论著

文章编号:1000-5404(2008)22-2082-04

人源肺腺癌噬菌体抗体库的构建及初步筛选

庞 华[1],罗 弋[2],李少林[2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院核医学科,[2]核医学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 构建人源肺腺癌噬菌体单链抗体库,并筛选肺腺癌细胞A549特异性单链抗体。**方法** 利用肺腺癌患者癌旁淋巴结组织构建肺腺癌噬菌体单链抗体库。从该抗体库中筛选特异性识别A549细胞的单链抗体,将阳性克隆菌转化*E. coli* HB2151进行可溶性表达。抗体亲和层析纯化后经SDS-PAGE、Western blot鉴定,通过ELISA法鉴定其与人肺腺癌细胞结合的特异性。**结果** 成功构建了1个4.6×10^7的噬菌体抗体库。在筛选过程中,肺腺癌噬菌体单链抗体得到富集,收获率逐轮得到提高,第5轮为第1轮的181倍。在*E. coli* HB 2151中实现了单链抗体的可溶性表达。SDS-PAGE与Western blot结果显示抗体相对分子质量为30×10^3左右。细胞ELISA测定结果显示可溶性抗体具有较高的特异性,能与A549细胞结合,而不与MDA-MB-435细胞结合。**结论** 从肺腺癌病人癌肿周围淋巴结扩增免疫球蛋白基因成功地构建人源肺腺癌噬菌体单链抗体库,并从中筛选到肺腺癌特异性抗体。

关键词:噬菌体抗体库;单链抗体;肺腺癌;筛选
中图法分类号:R392.13;R73-35;R734.2 **文献标识码**:A

Construction of and screening for phage antibody library of human lung adenocarcinoma

PANG Hua[1], LUO Yi[2], LI Shao-lin[2] ([1]Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital, [2]Department of Nuclear Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct human single-chain antibody gene library associated with lung adenocarcinoma, and screen lung adenocarcinoma cell A549-specific antibody. Methods The lymphatic tissue near lung adenocarcinoma was used to construct human single-chain antibody gene library. The specific antibody to lung adenocarcinoma cell A549 was screened from the antibody library. Positive clone bacteria were transformed to *E. coli* HB2151, and their dissolvability was observed. The soluble scFv was purified by affinity chromatography and its relative molecular mass was determined by SDS-PAGE and Western blotting. The specificity of scFv to human lung adenocarcinoma cells was identified with ELISA. Results The phage antibody library of 4.6×10^7 was constructed successfully. Single-chain antibody of human lung adenocarcinoma was enriched. The ratio of yield was increased gradually, 181 times higher after 5 rounds of panning than after the first round of panning. SDS-PAGE and Western blotting results showed soluble scFv' molecular mass was about 30 000. ELISA showed dissolved antibody had high specificity to bind A549 cells, not MDA-MB-435. Conclusion The single-chain antibody gene library of human lung adenocarcinoma was constructed successfully, and specific antibodies to lung adenocarcinoma were screened, providing the basis for single-chain antibody radionuclide imaging and treatment.

Key words: phage antibody library; single-chain variable fragment; lung adenocarcinoma; screening

1985年Smith[1]提出了噬菌体展示技术的概念及1990年Huse等[2]成功地构建第一个噬菌体组合文库为肿瘤的诊断及治疗提供了一种全新的方法。但是,目前报道的肺癌噬菌体抗体库多为鼠源性,因人抗鼠免疫反应而不适合临床运用。本研究利用肺腺癌患者癌旁淋巴细胞构建人源肺腺癌噬菌体抗体库,以避免人抗鼠免疫反应,适合于临床应用。

基金项目:国家自然科学基金(30370422)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370422)
作者简介:庞 华,女,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事放射肿瘤学方面的研究。电话:(023)89012479,E-mail:ph1973@126.com
通信作者:李少林,E-mail:shaolinli202@sina.com
收稿日期:2008-06-04;**修回日期**:2008-07-14

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、试剂和抗体 肺腺癌细胞A549、乳腺癌细胞MDA-MB-435为本实验室保存。RNA抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。RT-PCR试剂盒、*Sfi* Ⅰ和*Not* Ⅰ限制性内切酶、*Taq* DNA聚合酶、T_4 DNA连接酶均购自大连TaKaRa公司产品。噬菌粒载体pCANTAB5E、辅助噬菌体M13K07、大肠杆菌*E. coli* TG1、HB2151、噬菌体抗体纯化试

