DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.029
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
682 2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)07-0682-03

噬菌体抗体库的构建及抗AFP人单抗的筛选

肖天利,刘为纹,房殿春 (第三军医大学附属西南医院消化内科,重庆 400038)

提 要:目的 运用噬菌体抗体库技术,制备人源性抗AFP Fab段,为进一步的研究和临床运用打下基础。方法 用RT-PCR方法扩增人免疫球蛋白重链Fd及κ链基因,构建噬菌体抗体库,筛选出人抗AFP Fab片断,用ELISA检测其特异性。结果 初步克隆出人抗AFP Fab,该Fab具有结合AFP的活性。结论 噬菌体抗体库技术绕过了细胞杂交这一步骤,较好的解决了人体杂交瘤低效的难题,为人源性单抗的制备开辟了广阔的前景。

关键词:噬菌体抗体库;人单克隆抗体;AFP
中图法分类号:Q939.48;R373.9 文献标识码:A

Construction of phage antibody library and screening of human anti-ATP monoclonal antibody

XIAO Tian-li, LIU Wei-wen, FANG Dian-chun (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To isolate human anti-ATP Fab fragment from phage antibody library. Methods Human immunoglobulin heavy chain Fd genes and κ chain genes were amplified by RT-PCR and phage antibody library was constructed. Human anti-AFP Fab was obtained and its binding activity to AFP was tested by ELISA. Results The objective fragment was obtained and its specificity was identified by ELISA. Conclusion The successful isolation of human anti-ATP Fab proves the feasibility of phage display system in human McAb preparation and founds a basis for the further characterization and clinical application of the Fab.

Key words: phage antibody library; human monoclonal antibody; α-fetoprotein

抗体在现代医学中起着重要的作用,被广泛地运用于实验室研究、疾病的诊断与治疗。鼠源性单抗易产生抗鼠抗体,限制其反复使用[1]。常规人单抗制备方法效率低下、不稳定[2],而鼠源性单抗人源化仅取得有限的成功[3,4]。90年代初发展起来的噬菌体抗体库技术为人单抗的制备开创了一个全新的技术领域[5]。本研究用噬菌体抗体库技术初步克隆出抗AFP人单抗,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株、主要溶液及试剂

表达载体pComb3H为美国Scripps研究所Barbas教授惠赠。大肠杆菌菌株XL1-blue和辅助噬菌体VCSM13购自Stratagene公司。SB培养液:3%蛋白胨,2%酵母提取物,1% MOPS,pH 7.0。SOC培养液:2%蛋白胨,0.5%酵母提取物,0.05% NaCl,2.5 mmol/L KCl,pH 7.4,高压灭菌,使用前加入$MgCl_2$至10 mmol/L,葡萄糖至20 mmol/L。人源性AFP购自上海生物制品研究所。

1.2 引物

引物设计参照文献[6],由上海细胞所合成。重链Fd段5'端引物VH1a:5'-CAG GTG CAG CTC GAG CAG TCG GGG-3';VH3a:5'-GAG GTG CAG CTC GAG GAG TCT GGG-3';3'端引物CG1z:5'-GCA TGA ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG-3'。它们分别含有限制性内切酶*Xho*Ⅰ和*Spe*Ⅰ(下划线部位)识别序列。轻链κ链5'端引物Vk1a:5'-GAC ATC GAG CTC ACC CAC TCT CCA-3'和Vk3a:5'-GAA ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA-3';3'端引物Ck1d:5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CGGGCG AAC TCA G-3'。它们分别含有限制性内切酶*Sac*Ⅰ和*Xba*Ⅰ(下划线部分)的识别

作者简介:肖天利(1962—),男,四川省岳池县人,博士,副教授,主要从事肝癌的治疗方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754678

收稿日期:1999-09-10;修回日期:2000-02-19

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

序列。

1.3　淋巴细胞总 RNA 的提取、逆转录 PCR 法克隆 Fd 段基因及 κ 链基因

用硫氰酸胍-酚-氯仿一步法[7]提取 AFP(+)原发性肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)患者外周血淋巴细胞总 RNA。取约 20 μg 总 RNA, 加入 1 μg Oligod T, 250 mmol/L dNTP 及 200 U M-MLV 逆转录酶(GIBCOL BRL), 按产品说明书进行 cDNA 合成。PCR 扩增 Fd 段基因及 κ 链基因, 条件为 94 ℃变性 20 min、52 ℃退火 50 s、72 ℃延伸 1.5 min、最后 72 ℃延伸 10 min、共进行 35 轮循环。

