

DOI:10. 3724/SP. J. 1008. 2008. 00087

• 研究快报 •

人源性抗核抗体 Fab 片段的筛选及鉴定

陆慧琦^{1△}, 钱新宇^{2△}, 李爱民², 罗荣城^{2*}, 韩焕兴^{1*}

1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003
2. 南方医科大学南方医院肿瘤中心, 广州 510515

[摘要] **目的:**制备人源性抗核抗体 Fab 片段。**方法:**通过 4 轮淘筛,富集已构建的人源性抗核抗体 Fab 片段噬菌体抗体库,间接 ELISA 法鉴定 4 轮淘筛后抗核抗体 Fab 片段噬菌体抗体;提取阳性克隆的噬菌粒 DNA,切除 gⅢ 基因片段,自连接后转化大肠杆菌 XL1-Blue,以 IPTG 诱导表达可溶性人源性抗核抗体 Fab 片段;应用间接 ELISA 法及荧光免疫法对表达上清进行鉴定。**结果:**第 4 轮洗脱的噬菌体滴度较第 1 轮增加 200 余倍,从抗核抗体 Fab 片段噬菌体库中筛选出 2 株阳性克隆,切除 gⅢ 基因后自连的噬菌粒 DNA 经 *Xho* I 单酶切证实连接成功。间接 ELISA 法检测结果显示:制备的可溶性人源性抗核抗体 Fab 片段均呈现抗 dsDNA 阳性,具有抗原特异性;免疫荧光法结果显示:Hep2 细胞和猴肝脏组织细胞核显示均质型荧光,绿蝇短膜虫的动基体显示均质型荧光。**结论:**成功制备具有抗原特异性的可溶性、人源性抗核抗体 Fab 片段,为高亲和力抗核抗体 Fab 片段的制备奠定了基础。

[关键词] 抗核抗体;单克隆抗体;噬菌体展示肽库;筛选

[中图分类号] R 392.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0087-05

Panning and identification of humanized antinuclear antibody Fab fragment

LU Hui-qi^{1△}, QIAN Xin-yu^{2△}, LI Ai-min², LUO Rong-cheng^{2*}, HAN Huan-xing^{1*}

1. Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Department of Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare humanized antinuclear antibody Fab fragment. **Methods:** The reconstructed humanized antinuclear antibody (ANA) Fab phage display library was enriched by 4 rounds of panning and was identified by indirect ELISA method. Phasmid DNA isolated from positive clones was deprived of gⅢ gene. After self-ligation the recombinant plasmid was used to transform *E. coli*. XL1-Blue, then XL1-Blue was induced by IPTG to product soluble human antinuclear antibody Fab fragment. Finally, soluble human antinuclear antibody Fab in the supernatant was identified by indirect ELISA method and immunofluorescence. **Results:** The eluted phages were enriched by more than 200 folds after 4 rounds of panning. Two positive clones were isolated from the ANA Fab library. Electrophoresis after *Xho* I digestion proved that the self-ligation was successful after deletion of gⅢ gene. The results of indirect ELISA indicated that the 2 positive clones of Fab had specific anti-dsDNA activity. Indirect immunofluorescence showed homogeneous fluorescence within nuclei of Hep2 and monkey hepatic cells and in the *Crithidia* kinetoplast. **Conclusion:** We have successfully prepared soluble, specific human antinuclear antibody Fab fragment, which paves a way for preparation of high affinity antinuclear antibody Fab fragment.

[KEY WORDS] antinuclear antibodies; monoclonal antibody; phage display peptide library; panning

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1): 87-91]

抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)是以肿瘤变性坏死细胞核为靶点的通用型抗体,解决了其他肿瘤抗体靶向治疗过程中常见的抗原表达差异、抗原分布不均一及抗原调变等缺点,成为肿瘤靶向

治疗领域新的研究热点^[1-3]。目前人鼠嵌合型抗核抗体(ch-TNT)已制备成功^[4-5],标有¹³¹I的商品化放免靶向治疗药物也已经应用于临床治疗实体瘤,并取得肯定疗效。但人鼠嵌合型抗体保留了鼠可变区

