

从构建的噬菌体抗体库中筛选抗甲肝人单抗

万泽生¹ 王海涛² 姜绍谔³

(第三军医大学微生物学教研室 重庆 400038)¹

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)²

(第四军医大学微生物学教研室 西安 710032)³

摘 要 用固相化甲肝抗原,对所构建的噬菌体抗体库进行了 3 轮淘筛。第 3 轮淘筛后洗脱下来的噬菌体,较第 1 轮增加了近 100 倍。含有抗体重链基因和轻链基因的重组克隆,也由淘筛前的 25% 增至 100%。说明甲肝抗原对抗体库的淘筛,富集了表面呈现甲肝人单抗的噬菌体。经夹心 ELISA 法筛选到抗甲肝病毒噬菌体抗体,并以竞争抑制实验进一步证实了这些抗体的特异性。

关键词 噬菌体抗体库,人单克隆抗体,甲肝病毒

学科分类号 Q 93902

长期以来,尽管人们对人单克隆抗体制备技术进行了大量的研究并取得了不少进展,但还存在一些难以克服的弱点。如人单抗杂交瘤细胞系产生抗体量低、亲和力差,常表现不稳定易丧失产生人单抗能力,以及人体不能随意地进行各种抗原免疫等,导致人源性单抗制备困难。近年来抗体库技术的发展,尤其是噬菌体抗体库技术的出现,使人们能够不经过细胞融合,而采用基因工程的技术,从人外周血淋巴细胞 IgM RNA 直接制备抗体,为人单抗的制备开辟了广阔的前景^[1]。本文报道用噬菌体抗体库技术构建出噬菌体人抗体库,并从库中筛选出抗甲肝抗原的人源性噬菌体抗体。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌株: 表达载体 PComb3 和宿主菌大肠杆菌 XLI-Blue 为军科五所 11 室保存,辅助噬菌体 VCSM13 由海军总医院王琰教授惠赠。

1.1.2 甲肝病毒抗原: 蔗糖密度梯度纯化抗原中国预防医学科学院病毒所提供,用夹心 ELISA 法测其滴度为 1:16。细胞培养抗原购自解放军 302 医院试剂厂。

1.1.3 鼠抗甲肝单克隆抗体: 购自中国预防医学科学院病毒所,工作浓度为 1:400。

1.1.4 HRP-抗 VCSM13: 军科院五所 11 室制备,工作浓度为 1:1000。

1.1.5 人抗甲肝纯化多抗: 军科五所 11 室制备。测蛋白浓度为 9.8mg/ml,竞争 ELISA 法测效价为 1:1.6×10⁴。

1.2 构建噬菌体抗体库

参照文献[2]进行。用 XhoI/SpeI 酶解 PCR 扩增的人抗体重链基因片段^[3], 纯化后与用相同酶解的 pComb3 连接, 电转化大肠杆菌, 扩增后提取质粒。PCR 扩增的人抗体轻链基因片段^[3], 借助 Sac I/Xba I 位点插入该质粒。转化、扩增后感染 VCSM13, 振荡培养过夜。次日在离心后的上清液中加入 4% (W/V) PEG 和 3% (W/V) NaCl 沉淀噬菌体, 溶于 2ml PBS 中, 即得到噬菌体抗体库。

1.3 噬菌体抗体库的淘筛

用蔗糖密度梯度纯化的甲肝抗原 50 μ l 包被酶联板两孔, 3% BSA 封闭后, 每孔加 50 μ l 噬菌体抗体库 (约 10^{12} cfu), 37 $^{\circ}$ C 放置 2h。参照文献[2]进行淘筛。洗脱后的噬菌体加至 XLI-Blue (OD₆₀₀ 为 1) 中, 同于构建噬菌体抗体库的方法进行扩增、沉淀及浓缩噬菌体。用所得到的次级噬菌体抗体库进行下一轮的淘筛 (panning)。

