论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1284-03

人源肺腺癌单链抗体基因文库的构建

庞 华[1],罗 弋[2],李少林[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院核医学科;2. 重庆医科大学基础医学院核医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:制备人源抗肺腺癌单链抗体(Single-chain variable fragment,scFv)基因文库。方法:利用肺腺癌患者癌旁淋巴组织提取总RNA,通过RT-PCR分别扩增V_H和V_L基因片断,再将经纯化的V_H和V_L基因片断通过"剪切重叠延伸PCR"(Splicing over-lapping extend PCR,SOE-PCR)而形成scFv基因片断。将scFv基因克隆入噬菌粒载体pCANTAB-5E电转入Ecoli TG1。PCR法鉴定抗体基因插入率,1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆酶切产物。结果:肺腺癌周围淋巴结的提取总RNA琼脂糖电泳结果中可见清晰的28 S、18 S条带;V_H基因的大小约为370 bp,V_L基因为350 bp,组装后的scFv基因约为750 bp。PCR连接产物的转化效率为2.2×10^7 CFU/μg,scFv的阳性插入率为83.3%(20/24)。结论:成功地构建了人源抗肺腺癌scFv基因片断,为进一步筛选人源抗肺腺癌scFv库提供了试验基础。

【关键词】噬菌体抗体库;单链抗体;肺腺癌;构建

【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-19

Construction of gene library of human-originated single-chain variable fragment antibody associated with lung adenocarcinoma

PANG Hua, et al

(Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*:To construct human single-chain variable fragment (scFv) antibodies gene library associated with lung adenocarcinoma. *Methods*:Total RNA was extracted from the lymphatic tissue near the lung adenocarcinoma.V_H and V_L fragments were amplified with RT-PCR, the purified V_H and V_L fragments were used to produce scFv fragment by splicing-overlap-extension PCR. The scFv gene was cloned in pCANTAB-5E Phasmid, then transferred to Ecoli TG1.The insertion ratio of antibody gene was identified with RT-PCR, the positive enzyme-cutting products were identified with 1.5% agarose gel electrophoresis. *Results*:Clear 28 S and 18 S strips were found in total RNA;The size of V_H is about 370 bp, V_L is about 350 bp.The size of scFv is about 750 bp.After transformation into Ecoli TG1, 2.2×10^7 CFU/μg ampicillin resistant bacteria colonies grow after overnight culture, and the positive insert ratio was 83.3%. *Conclusion*:Human single-chain variable fragment (scFv) antibodies gene associated with lung adenocarcinoma was constructed successfully. It could provide bases to further screen the antibody library construction.

【Key Words】 Phage antibody library; Single-chain variable fragment; Lung adenocarcinoma; Construction

肺癌是人类较常见的恶性肿瘤之一。以化疗、放疗及手术治疗在内的综合治疗,由于疗效并不满意,又因副作用太大而在临床应用中受到诸多限制,因此,免疫疗法成为研究的热点,同时,针对免疫疗法所必须的抗体的制备也成为许多学者研究的重点。但是,无论是早期利用肿瘤细胞免疫小鼠得到的多克隆抗体,还是以后运用杂交瘤技术生产的单克隆抗体都因为抗体的特异性低或者人抗鼠免疫反应等原因而不适用于临床肿瘤治疗。直到噬菌体抗体库技术的出现,才为肿瘤的抗体免疫治疗带来了新的契机。该技术与传统的杂交瘤技术相比,易于体外筛选和扩增所需抗体;不需要饲养动物和大规模的细胞培养;得到的抗体为人源性的单克隆抗体;可方便地获得抗体基因进行进一步的研究等。本研究利用RT-PCR技术以及噬菌体抗体库技术建立了人源性肺腺癌单链噬菌体抗体基因库,为制备肺腺癌的人源scFv奠定基础。

作者介绍:庞 华(1973-),女,主治医师,硕士,研究方向:放射肿瘤学。

通讯作者:李少林,男,教授,E-mail:shaolinli202@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30370422)。

1 材料和方法

1.1 材料

总RNA抽提试剂盒(Tissue RNA Kit),胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit),质粒抽提试剂盒(Plasmid Kit)均购自上海华舜生物工程有限公司。RT-PCR 试剂盒 (RNA PCR Kit)、*Sfi* Ⅰ和*Not* Ⅰ限制性内切酶、Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶购于大连宝生物公司。DNA 100 bp Marker购自上海生工生物工程技术服务有限公司。噬菌粒载体pCANTAB-5E、辅助噬菌体M13K07、大肠杆菌*Ecoli* TG1均购自Amersham Biosciences公司。

