

全人源化抗结肠癌单链抗体基因的克隆和表达

朱建高 李官成 李跃辉 胡锦涛 周国华 胡志伟 孙去病 李小玲*

(湖南医科大学肿瘤研究所 长沙 410078)

摘 要 分离大肠癌患者外周血单个核细胞(PBMC),在体外用灭活的大肠癌细胞再次致敏后,经 EBV 转化,然后用有限稀释法克隆分泌抗大肠癌细胞抗体的 B 细胞;多次 PCR 扩增和克隆其抗体可变区基因(V_H/V_L cDNA),并用编码(Gly₄Ser)₃ 的互补序列连接成 ScFv cDNA(V_H -linker- V_L),经酶切克隆入载体 fUSE 5 RF,使之呈现于噬菌体表面。通过用 3 轮肿瘤细胞和正常人 PBMC 淘选后,ELISA 检测 80% 的单克隆噬菌体抗体显示了很强的阳性反应。以上结果初步说明:联合应用体外致敏、EBV 转化、PCR 扩增和噬菌体呈现技术制备高亲和力全人源化的抗肿瘤抗体是可行的。

关键词 大肠癌,噬菌体呈现,单链抗体,EBV 转化,体外致敏,聚合酶链反应

中图分类号 R739.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0526-05

人源化单链抗体(ScFv)在肿瘤临床应用的最大优点是避免了鼠源抗体应用于人体内产生的 HAMA 反应(人抗鼠抗体反应),以及分子量小,容易进入实体瘤。噬菌体人抗体库技术为快速选择特异性抗体提供了简便而高效的操作系统^[1]。目前,通过该技术已获得多株针对不同抗原的特异性噬菌体人单链抗体。国内关于抗肿瘤单链抗体的报道很多^[2-4],但大多是通过基因工程技术把鼠源杂交瘤抗体改造成小分子单链抗体,仍属鼠源单链抗体。96 年,我室已开始从事全人源化的基因工程抗体研究,用体外致敏的大肠癌患者 PBMC 构建了抗大肠癌的噬菌体抗体库,但发现筛选得到的噬菌体单链抗体与肿瘤抗原亲和力较低^[5],这可能与构建的噬菌体抗体库质量有关。其可能原因包括:第一是抗体库容量小,约 10^6 ;理论上,包括各种抗原特异性的库容须在 10^{14} 以上,而目前达到此库容量在技术要求上是比较困难的,如果抗体库库容不大,就有可能筛选不到理想的人单克隆抗体。第二是由于分泌高亲和力的特异性抗体的 B 细胞数量较少,在基因操作中丢失了通过免疫系统最初已选择好的高亲和力的 V_H 和 V_L 的原始(original)配对^[6],因此,我们力求通过富集分泌特异性抗体 B 细胞来克隆特异性抗体基因。为了得到高亲和力的抗肿瘤抗体,我们采

取的策略是应用 EBV 转化技术,体外转化经抗原致敏的肿瘤病人外周血单个核细胞(PBMC),从而获得永生化的、分泌高亲和力的、抗大肠癌 B 细胞克隆,克隆其免疫球蛋白可变区基因,以此在体外经过 DNA 重组技术恢复 B 细胞内高亲和力的 V_H/V_L 原始的配对,并展示在噬菌体表面。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、细菌及质粒:人大肠癌细胞株为 HRT-18,绒猴淋巴瘤母细胞样细胞株为 B95-8,均由本室保存,培养在含 10% 新生小牛血清 RPMI-1640 培养基中。*E. coli* MC1061、*E. coli* K802、*E. coli* K91Kan 及丝状噬菌体 fUSE 5 均由美国 Yale 大学 Garen 教授惠赠。

1.1.2 培养基:胎牛血清(FCS)及新生小牛血清(NBS)为杭州四季青公司产品,细胞及细胞菌培养基及琼脂糖均为 Gibco/BRL 公司产品,rhIL-2,谷氨酰胺、丙酮酸钠及环孢霉素 A 均为 Sigma 公司产品。完全培养基均含 4mmol/L 谷氨酰胺及 2mmol/L 丙酮酸钠。

