DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.006
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)14-1239-03

论著

抗HCMV人源化噬菌体抗体库的构建

顾长国,刘 琛,李 磊 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 构建抗巨细胞病毒噬菌体抗体库,为制备巨细胞病毒感染治疗用单克隆抗体奠定基础。方法 以巨细胞病毒感染患者外周血淋巴细胞为材料,建立噬菌体抗体库,并对其进行鉴定。结果 构建完成了一个库容为6.5×10^6 cfu/ml的噬菌体抗体库。结论 人源化抗巨细胞病毒噬菌体抗体库的建立为下一步抗体的筛选和表达奠定了基础。

关键词:巨细胞病毒;噬菌体抗体库;构建
中图法分类号:R373.9;R392.11;R394-3 文献标识码:A

Construction of humanized phage display antibody library for human cytomegalovirus

GU Chang-guo, LIU Chen, LI lei (State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct a phage display antibody library of human cytomegalovirus (HCMV) for providing the basis of screening humanized antibody against HCMV infection. Methods The peripheral lymphocytes from HCMV-infected patients were collected and the phage display antibody library were constructed and identified. Results A phage display antibody library with titer of 6.5×10^6 cfu/ml has been constructed. Conclusion The library has laid the foundation for further screening and expression of the specific antibody in the future.

Key words: human cytomegalovirus; phage display antibody library; construction

巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是婴儿宫内感染,以及因免疫抑制剂、器官和骨髓移植、AIDS等所致免疫低下患者罹患严重感染的重要病原[1]。HCMV感染是一种全身性感染,常引起多器官损害,它可在上皮细胞、血管内皮细胞、白细胞等不同细胞内存留并复制,一旦感染终身携带,当机体免疫力低下时反复增殖,导致细胞的变性坏死。病毒感染在新生儿先天畸形、器官移植患者和AIDS患者等免疫低下人群中的危险性日益受到重视。器官移植术后,在免疫抑制药物对机体免疫功能严重抑制的情况下,抗生素对细菌性感染的控制起到了一定的作用,而病毒性感染相应地突出,成为临床工作中的一个重要课题[2,3]。

目前抗病毒治疗中的药物通常是核苷酸的衍生物或类似物,虽然对病毒的复制和增殖具有较好的阻止作用,但受其作用机制的约束,对机体细胞的副作用也是显而易见的。抗病毒治疗是抗体应用中的一个重要领域。因此获取针对不同病毒的抗体是一个方兴未艾的研究领域。以往杂交瘤技术获得的抗体多是异源性蛋白,不利于人体的长期大量使用,人源化抗体的获得对后续的研发具有重要意义。本研究就以此为切入点,构建了人源化的HCMV噬菌体单链抗体库,以其为后续的筛选、表达和功能分析打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);Trizol (Invitrogen公司);逆转录试剂盒(Invitrogen公司);PCR试剂盒(Takara公司);胶回收试剂盒(Takara公司);引物[4](上海申友公司合成);T4DNA联接酶及 *Sfi* I 内切酶(TaKaRa公司);质粒pComb3X(美国Sripps研究所);XL1-blue菌株(strategene公司)。

1.2 方法

1.2.1 外周血淋巴细胞分离和RNA提取 取15 ml离心管,每管加淋巴细胞分离液8 ml。将4 ml血液轻轻叠加在分离液上。3 000 r/min离心20 min。轻轻吸取分层界面的淋巴细胞层,3 000 r/min离心20 min。轻轻吸去上清,加入0.5 ml Trizol混匀。参考Trizol说明书提取RNA。

1.2.2 逆转录 按照试剂盒说明书将提取的RNA进行逆转录。

1.2.3 PCR及产物回收 将引物分别配对后,按照试剂盒说明书进行PCR分别扩增抗体重链和轻链可变区,电泳后用胶回收试剂盒回收PCR产物。

1.2.4 ScFv的装配 PCR体系中加入等分子的VH、VL,连接VH、VL,凝胶电泳纯化750 bp左右条带。ScFv片段用 *Sfi* I 内切酶酶切,按说明书操作。

1.2.5 感受态大肠杆菌的制备 从平板培养基挑取电感态

基金项目:重庆市科委院士基金(41A11533)
Supported by the Funds for Academicians by Scientific Committee of Chongqing (41A11533)
作者简介:顾长国(1970-),男,福建省建宁县人,博士研究生,助理研究员,主要从事感染免疫相关方面的研究。电话:(023)68757431
收稿日期:2004-02-25;修回日期:2004-04-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌的制备单个菌落接种于 2× YT 培养基过夜培养，振荡培养至 A_{600} = 0.5，预冷的无菌 10% 甘油洗 3 遍，4 ℃离心，用 3 ml 无菌的 10% 甘油悬浮，分装于冻存管－70 ℃保存。