1.4　大肠杆菌的电穿孔转化

2.5ml 过夜培养的 XL1-Blue 菌液接种到 500 ml SB 中, 37 ℃培养至 A_{600} = 0.7~0.8, 冰浴 15 min, 4 ℃离心, 弃上清, 用 10% 冷甘油将细菌洗涤 2 次后, 悬浮于 2 ml 10%甘油中, -70 ℃冻存备用。电穿孔时将细菌取出融化, 使用 Bio-Rad 公司的 Gene pulser transfection 系统, 按说明书进行穿孔。

1.5　噬菌体抗体库的构建

将 PCR 扩增的 κ 链 DNA 经 *Sac*I+ *Xba*I 消化, 电泳纯化后插入载体 pComb3H 中, 电穿孔转化 XL1-Blue 细胞, 扩增转化后的细菌, 提取质粒得到轻链库 DNA。同样, 将 PCR 扩增的 Fd DNA 经 *Xho*I+ *Spe*I 消化, 插入轻链库质粒, 电穿孔转化 XL1-Blue, 纯化的细菌加 3 ml SOC 培养液, 30 ℃培养 1 h 后加入含氨苄青霉素 50 μg/ml 及四环素 10 μg/ml SB 20 ml, 37 ℃振荡培养 2 h, 加入约 10^{12}空斑形成单位(PFU)的辅助噬菌体 VCSM13, 接种到 100 ml 含相同抗生素的 SB 中, 37 ℃振荡培养 2 h, 加入卡那霉素至终浓度 70 μg/ml, 30~37 ℃振荡培养过夜, 离心收集上清, 加入 PEG-8000 到 4%, NaCl 到 3%, 冰浴 30 min 后, 离心弃上清, 以 2 ml 含 1% BSA 的 TBS 溶解沉淀, 离心收集上清即为噬菌体抗体库。

1.6　噬菌体抗体库滴度的测定

将噬菌体抗体库溶液按一定比例稀释于 SB 中, 取 10 ml 加到 100 ml XL1-Blue(A_{600} = 1.0)中, 铺氨苄青霉素培养基, 37 ℃培养过夜, 次日计数集落, 计算集落形成单位(CFU)。

1.7　菌落直接 PCR 鉴定法

挑取单个细菌集落, 悬于 200 ml 水中, 煮沸 2 min, 取 2 ml 以适当引物进行 PCR 反应, 琼脂糖凝胶电泳检测相应扩增带。

1.8　噬菌体抗体库的筛选(Panning)

将 AFP 以 0.05%碳酸盐缓冲液稀释至 40 μg/ml, 每孔 25 μl (1 μg AFP)包被 ELISA 板, 吸去包被液, 以含 3% BSA 的 PBS 加满小孔, 37 ℃封闭 1 h, 吸去封闭液, 加入 50 μl 噬菌体抗体库液(约 10^{11}~10^{12}个 CFU), 37 ℃培育 2 h, 吸去噬菌体抗体液, 以含 0.05%吐温的 TBS 加满小孔, 用力吹打。5 min 后吸弃 TBS(第 2 轮洗 5 次, 第 3 轮以后洗 10 次), 加入 50 μl 的洗脱液(0.1 mol/L HCl, 以甘氨酸调至 pH 2.2, 加 BSA 至 0.1%), 室温静置 10 min, 将洗脱液稍加吹打后吸出, 立即加入 3 μl 2 mol/L Tris 中和, 加 2 ml XL1-Blue(A_{600} = 1), 室温静置 15 min 感染, 接种到 10 ml SB(含氨苄青霉素 20 μg/ml, 四环素 10 μg/ml)中, 取 1.0 μl 和 10 μl 铺盘测定 CFU, 其余菌液 30 ℃振荡培养 1 h, 加入氨苄青霉素至终浓度 50 μg/ml, 37 ℃继续培养 1 h, 加入辅助噬菌体 VCSM13 10^{12} PFU, 接种到 100 ml SB(含氨苄青霉素及四环素)中, 37 ℃培养 2 h, 加入卡那霉素至终浓度 70 μg/ml, 30~37 ℃振荡培养过夜, 离心, 上清进行 PEG 沉淀, 所得的次级噬菌体抗库可进行下一轮的筛选。