1.4 制备噬菌体抗体

从第 3 轮淘筛后, 滴定噬菌体洗脱量在 LB 平板上, 挑取单个菌落至装有 2ml SB (100 μ g/ml 羧苄青霉素, 10 μ g/ml 四环素) 的大试管中, 37 $^{\circ}$ C 摇至 OD₆₀₀ 为 0.8~1 加入 50 μ l VCSM13, 摇 2h 后加入卡那霉素至终浓度为 70 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 振摇过夜。4 $^{\circ}$ C 离心 (5000r/min) 15min, 取上清液用以噬菌体抗体的鉴定实验。

1.5 鉴定噬菌体抗体

1.5.1 夹心 ELISA 法: 将甲肝病毒细胞培养抗原加入已包被有鼠抗甲肝单克隆抗体的酶联孔中, 封闭后加入用 1% BSA 释稀液作 1:2 稀释的噬菌体抗体 50 μ l, 作用后加入 HRP-抗 VCSM13, OPD 显色并测定 OD_{490nm} 值。

1.5.2 竞争抑制实验: 同 ELISA 夹心实验包被甲肝抗原。用不同稀释度的人抗甲肝纯化多抗, 与鉴定出的抗甲肝阳性噬菌体抗体等量混合, 加入酶联孔中, 其余操作同 ELISA 法。

2 结果

2.1 噬菌体抗体库的构建

先将人抗体重链 Fd 基因插入载体 pComb3, 转化大肠杆菌并经过大量扩增后提取质粒, 得到 Fd 载体 DNA。进一步将轻链基因克隆入该载体中。电转化大肠杆菌后, 计数在含羧苄青霉素的平板上出现的抗性菌落数, 推知构建出的人抗体 Fab 库的库容量为 1.2×10^6 。随机挑取 12 个菌落, 提取质粒用 XbaI 酶切, 电泳后见有 6 个质粒带滞后 (见图版 I-1 中的 1、4、6、9、10、12 道), 据此认为该库中含有重、轻链基因的重组子为 50%。从这些重组子中随机选取 4 个质粒 DNA, 经 SacI + XbaI 或 XhoI + SpeI 双酶切, 电泳后均见有 660bp 的酶切片段产生 (图版 I-2), 其分子量同 PCR 扩增的抗体基因^[3], 进一步证明这些克隆中含有抗体重链 Fd 基因和轻链基因。感染 VCSM13 后, 对噬菌体上清用 PEG 沉淀浓缩, 得到了噬菌体滴度为 5.1×10^{14} cfu/ml 的噬菌体抗体库。随机挑取 12 个菌落作质粒单酶切分析, 发现插入重、轻链基因的克隆数为 3/12 (图版 I-3-A)。

2.2 淘筛对噬菌体抗体的富集

用纯化的甲肝抗原, 对构建的噬菌体抗体库进行了 3 轮淘筛。淘筛对噬菌体抗体的富集作用见表 1。

表 1 淘筛对噬菌体抗体的富集效应

Table 1 Selective enrichment of phage antibodies during panning

Rounds of panning	Input /cfu	Eluted cfu	Yield/%	Clones containing Fab genes
0	-	-	-	3/12
1	5.1×10^{12}	7.2×10^5	1.40×10^{-5}	6/12
2	1.8×10^{13}	6.0×10^6	3.30×10^{-5}	11/12
3	4.3×10^{12}	8.7×10^7	2.04×10^{-3}	12/12

Yield/% = (No. of phage eluted \times 100)/(No. of phage input)

每次淘筛后随机挑取 12 个经噬菌体感染的细菌集落,提取质粒用 XbaI 单酶切电泳分析,结果见图版 I-3。

2.3 噬菌体抗体的鉴定

2.3.1 噬菌体抗体的抗原结合活性: 从第 3 次淘筛后洗脱下来的噬菌体感染的细菌集落中随机挑选 50 个克隆制备噬菌体抗体上清液,用夹心 ELISA 法检测与甲肝抗原(HAVAg)的结合活性,其中有 26 个克隆呈 ELISA 阳性(以 P/N 值 > 4 判为阳性),阳性率为 50%。表 2 为其中的 5 个克隆与 HAVAg, 乙肝表面抗原(HBsAg)及小牛血清白蛋白

表 2 噬菌体抗体与 HAVAg 结合反应的 ELISA 测定

Table 2 Binding of phage antibodies with HAVAg in ELISA

Phage antibody /Clones	HAVAg	HbsAg	BSA
517	0.83 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01
597	0.86 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.01
629	0.69 ± 0.05	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.02
646	0.98 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.00
655	0.75 ± 0.04	0.14 ± 0.01	0.09 ± 0.02