1.2.6 Scfv 与载体连接 200 ng Scfv 基因片段，300 ng 载体，T4DNA 联接酶（TaKaRa），16 ℃ 1 h，70 ℃灭活 10 min，冰浴 5 min。

1.2.7 带有目的基因的载体转导入大肠杆菌 100 μl 感受态细菌与 2 μl pComB3X 混合，加入预冷的 0.1 cm 电转杯内，冰浴 30 min，电转导（25 μF，2.5 kV，200 ohms）持续 4 ms，立即用新鲜 SOC 约 5 ml 冲洗电转杯，将冲洗液置于 50 ml 无菌离心管中，再加入 7 ml 含有氨苄青霉素和葡萄糖的 2× YT 培养基培养。

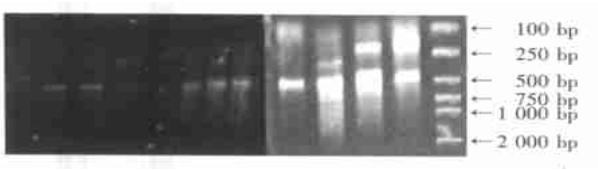
1.2.8 重组噬菌体的扩增 转导的细胞 8 ml 加入含有 15 ml 含葡萄糖的 2× YT 培养基的 50 ml 离心管内 37 ℃培养至 A_{600} = 0.5，加入 20 mg/ml 的氨苄青霉素 75 μl，3× 10^{10} 的 M13K07 噬菌体。

1.2.9 滴度计算 取 2 μl 培养液稀释到 200 μl SB 培养基中，分别取 100 和 10 μl 在 LB 羧苄平板上推板，37 ℃过夜。

2 结果

2.1 抗体可变区编码基因片段的扩增

图 1 显示的抗体重链可变区编码基因片段的 RT-PCR 结果，在 400 bp 左右出现的特异性条带与预计的结果相符合，左侧 6 个点样槽扩增的是编码 IgG 重链可变区的基因片段，右侧 6 个点样槽扩增的是编码 IgM 重链可变区的基因片段。

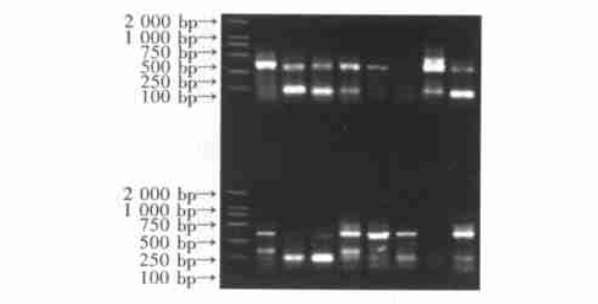


There are clear bands of about 400 bp as predicted

图 1 抗体重链编码区 RT－PCR 结果

Fig 1 RT-PCR of coding region of antibody heavy chain

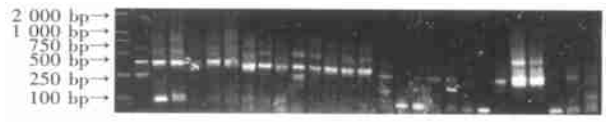
抗体轻链可变区编码基因片段的 RT-PCR 结果，在 3 500 bp 左右出现的特异性条带与预计的结果相符合。抗体轻链可变区的引物组合比较多。其中，其中 Vκ 共有 18 种组合（图 2）；Vλ 共有 27 种组合（图 3）。



There are clear bands of about 350 bp as predicted

图 2 抗体 **kappa** 链编码区 **RT-PCR** 结果

Fig 2 RT-PCR results of coding region of antibody heavy chain



There are clear bands of about 350 bp as predicted

图 3 抗体 **lamda** 链编码区 **RT-PCR** 结果

Fig 3 RT-PCR results of coding region of antibody heavy chain

2.2 重链轻链装配、连接和转化

将重链和轻链的 RT-PCR 产物经较回收后，用 linker 装配后，回收产物连接到载体 pComb3X 上后，转入 XL1-blue 菌中，稀释推板过夜，计算库容约为库容为 6.5× 10^6。