1.2 方法

1.2.1 淋巴结总RNA的提取 术中分离的肺癌患者(重庆医科大学附属第一医院胸外科肺癌病人10例,手术后经病理确诊均为腺癌)癌肿周围淋巴结,用无菌纱布包好后,迅速放入液氮中冻存。取回后立即利用RNA抽提试剂盒进行提取,首先在盛有液氮碾钵中迅速把淋巴组织碾成粉末,这样可使组织脆硬同时防止RNA破坏[1]。然后再利用RNA抽提试剂盒进行提取,得到总RNA。将获得的RNA贮存于-70℃。琼脂糖电泳判断RNA的完整性,分光光度仪测A_{260}/A_{280}判断RNA的纯度。

1.2.2 确定扩增VH和VL基因引物对 引物序列中的简并符号采用IUPAC命名方式:R=A或G;W=A或T;K=G或T;Y=C或T;S:G或C;H=A或C或T;N=A或C或G或T,引物参照[2-4]设计,引物委托北京三博远志生物技术有限责任公司合成,为PAGE纯化产品。引物浓度的计算:PCR反应中引物工作浓度为0.2 μmol/L。对扩增重链可变区和扩增轻链可变区的每一个后引物和每个前引物交叉配对(网格筛选)做PCR,然后分别将PCR产物电泳,确定扩增VH和VL基因片段的引物对。扩增重链可变区引物对:HuJ_H3FOR:5'-TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3';HuV_H5aBACK:5'-GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGG-3'。扩增轻链可变区引物对:HuJκ4FOR:5'-ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC-3';HuVκ5aBACK:5'-GAAACGACACTCACGCAGTCTCC-3'。扩增VH-Linker引物对:HuJ_H3Linker:5'-AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3';HuV_H5aBACK:5'-GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGG-3'。扩增VL-Linker引物对:HuJκ4FOR:5'-ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC-3';Linker-HuVκ5BACK:5'-TTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGAAACGACACTCACGCAGTCTCC-3';引入酶切位点的引物:HuV_H5aBACK*Sfi*:5'-GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC-3';HuJκ4FOR*Not*:5'-GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC-3'。

1.2.3 RT-PCR 逆转录反应(cDNA第一链的合成)

1.2.3.1 按下列组成配制反转录反应液 $MgCl_2$ 2 μl,10×RT Buffer 1 μl,RNase Free dH_2O 2.75 μl,dNTP Mixture (10 mmol/L each) 1 μl,RNase Inhibitor 0.25 μl,Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μl,RNA 2 μl,AMV Reverse Transcriptase 0.5 μl,总量10 μl。

1.2.3.2 按以下条件进行反转录反应 42℃ 20 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min 1个循环。

1.2.4 V_H和V_L基因扩增 用确定好的引物对分别在PCR仪上扩增V_H和V_L基因片段。

1.2.4.1 按下列组成配制PCR反应液 重链可变区和轻链可变区分别进行:5×PCR Buffer 10 μl,灭菌蒸馏水26.75 μl,Back primer 1 μl,Forward primer 1 μl,dNTP Mixture(10 mmol/L each) 0.5 μl,$MgCl_2$ 0.5 μl,TaKaRa Ex Taq™ HS 0.25 μl,总量40 μl。

1.2.4.2 把上一步的反应液加入到1.2.3 逆转录反应结束后的PCR反应管中,轻轻混匀。至此,总量为50 μl。

1.2.4.3 按以下条件进行PCR反应:94℃,2 min 1个循环,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,40个循环,72℃,7 min,1循环。PCR产物用琼脂糖凝胶电泳(1.5%)纯化回收V_H和V_L基因片段。

1.2.5 scFv基因的组装 V_H和V_L基因片段延伸连接肽V_H-linker和V_L-linker:用上述纯化的V_H和V_L基因片段作为它们延伸连接肽的模板,用相对应的human JH-linker primers和human V_H back primers扩增V_H-linker,用相对应的linker-human V_K primers和human J_K forward primers扩增V_L-linker。

剪切重叠延伸PCR (Splicing over-lapping extendPCR, SOE-PCR):将上述扩增的V_H-Linker和V_L-Linker的PCR产物在无引物情况下用SOE-PCR连接:首先变性步骤94℃ 5 min,1个循环;94℃ 1 min,60℃ 1 min,72℃ 1.5 min,5个循环;然后加入含酶切位点引物,94℃ 30 s,60℃ 1 min,72℃ 1.5 min,40个循环,胶纯化回收scFv。

1.2.6 单链抗体基因文库的建立 单链抗体基因先后用限制性内切酶*Sfi* Ⅰ和*Not* Ⅰ酶切过夜,产物纯化后,与同样酶切后噬菌体载体pCANTAB-5E进行连接反应,连接产物纯化后,电转化大肠杆菌TG1,涂SOBAG平板,同时用pUC18标准质粒测定转化效率,在含2%葡萄糖和100 μg/ml的SOB培养基上30℃培养过夜。

