,加入Tet至10 μg/ml培养至$D(600)>1.0$加入辅助噬菌体液300 μl,37 ℃振荡感染2 h,补加入Kan至终浓度为70 μg/ml,37 ℃培养过夜离心抽提上清。上清等比稀释后选取相应稀释浓度的液体感染XL_1-blue菌,均匀铺入双层LB固体培

养皿中(下层胶浓度 1.5%,上层胶浓度 0.7%)。37 ℃ 12 ~ 16 h 后数培养皿中的溶菌斑数,结合稀释倍数,确定 VCSM13 效价。

1.3　噬菌体抗体库的筛选与扩增

1.3.1　抗体库筛选　　LBP 以 0.05% 碳酸盐缓冲液(pH = 9.6)稀释至 50 μg/ml,每孔 10 ~ 25 μl(0.5 ~ 1 μg LBP) + 80 μl 包被液包被 96 孔板,4 ℃过夜。吸去包被液后,第 1 轮筛选时用 1 × PBS 冲洗 2 次(以后几轮中用 0.05% 的 PBS-吐温洗 2 次,1 × PBS 洗 3 次),用含 3% 的 BSA-PBS 液加满小孔,37 ℃封闭 1 h,吸去封闭液,1 × PBS 冲洗 3 次,加入 100 μl 噬菌体抗体库,37 ℃结合 2 h;吸去噬菌体抗体液,以含 1 × PBS 冲洗 3 次,加入 100 μl 洗脱液(0.1 mol/L HCl,以甘氨酸调至 pH = 2.2,加 BSA 至 0.1%),获得液体即为筛选后噬菌体抗体库。

1.3.2　筛选后的扩增　　将所筛选后的抗体库 10 μl 感染 100 μl XL_1-blue 菌,加入 10 ml SB 培养液(含 Amp 20 μg/ml, Tet 10 μg/ml),37 ℃振荡培养 1 h 后补加 Amp 至终浓度为 50 μg/ml,并加入 VCSM13 1 ml,后转移至 100 ml SB 中(含 Amp 50 μg/ml, Tet 10 μg/ml),37 ℃培养 2 h,再加入 Kan 至终浓度为 70 μg/ml,37 ℃过夜。次日将菌液以 4 000 r/min 于 4 ℃离心 15 min 收集上清,加入 4% PEG8000 和 3% NaCl,以 10 000 r/min 于 4 ℃离心 20 min 收集菌体并用 2.5 ml 含 1% BSA 的 PBS 液溶解;离心后上清即为扩增后的噬菌体抗体库。将此上清按 1∶100 比例稀释至 $10^{8\sim12}$ 后感染 1 ml XL_1-blue[D(600) = 0.8 ~ 1.0]15 ~ 25 min,吸取 100 μl 用玻璃棒均匀铺于含 Amp 50 μg/ml, Tet 10 μg/ml 的 LB 固体板上,37 ℃培养过夜,次日计算菌落形成单位[3]。

1.3.3　含抗体库的质粒抽提　　将感染抗体库后的 XL_1-blue 于 SB 中培养,离心收集菌体;用 SDS 裂解法提取细菌质粒 DNA。

1.4　*gene* Ⅲ的切除及轻(L)、重(H)链自连环化

1.4.1　*gene* Ⅲ的位置　　由于重链位于 pComb3H 的 *gene* Ⅲ上,使得抗体 Fab 与 *gene* Ⅲ蛋白一起位于噬菌体的表面,从而利于筛选。当切除 *gene* Ⅲ后,抗体 Fab 则成为分泌性抗体,单克隆抗体进入培养基中,因此可应用细菌的培养基对其抗体的活性进行鉴定。