[收稿日期] 2007-06-16 **[接受日期]** 2007-12-04
[基金项目] 上海市科委科技资助项目(04DZ19106);广东省科技计划项目(2005b10401022). Supported by Shanghai Science and Technology Committee (04DZ19106) and Guangdong Science and Technology Committee(2005b10401022).
[作者简介] 陆慧琦,博士生, E-mail: huiqi_lu@yahoo. com. cn; 钱新宇,博士生, E-mail: qxy0776@yahoo. com. cn. △共同第一作者(Co-first authors)
* 通讯作者(Corresponding authors). Tel :021-63610109-73637, E-mail: hanhuanxing@sohu. com; Tel :020-61641888-87150, E-mail: lrc@nfhoc. com

的异源性,用于人体可引起人产生抗鼠抗体而导致排斥,从而不能较好地参与人体的免疫反应,因此有必要制备完全人源化的抗核抗体。随着噬菌体抗体库技术的出现,制备人源性抗体趋于简便,极大地降低了人源性抗体制备的复杂性,提高了工作效率^[6-7]。我们前期应用噬菌体抗体库技术成功构建富含人源性抗核抗体 Fab 片段的噬菌体抗体库^[8]。本研究在此基础上,应用噬菌体抗体库的“吸附—洗脱—扩增”高效筛选系统,获取特异性的人源性抗核抗体 Fab 片段,并分析其免疫活性,为进一步将其应用于肿瘤靶向免疫治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 重组人源抗核抗体 Fab 片段噬菌体抗体库由本室前期构建^[8];M13KO7 购于 New England 公司;anti-dsDNA ELISA 检测试剂盒、anti-U₁RNP ELISA 检测试剂盒、绿蝇短膜虫基质片、Hep2 细胞、猴肝基质片为德国欧盟公司产品。XL1-Blue 菌株由本室保存。Xho I 工具酶、DNA Marker 购于大连宝生物工程有限公司,HRP-羊抗人 IgG Fab 抗体、FITC-羊抗人 IgG Fab 抗体为 Sigma 公司产品,其余试剂皆为国产分析纯。

1.2 抗核抗体 Fab 片段噬菌体抗体的亲和富集 取商品化 anti-dsDNA ELISA 检测试剂盒微孔板,每孔加入 100 μ l 的抗核抗体 Fab 片段噬菌体抗体库原液,37℃ 孵育 2 h,吸去噬菌体抗体库,用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 液洗 10 次,每次 1 min。加入 50 μ l 洗脱液(0.1 mol/L HCl,甘氨酸调 pH 值至 2.2,加入 BSA 至终质量体积分数 0.1%),室温静置 10 min,将洗脱液吹打后吸出,立即加入 2 mol/L 的 Tris 中和,加入新鲜制备的 XL1-Blue 大肠杆菌培养液,室温静置 15 min 后,加入四环素(Tet)和氨苄西林(Amp),取 1 μ l 涂板测定噬菌体洗脱量,其余 37℃ 振荡培养 1 h 后转入 LB(Amp+Tet) 100 ml,1 h 后加入 10^{12} pfu/ml 辅助噬菌体 M13KO7,振荡 2 h 后加卡那霉素至终质量浓度为 70 ng/ml,30℃ 培养过夜。次日离心,上清液用 PEG 和 NaCl 沉淀,再以 1% BSA 复溶即得到次级噬菌体抗体库。按上述方法共重复进行 4 轮筛选。

1.3 噬菌体抗体库滴度的测定 噬菌体抗体库原液或次级抗体库溶液在无菌条件下,用 LB 培养液作 10 倍稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 的抗体库溶液备用。取单株大肠杆菌 XL1-Blue 菌落,在

2 ml 含四环素的 LB 培养液中 37℃ 过夜,接种于 2 ml 含四环素的 LB 培养液中,扩增至 D_{600} 为 0.2~0.3 时,每 100 μ l XL1-Blue 菌液加入 1 μ l 稀释后的噬菌体抗体库溶液,感染后的 XL1-Blue 均匀涂布于 LB(Tet)琼脂板中,稍作吸收后倒置放入 37℃ 培养箱中,培养 10 h。统计 LB 平板的菌落数,乘以稀释倍数即为噬菌体抗体库滴度。其余 3 轮筛选同法测定噬菌体抗体库滴度。