1.1.3 大肠癌病例:1 例大肠癌患者来源于湖南医科大学湘雅医院,经病理科确诊为结肠癌,术前 1 天

收稿日期:2001-01-05,修回日期:2001-04-06。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900141)。

* 联系作者。Tel:86-731-4805445; Fax:86-731-4471339; E-mail:libsun@public.cs.hn.cn

无菌静脉采血 5 mL。

1.1.4 主要试剂:HRP 标记的抗 M13 单克隆抗体 (HRP/Anti-M13) 购自 Pharmacia Biotech 公司, TRIzol 试剂购自 Gibco/BRL 公司, HRP 标记的抗人 IgG/M 为北京邦定公司产品, 100bp DNA marker 为 MBI 公司产品, 多条 PCR 特异引物根据 Cai 等^[7] 设计由美国生命技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 大肠癌细胞抗原的制备、EBV 粗提液的制备和大肠癌患者外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离^[8]:用丝裂霉素 C 处理大肠癌细胞; EBV 粗提液为对数生长期的 B95-8 细胞培养上清; 采用密度梯度离心法分离 PBMC。

1.2.2 大肠癌患者 PBMC 的体外致敏: 细胞抗原按大肠癌细胞: PBMC = 1:10 的比例加入培养的 PBMC 中, 于 37℃ 5% CO₂ 孵箱培养 6~8d。培养为含 10% FCS 的 RPMI-1640 完全培养基 (含 20u/mL rhIL-2)

1.2.3 EBV 转化:计数致敏后的 PBMC, 按 4×10^6 PBMC 加入 1mL EBV 培养上清, 于含 CO₂ 孵箱静置培养 2h, 吸弃上清, 加含 2μg/mL 环孢霉素 A, 20u/mL 的 10% FCS RPMI-1640, 按每孔 5×10^5 PBMC 分装入 24 孔细胞培养板 (Costar) 中, 每隔 5d 半量换液。培养 4 周左右, 将转化的 B 细胞按 5×10^3 细胞/孔浓度培养于 96 孔细胞培养板, 经过约 2 周左右, 收集其上清, 用于 ELISA 检测特异性抗体的产生。

1.2.4 间接 ELISA 检测抗肿瘤抗体:用大肠癌细胞 HRT-18 铺肿瘤细胞抗原板, 经 0.15% 戊二醛室温固定 20 min, 1% BSA 37℃ 封闭 1h, PBS 洗板 3 次。分别加入收集的 B 细胞培养上清, 37℃ 温育 2h 或 4℃ 过夜, PBS 洗板 5 次, 加入 HRP 标记的抗人 IgG/M (1:2000), 37℃ 孵育 1h PBS 洗板 5 次, ABTS 显色, 测定吸收值 (A_{405})。阴性对照为含 1% BSA 培养基, 阳性域值为阴性对照孔的 A_{405} 值均值与其 3 倍标准差之和。

1.2.5 有限稀释法克隆分泌抗大肠癌细胞抗体的 B 细胞:取转化的 ELISA 阳性孔 B 细胞, 按每孔 40、10、1 个 B 细胞浓度加入 96 孔 U 型细胞培养板上, 于 37℃, 5% CO₂ 孵箱培养 10~14d, 可见到克隆细胞增殖, 3 周左右, 取其上清用于 ELISA 检测 (方法见 1.2.4), 阳性孔细胞培养 4 周左右, 可转至 24 孔细胞培养板培养, 再过 10d 左右, 可在 25cm² 塑料瓶 (Costar) 中直立培养, 细胞扩增至 $10^5 \sim 10^6$, 即可用于总 RNA 抽提。

1.2.6 阳性 B 细胞克隆总 RNA 的分离和逆转录成 cDNA (第 1 链):收集分泌抗大肠癌抗体的 $10^5 \sim 10^6$ 个 B 细胞克隆 (命名为 99-7-5AgB12), PBS 洗涤细胞 2 次, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 以此为模板用逆转录试剂盒 (Invitrogen 公司) 合成 cDNA (第 1 链), 操作方法按试剂盒说明进行, 最后于 100℃ 3min 灭活逆转录酶。

