文章编号:1000-5404(2006)20-2099-02

技术方法

人源化 Fab 段噬菌体抗体库的构建

张效云,董明纲,刘 洁,常晓彤,侯丽娟,韩 瑞,李彪英,宋桂芹 (河北北方学院生物化学教研室,张家口 075029)

提 要:目的 构建人源化 Fab 噬菌体抗体基因库。**方法** 利用反转录 PCR 和 PCR 技术从 B 细胞淋巴瘤患者外周血淋巴细胞中扩增人 IgG 抗体重链 Fd 基因及 κ、λ 轻链基因,将之克隆入噬菌体载体 pComb3,构建人源性 Fab 噬菌体抗体库,并进行鉴定。**结果** 构建完成了库容量为 6.0×10^8 的噬菌体抗体库。**结论** 成功地构建了人源化噬菌体抗体库,为下一步抗 CD20 抗体的筛选和表达奠定了基础。

恶性淋巴瘤的发病率在各种恶性肿瘤中居第 11 位,在儿童和青年中所占比例较高,是儿童最常见的恶性肿瘤之一。美罗华(rituximab)是目前国内外用于治疗 B 细胞淋巴瘤的单克隆抗体[1],由于美罗华为人鼠嵌合型单克隆抗体,具有一定的免疫原性,限制了它的临床推广应用,而利用杂交瘤技术制备人源性 mAb 又存在融合率不高,杂交瘤不稳定,抗体产量低等一些难题。噬菌体抗体库技术[2]是用基因工程的方法制备人源性 mAb,它的出现为上述问题的解决提供了可能。本研究从 B 细胞淋巴瘤患者外周血淋巴细胞(PBL)中扩增出了重链 Fd 基因及 κ、λ 轻链基因[3],成功地构建了库容量为 6.0×10^8 的人源化 Fab 抗体基因库,为其下一步抗 CD20 人源化抗体的筛选、表达、功能研究及应用打下了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和试剂

质粒 pComb3 购自美国 Scripps 研究所,大肠杆菌 XLI-Blue 和辅助噬菌体 M13K07 购自 Stratagene 公司,Trizol 试剂为 BioDev 公司的产品,RT-PCR 试剂盒购自上海生物工程有限公司,Oligodt 及 RNAsin 购自 Promega 公司,鼠抗人 B 细胞 mAb(CD20)和 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG,购于北京中山生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 人 PBL 的分离及细胞总 RNA 的提取 选取确诊的 B 细胞淋巴瘤患者 3 例,用 ELISA 法测得其血清中抗 CD20 IgG 抗体阳性,用淋巴细胞分离液按常规法分离人 PBL,然后用 Trizol Reagent 提取淋巴细胞的 RNA,利用 Sangon One Step RT-PCR kit 经逆转录得到 cDNA 第一链。具体方法均参照其说明书进行。

1.2.2 引物 引物设计参考文献[4],加以适当改动,其序列如下:重链 Fd 段上设计 *Xho* Ⅰ 和 *Spe* Ⅰ 酶切位点,轻链设计 *Spe* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切位点,具体引物设计如表 1。PCR 反应取反转录产物 5 μl,加入 10 × PCR 缓冲液 10 μl,10 mmol/L dNTP 2 μl,每端引物加 50 pmol,DNA 聚合酶 2 U,补双蒸水至 100 μl,94 ℃,1 min,50 ℃,55 ℃,58 ℃,45 s,72 ℃,1.5 min,扩增 35 个循环,观察结果。

表 1 引物设计

引物序列	位置
人重链 3′端引物	
5′-GCATGTACTAGTTTTGTCACAAGATTTGGG-3′	CG1Z
5′-CTCGACACTAGTTTTGCGCTCAACTGTCTT-3′	CG2A
5′-TGTGTGACTAGTGTCACCAAGTGGGGTTTT-3′	CG3A
5′-GCTCACACTAGTAGGCAGCTCAGCAATCAC-3′	CM1
人重链可变区 5′引物	
5′-(C/G)AGGTGCAGCTCGAG(C/G)AGTCTGGG-3′	VH1a, VH3a
5′-(C/G)AGGTGCAGCT(A/G)CTCGAGTCTGGG-3′	VH1f, VH2f, VH3f
5′-CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG-3′	VH4f
5′-CAGGTACAGCTCGAGCAGTCAGG3′	VH6a
人 κ 链 3′端引物	
5′-GCGCCGTCTAGAACTAACACTCTCCCCTGTTGAGCT CTTTGTGACGGGCGAACTCAG-3′	CKIZ
人 κ 链可变区 5′端引物	
5′-GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCA-3′	Vκ1a
5′-GAAATTGAGCTCACGCAGTCTCCA-3′	Vκ3a
5′-GATATTGAGCTCACTCAGTCTCCA-3′	Vκ2a
5′-GACATCGAGCTCACCCAGTCCCC-3′	Vκ1s
人 λ 链 3′端引物	
5′-CGCCGTCTAGAATTATGAACATTCTGTAGG-3′	CL2
人 λ 链可变区 5′端引物	
5′-AATTTTGAGCTCACTCAGCCCCAG-3′	VL1
5′-TCTG(C/T)(C/G)GAGCTCCAGCC(T/G)(G/C) CCTC(A/C)GTG-3′	VL2, VL3
5′-TCTGAAGAGCTCCAGGACCCTGTTGTGTCTGTG-3′	VL4
5′-CAG(G/T)(C/T)TGAGCTCAC(G/T)CA(A/G) CCGCCC-3′	VL5, VL7
5′-CAGTCTGAGCTCACGCAGCCGCCC3′	VL5
5′-CAGACTGAGCTCACTCAGGAGCCC-3′	VL6

