

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00087

人源肺腺癌噬菌体抗体库的构建及筛选

罗 弋¹, 庞 华², 李少林^{1*}, 曹 辉¹, 彭志平¹

1. 重庆医科大学放射医学教研室, 重庆 400016

2. 重庆医科大学附属第一医院核医学科, 重庆 400016

[摘要] **目的:**构建人源噬菌体单链抗体 ScFv 基因文库,并从中筛选出抗肺癌抗体。**方法:**提取肺癌患者癌旁淋巴结组织,通过 RT-PCR 扩增出重链可变区基因(V_H)和轻链可变区基因(V_L),再经剪切-重叠-延伸 PCR(SOE-PCR)将 V_H和 V_L连接得到单链抗体 ScFv。将双酶切后的 ScFv 基因片段克隆入噬菌体表达载体 pCANTAB5E,得到初级噬菌体抗体库。以肺腺癌细胞株 A549 为抗原对抗体库进行“吸附-洗脱-扩增”筛选富集,共进行 4 轮筛选,鉴定抗体库性能。**结果:**成功构建噬菌体单链抗体库。在亲和筛选过程中,肺癌单链抗体得到富集,收获率逐轮提高,第 4 轮为第 1 轮的 115 倍。随机选取 10 个克隆,通过 ELISA 法检测到其中 7 个与肺癌细胞呈阳性反应,阳性率为 70%。**结论:**通过噬菌体展示技术得到肺癌相关人源单链抗体,筛选后的单链抗体能与肺腺癌细胞 A549 特异性结合。

[关键词] 噬菌体展示;抗体库;单链抗体;肺腺癌

[中图分类号] Q 78 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)01-0087-04

Construction and screening of human phage display antibody library against lung adenocarcinoma

LUO Yi¹, PANG Hua², LI Shao-lin^{1*}, CAO Hui¹, PENG Zhi-ping¹

1. Department of Radiation Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016

[ABSTRACT] **Objective:** To construct human single-chain variable fragment (ScFv) antibody library, and screen out antibodies against lung adenocarcinoma from the library. **Methods:** The total RNA was isolated from tumor adjacent lymph nodes of the lung adenocarcinoma patients and was used to amplify V_H and V_L genes by RT-PCR. V_H and V_L genes was joined with a DNA linker by SOE-PCR to form the ScFv. The gel purified ScFv gene repertoires were cloned into the phage vector pCANTAB5E to construct the primary phage library. Panning against lung adenocarcinoma cell line A549 was performed for four rounds and the phage library was identified. **Results:** A recombinant phage antibody library was successfully constructed. The fourth phage harvest yielded 115 times as much as that of the first one. During affinity screening, the antibody was enriched with the increase of panning rounds. Positive reactions to A549 were detected in 7 of 10 randomly selected clones, with a positive rate of 70%. **Conclusion:** A human phage-display antibody library has been successfully constructed. The selected ScFv fragment can specifically bind to human lung adenocarcinoma cell line A549.

[KEY WORDS] phage display; antibody library; single chain variable fragment; lung adenocarcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(1):87-90]

抗体靶向治疗在临床上具有独特而重要的作用。在对肿瘤的治疗中,抗体技术也日渐成为一种不可忽视的手段。然而,因为目前大部分肿瘤抗体是异源性抗体,在人体应用会产生抗-抗体反应,并存在抗体在体内清除速率慢的弊端^[1-2]。因此针对肿瘤的抗体制剂尚未被真正有效广泛地应用于临床。人源噬菌体抗体库技术有效地解决上述问题,为肿瘤的抗体靶向治疗带来新的希望。本实验利用噬菌体抗

体库技术制备人抗肺癌单链抗体,通过 4 轮“吸附-洗脱-扩增”亲和筛选(bio-panning),噬菌体抗体库得到有效富集,所得单链抗体与肺腺癌细胞 A549 有较好亲和力。

1 材料和方法

1.1 材料 RNA 抽提试剂盒(RNA Kit)、胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit)、质粒抽提试剂盒(Plasmid Kit)均购自