1.2.7 PCR法鉴定抗体基因插入率 挑取24个细菌集落,加入3 ml含氨苄青霉素100 mg/ml的LB培养过夜。按质粒提取试剂盒说明提取质粒,取2 μl为模板采用50 μl体系,进行PCR扩增琼脂糖凝胶电泳检测scFv的阳性插入率。

1.2.8 阳性克隆酶切鉴定 PCR反应阳性的质粒用*Sfi* Ⅰ和*Not* Ⅰ双酶切,产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳。

2 结 果

2.1 淋巴结总RNA的提取

肺腺癌患者淋巴结总RNA用1.5%琼脂糖凝胶

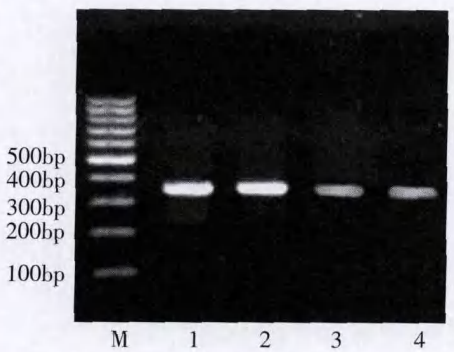
电泳判断RNA的完整性,可见2条带28 S和18 S,而且28 S条带的亮度是18 S的2倍。分光光度仪测A_{260}/A_{280}判断RNA的纯度>1.8。

2.2 V_H和V_L基因扩增产物的鉴定

V_H和V_L基因扩增后,经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,V_H基因的大小约为370 bp,V_L基因为350 bp,见图1。

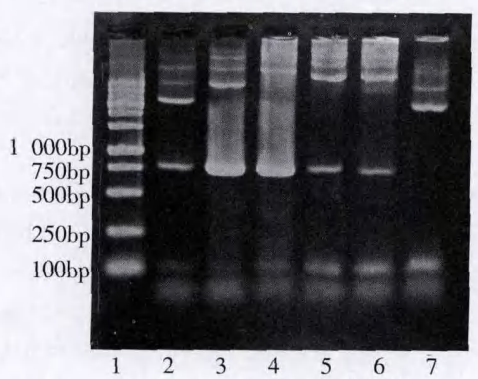
2.3 scFv基因的组装

scFv基因组装后,经1.5%琼脂糖凝胶电泳证实,组装后的scFv基因约为750 bp,见图2。



M. 100 bp DNA marker;1、2. V_H 片断;3、4. V_L 片断

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



1. Marker;2~6. PCR 为阳性,
7. PCR 为阴性

图 3 随机挑取克隆抽提质粒 PCR 反应

2.4 PCR连接产物的转化效率的测定

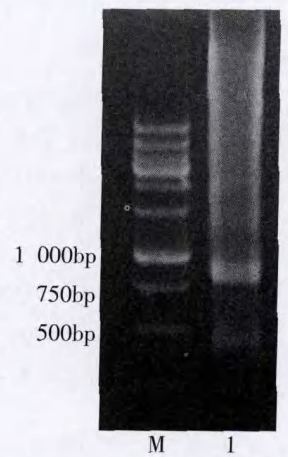
pUC18标准质粒测定大肠杆菌TG1转化效率为10^8 CFU/μg,PCR连接产物的转化效率为2.2×10^7 CFU/μg。

2.5 PCR法鉴定抗体基因插入率

PCR法检测24个菌落,20个克隆扩增出scFv,目的基因插入率为83.3%,见图3。

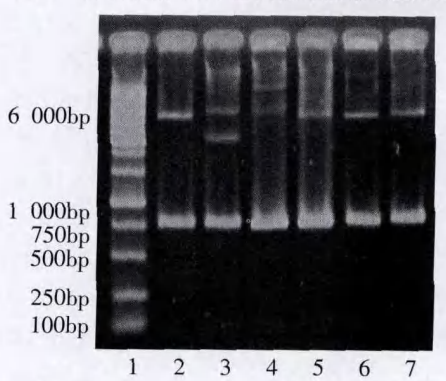
2.6 阳性克隆酶切鉴定

随机挑取6个单克隆质粒以*Sfi* Ⅰ和*Not* Ⅰ双酶切,均有目的片段释放,见图4。



M. 6 kb marker;1. scFv 基因

图 2 拼接后的 scFv 基因的琼脂糖凝胶电泳鉴定



1. 6 kb Marker;2~7均可见 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

3 讨 论

scFv具有分子量小、组织穿透性好、免疫原性低、非靶部位存留时间短、组织穿透力强、易于基因工程制备和改造等优点[5],因而在肿瘤的诊断及治疗中有广泛的应用前景,是目前的研究热点之一。但是目前报道的用于肿瘤研究的scFv多为鼠源性抗体,这些抗体因人抗鼠免疫反应等原因而不适合于临床应用。