1.2.3 噬菌体抗体库的构建 用 *Xho* Ⅰ 及 *Spe* Ⅰ 将扩增的重链 Fd 产物消化后,克隆入相应酶切噬粒 pComb3 上,电穿孔转入大肠杆菌 XL1-blue,提取含有重链 Fd 的重组子,用 *Xba* Ⅰ 及 *Sac* Ⅰ 酶切,再与 κ、λ 轻链基因经相应酶切的片段连接电转化 XL1-blue,即构成噬菌体抗体库。

1.2.4 噬菌体抗体库滴度的测定 在上述 Fab 抗体基因库中加入 10^{10} pfu(噬斑形成单位)的辅噬菌体 M13K07,超感染后制备成噬菌体抗体库,将抗体库梯度稀释后,取 2 μl 感染 100 μl

基金项目:河北省教育厅自然科学基金资助项目(Z2004406)
Supported by Nature Science Foundation of Hebei Provincial Educational Department (Z2004406)

作者简介:张效云(1970-),女,河北省张家口市人,硕士,副教授,主要从事单克隆抗体方面的研究。电话:(0313)8041697

收稿日期:2005-11-07;**修回日期**:2006-02-03

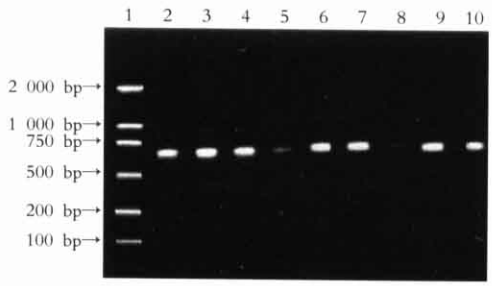
新制的 XL1-blue[$D(600)=0.8$]室温感染 15 min,铺于含 Amp 的 LB 平板,37 ℃培养过夜,次日计数菌落形成单位(cfu)。

1.2.5 噬菌体抗体库多样性分析 从 LB 平板上随机挑取 10 个单菌落,提取质粒后用 *Xba* Ⅰ + *Xho* Ⅰ 双酶切检测,观察电泳结果。

2 结果

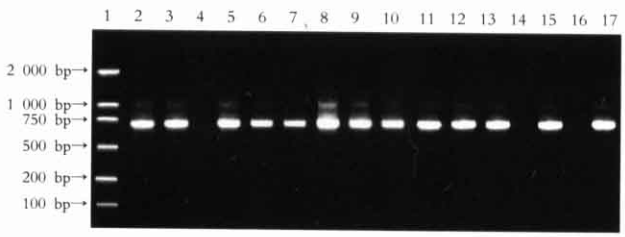
2.1 人免疫球蛋白重链及轻链基因 PCR 扩增

各取其 PCR 产物 5 μl 在 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果可见:在对轻链的扩增中均获得了相应 PCR 产物,大小约 700 bp左右的人抗体轻链基因(图 1)。在对重链的扩增中,有 3 条链改变退火温度依然未出现扩增产物(图 2)。



1: DNA 标准; 2: VL1; 3: VL2, VL3; 4: VL4; 5: VL5, VL7; 6: VL6; 7: Vκ1A; 8: Vκ2A; 9: Vκ3A; 10: Vκ1S;