[收稿日期] 2008-06-05 **[接受日期]** 2008-10-29

[基金项目] 国家自然科学基金(30370422)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30370422)。

[作者简介] 罗 弋,博士。E-mail: littleroy@163.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 023-68485060, E-mail: shaolinli202@sina.com

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 连接酶为大连宝生物公司产品。噬菌粒载体 pCANT-AB-5E、辅助噬菌体 M13KO7、大肠杆菌 *E. coli* TG1、辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体(HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate)均购自 Amersham 公司。人肺腺癌细胞株 A549 为本实验室保存,乳腺癌细胞株 MDA-MB-435 由重庆医科大学病理生理学教研室段红博士惠赠。引物参照 Marks 等^[3]设计,由北京三博志远生物技术有限公司合成。网格筛选确定扩增 V_H 基因的引物对, HuJ_H 3FOR: 5'-TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC-3'; HuV_H 5aBACK: 5'-GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GG-3'。网格筛选确定扩增 V_L 基因的引物对, HuJ_k 4FOR: 5'-ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3'; HuV_k 5aBACK: 5'-GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'。 V_H 连接 Linker 的引物对, HuJ_H 3Linker: 5'-AGA GCC ACC TCC GCC TGA ACC GCC TCC ACC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC-3'; HuV_H 5aBACK: 5'-GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GG-3'。 V_L 连接 Linker 的引物对, HuJ_k 4FOR: 5'-ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3'; Linker- HuV_k 5BACK: 5'-GTT CAG GCG GAG GTG GCT CTG GCG GTG GCG GAT CGG AAA CGA CAC TCA CGC AGT CTC C-3'。引入酶切位点的引物, HuV_H 5aBACKS*fi*: 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC-3'; HuJ_k 4FOR*Not*: 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3'。

1.2 RNA 的提取 取肺腺癌患者癌旁淋巴结,剪切成绿豆大小的组织块,迅速 -80°C 冻存。再于液氮中彻底碾磨成粉末。根据 RNA 抽提试剂盒说明提取总 RNA。通过琼脂糖凝胶电泳(1%)鉴定 RNA 的完整性。

1.3 V_H 和 V_L 的合成 首先以 Oligo dT 为引物通过 RNA 逆转录合成第 1 条 cDNA 链。逆转录 PCR 条件: 42°C 20 min, 99°C 5 min, 5°C 5 min, 1 个循环。再以此单链为模板,用确定好的引物对分别扩增 V_H 和 V_L 基因片段。PCR 条件: 94°C 2 min, 1 个循环; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 40 个循环; 72°C 7 min, 1 个循环。PCR 产物电泳、纯化回收 V_H 和 V_L 基因片段。

1.4 单链抗体(ScFv)的组装 以上述纯化的 V_H 和 V_L 基因片段作为它们延伸连接胶的模板,用 V_H 和 V_L 各自相对应的引物扩增 V_H -linker 和 V_L -linker。PCR 反应条件: 94°C 2 min, 1 个循环; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环。PCR 产物电泳鉴定。

再通过“剪切-重叠-延伸 PCR”(SOE-PCR)形成 ScFv 基因片段。先无引物情况下将上述扩增的 V_H -linker 和 V_L -linker 的 PCR 产物连接。PCR 条件: 94°C 5 min, 1 个循环; 94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1.5 min, 5 个循环。然后向上述 PCR 反应体系加入含酶切位点(*Sfi* I、*Not* I)的引物,继续 PCR 反应。PCR 条件: 94°C 30 s, 60°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环。从而得到 ScFv 基因片段。PCR 产物电泳、

切胶、纯化。

1.5 重组质粒的构建 纯化的 SOE-PCR 产物分别经 *Sfi* I 和 *Not* I 双酶切反应后,与载体 pCANTAB-5E 连接。同时设立阳性(Control insert)和阴性(无插入基因片段)对照。用电击穿孔转化法将纯化的连接反应产物转入感受态大肠杆菌 TG1。转化细菌富集后涂 SOBAG 平板。 30°C 培养过夜。随机挑取 25 个单菌落,加入 2-YT 培养液振荡培养过夜后提取质粒,进行质粒 PCR 鉴定并计算插入率。质粒鉴定阳性结果再作双酶切鉴定,最后进行 ScFv 基因序列分析。

