文章编号:1000-5404(2011)10-0977-03

论著

噬菌体展示EpCAM单链抗体及免疫原性初步研究

刘晓丽[1],张岸梅[1],林 盛[1],王欣欣[1],廖荣霞[2],孙建国[1],陈正堂[1](400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部医学英语教研室[2])

【摘要】 **目的** 利用噬菌体展示技术进行鼠抗人EpCAM单链抗体表达并鉴定其免疫活性,构建特异靶向上皮来源肿瘤细胞及癌干细胞的单链抗体。**方法** 采用全基因合成的方法合成VL+Linker+VH的EpCAM的单链抗体(ScFv)基因,克隆到pMD19-T简易载体中,将ScFv基因酶切并纯化后克隆到噬菌体载体pCANTAB-5E,热休克法转化至感受态的大肠杆菌TG1,随机挑取5个克隆,经辅助噬菌体超感染,形成鼠抗人EpCAM噬菌体单链抗体,用ELISA(以P/N>2判定为阳性)和免疫细胞化学法测定其抗原结合活性。**结果** 成功获得pCANTAB-5E/EpCAM ScFv重组克隆,经ELISA和免疫细胞化学测定,噬菌体展示阳性率为20%,展示的单链抗体能与EpCAM抗原和A549细胞特异性结合。**结论** 噬菌体展示技术制备EpCAM单链抗体方法简便、省时、高效。

【关键词】 单链抗体;噬菌体展示;EpCAM;免疫;肿瘤干细胞
【中图法分类号】 R392.11;R394-33;R392.13 【文献标志码】 A

Preliminary study on immunogenicity of phage-displayed mouse-anti-human EpCAM single-chain antibody

Liu Xiaoli[1], Zhang Anmei[1], Lin Sheng[1], Wang Xinxin[1], Liao Rongxia[2], Sun Jianguo[1], Chen Zhengtang[1]([1]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Medical English, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To express mouse-anti-human EpCAM single-chain antibody (ScFv) specifically targeting tumor cells or cancer stem cells of epithelial origin *via* phage display technology, and to identify its immunological activity. **Methods** Total gene synthesis method was used to synthesize mouse-anti-human EpCAM ScFv gene with a structure of VL+Linker+VH. The gene was cloned to pMD19-T Simple Vector and then was digested, after being purified, was cloned to phage vector pCANTAB 5E. Competent *E. coli* TG1 cells were transformed with pCANTAB 5E containing ScFv gene. Mouse-anti-human EpCAM ScFv was produced by helper phage M13K07 superinfection with 5 randomly selected clones, and the antigen binding activity was identified by ELISA and immunocytochemistry. **Results** Recombinant pCANTAB5E/EpCAM ScFv was constructed successfully, with a positive antigen-binding rate of 20% proven by ELISA and immunocytochemistry. The selected ScFv could specifically bind to EpCAM antigen and human lung adenocarcinoma cell line A549. **Conclusion** Mouse-anti-human EpCAM ScFv produced *via* phage display technology has advantages such as simple, highly efficient, and time-saving, which is expected to be helpful in diagnosing tumor cells and cancer stem cells of epithelial origin.

【**Key words**】 single-chain antibody; phage display; EpCAM; immunity; cancer stem cell

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2008AA02Z104) and the National Natural Science Foundation of China (81071786, 30971289). Corresponding author: Sun Jianguo, Tel: 86-23-68774490, E-mail: sunjg09@yahoo.com.cn; Chen Zhengtang, Tel: 86-23-68755626, E-mail: czt05@163.com

肿瘤是一种严重危害人类健康与生命的疾病,其发病隐袭,生存率低,死亡率高,且逐年攀升。导致肿瘤高病死率的重要原因之一是在肿瘤诊断时,大多数患者已经发展到Ⅲ或Ⅳ期,错过了手术治疗时机。而目前常用的辅助检查尚不能对肿瘤做出准确的早期诊断。寻找早期诊断的有效途径,成为近年来医务工作者们关注和研究的热点。上皮细胞粘附分子(EpCAM)是一个常见的高表达的上皮肿瘤相关抗原,具有介导钙非依赖型的同型上皮细胞间粘附的功能,其

【基金项目】 国家高技术研究发展计划(863计划,2008AA02Z104);国家自然科学基金(81071786,30971289)
【通信作者】 孙建国,电话:(023)68774490,E-mail:sunjg09@yahoo.com.cn
陈正堂,电话:(023)68755626,E-mail:czt05@163.com