本实验利用患者的癌旁淋巴组织提取RNA,由于新鲜组织中含有较多得RNA酶,我们利用液氮碾磨方法制备淋巴组织匀浆,从而有效的避免了RNA的破坏[1]。然后通过RT-PCR分别扩增V_H和V_L基因片断,再将V_H和V_L基因片断通过SOE-PCR而形成scFv基因片断。

论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1287-04

氯胺酮对烧伤早期小鼠肝应激相关蛋白IFIT1和JAB1表达的影响

巩继平[1,2],陈玉培[2],郭晓妹[3],粟永萍[1]

(1. 第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室全军复合伤研究所创伤 烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;
2. 重庆医科大学附属第二医院麻醉科,重庆 400010;3. 重庆医科大学基础医学院生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察小鼠应激相关蛋白IFIT1(Interferon-induced protein with tetratricopetide repeats1)和JAB1 (c-Jun activation domain-binding protein 1)在肝脏的表达的细胞定位及氯胺酮对烧伤后早期肝脏IFIT1和JAB1表达的影响,初步探讨氯胺酮调节炎症反应的分子机制。方法:将15只健康C57/129小鼠随机分为3组(n=5),正常对照组、烧伤组、烧伤+氯胺酮组。采用TBSA 15~20% Ⅲ度小鼠烧伤模型;氯胺酮10 mg/kg,肌肉注射,烧伤15 min给予。分别于烧伤后4 h脱臼处死,取肝。采用免疫印迹法(Western blot)观察各组肝IFIT1和JAB1的表达情况。取正常对照组肝组织作病理切片,行免疫组织化学方法对IFIT1和JAB1的表达做细胞定位。结果:烧伤组IFIT1表达较正常对照组显著增高(P<0.01),烧伤组JAB1表达较正常对照组显著降低(P<0.01);氯胺酮治疗组IFIT1表达较正常对照组、烧伤对照组显著降低(P<0.01),氯胺酮治疗组JAB1表达较正常对照组显著降低(P<0.05)、较烧伤组显著升高(P<0.05)。免疫组织化学方法显示,IFIT1在肝细胞胞浆表达为阳性,JAB1在肝细胞胞

作者介绍:巩继平(1973-),男,硕士,
研究方向:颈交感阻滞对严重创伤救治方面的研究。
通讯作者:粟永萍,女,教授, E-mail:suyp2003@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金海外学者合作研究项目(30328025)和创伤、烧伤与复合伤 国家重点实验室开放课题;国家973项目(2005CB522600)。

目前人源抗体库的主要来源是外周血淋巴细胞。构建一定容量的抗体库需要约1×10^7个B淋巴细胞,这意味着至少需要200 ml外周血。因此临床操作十分不便。本实验选择肺癌手术癌肿周围转移淋巴结标本为来源,构建人源抗体基因文库。因为淋巴转移是肺腺癌最常见的转移方式,以此来源的B细胞数量多,且可能经过肺癌相关抗原刺激,助于提高scFv的敏感性和特异性, 是构建肺癌相关的人源抗体库的最佳来源。

噬菌体抗体库技术的关键步骤就是构建大容量的人源抗体基因文库。抗体库越大,从中筛选出特异性抗体的可能性就越大[6]。构建一个库容为10^{11}的组合噬菌体抗体库,理论上认为基本上就包括了人体所有的抗体分子[7]。噬菌体抗体库容量的大小有赖于转化细菌的效率高低。一般来说,细菌的转化效率介于10^7~10^8 CFU/μg之间。本实验用pUC18标准质粒测定转化效率达到10^8 CFU/μg,PCR连接产物的转化效率也能达到2.2×10^7 CFU/μg,scFv的阳性插入率为83.3%,说明此方法制备的大肠杆菌基本达到抗体库构建的要求。

综上所述, 本试验构建的人源抗肺腺癌scFv基因文库为下一步得到高亲合力和高特异性的抗肺腺癌scFv打下了实验基础。而这种scFv完全克服了人抗鼠免疫反应而适合于临床的应用。

参 考 文 献

[1] HE Y Y,HE X R,YE T Z.RNA isolation from human embryonic tissues[J]. Journal of Experimental Hematology,2005,13(6):1058-1060.

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

[3] 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.

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

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

[6] Sidhu S S,Lowman H B,Cunningham B C,et al. Phage display for selection of novel binding peptides[J]. Methods Enzymol,2000,328:333-363.

[7] Pereira S,Van Belle P,Eleder D.Combinatorial antibodies against human malignant melanoma[J]. Immunology,1997,16(1):11-15.

(责任编辑:关蕴良)