3 讨论

抗体技术的出现对医学的发展起了非常重要的推动作用。从单克隆抗体到噬菌体抗体库技术和现在的转基因抗体技术。单克隆抗体技术巧妙的结合了抗体生成细胞的特异性和瘤细胞的无限增殖性，噬菌体抗体库技术使得体外获得抗体多样性成为可能，转基因抗体技术则能让动物体内产生人源化的抗体，这也是一个非常大的飞跃[5,6]。3 种不同的技术各有其利弊，其核心焦点在于如何获得人源化的抗体。用杂交瘤技术制备单克隆抗体的障碍在于所制备的单克隆抗体多为啮齿动物来源，其人源化过程充满艰辛，而且难以制备针对自身抗原成分的单克隆抗体；同时肿瘤等免疫原性弱的抗原的单克隆抗体不易制备。后两种技术能够有效地解决抗体的人源化问题，一种是噬菌体抗体库技术，另一种是转基因抗体技术。噬菌体抗体库技术使得体外获得抗体多样性成为可能，转基因抗体技术则能让动物体内产生人源化的抗体。虽然转基因抗体技术是目前获得人源化抗体最理想的途径，但是其技术难度非常大，对实验室设备和经费的需求非常高。根据我们对国外一些相关实验室的了解，转基因抗体技术前期研究经费通常在 300～400 万美元以上。相比之下，噬菌体抗体库技术费用低廉得多；噬菌体抗体库技术另一个优点在于因为没有 B 细胞成熟过程中的选择和淘汰，在体外获得的多样性可以远远大于体内 B 细胞产生抗体的多样性，同时所获得的序列均为人体来源，对未来的临床应用减少了很多顾虑。结合本实验室的具体情况，本研究选择采用噬菌体抗体库技术进行研究。Sui 等[7] 应用该技术成功获得了抗 SARS 表面刺突 S 蛋白的人源化抗体，所获得的抗体能够阻止 S 蛋白的粘附作用。表明该技术在获得人源化抗体过程中具有非常高的效率和不可或缺的重要作用。

抗体库库容大小主要决定于两个方面：获得所有抗体可变区基因数量；连接和转化的效率。为了获取

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

大容量的抗体库我们在许多实验环节进行摸索, 在 RNA 提取和逆转录过程中, 尽量减少 RNA 的降解; 采用随机八聚体作为逆转录引物, 可以促进 mRNA 逆转录为 cDNA 过程中, 尽可能的保留各种编码基因的多样性, 从而提高获取抗体可变区基因的效率; 在连接和转化过程中, 我们也摸索和优化实验条件。我们注意到 SfiI 限制性内切酶的特殊性, 其酶切位点为 5′-GGC-CNNNNNGGCC-3′, 3′-CCGGNNNNNCCGG-5′。

我们在抗体基因编码区正向引物和反向引物中加入 SfiI 酶切位点, 将其中的 5 个随机碱基序列分别设计成和载体上两个 *Sfi*I 酶切位点中一致的序列。这样可以避免过去在构建表达载体时, 通常要选用两个限制性内切酶, 有时在酶切缓冲体系和温度上同时难以满足两个限制性内切酶的不同需求; 同时可以减少限制性内切酶的消耗, 降低试验费用。

在摸索噬菌体抗体库的构建过程中, 我们首先体会到的难处是外周血标本的收集, 其次是工作量很大。为了确定 RNA 提取的完整性, 我们进行了 RNA 电泳, 28 S 和 18 SRNA 条带都很清晰, 表明 RNA 提取的结果较好。通过看家基因 β-actin 的逆转录扩增来判定 mRNA 逆转录为 cDNA 的成功与否, 取 β-actin 的逆转录扩增结果阳性的 cDNA 标本进行抗体引物不同组合的扩增。这样能够较好的节约试验费用。在 RTPCR 获得 VH 和 VL 基因编码片段时, 在大量引物的组合进行不同的 RTPCR 时, 总体上来说, VH 片段的获得比 VL 片段的获得难度大一些, 这一点可能与 VH 转录本的拷贝数量比 VL 转录本的拷贝数量更低有关。

综上, 本研究首先从供者外周血 B 淋巴细胞抽提 RNA, 经过 RT-PCR 反应扩增出人的 VH 和 VL 基因片段, 而后将 VH 和 VL 基因片段用 linker 拼接成 ScFv, 再与载体连接转化构成人抗体文库, 并使抗体蛋白与噬菌体基因 III 产物以融合蛋白形式表达于噬菌体表面。最终获得了一个库容量约为 6.5×10^6 的噬菌体抗体库, 为后续筛选抗巨细胞病毒人源化抗体奠定了基础。进一步的筛选工作正在进行中。

（致谢: 本课题研究过程中受到美国 Scripps 研究所 Carlos F. Barbas 教授和中国人民解放军海军总医院中心实验室王琰教授的指导和帮助, 特此致谢!）

参考文献:

[1] Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, *et al*. The human cytomegalovirus [J]. Pharmacol Ther, 2003, 98(3): 269－297.