表 3 噬菌体抗体的 ELISA 竞争抑制实验

Table 3 Competitive inhibition ELISA of phage antibodies

Phage antibody /Clones	Inhibition/%		
	Anti-HAVAb/mg·ml ⁻¹		
	980	98	9.8
517	80	45	24
597	85	60	34
629	70	47	34
646	80	58	40
655	78	52	40

Percentage of inhibition = $\frac{\text{Control OD}_{490} - \text{Inhibition OD}_{490}}{\text{Control OD}_{490}}$

$\times 100\%$

(BSA)的 ELISA 测定结果。

2.3.2 ELISA 竞争抑制实验: 用纯化的人抗甲肝多抗(9.8mg/ml)与抗甲肝噬菌体抗体,对甲肝抗原作 ELISA 竞争抑制实验,结果见表 3。

2.3.3 抗甲肝噬菌抗体阳性克隆 DNA 的酶切鉴定: 将抗甲肝噬菌体抗体阳性克隆 517、597、629、646、655 摇匀后提取质粒 DNA,加入 SacI + XbaI 双酶切,琼脂糖凝胶电泳分析可见约 660bp 的酶切片段(图版 I-4-A),证明这 5 个阳性克隆含有轻链基因。加入 SpeI + XhoI 双酶切,同样在琼脂糖凝胶上可见约 660bp 的 DNA 片段(图版 I-4-B),证明这 5 个阳性克隆也含有重链 Fd 基因。

3 讨 论

甲肝抗原能对抗体库中表面呈现甲肝人单抗的噬菌体起到特

异性富集作用。这是噬菌体抗体库技术特有的优越性^[4]。正是由于这种高效的淘筛作用,从一个噬菌体抗体库不仅能够筛选出高亲和力的抗体^[5],而且还可同时筛选出抗不同抗原的抗体^[6]。

用夹心 ELISA 法对噬菌体抗体的鉴定实验表明,呈 ELISA 阳性的噬菌体抗体只与甲肝抗原结合,而非相关抗原不发生反应;且这些 ELISA 阳性的噬菌体抗体与甲肝抗原的结合作用,能被纯化的人抗甲肝多抗呈剂量相关抑制。这些结果充分证实我们筛选出来的人源性噬菌体抗体,具有抗甲肝抗原的特异性。

噬菌体抗体库技术为人源性特异性抗体的制备提供了新途径。由于直接从基因水平制备抗体,消除了输血性传播病毒的隐患,加之噬菌体抗体可以在大肠杆菌中大量表达,使抗体的制备变得简单、经济。这些优越性使得噬菌体抗体有可能成为新型的免疫防治制剂。因此,抗甲肝噬菌体抗体制备的研究,在甲型肝炎的特异性防治研究领域具有实际意义。

参 考 文 献

- 1 Winter G, Milstein C. *Nature*, 1991, **349**(6307):293~299
- 2 Barbas C F, Lerner R A. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 1991, (2):119~124
- 3 万泽生, 王海涛, 姜绍璋. *细胞与分子免疫学杂志*, 1997, **13**(1):20~23
- 4 Winter G, Griffiths A D, Robert E *et al.* *Annu Rev Immunol*, 1994, **12**:433~455
- 5 Griffiths A D, Williams S C, Hartley O *et al.* *EMBO J*, 1994, **13**(14):245~3260
- 6 Sanna P P, Williamson R A, Logu A D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(4):6439~6443
- 7 邢玉兰. 见:高寿征主编, *病毒性肝炎防治研究*, 北京:北京出版社, 1998, 1~12.