1.2.7 单链抗体 (ScFv) 基因的克隆与表达载体的构建:参见文献^[7], 操作步骤简述如下: (1) 用 PCR 扩增 IgG/IgM 的可变区 (V_H) 和第一恒定区 (C_{H1}) 基因以及 κ 或 λ 整个轻链基因, 并在重链可变区基因的羧基末端和轻链可变区基因的氨基末端加上编码连接肽 (Gly_4Ser)₃ 的互补序列; (2) 用 PCR 组装成 V_H -Linker- V_L 的 ScFv cDNA; (3) ScFv cDNA 与丝状噬菌体载体 fUSE 5RF 的连接; (5) ScFv-fUSE5RF 用电击方法转化入细菌 MC1061 中表达, 获得初级噬菌体克隆。

1.2.8 用大肠癌细胞 (HRT-18) 和正常人 PBMC 筛选抗大肠癌 ScFv 噬菌体抗体:HRT-18 细胞在 75cm² 玻璃培养瓶中长满至单层, 用无血清培养基洗 3 次, 然后加 8mL 10% NBS RPMI-1640 培养基, 在 37℃ 温育 1h, 以封闭非特异性结合位点。在第一次 Panning 前, 初级噬菌体抗体用 4% (wt/vol) PEG/0.5mol/L NaCl 沉淀纯化, 溶于水中, 测定噬菌体的滴度。加 1×10^{11} TU (Transducing unit) 至 4mL 含 10% NBS RPMI-1640 培养基中, 37℃ 温育 1h, 以封闭丝状噬菌体表面蛋白非特异性结合位点。4mL 噬菌体抗体加至已封闭好的 HRT-18 细胞培养瓶中, 在室温放置 2h, 倾去未结合的噬菌体, 用无菌 PBS 洗涤 HRT-18 细胞 10 次, 然后加 1mL 0.1mol/L 三乙胺 (TEA) 于 37℃ 裂解细胞 5 min, 立即加入 0.5mL Tris-HCl (pH7.6) 中和, 中和后的噬菌体与 5mL 对数生长期的 *E. coli* K91Kan 混合, 于 37℃ 静止感染 30min 后, 取部分细菌铺到含 15μg/mL 四环素的 2 × YT 琼脂糖平板上, 以计算回收效率和挑取单克隆细菌, 另大部分直接加 30mL 含 15μg/mL 四环素的 LB 培养基中振摇过夜, 以扩增噬菌体。重复此亲和选择步骤 2 次。在最后一轮亲和选择后, 用含 10% NBS RPMI-1640 稀释没有扩增的噬菌体抗体 10^6 TU/mL, 取 10mL 加至已分离好的正常人 PBMC (1×10^6) 中, 于 37℃ 温育 1h, 离心后取上清加至 1×10^6 正常人 PBMC 中。如此 3 次, 没有吸附的噬菌体感染 *E. coli* K91Kan 细菌, 铺至 2 × YT 琼脂糖平板, 过夜培养, 第二天接种单个菌落到 2mL 含四环素 LB 培养基中, 于 37℃ 振摇过夜,

离心保留上清,贮存于 4℃,用于 ELISA 分析。

1.2.9 ELISA 分析:用 HRT-18 细胞 ELISA 初筛挑取的单克隆菌落上清。具体方法如下:肿瘤细胞培养在 96 孔细胞培养板上,长满至单层后,用 0.15% 戊二醛固定 20min, PBS 洗板 3 次, 1% BSA-PBS 于 37℃ 封闭 1h。在单克隆噬菌体抗体上清与细胞抗原温育之前,先与 1% BSA-PBS 各 100 μ L 室温温育 30min, 然后分别加入细胞抗原孔中,置室温 2h, PBS 洗 5 次后,加入 100 μ L/孔 HRP/Anti-M13(1:2500), 37℃ 温育 1h, PBS 洗板 6 次, ABTS 显色。于酶标仪(EL₈₀₀)读取 A_{405} 值。以空白噬菌体 fUSE 5 作为阴性对照,所有的分析均是平行 3 孔。