1.4 噬菌体抗体的鉴定 经 4 轮富集后洗脱的噬菌体抗体感染 XL1-Blue,铺板,挑取 90 株单克隆菌落,分别接种到 2 ml 含四环素(10 μ g/ml)和羧苄西林(20 μ g/ml)的 LB 培养液中,37℃ 振荡培养 1 h 后加入 10^{12} pfu/ml 辅助噬菌体 M13KO7,继续培养 2 h 后加入卡那霉素至终质量浓度为 70 μ g/ml,30℃ 培养过夜。次日离心后,各取 50 μ l 上清液用等量的 1% BSA 混合,分别加入到 anti-dsDNA ELISA 检测试剂盒微孔板中,孵育 2 h,吸去各孔液体,用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 液洗 4 次,加入 HRP-羊抗人 IgG Fab 抗体,反应 1 h 后吸去各孔液体,PBS 液洗 4 次,加 TMB/H₂O₂ 显色底物,避光,30 min 后终止反应,测定 D_{450} 值。

1.5 抗核抗体 Fab 片段的获取 挑选噬菌体抗体鉴定实验中 D_{450} 值最高的 2 株单菌落,扩增后抽提噬菌粒,Spe I /Nhe I 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳后,胶回收 4 176 bp 的 DNA 条带(去除 g III 基因 DNA 片段),进行自连接。取部分自连的质粒 DNA,Xho I 单酶切后行 1% 琼脂糖凝胶电泳,以鉴定连接效果。证实连接成功后将自连的质粒 DNA 转化至 XL1-Blue,各挑取 3 个单菌落扩增,37℃ 培养至 D_{600} 为 0.5 时加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,30℃ 振荡过夜,收集菌体,反复冻融后 4℃ 离心,保存 6 份上清液备用。

1.6 抗核抗体 Fab 片段的 ELISA 鉴定 取 1.5 项下制备的 6 份上清液各 100 μ l 用 1% BSA 10 倍稀释,共 6 组,分别加入到 anti-dsDNA ELISA 检测试剂盒的条孔中,阴、阳性对照取试剂盒内的质控血清,各 100 μ l/孔,并做复孔处理。孵育 1 h,吸去各孔液体,用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 液洗 4 次,加入 HRP-羊抗人 IgG Fab 抗体,反应 1 h 后吸去各孔液体,PBS 液洗 4 次,加 TMB/H₂O₂ 显色底物,避光,30 min 后终止反应,测定 D_{450} 值。同时用 anti-U₁RNP ELISA 检测试剂盒测定制备的 Fab 片段与

无关抗原核糖核蛋白是否有非特异性结合。

1.7 可溶性 Fab 片段的免疫荧光鉴定 取1.5项下制备的 6 份上清液用 PBS 作 10 倍稀释,共 6 组,以试剂盒内阴、阳性质控血清为对照,分别加入到绿蝇短膜虫基质片、Hep2 细胞和猴肝基质片上,孵育 30 min,洗涤后加入 FITC-羊抗人 IgG Fab 抗体,孵育 30 min,洗涤后滴加甘油少许,在荧光显微镜下观察结果。

2 结 果

2.1 抗核抗体 Fab 片段噬菌体抗体的筛选结果 用抗原固相法对抗核抗体 Fab 噬菌体抗体进行了 4 轮亲和富集,第 1 轮洗脱的噬菌体滴度为 1.05×10^5 ,第 2、3 轮都较前有数量级的提高,第 4 轮筛选较第 3 轮无明显提高,故停止下一轮筛选(表 1)。

表 1 抗核抗体 Fab 片段噬菌体抗体库的淘筛结果

Tab 1 Multiple panning result of combined antinuclear antibody Fab libraries			
Round of panning	No. of phage applied	No. of phage eluted	Yield of phage
1	5×10^{12}	1.05×10^5	2.10×10^{-8}
2	5×10^{12}	3.13×10^6	6.26×10^{-7}
3	5×10^{12}	1.97×10^7	3.94×10^{-6}
4	5×10^{12}	2.73×10^7	5.46×10^{-6}

Yield of phage=(No. of phage eluted)/(No. of phage applied)

2.2 噬菌体抗体的鉴定结果 经间接 ELISA 法共检测 90 株单克隆菌落扩增得到的噬菌体抗体,结果显示有 2 株克隆呈阳性(D_{450} 分别为 1.534、1.609),

3 株克隆表现为弱阳性(D_{450} 分别为 0.295、0.307、0.511),阴性对照、阳性对照的 D_{450} 值分别为 0.05 和 2.211,均符合要求。