1.6 噬菌体抗体的表达 用 2-YT 培养液洗含有阳性克隆的 SOBAG 平板。洗得的菌液用 2-YTAG 稀释至 $D_{600} = 0.3$,振荡培养 1 h。加入 M13KO7 辅助噬菌体,振荡培养 1 h 后离心弃上清,2-YTAK 重悬细菌,振荡培养过夜。次日菌液离心取上清,加入 1/5 体积 PEG/NaCl,冰浴 1 h。离心弃上清,沉淀重悬于 2-YT,离心后将上清用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤器过滤,加入叠氮钠至终浓度 0.02%, 4°C 保存。

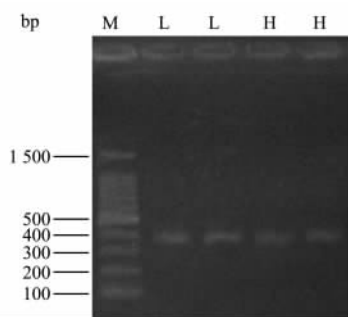
1.7 肺癌细胞对抗体库的筛选富集 收集 10^7 个人肺腺癌细胞 A549,用冰预冷的 1% BSA/PBS 悬浮,冰浴 50 min 封闭非特异性结合部位。沉淀细胞后加入噬菌体抗体库液(先用正常支气管上皮细胞 HBE16 吸附进行阴性筛选)振荡培养 1 h。离心弃上清后用冰预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 $500\ \mu\text{l}$ 洗脱液[0.1 mol/L Gly/HCl(pH 2.2)],冰浴 5 min 后沉淀细胞,加入 2 mol/L 的 Tris 碱溶液 30 μl 进行中和。取上清,加入新鲜的 TG1 菌液振荡培养 1 h,再加入 2-YTAG 培养液振荡培养 1 h。加入 M13KO7 辅助噬菌体,振荡培养 1 h。沉淀细胞后用 2-YTAK 培养液重悬细胞,振荡培养过夜。次日菌液 4°C 离心,上清中加入 1/5 体积 PEG/NaCl,冰浴 1 h。 4°C 离心弃上清,沉淀重悬于 2-YT 液中,再次 4°C 离心收集上清,用于下一轮富集。第 2、3、4 次筛选除了 PBS 洗涤次数分别为 4、5、6 次外,其余步骤与第一次筛选相同。每轮富集前后测定噬菌体滴度。

1.8 细胞 ELISA 检测抗体特异性 富集后的噬菌体感染大肠杆菌 TG1 后,涂 SOBAG 平板, 30°C 过夜培养。自平板上挑取单菌落加入 96 孔细胞培养板培养,制备单链噬菌体抗体。将肺腺癌细胞 A549 按 1×10^4 /孔的密度接种在 96 孔培养板,并取乳腺癌细胞 MDA-MB-435 作为对照。经 4% 多聚甲醛固定,ELISA 法测定 ScFv 抗体免疫活性。一抗为噬菌体抗体,二抗为 HRP/Anti-M13 单克隆抗体。分别以 2-YT 培养液、辅助噬菌体 M13 代替噬菌体抗体作为空白对照和阴性对照。DAB 避光显色 20 min,405 nm 波长酶标仪读板。 D 值大于乳腺癌细胞对照组 2 倍的判作阳性。

2 结果

2.1 癌旁淋巴结总 RNA 的提取及电泳鉴定 由 3 例肺腺癌患者癌旁淋巴结提取总 RNA,电泳可见 2 条带 18S 与 28S,且 28S 条带亮度是 18S 的 2 倍,提示 RNA 完整性好。

2.2 RT-PCR 扩增 V_H 、 V_L 基因片段及电泳鉴定 以所提取 RNA 为模板,逆转录得 cDNA,再分别利用 V_H 、 V_L 各自上下游引物,通过 PCR 反应扩增出 V_H 、 V_L 基因。电泳示 V_H 、 V_L 基因片段得到成功扩增(图 1)。