剂盒(17-1362-01)与检测试剂盒(27-9402-01)、HRP/抗 M13 噬菌体单克隆抗体均购自 Amersham Biosciences 公司。

1.1.2　引物　　参照文献[3－5]设计,由北京三博志远生物技术有限公司合成。扩增重链可变区引物对:5′-TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3′;5′-GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGG-3′。扩增轻链可变区引物对:5′-ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC-3′;5′-GAAACGACACTCACGCAGTCTCC-3′。扩增 V_H-Linker 引物对:5′-AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTG AAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3′;5′-GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGG-3′。扩增 V_L-Linker 引物对:5′-ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC-3′;5′-GTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGAAACGACACTCACGCAGTCTCC-3′。引入酶切位点的引物:5′-GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC-3′;5′-GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC-3′。

1.2　方法

1.2.1　总 RNA 的提取　　重庆医科大学附一院 2006 年 7－9 月肺腺癌手术病例(10 例),术中分离的癌旁淋巴结,取回后用 RNA 抽提试剂盒(硫氰酸胍/酸酚一步法)进行提取,得到总 RNA。

1.2.2　V_H和 V_L基因扩增　　以 Oligo dT 作为引物合成 cDNA 第一链,然后以 cDNA 第一链为模板,以上下游引物配对分别扩增轻链基因片断和重链基因片断。再利用 Linker 引物分别扩增得到 V_H-Linker 基因片断和 V_L-Linker 基因片断。

1.2.3　scFv 基因的连接及 PCR 扩增　　先将回收纯化的 V_H-Linker 基因片断和 V_L-Linker 基因片断进行连接,通过重叠-延伸-拼接 PCR(SOE-PCR)形成 scFv 基因片断。然后再向反应体系中加入 scFv 扩增的引物(带有酶切位点),形成两端分别带有酶切位点的 scFv 基因片断。

1.2.4　噬菌体抗体库的构建　　用 T_4 DNA 连接酶连接经 *Sfi* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切 scFv 基因片断和 pCANTAB-5E 载体,电穿孔法转化 TG_1感受态细胞,铺 SOBAG 平板培养过夜。随机挑取 24 个转化后 TG_1菌落,提取质粒,将 PCR 反应阳性的质粒用 *Sfi* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切鉴定。将阳性细菌克隆铺 SOBAG 平板培养过夜,10 ml 2-YT 培养液收聚细菌。取少许悬于 2-YTAK 37 ℃ 250 r/min 振荡培养 1 h,加入 5×10^{10} pfu 的 M13K07,37 ℃ 250 r/min振荡培养 1 h。离心,菌体重悬于 2-YTAK 培养液,37 ℃ 250 r/min 振荡培养过夜。收集上清,加入 1/5 体积的 PEG/NaCl 沉淀噬菌体,离心,沉淀重悬 1 ml 2 × YT 中,即为噬菌体抗体 scFv 抗体库,4 ℃储存备用。

1.2.5　人源肺腺癌噬菌体 scFv 的富集筛选　　取冻存 scFv 噬菌体抗体库菌种 1 ml 进行噬菌体表面呈现。先以人成纤维细胞进行 1 轮吸附,再以肺腺癌细胞(A549)为抗原(1×10^7)对所建抗体库进行 5 轮吸附-洗脱-扩增的富集筛选。每轮富集筛选前后,测定噬菌体滴度。

1.2.6　scFv 基因的表达及纯化　　用 ELISA 检测为阳性重组噬菌体克隆感染 *E. coli* HB2151,经终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导表达后,收集上清,即为可溶性 scFv 抗体,－20 ℃保存。按试剂盒说明将可溶性抗体过 HiTrap™ Anti-E Tag 柱,检测 A_{280},合并峰值最高几管,此为纯化后的可溶性抗体。

1.2.7　SDS-PAGE、Western blot 及 ELISA 鉴定 scFv 的特异性　　以表达可溶性 scFv 抗体阳性菌液上清做 12% 分离胶和 5% 浓缩胶 SDS-PAGE;HRP 标记单克隆抗体行 Western blot 检测。分别以肺腺癌细胞 A549、乳腺癌细胞 MDA-MB-435 作为靶抗原作 ELISA 检测,同时设定空白、阴性对照。于 96 孔培养板中每孔约 10^4个细胞,37 ℃孵育过夜后,每孔加入 100 μl 2% BSA/PBS 封闭液室温封闭 2 h 后,加入噬菌体单链抗体 100 μl,4 ℃孵育过夜。加入 100 μl HRP/抗 M13 噬菌体单抗,室温孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次,DAB 避光显色 20 min,405 nm 波长酶标仪读板。P/N > 2 为阳性。