1.9　可溶性 Fab 分子的表达

将第 4 轮筛选扩增的细菌提取双链质粒 DNA, 用 *Spe*I/*Nhe*I 消化, 切除噬菌体外壳蛋白 III 的编码基因, 经连接酶连接自身环化后转化 XL1-Blue 细菌, 铺氨苄青霉素盘, 次日随机挑取单集落, 接种到 10 ml SB(含 50 μg/ml 氨苄青霉素, 20 mmol/L $MgCl_2$), 37 ℃振荡培养 6 h, 加入 IPTG 至 1 mmol/L, 诱导表达可溶性 Fab 段分子, 然后降低培养温度至 30 ℃, 振荡培养过夜, 离心收集上清用于 ELISA 检测。

1.10　ELISA 检测抗体特异性

用 AFP 包被 ELISA 板, 以 3% BSA 封闭非特异结合部位, 加入待检噬菌体抗体溶液, 以 HRP-羊抗人 IgG Fab 进行结合反应, 以底物邻苯二胺显色, 测定 492nm 处的 D_{492}值。

1.11　抗 AFP Fab 段轻重链 DNA 序列测定

按照 T7DNA 聚合酶测序操作说明书进行。

2　结果

2.1　扩增的 Fd 段和 κ 链基因

从 AFP 阳性的 HCC 患者外周血分离淋巴细胞, 提取 RNA, 逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 用 PCR 方法用人免疫球蛋白可变区引物扩增 Fd 和 κ 链的基因, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 可在 680 bp 处见到扩增带, 见图 1。

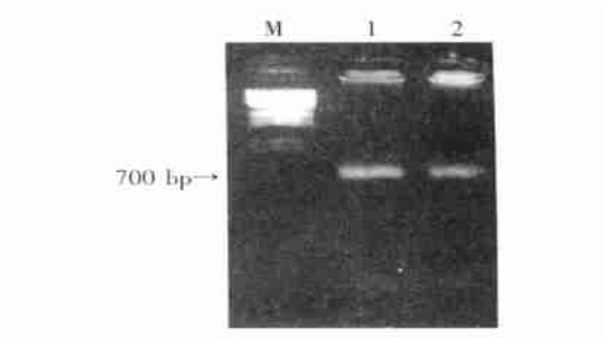


图 1　Fd 段和 κ 链的 PCR 扩增

M: λDNA *Hind* III/ *EcoR* I 消化

1: κ 链 PCR 产物; 2: Fd 段 PCR 产物

Fig 1　PCR amplification of Fd genes and κ chain genes

M: λDNA *Hind* III/ *EcoR*I digest; 1: PCR product of κ chain gens; 2: PCR product of Fd genes

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

2.2 轻链库

将PCR扩增的κ链DNA经琼脂糖电泳分离，电洗脱回收后，用 *Sac*I＋ *Xba*I 消化，重组到载体 pComb3H 相应的酶切部位，电穿孔转化大肠杆菌 XL1-Blue，取少量细菌铺盘，测定库容量为4×10^6，随机挑取10个集落，用直接PCR鉴定法扩增κ链基因，鉴定重组率，重组率为70%。其余的细菌，继续培养，提取质粒，即为轻链库DNA。

2.3 构建的噬菌体抗体库

将PCR扩增的Fd段DNA经 *Xho*I＋ *Spe*I 消化，重组到轻链库质粒DNA相应的酶切部位，经电穿孔转化大肠杆菌，取少量细菌铺盘，计数集落测定库容约为1×10^7。从培养盘上随机挑取10个细菌集落，用直接PCR鉴定法扩增Fd段基因，重组率为50%，其余的菌液加入辅助噬菌体VCSM13超感染，经PEG沉淀，分离收集上清，即为噬菌体抗体库（滴度为1.3×10^{12} CFU/ml）。