1.2.10 DNA 指纹分析:挑取第 3 轮筛选后的 10 个阳性克隆, PCR 扩增其插入片段, 引物为噬菌体通用引物, 5'端引物: 5'-CGT GTT CCT TTG GCC ATG GAC TCG GCC GAC GTG GCC-3' 3'端引物: 5'-TTT TGC CTC GAG TGC GGC CGC AGT TTC GGC CCC AGC GGC CCC-3'。PCR 产物纯化后,用限制酶 *Hinf* I 酶切, 37℃ 作用 3h, 在 1.5% Agarose 凝胶电泳分析。

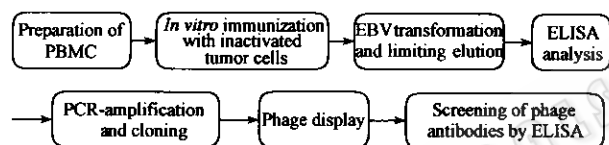


图 1 实验步骤的简要流程图

Fig.1 Schematic representation of the experimental procedure used to obtain human-antigen-specific antibodies against colorectal cancer

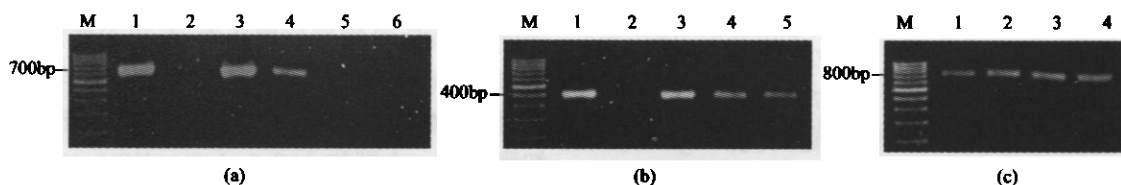


图 2 PCR 扩增和克隆抗体可变区基因

Fig.2 Antibody genes of variable region amplified and cloned by PCR. M:100 bp DNA ladder markers

(a) 1. $V_H1,4,6-C_H1(\gamma)$; 2. $V_H2-C_H1(\gamma)$; 3. $V_H3,5-C_H1(\gamma)$; 4. $V_\kappa1,4-C_\kappa$; 5. $V_\kappa2,3,6-C_\kappa$; 6. $V_\kappa5-C_\kappa$

(b) 1. $V_H1,4,6-J_H$; 2. V_H2-J_H ; 3. $V_H3,5-J_H$; 4. $V_\kappa1,4-J_\kappa$; 5. $V_\kappa1,4-J_\kappa$

(c) 1. $V_H1,4,6-linker-J_\kappa1$; 2. $V_H1,4,6-linker-J_\kappa2$; 3. $V_H3,5-linker-J_\kappa1$; 4. $V_H3,5-linker-J_\kappa2$

2.3 抗大肠癌噬菌体单链抗体的筛选

在 HRT-18 细胞上经过 3 轮亲和选择,裂解细胞,回收结合在胞膜的噬菌体和通过内化作用进入胞内的噬菌体抗体,得到抗肿瘤抗体富集倍数为 100 倍。经第 3 轮亲和选择后,90% (25/27) 的噬菌体克隆能与肿瘤细胞 HRT-18 结合(表 1),80% 的噬菌体克隆显示与肿瘤细胞很强的结合反应(图 4)。

2 结果

2.1 有限稀释法克隆 EBV 转化的 B 细胞

分离大肠癌患者的 PBMC,在体外再次抗原致敏 6~8d 后,经 EBV 转化,培养在 24 孔细胞培养板中,扩大培养后,按 5×10^3 细胞/孔铺 2 块 96 孔细胞板,每孔均可见克隆生长,ELISA 检测约 25% 孔的细胞分泌特异性抗体。取 A_{405} 值较高的多克隆细胞扩增,进行有限稀释,培养 1 个细胞的孔中均未见细胞克隆形成,10 个细胞/孔的克隆生成率为 6% (4 孔),40 个细胞/孔的克隆生成率为 37.5% (27 孔)。经 ELISA 分析,其中 4 孔(2%)细胞有抗大肠癌抗体分泌,取 A_{405} 值最高的孔 B12 扩大培养。

