DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.018
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

文章编号:1000-5404(2001)04-0407-03

论著

鼠抗脂多糖单链噬菌体抗体库的构建

陈 鸣,府伟灵,俞丽丽,张 雪 (第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038)

提 要:目的 构建一个鼠源性的抗脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)单链噬菌体抗体库,以供进一步生物医学应用。方法 用纯LPS免疫BALB/c小鼠4个星期后,从脾细胞中提取总RNA,用RT-PCR技术扩增出小鼠抗体重链、轻链可变区基因(VH, VL),然后用Linker将VH, VL交联形成单链抗体可变区片段(ScFv)。经*Not*Ⅰ、*Sfi*Ⅰ双酶切后与经同样双酶切的pCANTAB5E噬菌粒载体相连,转化入感受态大肠杆菌TG1,构建鼠抗LPS单链噬菌体抗体库,并随机抽取转化后的4个大肠杆菌TG1菌落,以检测外源DNA的转入情况。结果 ELISA法检测小鼠血清中抗LPS的效价为1∶12 800。提取的总RNA浓度为12.3813 μg/ml,纯度较好。扩增出的VH长约340 bp,VL长约320 bp,ScFv长约800 bp。转化入TG1后有约1.9×10^7个菌落,抽提4个菌落后经*Sfi*Ⅰ、*Not*Ⅰ双酶切的结果显示有1个菌落的质粒转化进了外源DNA片段。结论 成功地构建出了一个有效库容量为4.75×10^6的鼠抗LPS单链噬菌体抗体库。

关键词:脂多糖;噬菌体抗体库
中图法分类号:R373.9;R392.11 文献标识码:A

Construction of anti-lipopolysaccharide single-chain phage antibody library in mice

CHEN Ming, FU Wei-ling, YU Li-li, Zhang Xue (Department of Laboratory Diagnosis, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct an anti-LPS single chain phage antibody library in mice for further biomedical works. Methods Total RNA was extracted from splenic cells for reverse transcription after BALB/C mice had been immunized with pure LPS for 4 weeks. The designed primers were used to amplify the variable region genes of both heavy and light chain (VH, VL) with polymerase chain reaction. The VH and VL were then conjugated to form a single chain of variable fragment (ScFv) by a linker. The ScFv was cut by *Not*Ⅰ and *Sfi*Ⅰ and then ligated into a pCANTAB5E phagemid vector which was digested with the same restriction enzymes. The ligated vector was then tranfected into the competent *E. coli* TG1 cells. Four TG1 clones were randomly selected to detect the exotic DNA. Results The titer of anti-LPS in murine sera was 1∶12 800. The concentration of total RNA was 12.3813 μg/ml. The length of the fragments were 340 bp for VH, 320 bp for VL and 800 bp for ScFv respectively. 1.9×10^7 clones were grown after transfection and one from the four randomly selected clones was identified to contain the exotic DNA. Conclusion A 4.75×10^6 murine anti-LPS single chain phage antibody library was successfully constructed.

Key words: LPS; phage antibody library

抗体的发展在经历了多克隆抗体、单克隆抗体后,现已发展到第三代基因工程抗体。其中,源于1985年Smith[1]报道的在单链噬菌体表面表达一种小分子多肽发展而来的噬菌体抗体库技术在人源性抗体的制备、肿瘤及自身免疫性疾病的诊断、治疗上有巨大的潜力。作为噬菌体表面呈现技术在基因工程抗体应用上的一个成功范例,噬菌体抗体库技术可以模拟体内B淋巴细胞受到刺激后分化、成熟直至分泌抗体的过程。在将编码抗体的基因插入噬菌体编码外壳蛋白的基因中,使抗体基因与噬菌体外壳蛋白基因Ⅲ或基因Ⅷ连接后,抗体就会和外壳蛋白融合,以ScFv[2,3]或Fab[4]的形式表达在噬菌体表面,从而被特异的抗原筛选出来。噬菌体抗体库技术绕过了复杂的杂交瘤技术,将杂交瘤的无限传代变成了基因的无限传代,在生产人源化抗体及对鼠源性单克隆抗体的人源化改造上有明显的优越性。使人们期望的人为改造抗体成为可能,是基因工程抗体领域的一个重大突破。

本研究旨在构建出一个鼠抗LPS的单链噬菌体抗体库,以期为临床上脓毒症的治疗提供一种有效的抗LPS生物制剂。同时也摸索一下构建噬菌体抗体库的条件,积累一定的经验为今后该抗LPS抗体基因的克隆、测序以及人源化做技术储备。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 由本校实验动物中心提供的6周龄雌性BALB/c小鼠。