2.4 筛选噬菌体抗体库

以AFP抗原对噬菌体抗体库进行了4轮吸附→洗脱→扩增的富集性筛选。尽管从第1轮到第4轮的洗涤次数分别由1次增加到5、10次。但从固相洗脱下来的噬菌体滴度却显示出明显的增加趋势，第4轮比第1轮增加了40倍，见表1。

表1 亲和吸附筛选对噬菌体抗体的富集效应

Tab 1 Antigen-specific sorting enrichment of phage displaying Fab fragment

Round of panning	Input CFU	Eluted CFU	Clones containing Fab genes
0	—	—	1/10
1	1.3×10^{12}	2.0×10^4	2/10
2	2.5×10^{11}	7.0×10^4	3/10
3	1.5×10^{11}	3.1×10^5	5/10
4	2.5×10^{11}	8.0×10^5	8/10

2.5 ELISA法检测抗体特异性

将第4轮筛选后得到的细菌集落中，挑取24个克隆制备噬菌体抗体，用间接ELISA法测定其与抗体AFP的结合活性，其中有18个克隆结果为阳性，其中7个标本的D_{492}结果分别为（1.43±0.04）、（1.56±0.01）、（1.27±0.34）、（1.02±0.08）、（1.06±0.28）、（0.55±0.08）、（1.11±0.02），而含有空载体pComb3H *E. coli* 的培养上清的对照组为（0.02±0.01）。

2.6 同源性检索

对筛选出的抗AFP Fab段克隆1的轻重链可变区的序列进行测定后，通过Internet联机终端检索，对获得的基因片段与GeneBank＋EMBL＋DDBJ＋PDB Ig基因库已知DNA序列进行同源性比较。结果显示克隆1重链可变区基因为人免疫球蛋白重排重链V区基因VH III亚群（同源性为91%～100%）；轻链可变区基因VL属于人免疫球蛋白胚系κ轻链V区基因Vκ I 亚群（同源性为90%左右）。

3 讨论

90年代初发展起来的噬菌体抗体库技术为单抗的制备开辟了全新的技术领域。该技术用PCR方法，把免疫球蛋白全套可变区基因扩增出来，重组到噬菌体表达载体中，并通过与噬菌体外壳蛋白形成融合蛋白，使抗体片段表达于噬菌体表面。这样噬菌体就模仿了B淋巴细胞。将免疫球蛋白可变区基因克隆入噬菌体载体，建立噬菌体抗体库，与固相化的特异性抗原相结合，将非结合的噬菌体冲掉，将结合的噬菌体洗脱下来而回收，用以感染新的大肠杆菌，产生更多的噬菌体，为下轮筛选做准备。这样通过数轮“吸附→洗脱→扩增”过程，模仿体内的免疫选择可轻而易举地筛选容量为10^8的噬菌体抗体库。我们运用噬菌体抗体库技术，初步成功制备了抗AFP人单抗Fab片段，证明了这个系统的有效性。噬菌体抗体库技术绕过了细胞杂交这一关，较好地解决了人体杂交瘤低效的难题，为人源性单抗的制备开辟了广阔的前景。

参考文献：

[1] Shawler D L, Bartholomew R M, Smith I M, *et al*. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG[J]. J Immunol, 1985, 135(2): 1 530—1 535.

[2] Thompson K M. Human monoclonal antibodies[J]. Immunol Today, 1988, 6(4): 113—117.

[3] Morrison S L, Johson M J, Herzenberg L A, *et al*. Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(21): 6 851—6 855.

[4] Riechmann L, Clark M, Waldmann H, *et al*. Reshaping human antibodies for therapy[J]. Nature, 1988, 332(6 162): 323—327.

[5] Marks J D, Hoogenboom H R, Griffiths A D, *et al*. Molecular evolution of proteins on filamentous phage: Mimicking the strategy of the immune system[J]. J Biol Chem, 1992, 267(23): 16 007—16 010.

[6] Persson M A, Caothien R H, Burton D R. Generation of diverse high affinity human monoclonal antibodies by repertoire cloning [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(6): 2 432—2 436.

[7] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(6 211): 156—159.

（编辑 谢义霞）

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