2.3 抗核抗体 Fab 片段的获取及 ELISA 鉴定结果 噬菌体抗体鉴定为阳性的克隆经 *Spe* I /*Nhe* I 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳发现在 4 200 bp 与 530 bp 附近出现 2 条 DNA 条带(图 1)。此结果证实酶切完全,目的片段符合预期要求。自连的质粒 DNA 经 *Xho* I 单酶切,电泳证实连接成功,目的片段长度约 4 200 bp,未见其他杂带。间接 ELISA 法检测结果显示制备的 6 株克隆 Fab 片段均呈抗 dsDNA 阳性(表 2),与无关抗原核糖核蛋白无非特异性结合。此结果提示所制备的 Fab 具有抗原特异性。

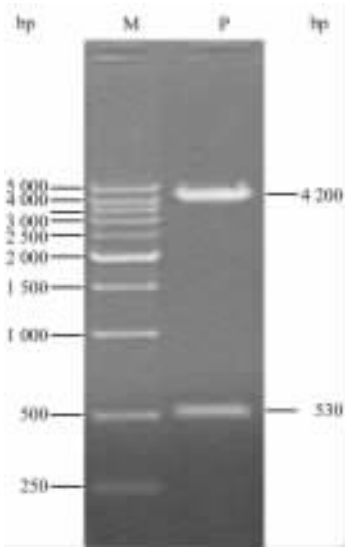


图 1 重组质粒 *Spe* I /*Nhe* I 双酶切鉴定结果

Fig 1 Electrophoresis of recombinant plasmid digested by *Spe* I /*Nhe* I

M: Marker; P:Plasmid and gIII

表 2 6 株抗核抗体 Fab 片段阳性克隆的 ELISA 鉴定

Tab 2 Identification of 6 strains of antinuclear antibody Fab fragment by ELISA								(D_{450})
Dilution	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	Negative control	Positive control
Initial	1.597	1.654	1.421	1.467	1.503	1.488	0.109	2.171
1 : 10	1.101	1.193	1.089	0.974	1.007	0.995		
1 : 100	0.295	0.302	0.288	0.267	0.281	0.273		
1 : 1 000	0.179	0.184	0.171	0.122	0.129	0.130		

2.4 抗核抗体 Fab 片段的免疫荧光鉴定结果 2 株阳性克隆表达的抗核抗体 Fab 片段的免疫荧光检测结果一致:在绿蝇短膜虫基质片上,1 : 10 抗核抗体 Fab 表现为动基体均质型荧光(图 2);Hep2 细胞

片上,1 : 100 抗核抗体 Fab 表现为细胞核的均质型荧光,分裂期细胞的浓缩染色体荧光增强,染色体周围区荧光较弱(图 3);猴肝组织片表现为细胞核均质型荧光(图 4)。

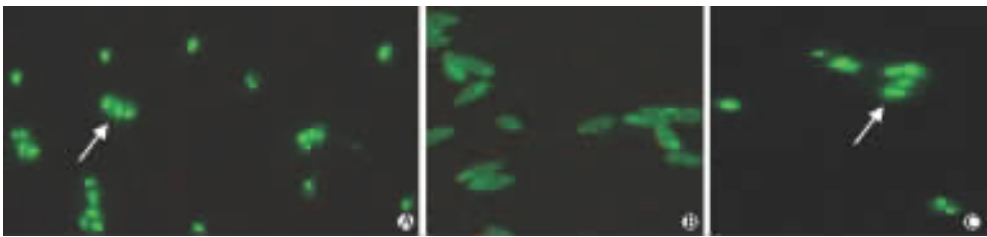


图 2 绿蝇短膜虫基质片上抗核抗体 Fab 片段、阴性对照及阳性对照的免疫荧光染色

Fig 2 Identification of Fab fragment with *Crithidia* kinetoplast by indirect immunofluorescence assay

A: ANA Fab(1 : 10) exhibiting homogeneous fluorescence with *Crithidia* kinetoplast (arrow spot); B: Negative control showing no fluorescence; C: Positive control showing homogeneous fluorescence(arrow spot). Original magnification: ×400