2.2 V_H/V_L 基因的克隆和重组表达载体的构建

提取 99-7-5AgB12 细胞总 RNA,总 RNA 经电泳鉴定无降解及 $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$;经 RT-PCR 扩增出 2 种 $V_H-C_H1(\gamma)$ cDNA,一种 $V_\kappa-C_\kappa$ cDNA,分子大小均为 ~700bp(图 2a),第 2 次 PCR 扩增出 2 种 $V_H-V_H(\gamma)$ cDNA,2 种 $V_\kappa-J_\kappa$ cDNA,分子大小均为 ~400bp(图 2b),2 种 V_H cDNA 和 2 种 V_κ cDNA 经组合,PCR 连接成带 linker 的 ScFv cDNA(图 2c)。将部分连接产物 ScFv-fUSE 5RF 电击转化入感受态 *E. coli* MC1061,经四环素抗性筛选后得到 6.3×10^5 初级噬菌体抗体克隆。从初级噬菌体抗体克隆中随机挑取 10 个克隆培养,经 PCR 扩增检测外源基因片段插入率为 80%。

ELISA 结果判断标准: $A_{405} < 0.2$ 为阴性(-), A_{405} 在 0.2~1.0 之间为阳性(+), $A_{405} > 1.0$ 为强阳性(+++)。

2.4 HRT-18 细胞 ELISA 阳性克隆的 DNA 指纹分析

PCR 扩增 10 个阳性噬菌体抗体克隆中插入的 ScFv 基因,其插入片段均为 ~800bp,为全长 ScFv 基因大小(图 3a)。经 *Hinf* I 酶切显示其指纹图基本

表 1 ELISA 检测噬菌体克隆与 HRT-18 细胞的结合反应

Table 1 ELISA tests phage antibodies for binding to HRT-18 cells

| Panning step | Clones | | |
|--------------|--------|---|----|
| | - | + | ++ |
| 1 | 12 | 1 | 0 |
| 2 | 14 | 4 | 5 |
| 3 | 2 | 4 | 21 |

Enrich for tumor-specific clones from scFv fusion phage library after 3 rounds of panning on HRT-18 cells. Phage clones were randomly selected for ELISA after each panning step

一致(图 3b), 3 个片段大小均为 ~150bp、~300bp、~450bp, 说明 10 个噬菌体抗体克隆可能含有相同的抗体基因。

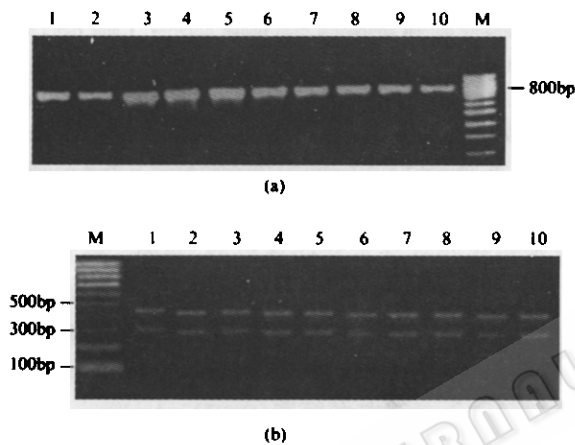
图 3 ScFv 克隆的 *Hinf* I 指纹分析

Fig.3 *Hinf* I fingerprinting analysis of 10 ELISA-positive ScFv clones from phage library after 3 rounds of panning of phage-displayed antibody library on colorectal cancer cells.

Marker: 100bp DNA ladder markers.

(a) PCR products of 10 ScFv fusion phage clones.

(b) The product digested with *Hinf* I.