在上皮组织肿瘤中的表达水平远远超过正常组织[1]。结直肠癌、前列腺癌、肝癌、食道癌、肺癌、头颈部癌、胰腺癌和乳腺癌等多种肿瘤中EpCAM高表达[2-3]，且许多上皮癌如结肠癌[4]、肝细胞癌[5-6]、乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌的肿瘤干细胞中都有EpCAM高表达[7-9]。EpCAM作为上皮来源肿瘤的诊断和预后的特异性标志[10]，被应用于多种肿瘤的抗体或疫苗的临床试验中[11]。因此，简便、省时、高效地获得EpCAM单链抗体，具有重要的意义。本研究拟通过噬菌体展示技术进行鼠抗人EpCAM单链抗体的噬菌体展示，并初步鉴定免疫活性，为鉴定靶向上皮来源的肿瘤细胞及癌干细胞奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

肺腺癌A549上皮细胞为本实验室保存。胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自Qiangen公司，限制性内切酶*Sfi* Ⅰ、*Not* Ⅰ、*Pst* Ⅰ、*Sal* Ⅰ均为大连TaKaRa公司产品，T_4 DNA连接酶为Promega公司产品，噬菌体载体pCANTAB-5E、辅助噬菌体M13K07、HRP/Anti-M13噬菌体单克隆抗体均购自Amersham公司，大肠杆菌TG1购自北京四环医药科技有限公司，EpCAM抗原为义翘神州公司产品，ABTS为Sigma公司产品。

1.2 方法

1.2.1 EpCAM ScFv的合成 根据GenBank中鼠抗人EpCAM抗体可变区重链(GI 20797196)及轻链序列(GI 20797199)，采用了经典的Linker形式(G4S)3，并分别引入*Sfi*Ⅰ、*Pst*Ⅰ和*Not*Ⅰ、*Sal*Ⅰ酶切位点，采用全基因合成的方法由大连TaKaRa公司合成VL+Linker+VH的EpCAM ScFv，克隆到pMD19-T简易载体中。

1.2.2 重组噬菌体pCANTAB-5E/EpCAM ScFv质粒的构建 pMD19-T/EpCAM ScFv先后用*Sfi* Ⅰ和*Not* Ⅰ消化后与经同样处理的载体pCANTAB-5E连接，同时设立阳性(Control insert)和阴性(载体自连)对照组。热休克法将各组转入感受态大肠杆菌TG1，吸出100 μl转化中的细菌转入含有900 μl的预热到37 ℃的LBG培养基中250 r/min振摇培养1 h，分别取出100 μl铺SOBAG平板，另吸100 μl未经转化的感受态大肠杆菌TG1铺1块SOBAG平板做空白对照，30 ℃培养过夜。

1.2.3 重组噬菌体质粒的酶切鉴定与DNA序列分析 从过夜培养的SOBAG平板随机挑取5个分离良好的单菌落，加入2×YT-A培养液中，30 ℃，250 r/min振摇过夜培养，提取重组pCANTAB-5E质粒，进行*Sfi* Ⅰ/*Not* Ⅰ双酶切，酶切后出现750 bp左右的外源性插入片段者进行核酸序列测定。

1.2.4 噬菌体单链抗体的表达 从以上过夜培养的菌液中分别吸出4 μl，加入含有400 μl 2×YT-AG培养液的聚丙烯试管中，30 ℃，250 r/min振摇过夜培养，吸出40 μl菌液，加入另一含有400 μl的5×10^8 pfu/ml M13K07的2×YT-AG培养基的聚丙烯试管中，37 ℃，150 r/min振摇培养2 h进行超感染，1 500×*g*离心20 min，弃上清，用400 μl的2×YT-AK重悬细菌，37 ℃，250 r/min过夜培养，1 500×*g*离心20 min，即得到含有重组噬菌体的上清。

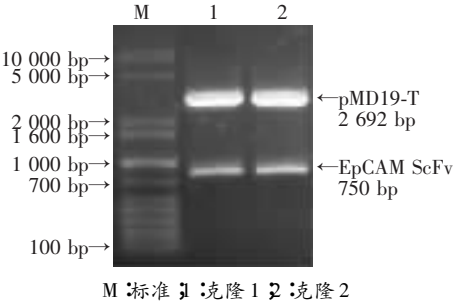
1.2.5 ELISA检测抗体特异性 吸出320 μl含有重组噬菌体的上清到另一新的聚丙烯管中，加入80 μl封闭液(2%脱脂奶粉/PBS)，室温孵育15 min，进行ELISA检测抗体特异性结合性能。将EpCAM抗原以10 μg/ml稀释后包被于96孔酶标板2 h，以2%脱脂奶粉/PBS 37 ℃ 1 h封闭非特异结合部位，然后加入含有待测EpCAM抗体的上清200 μl/孔，分别以PBS和没有插入片段的辅助噬菌体M13K07作为空白对照和阴性对照，一抗为噬菌体抗体，二抗为HRP/Anti-M13单克隆抗体。底物ABTS显色20 min，测定405 nm光密度值[*D*(405)]。按下列公式计算并判断结果：用空白孔调零后，样品*D*(405)值/阴性对照平均*D*(405)值≥2.0，判断为阳性；样品*D*(405)值/阴性对照平均D(405)值<2.0，判断为阴性。阴性对照*D*(405)值低于0.05按0.05计算，高于0.05按实际*D*(405)值计算，显色阳性的克隆再以A549细胞为抗原鉴定抗原抗体反应的特异性。