1.4.2　*gene* Ⅲ的切除及质粒自连环化　　用 *Nhe* Ⅰ酶及 *Spe* Ⅰ酶对筛选后的抗体库质粒进行酶切(37 ℃ 4.5 h),凝胶电泳后用透析袋回收法进行回收[4],并通过 *Nhe* Ⅰ及 *Spe* Ⅰ酶切后的粘性互补末端以 T_4 DNA 连接酶进行自连环化。

1.5　ELISA 法筛选活性最强的单克隆菌株

以 LBP 为抗原,包被 96 孔板;将转入质粒的大肠杆菌 XL_1-blue 经 IPTG 诱导表达,获得上清(含 Fab)为一抗,以辣根过氧化物酶标记的羊抗人 Fab 为二抗进行 ELISA 实验,筛选出表达抗体与 LBP 结合能力最强的单克隆菌。

1.6　Fab 抗体的表达检测

以含空 pComB3H 质粒的大肠杆菌 XL_1-blue 菌体蛋白作为对照,菌体蛋白以 120 g/L 分离胶(聚合度 6%)和 40 g/L 浓缩胶(聚合度 3%),进行 Tris-Tricine 电泳;将结合能力最强菌株加 IPTG 诱导表达,上清经 0.05 mmol/L PBS 液脱盐及冻干,以辣根过氧化物酶标记的羊抗人 Fab 为二抗进行 Western blotting 检测,鉴定纯化的蛋白是否为目的蛋白。

1.7　ELISA 法测定可溶性抗体效价及特异性

以人 LBP 为抗原,经 IPTG 诱导表达的可溶性抗体上清为一抗,以辣根过氧化物酶标记的羊抗人 Fab 为二抗,将表达上清等比稀释,分别以人白蛋白为对照进行 ELISA 实验,测定获得抗体 Fab 的结合能力。

2　结果

2.1　辅助噬菌体(VCSM13)扩增后效价测定

由于噬菌体抗体库于 -70 ℃保存时间较长,为防止活性下降,将辅助噬菌体重新扩增。现经 5 轮筛选扩增后辅助噬菌体(VCSM13)效价为 3×10^{12}(图 1、2)。

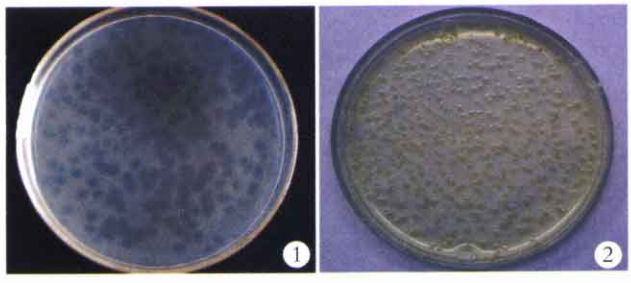


图 1　辅助噬菌体(VCSM13)扩增后获得的噬菌斑

图 2　筛选后的噬菌体抗体库在含 AMP 的 LB 上生长

2.2　经筛选扩增后噬菌体抗体库(pComB3H)效价测定

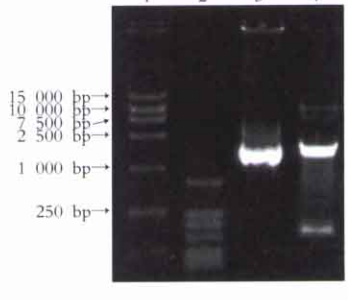
经过 5 轮筛选、感染、扩增,噬菌体抗体库(pComB3H)铺板在含抗生素(Amp)的 LB 板上,可见有明显的抗 Amp 单菌落生长(图 2)。5 轮筛选过后,抗体活性由第 1 次筛选后 3.8×10^8 升高为 3.0×10^{13},证明抗体浓缩了 8.16×10^4 倍(表 1),证明筛选是成功的。