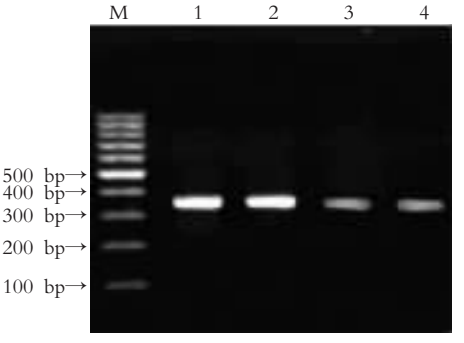
2　结果

2.1　总 RNA 的鉴定

从淋巴组织中提取总 RNA 后,电泳可见明显的 28 S 和 18 S 2 条带,28 S 为 18 S 亮度 2 倍以上,其完整性好,无明显降解。

2.2　V_H基因片断和 V_L基因片段的鉴定

V_H和 V_L基因扩增后,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果提示 V_H基因片段在 370 bp,V_L基因片段在 350 bp(图 1)。

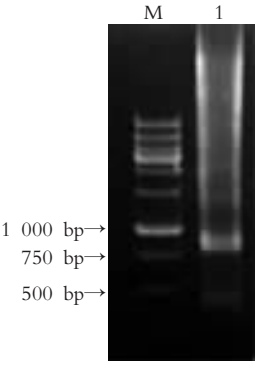


M:DNA 标准;1、2:V_H片段;3、4:V_L片段

图 1　抗体重链 V_H和轻链 V_L可变区 PCR 扩增片段的琼脂糖凝胶电泳鉴定

2.3　scFv 基因片段的鉴定

V_H-Linker 和 V_L-Linker 基因连接后,利用含有 *Sfi* Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切位点的引物进行 PCR 扩增,得到含有酶切位点的 scFv 基因。利用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,结果提示 scFv 基因在 750 bp 左右(图 2)。

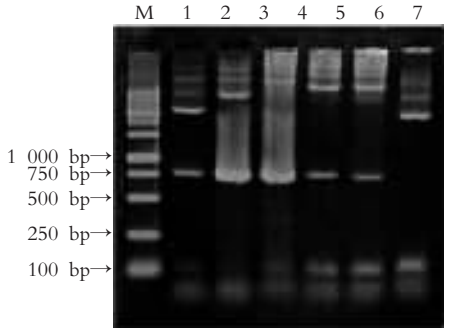


M:标准;1:scFv 基因

图 2　拼接后的单链抗体基因的琼脂糖凝胶电泳鉴定

2.4　质粒 DNA 的 PCR 检测

从 SOBAG 平板上随机挑选 24 个单菌落加入 3 ml 2-YT 培养液中振荡培养过夜,提取质粒。质粒 PCR 鉴定提示 scFv 基因插入率为 83.3%(20/24,图 3)。

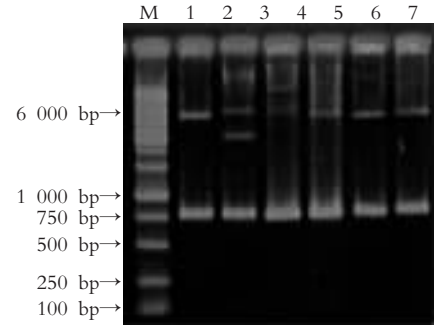


1：标准；2～6：阳性；7：阴性

图3 随机挑取克隆抽提质粒 PCR 反应

2.5 质粒 DNA 的酶切鉴定

将 PCR 阳性的质粒用 *Sfi* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切，用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后可在 750 bp 及 6 000 bp 处见条带（图4）。



1：标准；2～7：可见 scFv 的片断（下）和载体（上）

图4 PCR 反应阳性的质粒用 *Sfi* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切结果

2.6 噬菌体单链抗体库的筛选

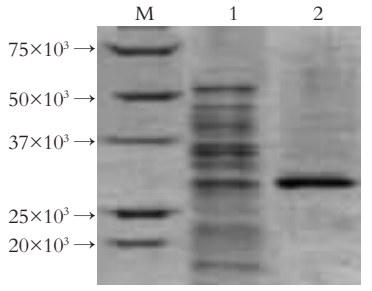
以肺腺癌细胞 A549 对噬菌体 scFv 库进行了 5 轮吸附-洗脱-扩增的富集筛选（表1），可见洗脱下来的噬菌体抗体量越来越大，投入产出比增加，第 5 轮噬菌体收获率是第 1 轮的 181 倍，说明携带肺腺癌相关抗体的噬菌体得到了有效富集。