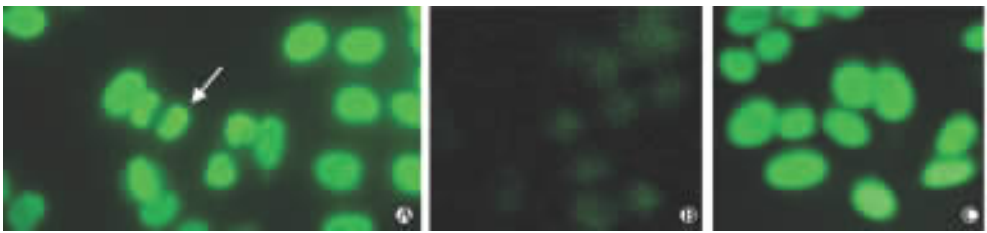


图 3 Hep2 细胞片上抗核抗体 Fab 片段、阴性对照及阳性对照的免疫荧光染色

Fig 3 Identification of Fab fragment on Hep2 cells by indirect immunofluorescence assay

A: ANA Fab(1 : 100) exhibiting homogeneous fluorescence with Hep2. Condensed chromosome showing enhanced fluorescence in cells during dividing phase (arrow spot), whereas surrounding areas of chromosome displaying weak fluorescence. B: Negative control showing no fluorescence; C: Positive control showing homogeneous fluorescence. Original magnification: ×400

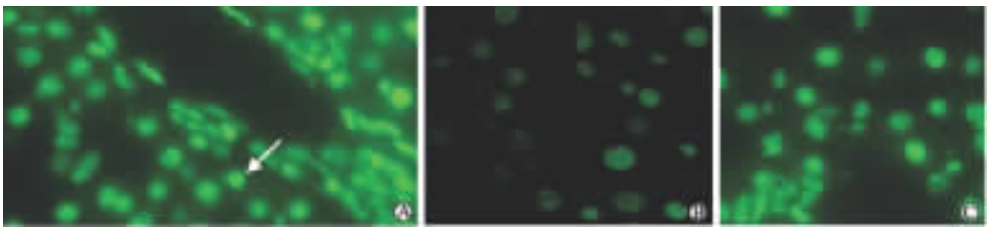


图 4 猴肝组织片上抗核抗体 Fab 片段、阴性对照及阳性对照的免疫荧光染色

Fig 4 Identification of Fab fragment with monkey hepatic tissues by indirect immunofluorescence assay

A: ANA Fab(1 : 100) exhibiting homogeneous fluorescence with monkey hepatic tissues(arrow spot); B: Negative control showing no fluorescence; C: Positive control showing homogeneous fluorescence. Original magnification: ×400

3 讨 论

抗体文库技术是以分子生物学方法将人体的抗体编码基因扩增、克隆,并以原核细胞表达的过程。利用文库技术可构建单链抗体或抗体 Fab 片段,二者的区别在于前者只克隆 Fv 基因,并以连接片段将重链与轻链基因相连接,而后者则是克隆重链的 Fd 段与整个轻链基因,双启动表达后使二者在质周腔组装,在技术上更进了一步^[9-10]。噬菌体抗体库技术将噬菌体表面递呈技术引入抗体库的构建,克服了随机组合抗体库随机性强、筛选工作量大及不容易获得特异性抗体的缺点,能从噬菌体抗体库中直

接筛选出特异性抗体,方法简单易行,大大缩短了实验周期^[11]。

本实验采用的人源性抗核抗体 Fab 噬菌体抗体库是我们前期^[8]自行构建的。其基因来源于抗核抗体间接免疫荧光检测滴度大于 1 : 10 000 的系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血淋巴细胞,有利于获得高丰度的抗核抗体表达基因。如此建立的噬菌体展示文库,其中的噬菌体已相当部分或大部分为抗原特异噬菌体,但如需确定出抗原阳性株,仍需要进一步的筛选。本研究通过 4 轮“吸附—洗脱—扩增”富集噬菌体抗体,筛选阳性克隆。结果发现,第 4 轮洗脱的噬菌体滴度较第 3 轮无明显提高,表明抗核抗

体阳性克隆富集趋于稳定。进一步应用间接 ELISA 法对富集后噬菌体抗体进行鉴定,结果证实富集产物中存在有较高比例的抗核抗体 Fab 片段噬菌体。

然而,上述表达系统是为筛选设计的,不能提供大量抗体,需要改变抗体的产生方式。本研究通过 *Spe* I /*Nhe* I 双酶切,并对 4 200 bp 条带 DNA 进行自连,成功切除目的质粒中 *g* III 基因片段,消除了抗核抗体 Fab 的膜表达。重新连接的质粒经转化、培养增菌,以蛋白诱导剂 (IPTG) 诱导抗体合成,离心沉淀细菌,反复冻融,成功制备出富含可溶性抗核抗体 Fab 片段的菌体上清。