Selection of Human Anti-HAV McAb from a Phage Antibody Library

Wan Zesheng¹ Wang Haitao² Jiang Shaozhun³

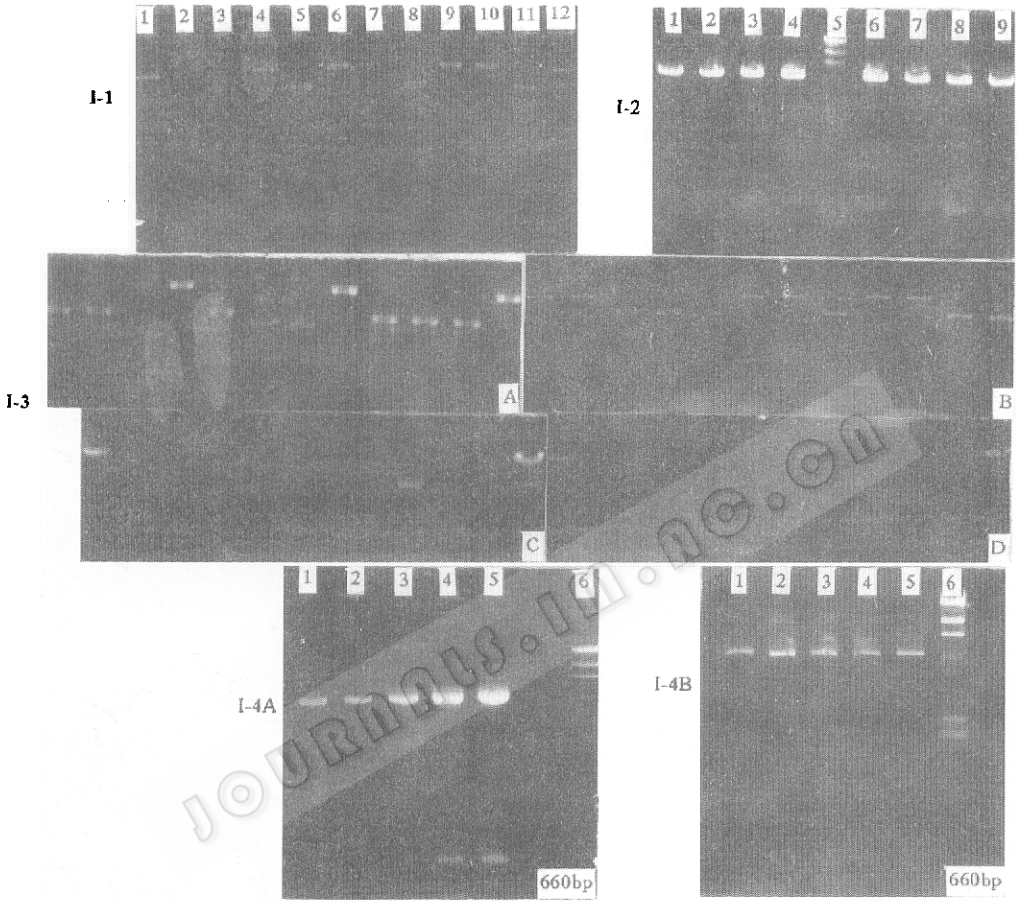
(*Department of Microbiology, The Third Military Medical University, Chongqing 400038*)¹

(*Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Science, Beijing 100071*)²

(*Department of Microbiology of The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032*)

Abstract The phage displaying antibody fragments were subjected to three rounds of panning with HAV antigen in solid phase. The eluted phage was enriched nearly 100 fold, and the percentage of recombinant clones increased from 25% to 100% after three rounds of panning. The HAV antigen-specific monoclonal antibodies were selected by sandwich ELISA, and the specificity of these antibodies was further confirmed by competitive inhibition ELISA.

Key words Phage antibody library, human McAb, hepatitis A virus



I-1 Restriction patterns of recombinant clones from a human Ig Fab library with XbaI
 I-2 Restriction patterns of recombinant clones from a human Ig Fab library with XbaI + SaeI(1~4) or with XhoI + SpeI(6~9); 5. λ DNA/HindIII marker
 I-3 Restriction patterns of recombinant phage antibody clones
 A. Before panning;
 B. After the 1st round panning;
 C. After the 2nd round panning;
 D. After the 3rd round panning
 I-4 Restriction patterns of recombinant phage antibody clones
 A. Light-chain genes
 B. Heavy-chain genes
 1. Clone 517; 2. Clone 597; 8. Clone 629;
 4. Clone 646; 5. Clone 655.
 6. λ DNA/HindIII marker