1.1.2 试剂 LPS为Sigma公司的产品;TripureTM Isolation Reagent、质粒抽取试剂盒、T4 DNA连接酶及NotI、SfiI限制性内切酶均购自Boehringer Mannheim公司;小鼠噬菌体抗体库的合成试剂盒购自Pharmacia Biotech公司。SOBAG培养基:SOB中含100 μg/ml氨苄青霉素及2%的葡萄糖。

1.1.3 仪器 DNA扩增仪为PE公司GeneAmp 2400型;紫外

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570042)
作者简介:陈 鸣(1971—),男,福建省闽侯县人,博士,主治医师,主要从事基因工程抗体方面的研究。电话:(023)68753687
收稿日期:2000-04-05;修回日期:2000-12-17

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

分光光度仪为 Beckman DU-600 型。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫动物及血清抗 LPS 效价的滴定 15μg LPS 加卡介苗免疫佐剂，每周 1 次腹腔注射免疫 5 只雌性 BALB/c 小鼠，共 4 周，取脾脏前 3 d 加强免疫 1 次。间接 ELISA 法测定其中 1 只小鼠血清中抗 LPS 的效价。

1.2.2 总 RNA 的提取 用 Tripure™ Isolation Reagent 从该小鼠脾脏提取总 RNA，溶于 70μl 无 RNase 的水中，其中 20μl 在 Beckman DU-600 分光光度仪上测量 RNA 的浓度及纯度。

1.2.3 cDNA 第一链的合成 取出 50μl 的 RNA 液(约含 600 ng 总 RNA)，按如下比例反转录合成 cDNA 第一链(RNA 液 21μl、第一链混合液 11μl、DTT 液 1μl，总量 33μl)。

1.2.4 PCR 扩增抗体 VH、VL 以 cDNA 第一链为模板，PCR 扩增合成 VH、VL 基因。(两管中分别加入 VH、VL 引物 2μl，cDNA 第一链 16.5μl，10× buffer 5μl，20 mmol/L dNTP 2.5μl，Taq 酶 1μl，双蒸水 23μl，反应总体积为 50μl)扩增条件为：94 ℃ 1 min，55 ℃ 2 min，72 ℃ 2 min。共 30 个循环。

1.2.5 VH、VL 基因的纯化及定量 以两个 Microspin™ 柱分别纯化 VH、VL。并将纯化产物与 5 ng/μl 的 VH Marker 同时电泳以比较其浓度。

1.2.6 交联反应合成 ScFv 约等摩尔量的 VH 和 VL 加入 Linker-Primer Mix 后，置基因扩增仪上 94 ℃ 1 min，63 ℃ 4 min。循环 7 次以合成 ScFv。

1.2.7 ScFv 上加入酶切位点及其纯化定量 在合成的 ScFv 上加入 RS Primer Mix，置基因扩增仪上 94 ℃ 1 min、55 ℃ 2 min、72 ℃ 2 min，循环 30 次。产物同样用 Microspin™ 柱纯化，并与 5 ng/μl 的 ScFv Marker 同时电泳以比较其浓度。

1.2.8 酶切反应及其产物的纯化 纯化后的 ScFv 分别加入 *Sfi*Ⅰ、*Not*Ⅰ 进行酶切。酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1)抽提后，用 Microspin™ 柱纯化酶切产物。

1.2.9 ScFv 基因与 pCANTAB5E 载体的连接 3 支 Eppendorf 管，分别记为 A、B、C 管。A 管为外源基因连接管，加入上步纯化的 ScFv 基因片段；B 管为阳性对照管，加入 Control Insert；C 管为载体自连对照管。总量各为 50μl。加入 T_4 连接酶，16 ℃孵育 1 h。

1.2.10 转化 另取 3 支 Eppendorf 管，记为 A'、B'、C' 管。分别加入 A、B、C 管的 50μl 连接产物及 1 ml 新鲜的感受态 TG1，冰上 45 min 后 42 ℃水浴 2 min，冰上再短时冷却。各吸 100μl A'、B'、C' 管中的 TG1 移至 900μl LBG 培养液中，摇床培养 1 h 后各取 100μl 接种至 3 块 SOBAG 培养基上。另吸 100μl 未经转化的感受态 TG1 铺一块 SOBAG 做阴性对照，30 ℃培养过夜。A' 管中剩余的 900μl 转化过的 TG1，用于以后的噬菌体援救工作。

1.2.11 抽取质粒检测外源基因连接情况 挑取接种 A' 管的 SOBAG 上生长的 4 个菌落，抽取质粒。分别用 *Sfi*Ⅰ、*Not*Ⅰ 酶切以鉴定插入的外源基因。