表 1　用人源性 LBP 对抗体库的亲和筛选

筛选轮次	包板抗原量(μg)	筛选前效价	筛选后效价	扩增后效价
1	1	3.8×10^8	9.1×10^7	2.55×10^9
2	1	2.55×10^9	1.1×10^9	8.3×10^{10}
3	0.5	8.3×10^{10}	4.6×10^9	7.3×10^{11}
4	0.5	7.3×10^{11}	3.8×10^{11}	2.0×10^{12}
5	0.5	2.0×10^{12}	6.2×10^{11}	3.1×10^{13}

2.3　抗体库质粒的提取与 *gene* Ⅲ的切除

从细菌中抽提出的质粒经透析袋回收法回收,1.3 % 凝胶电泳可见含 H、L 链与 *gene* Ⅲ完整 pComB3H 大小为 4 800 ~ 5 000 bp。经 *Nhe* Ⅰ及 *Spe* Ⅰ双酶切后,切下 *gene* Ⅲ约为600 bp,已切除 *gene* Ⅲ的 pComB3H 大小为 4 200 ~ 4 400 bp(图 3)。



1:DNA 标准 15 000 bp; 2:DNA 标准 2 000 bp; 3:完整的 pComB3H 质粒; 4:用 *Nhe* Ⅰ及 *Spe* Ⅰ酶切除 *gene* Ⅲ

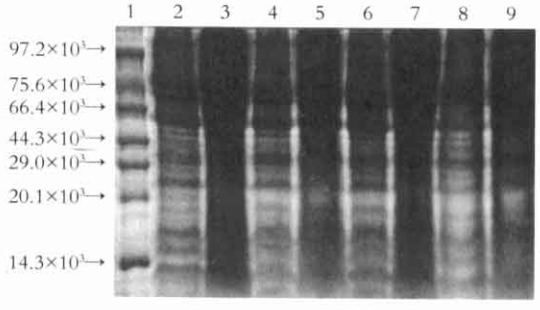
图 3　酶切 *gene* Ⅲ经透析袋回收后的 pComB3H

2.4 ELISA 筛选高结合力单克隆菌

以 LBP 为抗原，表达上清为一抗进行 ELISA 实验，从 30 个单菌落中筛选出活性较强的菌体 7 株，根据与对照组相比 OD 值超过对照组 2 倍的为强阳性，又从这 7 株中筛选出活性最强的 3 株单克隆菌：4 号（OD 值 0.13，与抗原结合力是阴性对照的 4.2 倍）、13 号（OD 值 0.093，与抗原结合力是阴性对照的 3.1 倍）和 9 号菌（OD 值 0.084，与抗原结合力是阴性对照的 2.8 倍），由此得出其中 4 号菌结合能力最强。

2.5 Fab 抗体的表达

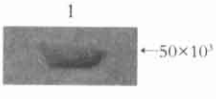
筛选出的 3 个单克隆菌菌体蛋白，进行 SDS-PAGE 电泳，含空 pComB3H 质粒的 XL_1-blue 菌体蛋白作为对照；可见约在 20×10^3 处含空质粒的细菌有蛋白条带，而含目的片段（Fab）的单克隆菌则无此蛋白，表明目的蛋白的表达抑制了细菌本身蛋白表达（图 4）。



1：低分子蛋白标准；2，3：含空 pComb3H 的大肠杆菌 XL_1-blue 全菌蛋白（10、25 μl 菌液所含细菌）；4，5：4 号菌菌体蛋白（10、25 μl 菌液所含细菌）；6，7：13 号菌菌体蛋白（10、25 μl 菌液所含细菌）；8，9：9 号菌菌体蛋白（10、25 μl 菌液所含细菌）

图 4 对菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析

将活性最强的 4 号菌经 IPTG 诱导表达，上清脱盐、冻干后进行 Western blotting 检测，在约 50×10^3 处出现明显阳性条带，证明表达的 Fab 已由细菌进入培养基（图 5）。