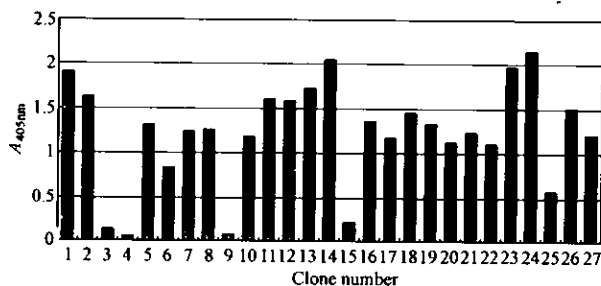


图 4 ScFv 噬菌体抗体与 HRT-18 的 ELISA 检测结果

Fig.4 Whole-cell ELISA with phage antibodies prepared from 27 clones randomly picked after 3 rounds of panning on HRT-18 cells

3 讨论

在人体免疫系统中, 高亲和力抗体的产生是免

疫应答过程中抗体链替换和体细胞高突变的结果。采用体外免疫方法, 以人肿瘤细胞体外再次致敏大肠癌患者 B 淋巴细胞, 在抗原压力选择下, 只有抗原特异性 B 细胞增殖分化; 同时, 抗体可变区基因发生大量突变, 从而产生高亲和力抗体, 一般表现为具有高亲和力的 IgG 类抗体, 这从 PCR 扩增出抗体可变区基因为 $V_H(\gamma)$ 得到了验证; 这也对筛选高亲和力的抗肿瘤单链抗体是有利的。

在 EBV 转化过程中, 高质量的血清及一定浓度的细胞数至关重要。用有限稀释法克隆分泌抗大肠癌抗体的 B 细胞时, 曾用 0.5 个细胞/孔和 1 个细胞/孔浓度铺多块细胞板, 结果均无克隆生长, 国外有报道 0.5 个细胞/孔能长出细胞克隆, 但转化效率非常低, 这可能与高质量的血清有关。我们采用了 40 个细胞/孔和 10 个细胞/孔的浓度来进行有限稀释, 获得了较理想的转化率。

从初级噬菌体抗体克隆中分离出抗大肠癌噬菌体单链抗体, 通过 3 轮细胞筛选, 至第 2 轮筛选时, 我们就筛选到了 5 个 A_{405} 值较高的阳性克隆, 第 3 轮筛选时阳性克隆更多。究其原因可能是抗体基因 V_H/V_L 只来源于一个或几个 B 细胞, 通过 EBV 转化和 PCR 放大抗体基因, 其抗体基因大多是重复的, 因而不必费时费力来构建大容量的抗体库; 同时, 10 个克隆 DNA 指纹图谱基本一致也可能说明这一点。我们合成了 17 对人全套抗体基因简并引物, PCR 扩增和克隆抗体基因时, 理论上能扩增出人全套抗体基因, 包括 IgM 的 3 种 V_H cDNA, IgM 的 3 种 V_L cDNA, 6 种 V_H cDNA 和 3 种 V_L cDNA, 但实际上, 我们仅扩增出 IgG 的 2 种 V_H cDNA 及 2 种 V_L cDNA, 这可能也说明了抗体基因来源于 1 个或几个有限的 B 细胞来源。

淘选初级噬菌体抗体克隆, 除经过与肿瘤细胞亲和和选择, 我们应用了正常人 PBMC 来除去与正常 PBMC 细胞结合的噬菌体抗体, 增加获得特异性抗肿瘤抗体的机会。在筛选时, 洗脱细胞上结合的噬菌体一般是利用改变 pH(酸洗脱)来洗脱结合于细胞上的噬菌体抗体^[7], 但是, Becerril 等^[10]发现噬菌体抗体除结合在细胞膜表面外, 还有许多通过内化作用进入胞内的噬菌体抗体, 这部分噬菌体抗体或许对以后抗体导向治疗等是很有用处的, 这在我们以前的实验中也证实了这一点^[11], 因此我们用细胞裂解液来回收结合在胞膜和进入胞内的噬菌体, 也避免了高亲和力、特异性抗体的丢失。