1.2.6 免疫细胞化学法测定抗体的特异性 将A549细胞按1×10^4/孔的密度接种于96孔细胞培养板上，待细胞贴壁生长后，弃去培养基，PBS洗涤5 min，用4%的多聚甲醛固定2 h后，加入1% BSA/PBS(200 μl/孔)，37 ℃封闭1 h，弃去封闭液，加入待测噬菌体抗体(100 μl/孔)，37 ℃孵育1 h，PBS洗涤3次，加HRP/Anti-M13(工作浓度1∶5 000，100 μl/孔)，37 ℃孵育1 h，PBS洗涤5次后加DAB避光显色20 min，并以PBS代替EpCAM抗体作为阴性对照，于倒置相差显微镜下照相。

2 结果

2.1 pMD19-T/EpCAM ScFv的双酶切

pMD19-T/EpCAM ScFv双酶切(*Sfi* Ⅰ/*Not* Ⅰ)，获得750 bp ScFv片段(图1)。



M：标准；1：克隆1；2：克隆2

图1 pMD19-T/EpCAM ScFv双酶切(*Sfi* Ⅰ/*Not* Ⅰ)电泳结果

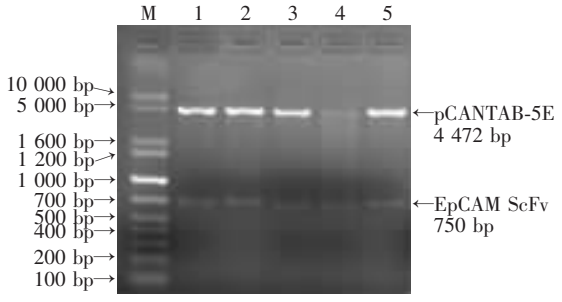
2.2 pCANTAB-5E/EpCAM ScFv重组质粒的构建及测序

EpCAM ScFv基因片段与线性化噬菌体载体pCANTAB-5E连接后转化感受态大肠杆菌TG1，SOBAG平板上可见大量菌落生长。随机挑取5个单菌落做双酶切鉴定，1%凝胶电泳可见750 bp的清晰条带(图2)。DNA序列测定结果显示，与EpCAM ScFv抗体基因完全一致，ScFv全长750 bp，其中VH 363 bp，编码121个氨基酸；VL 342 bp，编码114个氨基酸，两者以连接肽$(Gly_4Ser)_3$相连，末端接有检测肽E-tag基因。

2.3 ELISA法检测EpCAM噬菌体抗体的特异性

以EpCAM抗原包被96孔酶联板，用随机挑选的5个阳性克隆制备EpCAM单链抗体进行ELISA检测，结果显示，其中1

个克隆与 EpCAM 抗原反应呈绿色，而空白对照及阴性对照均未显色，表明 EpCAM 单链抗体与 EpCAM 抗原发生了特异性结合，噬菌体展示阳性率为 20%。

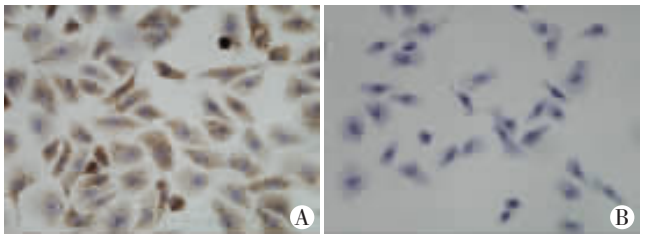


M：标准；1～5：随机挑取的 5 个重组 pCANTAB-5E/EpCAM ScFv 质粒双酶切（*Sfi* Ⅰ/*Not* Ⅰ）

图 2 重组 pCANTAB-5E 质粒双酶切鉴定

2.4 免疫细胞化学鉴定 EpCAM 单链抗体的特异性

贴壁生长的 A549 细胞，经固定、封闭、与 EpCAM 噬菌体抗体结合及显色后，可见 A549 细胞膜及细胞质呈棕色深染，细胞核未见染色，阴性对照细胞细胞膜及细胞质均未见染色，表明 EpCAM 单链抗体与 A549 细胞发生了特异性结合（图 3）。