图1 PCR扩增 V_H 、 V_L 基因Fig 1 PCR amplification of V_H and V_L M: Marker; L: V_L ; H: V_H

2.3 ScFv的组装及电泳鉴定 V_H 、 V_L 基因片段通过 linker 肽段的连接, 组装成完整 ScFv 基因。再分别以含 *Sfi* I、*Not* I 酶切位点的肽段为引物, PCR 扩增 ScFv 基因。电泳示于 750 bp 处可见清晰亮带(图 2)。

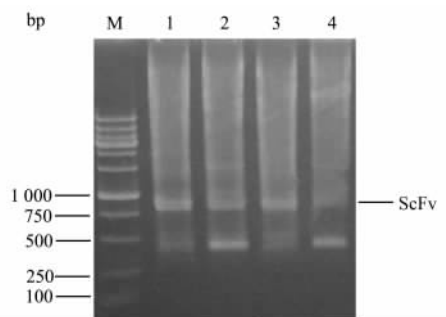


图2 PCR扩增ScFv片段

Fig 2 ScFv fragments amplified by PCR

M: Marker; 1-4: PCR products

2.4 重组质粒的构建及鉴定 经培养后可见阳性平板上菌落满布, 样品平板上亦有大量菌落, 略少于阳性平板。阴性平板仅有数个菌落出现。在样品平板随机挑取的 25 个单菌落中, 22 个克隆出 ScFv, 基因插入率为 88%。凝胶电泳可见在 750 bp 处有明显条带。再将阳性质粒做双酶切鉴定并电泳, 示于 750 bp 处出现清晰亮带(图 3)。最后将 ScFv 基因进行序列分析, 所得序列在 NCBI 网站 GenBank 基因库中进行比对, 有 99% 的基因序列比对成功。

2.5 噬菌体抗体库的筛选及抗体库性能鉴定 以肺腺癌细胞株 A549 对噬菌体抗体库进行 4 轮“吸附-洗脱-扩增”富集筛选。可以看到随着洗涤次数的增加, 噬菌体抗体的收获率呈增加趋势, 经过 4 轮筛选增加了约 115 倍, 表明噬菌体抗体库得到有效富集(表 1)。

富集后的噬菌体感染大肠杆菌后铺培养板培养, 并从中挑取 10 个单菌落加入 96 孔培养板制备单克隆 ScFv 抗体。将肺腺癌细胞 A549 接种 96 孔板培养, 以乳腺癌细胞 MDA-MB-435 作为对照, 并设立空白及阴性对照。每孔加入 100 μ l HRP/Anti-M13 单克隆抗体进行 ELISA 实验。显色后于倒置显微镜下观察, 可见肺腺癌细胞组染色明显较其他对照组强(图 4)。405 nm 波长酶标仪读板结果显示其中有 7 个克

隆与 A549 细胞呈阳性反应, 表明抗体与肺腺癌细胞 A549 有较好亲和力。

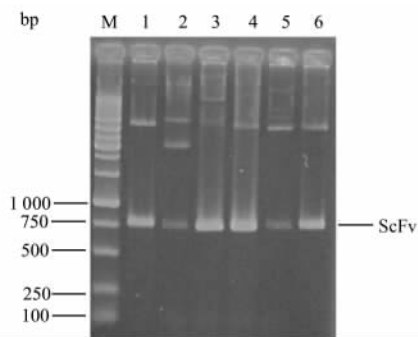


图3 重组质粒双酶切鉴定

Fig 3 Identification of recombinant plasmid by enzyme digestion

M: Marker; ; 1-6: Enzyme digestion products

表1 肺癌细胞 A549 对噬菌体抗体库的富集

Tab 1 Panning phage antibody library using lung cancer cell line A549

Round of panning	Inputed phages (cfu)	Eluted phages (cfu)	Yield/%
1	5.0×10^{12}	6.5×10^4	1.3×10^{-6}
2	3.2×10^{12}	4.3×10^5	1.3×10^{-5}
3	2.6×10^{11}	6.2×10^5	2.4×10^{-4}
4	3.8×10^{11}	5.7×10^5	1.5×10^{-4}