2 结果

小鼠血清中抗 LPS 的效价为 1∶12 800，提取的总 RNA 的 A_{260}为 0.2778，A_{280}为 0.1379，A_{260}/A_{280}= 2.0506，纯度较好。RNA 浓度为 12.3813 μg/ml。VH、VL 基因经 PCR 扩增后分别为 320 bp 和 340 bp 左右，其纯化及半定量后见图 1。

合成的 ScFv 为 800 bp 左右。其纯化及半定量后见图 2。VH、VL 及合成的 ScFv 见图 3。



图1 PCR 扩增后的 VH、VL 的半定量

Fig 1 Semi-quantitation of VH, VL after PCR

1: 4μl VL; 2: 8μl VL; 3: 25 ng VH marker; 4: 12.5 ng VH marker; 5: 8μl VH; 6: 4μl VH; The second band of larger molecular weight behind the VH marker is pUC18 vector

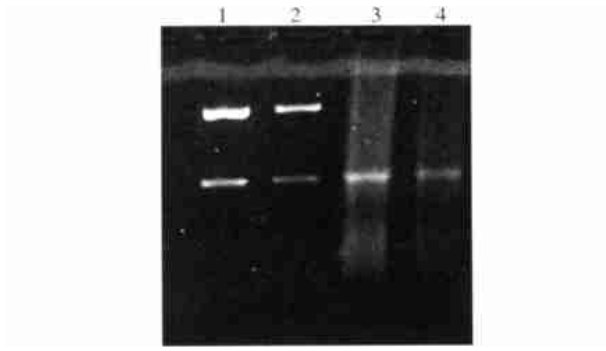


图 2 PCR 扩增后的 ScFv 的半定量

Fig 2 Semi-quantitation of assembled ScFv

1: 25 ng ScFv marker; 2: 12.5 ng ScFv marker; 3: 8μl ScFv; 4: 4μl ScFv; The second band of larger molecular weight behind the ScFv marker is pUC18 vector



图3 PCR 扩增后的 VH、VL、ScFv

Fig 3 Purified VH, VL and ScFv after PCR amplification

1: ScFv; 2: DNA marker; 3: VL; 4: VH

A' 管转化后的 TG1 布满了 SOBAG，作了 10 倍比稀释后，在 1∶1 000 的 SOBAG 上约有 190 个菌落，则原来的库容量应为 $190\times1\,000\times10\times10=1.9\times10^7$，阳性对照约有 1×10^6 个菌落，载体自连检测有 3 个菌落，阴性感受态 TG1 对照则仅有 1 个菌落。

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

随机抽取转化后的4 个TG1 菌落, 抽提质粒后经 *Sfi* Ⅰ 、*Not* Ⅰ 双酶切的结果显示仅有 1 个菌落的质粒转化进了外源 DNA 片段, 见图 4。

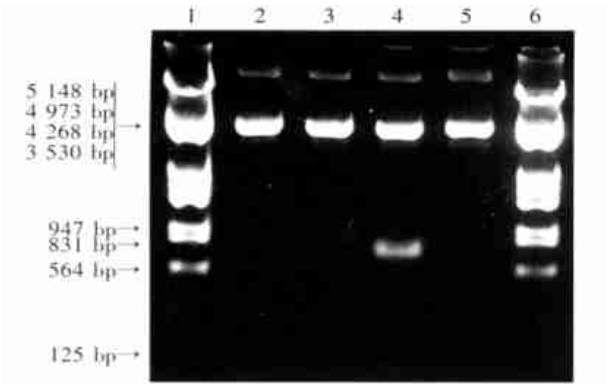


图 4　重组噬菌粒的酶切分析

Fig 4　Digestive analysis of the recombinant phagemid

1, 6: λDNA marker digested by *EcoR*Ⅰ and *Hind* Ⅲ; 2, 3, 4, 5: four extracted phagemids, among these, 4 represent a 800 bp exotic DNA and pCANTAB5E vector