A：A549 细胞阳性；B：阴性对照

图 3 A549 细胞与 EpCAM 单链抗体的免疫细胞化学显色（×400）

3 讨论

抗体技术作为研究蛋白质的核心工具，随着 20 世纪 80 年代噬菌体展示技术的出现而进入了一个新的发展阶段[12]。该技术不经免疫而制备抗体，无需繁杂费时饲养动物和大规模的细胞培养，且易于基因工程制备和改造[13]。本实验利用噬菌体展示技术，成功获得鼠抗人 EpCAM 单链抗体，达到 20% 的噬菌体展示阳性率，通过 ELISA 和 A549 细胞免疫染色检测，显示 EpCAM 噬菌体抗体具有较高的免疫活性。研究结果表明，该方法简便、快捷、高效，是制备 EpCAM 单链抗体的重要方法。

肿瘤干细理论认为，肿瘤的复发、侵袭转移、耐药、抗辐射等恶性表型特征都与肿瘤干细胞有关[14]。随着肿瘤干细胞研究的深入，寻找肿瘤干细胞表面标志物、发展新的肿瘤诊断方法已经成为提高病人存活率的重要途径之一。近年来，EpCAM 被认定可作为肿瘤的起源--干细胞的另外一种标志[15]，使其成为诊断和治疗上皮来源肿瘤的更有意义的靶标。特异性靶向 EpCAM 的单链抗体，可望成为鉴定上皮来源肿瘤细胞及癌干细胞的重要工具。

A549 细胞为上皮来源的肺腺癌细胞，细胞膜及细胞质内 EpCAM 抗原广泛表达。本实验获得的 EpCAM 单链抗体可与 A549 细胞膜及细胞质内的 EpCAM 抗原进行有效结合，显示了较好的免疫活性。研究表明，本实验利用噬菌体展示技术成功进行了 EpCAM 特异性单链抗体的表达，为本课题下一步肺癌噬菌体抗体库的构建和筛选肺癌细胞特异性抗体等研究奠定了重要的实验基础。该技术所展示出的 EpCAM 抗体具有免疫活性强、高效、生产简便的特点，对制备 EpCAM 单克隆抗体、深入研究其生物学功能以及对上皮来源肿瘤的早期靶向检测和治疗具有重要的临床意义。

参考文献：

[1] Went P T, Lugli A, Meier S, *et al*. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas[J]. Hum Pathol, 2004, 35(1): 122-128.
[2] Ruck P, Wichert G, Handgretinger R, *et al*. Ep-CAM in malignant liver tumours[J]. J Pathol, 2000, 191(1): 102-103.
[3] Piyathilake C J, Frost A R, Weiss H, *et al*. The expression of Ep-CAM (17-1A) in squamous cell cancers of the lung[J]. Hum Pathol, 2000, 31(4): 482-487.
[4] Dalerba P, Dylla S J, Park I K, *et al*. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(24): 10158-10163.
[5] Yamashita T, Budhu A, Forgues M, *et al*. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2007, 67(22): 10831-10839.
[6] Yamashita T, Forgues M, Wang W, *et al*. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2008, 68(5): 1451-1461.
[7] O'Brien C A, Pollett A, Gallinger S, *et al*. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. Nature, 2007, 445(7123): 106-110.
[8] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, *et al*. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983-3988.
[9] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, *et al*. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells[J]. Nature, 2007, 445(7123): 111-115.
[10] Went P, Dirnhofer S, Schopf D, *et al*. Expression and prognostic significance of EpCAM[J]. J Cancer Mol, 2008, 3(6): 169-174.
[11] Baeuerle P A, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer[J]. Br J Cancer, 2007, 96(3): 417-423.
[12] Beckman R A, Weiner I M, Davis H M. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors[J]. Cancer, 2007, 109(2): 170-179.
[13] 宋文全. 噬菌体抗体库技术的发展及应用[J]. 国外医学：免疫学分册, 2005, 28(3): 147-150.
[14] 谢伟, 龙海霞, 张恒, 等. 人卵巢癌细胞系 A2780 中肿瘤干细胞的分离及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(4): 356-259.
[15] Visvader J E, Lindeman G J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(10): 755-768.

（收稿：2011-03-08 修回：2011-03-29）
（编辑 汪勤俭）