图 1 人抗体轻链基因 PCR 扩增产物电泳图



1: DNA 标准; 2: VH1a, VH3a-CG1Z; 3: VH1f, VH2f, VH3f-CG1Z; 4: VH6a- CG1Z; 5: VH4f- CG1Z; 6: VH1a, VH3a- CG2A; 7: VH1f, VH2f, VH3f- CG2A; 8: VH4f- CG2A; 9: VH6a- CG2A; 10: VH1a, VH3a- CG3A; 11: VH1f, VH2f, VH3f- CG3A; 12: VH4f- CG3A; 13: VH1a, VH3a-CM1; 14: VH6a- CG3A; 15: VH4f-CM1; 16: VH1f, VH2f, VH3f- CM1; 17: VH6a- CM1

图 2 人抗体重链基因 PCR 扩增产物电泳图

2.2 人源性噬菌体抗体库的构建及多样性分析

将上述扩增出的轻、重链 PCR 产物分别混合,电洗脱纯化后经酶切、连接、转化,构建成人源性噬菌体抗体库,库容为 6.0×10^8。挑取 10 单菌落提取质粒,经 *Xho* Ⅰ + *Xba* Ⅰ 酶切鉴定,有 8 个可切出 2.2 kb 左右片段,即有目的片段 Fd 基因及轻链基因插入,2 个可切出 1.5 kb 左右片段,仅含有重链或轻链基因,说明 Fab 重组率约为 80%。

3 讨论

噬菌体抗体库技术是近年来发展起来的一项重要的新技术。它的出现为人源性、特异性抗体的制备提供了一条新的途径[5,6]。通过将 Fab 段基因表达在单链噬菌体的表面,使表型(与抗原特异结合)和基因型(含有 Fab 段基因)联系在一起,使识别抗原的能力和进行再扩增的能力结合在一起,因此可通过"吸附一洗脱一扩增"筛选特异性抗体,使抗体的制备变得简单、经济,因而成为极高效的筛选体系。本研究之所以选用 B 细胞淋巴瘤患者外周血淋巴细胞进行基因的扩增,目的是为了进行后续特异性抗 CD20 人源化抗体的筛选。CD20 分子是一具有信号转导功能的 B 细胞表面的膜蛋白,可调控 B 细胞的增殖、分化和形成 Ca^{2+} 通道。人类免疫应答中 B 细胞 Ca^{2+} 的信号转导扮演重要作用[7]。抗 CD20 抗体作为 B 淋巴细胞淋巴瘤的一个很好的治疗靶点,目前国外已将人鼠嵌合型抗 CD20 mAb 应用于临床,因此研制抗 CD20 mAb 特别是人源性抗体意义重大。本研究采用 RT-PCR 的方法,从 B 细胞淋巴瘤患者外周血淋巴细胞中扩增出抗体重链 Fd 基因及轻链基因,其分子质量与文献报道一致。通过克隆入相应酶切后的噬粒 pComb3,转化 XL1-blue,构建了人源化 Fab 段噬菌体抗体库,使抗体蛋白与噬菌体 g3p 以融合蛋白形式表达于噬菌体表面,库容为 6.0×10^8,为后续特异性抗 CD20 人源化抗体的筛选奠定了基础。

关键词: CD20 基因; Fab 抗体; 噬菌体抗体库
中图法分类号: R392.2 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] TSIARA S N, KAPSALI H D, CHAIDOS A, *et al*. Treatment of resistant/relapsing chronic lymphocytic leukemia with a combination regimen containing deoxycoformycin and rituximab[J]. Acta Haematol, 2004, 111(4): 185 - 188.

[2] WINTER G, GRIFFITHS A D, HAWKINS R E, *et al*. Making antibodies by phage display technology[J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12: 433 - 455.

[3] BARBAS C F, BURTON D R, DARID L, *et al*. Monoclonal antibodies from combinatorial libraries[M]//Cold Spring Harbor Laboratory. ed. Laboratory Mannal, New York: Cold Spring Harbor, 1993: 29.

[4] ELSBACH P, WEISS J. The bactericidal/permeability - increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide[J]. Immunobiology, 1993, 187(3 - 5): 417 - 429.

[5] BARBAS C F 3rd, LERNER R A. Combinatorial immunoglobulin libraries on the surface of phage (phabs): rapid selection of antigen-specific fabs[J]. Methods, 1991, 2(2): 119 - 124.

[6] CARTER P, MERCHANT A M. Engineering antibodies for imaging and therapy[J]. Curr Opin Biotechnol, 1997, 8(4): 449 - 454.

[7] KANZAKI M, NIE L, SHIBATA H, *et al*. Activation of a calcium-permeable cation channel CD20 expressed in Balb/c 3T3 cells by insulin-like growth factor-I[J]. J Biol Chem, 1997, 272(8): 4964 - 4969.

(编辑 陈聪连)