[2] Castillo J P, Kowalik T F. HCMV infection: modulating the cell cycle and cell death[J]. Int Rev Immunol, 2004, 23(1－2): 113－139.

[3] Krmpotic A, Bubic I, Polic B, *et al*. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection[J]. Microbes Infect, 2003, 5(13): 1263－1277.

[4] Rader C, Barbas C F 3rd. Phage display of combinatorial antibody libraries [J]. Curr Opin Biotechnol, 1997, 8(4): 503－508.

[5] Bruggemann M. Human antibody expression in transgenic mice[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2001, 49(3): 203－208.

[6] Barbas C F 3rd, Burton D R. Selection and evolution of high-affinity human anti-viral antibodies[J]. Trends Biotechnol, 1996, 14(7): 230－234.

[7] Sui J H, Li W H, Wayne A, *et al*. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association[J]. PNAS, 2004, 101(8): 2536－2541.

（编辑　汪勤俭）

（上接 1238 页）

3　讨论

氧代谢主要包括氧输送(DO_2)、氧消耗(VO_2)和肺内分流(Q_s/Q_t)3 个环节。正常情况下, DO_2 下降时组织细胞通过增加 O_2Ext 而使 VO_2 保持不变, DO_2 的增减一般不会引起 VO_2 的变化, 因此, DO_2 与 VO_2 互不相关, 二者呈非依赖关系。在缺氧情况下, 一旦机体 DO_2 降至不满足组织需要时, VO_2 才随着 DO_2 的降低而降低, 此时二者相关性甚好[1], 出现 VO_2 氧依赖关系。

在以上 3 个环节中 Q_s/Q_t 被认为是肺氧合的金指标, Q_s/Q_t 越小, 肺氧合越好。在实验中, 空运高原幼猪应用氨茶碱前与应用氨茶碱后比较, MPAP、PVR 与 Q_s/Q_t 均处于相对较高水平, CO、DO_2 与 VO_2 则处于相对较低水平, 在应用氨茶碱后 MPAP、PVR 与 Q_s/Q_t 显著降低, CO、DO_2 与 VO_2 则显著升高, 其中 VO_2 随着 DO_2 的变化而变化, 但在应用氨茶碱后 O_2Ext 则无明显变化。这说明空运高原幼猪在应用氨茶碱前机体处于缺氧状态, 而应用氨茶碱后幼猪机体的缺氧得到显著的改善。据研究证明[2], 移居动物在低氧适应的 DO_2、VO_2、O_2Extt3 个环节上主要依靠功能适应, 如以通气增加, 心输出量增加, 红细胞增多来弥补缺氧, 且这 3 项中任一项出现变化都会对 DO_2 产生较大的影响。在实验中氨茶碱可以通过降低 PVP, 增加 CO, 提高 DO_2 而改善缺氧引起的组织氧代谢障碍已得到证实。所以, 根据移居动物在低氧适应上主要依靠功能适应这一原理, 我们认为不仅可以应用氨茶碱来增加 CO 而提高组织的 DO_2、VO_2, 改善组织因缺氧引起的氧代谢障碍。同时也提示我们, 对于慢性高原性疾病(如高原红细胞增多症), 是否可以利用增加 CO, 提高 DO_2, 从而达到预防和治疗的目的, 值得进一步研究。

关键词: 缺氧; 氨茶碱; 氧动力学

中图法分类号: R594.3　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Weissman C, Kemper M. The Oxygen uptake-oxygen delivery relationship during ICU interventions[J]. Chest, 1991, 99(2): 430－435.

[2] Garruto R M, Hoff C J. Genetic affinites and history[A]. In: Baker PT, Ltle MA. Man in the Andes: A Multidisciplinary Study of High-Altitude Quechua[M]. Stroudsburg, PA: Dowden, Hutechinson and Ross, 1976. 98－144.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net