3 讨论

噬菌体抗体库技术作为噬菌体表面展示和抗体组合文库技术相结合形成的一项新技术, 被誉为抗体技术的第三次革命。噬菌体抗体库技术就是通过提取人总 RNA, 经逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)得到抗体全套可变基因, 再通过噬菌体展示技术将其表达在噬菌体表面^[4], 经“吸附-洗脱-扩增”富集, 得到特异性抗体。通过噬菌体抗体技术得到的抗体是人源单链抗体, 克服了多克隆抗体和传统单克隆抗体的不足^[5]。噬菌体抗体库技术避开了杂交瘤技术, 不经过抗原抗体结合的免疫反应, 直接利用抗原从抗体库中筛选出相关抗体, 从而有效解决了抗体抗原性、抗体生产效率低等问题, 应用十分广泛^[6-8]。

肿瘤抗原缺乏一定的特异性, 用单一可溶肿瘤抗原进行筛选时不能很好保证所得抗体的肿瘤特异性。我们直接以肺腺癌细胞为抗原对抗体库进行筛选, 抗原完整性较高, 保持了抗原的天然构象, 抗原表位展示合理^[9-10], 所得抗肺腺单链抗体特异性较高。对于筛选次数的选择不宜过少或过多, 既要保证抗体得到有效富集, 也应避免某些稀有抗体的丢失。我们先用正常支气管上皮细胞对抗体库进行阴性筛选, 再用肺腺癌细胞进行 4 轮阳性筛选, 并逐轮增加 PBS 洗涤次数, 洗脱非特异结合部分。可以看到随着洗涤次数的增加, 噬菌体抗体的收获率呈增加趋势, 经过 4 轮筛选增加了约 115 倍, 表明噬菌体抗体库得到有效富集。

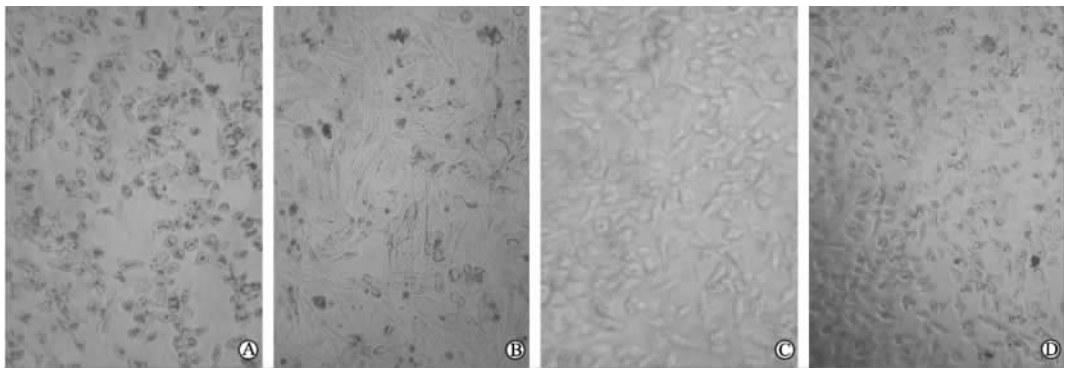


图4 抗体特异性检测光镜观察结果

Fig 4 Specific test of antibody under microscope

A: Lung adenocarcinoma cell group; B: Breast adenocarcinoma cell control group; C: Blank control group; D: Negative control group. DAB staining. Original magnification: $\times 200$

经典筛选方法的特点是简单易行,但不足之处是必须有已知的纯化抗原且筛选过程消耗的抗原量较多,有时筛选出的抗体易出现非特异性结合,对于筛选高亲和力抗体的实际效果欠佳。鉴于此,近年来一些新的筛选方法相继出现,比如细胞淘筛法、组织或体内淘筛法、选择感染法及自动淘筛等,在提高筛选的特异性及简化步骤、降低成本方面有所进步。Wang等^[11]将混合的表达c-myc抗原决定簇标记的ScFv片段,以及带有抗此标记的单克隆抗体(9E10)结合,形成稳定二聚体,并通过测定此二聚体来筛选特异抗体。此方法可使纯化的低亲和力单链抗体和相关抗原的反应性提高2倍,且使抗原特异性单链抗体产量得到提高。这些优化的筛选策略为我们进一步深入研究提供有益的参考。