进一步应用间接 ELISA 法鉴定获得的可溶性抗核抗体 Fab 片段。结果表明通过人源性抗核抗体 Fab 片段噬菌体抗体库最终获的抗核抗体 Fab 片段具有抗原特异性;在以绿蝇短膜虫、Hep2 细胞和猴肝组织基质片上表达的抗核抗体 Fab 片段均呈现特异的荧光。上述结果证明已成功制备了具有一定亲和力和特异性的可溶性抗核抗体 Fab 片段。然而,本研究所获得抗体的效价仍比较低,检测滴度仅为 1 : 100,后续研究希望能通过点突变提高抗体的亲和力,为可溶性抗核抗体 Fab 片段的制备及其在肿瘤免疫靶向治疗中的应用奠定基础。

[参 考 文 献]

[1] Sharifi J, Khawli L A, Hu P, King S, Epstein A L. Characterization of a phage display-derived human monoclonal antibody (NHS76) counterpart to chimeric TNT-1 directed against necrotic regions of solid tumors[J]. Hybrid Hybridomics, 2001, 20 (5-6): 305-312.

[2] Biela B H, Khawli L A, Hu P, Epstein A L. Chimeric TNT-3/

human beta-glucuronidase fusion proteins for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2003, 18: 339-353.

[3] Mizokami M M, Hu P, Khawli L A, Epstein A L. Chimeric TNT-3 antibody/murine interferon-gamma fusion protein for the immunotherapy of solid malignancies[J]. Hybrid Hybridomics, 2003, 22: 197-207.

[4] Shapiro W R, Carpenter S P, Roberts K, Shan J S. ¹³¹I-chTNT-1/B mAb: tumour necrosis therapy for malignant astrocytic glioma[J]. Expert Opin Biol Ther, 2006, 6: 539-545.

[5] Street H H, Goris M L, Fisher G A, Wessels B W, Cho C, Hernandez C, et al. Phase I study of ¹³¹I-chimeric (ch) TNT-1/B monoclonal antibody for the treatment of advanced colon cancer [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2006, 21: 243-256.

[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] Xia J, Bi H, Yao Q, Qu S, Zong Y. Construction of human ScFv phage display library against ovarian tumor[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2006, 26: 497-499.

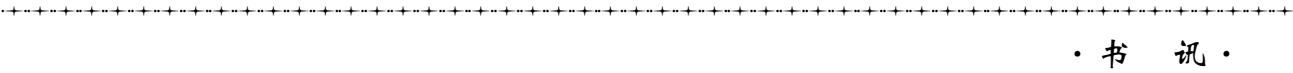
[8] 钱新宇, 陆慧琦, 李爱民, 罗荣城, 韩焕兴. 人源性抗核抗体 Fab 片段噬菌体抗体库的构建[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32: 1141-1144.

[9] Schofield D J, Pope A R, Clementel V, Buckell J, Chapple S D, Clarke K F, et al. Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization[J]. Genome Biol, 2007, 8: R254.

[10] Eisenhardt S U, Schwarz M, Bassler N, Peter K. Subtractive single-chain antibody (scFv) phage-display: tailoring phage-display for high specificity against function-specific conformations of cell membrane molecules[J]. Nat Protoc, 2007, 2: 3063-3073.

[11] Yin X, Ma Y, Liu M, Gao W, Wei D. Screening of a phage display library of exendin-4 mutants with the extracellular domain of rat GLP-1 receptor[J]. Protein Pept Lett, 2007, 14: 816-821.

[本文编辑] 贾泽军



《急诊常见疾病 X 线诊断》已出版

本书由夏玲瑛、田建明主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0798-8,16 开,定价 90.00 元。

本书是由作者从大量临床实践或病理实证的病例中精选汇编而成,共搜集典型病例 500 多例,图片近千张。主要包括骨关节外伤、胸部外伤、骨正常变异和发育异常、肺部和心血管病变、急腹症及消化道异物等。以急诊实例为纲,重点介绍容易漏诊、误诊的病例。不仅是影像科医师实用、必读的参考书,而且对内外科和相关临床科室医师也有重要的参考价值。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大新华书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>