综上所述,联合体外致敏、EBV 转化、PCR 和噬菌体呈现技术,这一策略适合于制备全人源化的高亲和力的抗肿瘤抗体,为抗体进一步应用于临床奠定了坚实的基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G *et al.* Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990, **348** (6301): 552 ~ 554
- [2] LI J(李竞), WANG Y(王琰), DONG Z W(董志伟) *et al.* Construction and Expression of 3H11 Human-mouse Chimerical Antibody Directed against Human Gastric Cancer. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*(中国肿瘤生物治疗杂志). 1998, **5**(2): 116 ~ 120
- [3] SONG L X(宋林霞), YU W Y(俞炜源). Construction and Expression of Anticolonic Cancer ScFv Fragment. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**(1): 82 ~ 85
- [4] WU X P(吴小平), ZHANG Z Q(张志强), YAN X Y(阎锡蕴) *et al.* A Novel Tumor Blood Vessel Specific Fab Antibody Fragment: Gene Cloning, Expression and Activity. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**(6): 695 ~ 698
- [5] HU Z W(胡志伟), LI X L(李小玲), SUN Q B(孙去病) *et al.* Cloning Human immunoglobulin Genes from Peripheral Blood Lymphocytes after *in vitro* immunization. *Progress Biochemistry and Biophysics*(生物化学与生物物理进展), 1997, **24**(5): 313 ~ 315
- [6] Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. *Nature*. 1991, **349** (6307): 293 ~ 299
- [7] Cai X, Garen A. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, **92**(14): 6537 ~ 6541
- [8] ZHU J G(朱建高), LI Y H(李跃辉), SUN Q B(孙去病) *et al.* Construction of phage antibody from EBV-transformed B-lymphocytes of colorectal cancer patients. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*(细胞与分子免疫学杂志), 2000, **16**(6): 467 ~ 471
- [9] Marks JD, Hoogenboom HR, Winter G *et al.* By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*, 1991, **222**(3): 581 ~ 597
- [10] Poul MA, Becerril B, Marks JD *et al.* Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. *J Mol Biol*, 2000, **301**(5): 1149 ~ 1161
- [11] ZHU J G(朱建高), HU J Y(胡锦跃), SUN Q B(孙去病) *et al.* Selection of Single-chain Fv Antibodies to Colorectal Cancer Antigens and Preliminary Characterization. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2001, **17** (1): 18 ~ 22

Cloning and Expression of Human Anti-colonic Cancer Single-chain Fv Fragment

ZHU Jian-Gao LI Guan-Cheng LI Yue-Hui Hu Jin-Yue ZHOU Guo-Hua
HU Zhi-Wei SUN Qu-Bing LI Xiao-Ling*

(Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078, China)

Abstract We report a new strategy for the generation of human anticolon cancer monoclonal antibodies based on the molecular cloning and expression of immunoglobulin variable region cDNAs derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) that were transformed by EBV. The immortalized B cells secreting tumor-specific antibodies were identified by HRT-18 cell ELISA and cloned by limiting dilution. Heavy- and light-chain V_H - C_{H1} (γ) and V_L - C_L cDNAs were rescued from ELISA-positive cells wells by RT-PCR. V_H and V_L were amplified by 2nd PCR and linked them together by 3rd PCR assembly with the use of a $(Gly_4Ser)_3$ linker. The ScFv cDNAs were then cloned into the fUSE 5 vector and displayed on phage. Phage clones were selected on HRT-18 cells and normal human PBMC. ELISA tested phage clones randomly picked after each panning step. > 80% of the clones showed a strong ELISA reaction, demonstrating the effectiveness of the panning procedure for selecting anticolon cancer antibodies. This approach offers an effective method by combining *in vitro* immunization, B-cell expansion for enrichment of specific B-lymphocytes, PCR gene cloning and phage display to make high-affinity human anticolon cancer monoclonal antibody molecules.

Key words colorectal carcinoma, phage display, single-chain Fv molecule, EBV transformation, *in vitro* immunization, polymerase chain reaction

Received: January 5, 2001

This work was supported by the grant from National Natural Science Foundation of China(39900141).

* Corresponding author. Tel: 86-731-8405445; Fax: 86-731-4471339; E-mail: libsun@public.cs.hn.cn