3　讨论

近几十年来, G^- 菌的感染一直是困扰临床的一个主要难题, 至今美国每年仍有约 30 万的脓毒血症患者, 约40%发展成休克, 病死率达 35%～60%[5]。LPS 作为 G^- 菌的毒性成分, 在内毒素血症和脓毒血症的发病过程中起着重要的作用。研究表明: LPS 可以先和 LPS 结合蛋白(LBP)结合后形成 LPS-LBP 复合体, 再与髓样细胞(如单核巨噬细胞)表面的膜 CD14 结合[6]; LPS 也可直接与可溶性 CD14 结合, 介导实质细胞(如内皮细胞)的反应[6]。内毒素与受体结合后的信号的跨膜传递过程是一个复杂的多种信号通路相互作用的过程, 包括蛋白激酶 C(PKC)、丝裂原激活的蛋白激酶(MAPKs)、Src 家族蛋白激酶在内的多种蛋白激酶被磷酸化激活[7], 然后移位到细胞核内, 作用于核因子 κB、ATF2、MEF2C 等转录因子, 使其发生磷酸化[7,8], 与细胞因子编码基因上游的启动子结合, 启动了多种细胞因子(包括 IL-1、TNF 等)的基因表达, 从而使靶细胞产生和释放一系列的炎症介质因子。众多的炎症介质因子在激活机体局部和整体的免疫系统参与清除细菌感染的同时, 也引发了机体的免疫病理损伤, 出现微循环障碍, 导致脓毒症和中毒性休克的发生[9]。而抗生素的不合理使用在裂解、杀灭细菌的同时, 可导致内毒素的快速释放, 使机体更易进入休克期[10]。因此, 研究能与内毒素结合的免疫制剂以阻止内毒素的病理损伤作用具有重要的临床应用价值。

噬菌体抗体库技术的出现使我们看到了用基因工程的方法制备抗 LPS 单抗的希望。但这首先要求我们构建的抗体库要有足够的有效表位多样性。其影响因素主要有 PCR 引物的设计、构建载体时所用的限制性内切酶及细菌的转化效率等。本研究所采用的 PCR 引物是根据小鼠抗体可变区 FR1 和 FR4 的保守碱基序列设计的, 可以很好地扩出整套抗体可变区基因。而且, 本研究选用的 SfiⅠ、NotⅠ 限制性内切酶借助计算机分析在免疫球蛋白数据库中的抗体可变区基因序列中没有酶切位点。这就保证了本研究构建的单链噬菌体抗体库的有效表位多样性。

目前, 许多实验室都构建了噬菌粒载体以取代噬菌体载体[2], 简单的噬菌粒载体就是在具有 colE1 的复制起点及抗生素选择标记的质粒上加上了单链噬菌体的主要基因间隔区。它的基因组长度更短, 可装进更多的外源基因; 而且可以使外源基因以双链的形式定向插入, 得到的重组体更稳定、高产; 还可省去从质粒亚克隆至噬菌体这一烦琐的步骤, 有利于外源基因的直接测序。本实验所用的载体是 pCANTAB5E 噬菌粒, 它是在 pUC119 质粒的基础上加入了 M13 单链噬菌体外壳蛋白基因Ⅲ的序列。外源 ScFv 基因插入到外壳蛋白基因Ⅲ编码的信号肽序列和主体蛋白序列之间, 形成的融合蛋白 ScFv-pⅢ可以保持两种母体蛋白的特性, 便于下一步抗 LPS 抗体的筛选。

本研究构建了一个有效库容量为 4.75×10^6 的单链噬菌体抗体库, 我们期望能从中筛选出对 LPS 具有较高亲和力的 ScFv 抗体, 进一步的筛选工作正在进行中。

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(4 705): 1 315－1 317.

[2] Rondot S, Koch J, Breitling F, *et al*. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(1): 75－78.

[3] Guo L, Wang J, Qian S, *et al*. Construction and structural modeling of a single-chain Fv-asparaginase fusion protein resistant to proteolysis[J]. Biotechnol Bioeng, 2000, 70(4): 456－463.

[4] Li J, Pereira S, Van Belle P, *et al*. Isolation of the melanoma-associated antigen p23 using antibody phage display[J]. J Immunol, 2001, 166(1): 432－438.

[5] Kilbourn R G, Szabo C, Traber D L. Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibits in circulatory shock: lessons from experimental and clinical studies[J]. Shock, 1997, 7(4): 235－246.

[6] Wong P M, Chugn S W, Sultzer B M. Genes, receptors, signals and responses to lipopolysaccharide endotoxin[J]. Scand J Immunol, 2000, 51(2): 123－127.

[7] Landmann R, Muller B, Zimmerli W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity[J]. Microbes Infect, 2000, 2(3): 295－304.

[8] Schutze S, Potthoff K, Machleidt T, *et al*. TNF activates NF-Kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown[J]. Cell, 1992, 71(5): 765－776.

[9] Lehr H A, Bittinger F, Kirkpatrick C J. Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy[J]? J Pathol, 2000, 190(3): 373－386.

[10] Evans M E, Pollack M. Effect of antibiotic class and concentration on the release of lipopolysaccharide from *Escherichia coli*[J]. J Infect Dis, 1993, 167(6): 1 336－1 343.

（编辑　薛国文）

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