表1 肺腺癌细胞 A549 对噬菌体抗体库的富集

富集次数	噬菌体滴度（cfu/ml）		噬菌体收获率（%）
	富集前	富集后	
1	4.9×10^{12}	7.8×10^{6}	1.59×10^{-6}
2	2.5×10^{12}	6.2×10^{6}	2.48×10^{-6}
3	1.8×10^{11}	9.1×10^{6}	5.05×10^{-5}
4	3.3×10^{11}	3.8×10^{7}	1.15×10^{-4}
5	1.6×10^{11}	4.6×10^{7}	2.88×10^{-4}

2.7 scFv 的表达及鉴定

用 ELISA 检测为阳性重组噬菌体克隆感染 *E. coli* HB2151，经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 1 h，进行可溶性 scFv 抗体表达。经亲和柱层析纯化可溶性抗体后用 SDS-PAGE 和 Western blot 进行鉴定。SDS-PAGE 显示相对分子质量为 30×10^3（图5）；Western blot 分析发现在相对分子质量为 30×10^3 处有 1 条清晰的显色条带（图6）。



M：标准；1：IPTG 诱导大肠杆菌 *E. coli* HB2151 的表达产物；2：纯化的可溶性抗体

图5 scFv 的 SDS-PAGE 鉴定

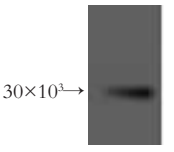


图6 svFv 的 Western blot 鉴定

2.8 噬菌体单链抗体的 ELISA 鉴定

以肺腺癌细胞 A549、乳腺癌细胞 MDA-MB-435 为靶抗原进行 ELISA 检测可溶性抗体的免疫活性，结果显示具有较高的特异性，能与 A549 结合，而不与 MDA-MB-435 结合（$P<0.05$，图7、8）。

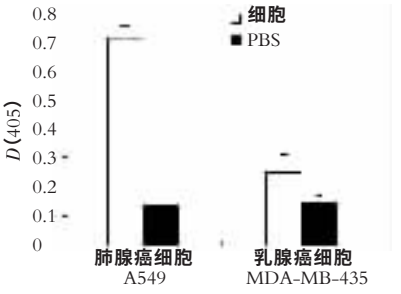
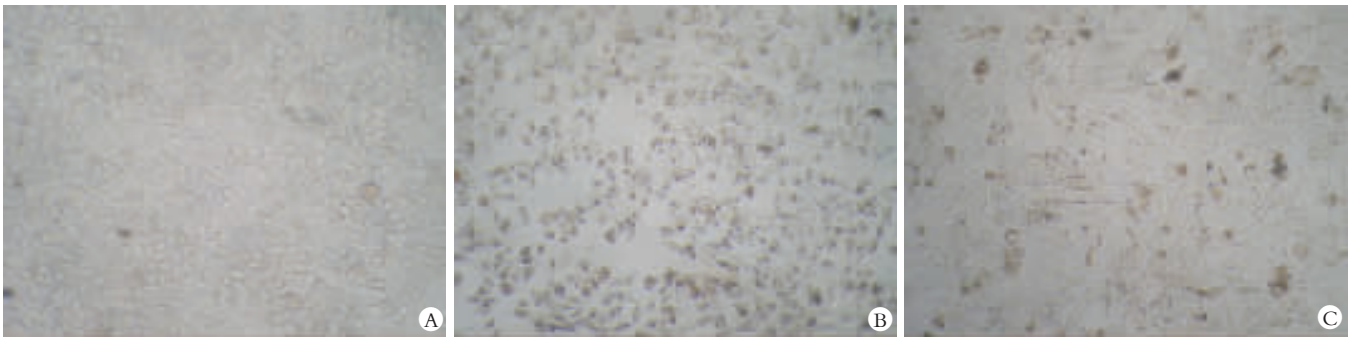


图7 ELISA 检测可溶性抗体与 A549 和 MDA-MB-435 细胞的结合活性



A：阴性对照；B：肺腺癌细胞阳性；C：乳腺癌细胞阴性

图8 细胞 ELISA 结果（×200）

3　讨论

噬菌体库技术是近 20 年新发展起来的一种制备单克隆抗体的新技术,由于噬菌体单链抗体不经过免疫也可直接从噬菌体抗体库中筛选出特异性抗体,而且具有分子量小、组织穿透性强、在靶抗原部位浓聚快等优点[3-6],在肿瘤的诊断及治疗中有很强的应用价值。国内已有利用此技术研制鼠抗乳腺癌细胞、膀胱癌和胃癌单抗的报道,这些抗体因为人抗鼠免疫反应而不适合于临床运用。因此,人源性抗肿瘤单抗对于临床上肿瘤抗体导向显像和治疗具有非常重要的意义,而人源性单抗的制备是迄今尚未解决的难题,故近年来利用噬菌体抗体库技术研制人源性抗肿瘤单抗受到关注。