随着肿瘤生物学和抗体工程技术的发展,人源化基因工程抗体已用于肿瘤临床治疗。如治疗Her-2基因高表达乳腺癌的Herceptin,治疗非霍奇金淋巴瘤的Rituxan等。人源噬菌体相对于多克隆抗体、鼠源性抗体的优势在于它能快速大量表达并筛选抗体,并且在需要进行长疗程的治疗计划中发挥重要作用。在噬菌体抗体治疗中,抗基因反应能通过对抗体选择的管理而得到避免^[12]。

本实验以pCANTAB-5E噬菌体为载体,从肺腺癌患者B淋巴细胞中克隆出抗体重链和轻链可变区基因,成功构建人源肺腺癌单链抗体库。经4轮筛选扩增使该库富集了115倍,得到与肺腺癌细胞A549有较好亲和力的噬菌体单链抗体,为下一步开展肿瘤特异性靶向治疗奠定了基础。

[参考文献]

[1] Xiao J, Horst S, Hinkle G, Cao X, Kocak E, Fang J, et al. Pharmacokinetics and clinical evaluation of ¹²⁵I-radiolabeled humanized CC49 monoclonal antibody (HuCC49deltaC(H)2) in recurrent and metastatic colorectal cancer patients[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2005, 20: 16-26.

[2] Weiner L M. Fully human therapeutic monoclonal antibodies [J]. J Immunother, 2006, 29: 1-9.

[3] Marks J D, Hoogenboom H R, Bonnert T P, McCafferty J, Griffiths A D, Winter G. By-passing immunization. Human anti-

bodies from V-gene libraries displayed on phage[J]. J Mol Biol, 1991, 222: 581-597.

[4] McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, Chiswell D J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains[J]. Nature, 1990, 348: 552-554.

[5] Flego M, Di Bonito P, Ascione A, Zamboni S, Carattoli A, Grasso F, et al. Generation of human antibody fragments recognizing distinct epitopes of the nucleocapsid (N) SARS-CoV protein using a phage display approach[J]. BMC Infect Dis, 2005, 73: 1-8.

[6] Velappan N, Martinez J S, Valero R, Chasteen L, Ponce L, Bondu-Hawkins V, et al. Selection and characterization of scFv antibodies against the Sin Nombre hantavirus nucleocapsid protein [J]. J Immunol Methods, 2007, 321(1-2): 60-69.

[7] Kioi M, Seetharam S, Puri R K. Targeting IL-13R alpha 2-positive cancer with a novel recombinant immunotoxin composed of a single-chain antibody and mutated Pseudomonas exotoxin[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7: 1579-1587.

[8] Mechaly A, Zahavy E, Fisher M. Development and implementation of a single-chain Fv antibody for specific detection of Bacillus anthracis spores[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74: 818-822.

[9] Figini M, Obici L, Mezzanzanica D, Griffiths A, Colnaghi M I, Winter G, et al. Panning phage antibody libraries on cells: isolation of human Fab fragments against ovarian carcinoma using guided selection[J]. Cancer Res, 1998, 58: 991-996.

[10] Heitner T, Satozawa N, McLean K, Vogel D, Cobb R R, Liu B, et al. Obligate multivalent recognition of cell surface tomoregulin following selection from a multivalent phage antibody library [J]. J Biomol Screen, 2006, 11: 985-995.

[11] Wang X, Campoli M, Ko E, Luo W, Ferrone S. Enhancement of scFv fragment reactivity with target antigens in binding assays following mixing with anti-tag monoclonal antibodies[J]. J Immunol Methods, 2004, 294(1-2): 23-35.

[12] Rader C, Cheresch D A, Barbas C F. A phage display approach for rapid antibody humanization; designed combinatorial V gene libraries[J]. PNAS, 1998, 95: 8910-8915.