1：4 号菌表达蛋白的阳性条带

图 5 Western blotting 检测 4 号菌表达的 Fab 抗体

2.6 对表达抗体 Fab 的活性鉴定

4 号菌经 IPTG 诱导表达，表达上清按不同比例稀释后 ELISA 实验，与人白蛋白的对照结果证明，当表达抗体被稀释到 10^6 时仍有结合活性（OD 值与阴性对照相比大于 2 倍以上），证明获得了能分泌高结合力抗体的单克隆菌。

3 讨论

脓毒症与内毒素血症是当前临床所面临的棘手难题，由其诱发的休克及多器官功能障碍综合征（MODS）一直是危重患者死亡的主要原因之一。目前，此类患者仍有 30% ~45% 因不能及时控制病情而死亡，并且脓毒症与内毒素血症的发病率每年有继续增长的趋势[5]。研究表明脓毒症与内毒素血症患者病理生理学的变化与 G-杆菌产生的内毒素（LPS）所致的感染反应有重要关系。LPS 作用于寄主细胞，导致多种炎症介质参与的级联反应，严重时可造成休克及患者死亡[6]。脂多糖结合蛋白（LBP）能增强 LPS 的作用，因此若能获得针对 LBP 的抗体，则能有效阻断 LPS 与 LBP 的结合，达到有效地降低 G-杆菌感染及脓毒性休克的病死率的目的。

噬菌体表面展示系统（phage surface display system，PSDS）[7] 具有简便、快捷、生产成本低、筛选容量大等优点，可通过亲和结合直接从抗体库中选择出特异抗体基因。噬菌体抗体兼具了多克隆抗体和单克隆抗体的性能，且可以很容易大规模生产，噬菌体抗体的诸多优点，显示出巨大的潜能。

本次研究利用成熟的噬菌体抗体库技术，以人 LBP 为抗原对噬菌体抗体库进行了 5 轮筛选，在筛选过程中在筛选过程中，抗原 LBP 的浓度逐渐减少，而抗体活性却逐渐增高，表明编码高亲和力抗体的噬菌体得到了回收和扩增。在得到阳性克隆后进一步抽提质粒、切除 *gene* Ⅲ后扩增表达，获得针对 LBP 的稳定的 Fv 单克隆抗体 Fab 段。从 ELISA 及 Western blotting 实验初步检测表明，获得抗体活性良好，这为下一步研究该抗体功能奠定了基础，同时也为二硫键稳定性 Fv 抗体（disulfide stabilized Fv fragment，dsFv）的改建做好了准备。用人 LBP 筛选的人源性抗体与以往动物源性抗体相比，对人具有同源性高、毒副作用低的特点；这对于进一步探索感染内毒素血症新的防治途径，将具有重要的科学意义和广阔的应用前景。

参考文献：

[1] BERNER R, FURLL B, STELTER F, *et al*. Elevated levels of lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in plasma in neonatal early-onset sepsis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(2): 440 - 445.

[2] 张维山，冷启新，王金平. 转录因子 NF-κB 在内毒素休克中的作用[J]. 解剖科学进展，2005，11(2)：161 - 163，166.

[3] 葛晓冬，刘友生，王晓东，等. 人源噬菌体抗体库的构建及抗人 NH-LBP 抗体的筛选与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2005，21(2)：180 - 184.

[4] 李和伟，王志永，刘彤华，等. 一种改进的质粒 DNA 提取及回收方法[J]. 基础医学与临床，1995，15(1)：77 - 78.

[5] O'REILLY M, NEWCOMB D E, REMICK D. Endotoxin, sepsis, and the primrose path [J]. Shock, 1999, 12(6): 411 - 420.

[6] 蒋力生，陈 鹏. 脓毒症与内毒素血症的治疗现状与展望[J]. 中国普外基础与临床杂志，2004，11(6)：551 - 553.

[7] MCCAFFERTY J, GRIFFITHS A D, WINTER G, *et al*. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains[J]. Nature, 1990, 348(6301): 552 - 554.

（编辑 陈聪连）