本试验直接从肺腺癌患者癌旁淋巴组织中提取总 RNA,通过 RT-PCR 扩增免疫球蛋白基因,再利用噬菌体展示技术构建了 1 个 4.6×10^7 的人源肺腺癌噬菌体单链抗体库。试验中,我们选择的患者癌旁淋巴组织来构建的噬菌体抗体库比用患者外周血淋巴细胞构建的噬菌体抗体库更易筛选到高亲和力的抗体[7]。淋巴转移是肺腺癌最常见的转移方式,我们选择肺腺癌患者癌旁淋巴组织来构建抗肺腺癌单链抗体基因有助于提高单链抗体的敏感性和特异性。

噬菌体抗体库的筛选通常是将噬菌体抗体库与固相化的靶抗原孵育后,反复洗涤去除非特异结合,再洗脱并收集与抗原结合的噬菌体,再次感染大肠杆菌,使特异的噬菌体得到富集。目前筛选方法主要有:①液相抗原的筛选[8]。此方法可较好地保持抗原的天然构象,用于抗原性质明确、能纯化的噬菌体抗体库的筛选;②完整细胞的筛选[9]。应用单层生长、或黏附、或悬浮的完整细胞对噬菌体抗体库进行直接淘筛,可筛选到细胞表面特定的标志物(抗原蛋白)的特异性抗体[10]。这种方法特别适用于针对难以表达或纯化的膜抗原筛选(如癌细胞表面抗原)。目前采用该方法已获得了黑色素瘤细胞、前列腺癌细胞、红细胞等特异性噬菌体抗体。③组织筛选[11]。用于一些难以获得单个细胞的组织进行特异性抗体的筛选。本试验采用第二种筛选方法,在筛选过程中采用先低后高的洗涤力度,低洗涤力度保证低丰度的噬菌体抗体不丢失,高洗涤力度则有利于得到高亲和力的噬菌体抗体。此外,还选择人成纤维细胞和肺腺癌细胞做正负差异性筛选,先用人成纤维细胞进行负性筛选,可除去某些非特异性的噬菌体抗体,再用肺腺癌细胞进行筛选,在吸附-洗脱-扩增的筛选过程中,收获率逐渐增加,5 轮共增加了 181 倍。证明特异性噬菌体抗体得到了富集,选择效率得到有效提高。SDS-PAGE、Western blot 及 ELISA 法检测表明筛选得到的抗体片段与肺腺癌有特异性的结合活性。本试验成功地构建了人源肺腺癌噬菌体单链抗体库,筛选到高亲和力噬菌体单链抗体,为肺腺癌单链抗体的放射性核素显影及免疫治疗提供了实验基础。

参考文献:

[1] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. Science, 1985, 228(4705): 1315-1317.

[2] Huse W D, Sastry L, Iverson S A, *et al*. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda [J]. Biotechnology, 1992, 24: 517-523.

[3] Xu M Y, Xu X H, Chen G Z, *et al*. Production of a human single-chain variable fragment antibody against esophageal carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(18): 2619-2623.

[4] Marks J D, Hoogenboom H R, Gonnert T P, *et al*. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage [J]. J Mol Biol, 1991, 222(3): 581-597.

[5] Osbourn J, Jermutus L, Duncan A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases [J]. Drug Discov Today, 2003, 8(18): 845-851.

[6] Yokota T, Milenic D E, Whitlow M, *et al*. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms [J]. Cancer Res, 1992, 52(12): 3402-3408.

[7] Saerens D, Kinne J, Bosmans E, *et al*. Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen [J]. J Biol Chem, 2004, 279(50): 51965-51972.

[8] Sanna P P, Williamson R A, De-Logu A, *et al*. Directed selection of recombinant human monoclonal antibodies to herpes simplex virus glycoproteins from phage display libraries[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(14): 6439-6443.

[9] Marks J D, Ouwehand W H, Bye J M, *et al*. Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library[J]. Biotechnology (NY), 1993, 11(10): 1145-1159.

[10] Palmer D B, George A J, Ritter M A. Selection of antibodies to cell surface determinants on mouse thymic epithelial cells using a phage display library [J]. Immunology, 1997, 91(3): 473-478.

[11] Protolano S, McLachlan S M, Rapoport B. High affinity, thyroid-specific human autoantibodies displayed on the surface of filamentous phage use V genes similar to other autoantibodies[J]. J Immunol, 1993, 151(5): 2839-2851.

(编辑　吴培红)