

# 人源性天然抗体库的构建及淀粉样蛋白 A $\beta_{1-42}$ 寡聚体单链抗体的筛选和鉴定

包福祥<sup>1,2</sup>, 何金生<sup>1</sup>, 曹贵方<sup>2</sup>, 尹凡<sup>1</sup>, 王鑫<sup>1</sup>, 庞思媛<sup>1</sup>, 张莹<sup>1</sup>, 洪涛<sup>1</sup>

1 北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044

2 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018

**摘要:** 本研究旨在利用噬菌体展示技术构建人源性天然抗体库, 以可溶性 A $\beta_{1-42}$  寡聚体对抗体库进行筛选获得针对低分子量 A $\beta_{1-42}$  寡聚体的特异性单链抗体。利用 RT-PCR 法从 10 个健康人外周血淋巴细胞中得到全套人抗体 VH 和 VL 基因, 经过重叠延伸 PCR 将 VH 和 VL 连接得到 scFv 片段, 将 scFv 片段酶切后克隆至 pCANTAB5E 噬菌体载体, 电转化 TG1 感受态菌, 获得库容为  $2.5 \times 10^9$  单链抗体库。经辅助噬菌体 M13K07 拯救, 以可溶性 A $\beta_{1-42}$  寡聚体为抗原, 对抗体库进行 4 轮筛选, ELISA 法筛选特异性识别 A $\beta_{1-42}$  寡聚体的阳性克隆, 将筛选到的阳性克隆 B19 转化至 *E. coli* HB2151 菌, 诱导表达可溶性 scFv 抗体。SDS-PAGE 及 Western blotting 分析结果显示可溶性 scFv 抗体获得了正确表达, 且能够与 A $\beta_{1-42}$  三聚体及纤维特异性结合, 亲和力( $K_d$ )为  $9 \times 10^{-6}$  mol/L。A $\beta_{1-42}$  寡聚体特异性单链抗体的获得为老年性痴呆(AD)的治疗研究奠定了基础。

**关键词:** 人源性天然抗体库, A $\beta_{1-42}$  寡聚体, 单链抗体, 老年性痴呆

## Isolation and identification of a human single chain Fv antibody against amyloid-beta 1-42 soluble oligomers from a human phage display library

Fuxiang Bao<sup>1,2</sup>, Jinsheng He<sup>1</sup>, Guifang Cao<sup>2</sup>, Fan Yin<sup>1</sup>, Xin Wang<sup>1</sup>, Siyuan Pang<sup>1</sup>, Ying Zhang<sup>1</sup>, and Tao Hong<sup>1</sup>

1 College of Life Sciences & Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China

2 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China

**Abstract:** To get specific scFv (Single-chain fragment variable) antibody against soluble A $\beta_{1-42}$ (Amyloid-beta) oligomers, we constructed a human single-chain Fv (scFv) antibody library by phage display technology. Using RT-PCR, we amplified the variable heavy (VH) and variable light (VL) genes from peripheral blood lymphocytes (PBL). Then we obtained the scFv fragments through SOE-PCR, and the scFv fragments were cloned into the vector pCANTAB5E and electroporated into competent *Escherichia coli* TG1 cells. Consequently, a scFv phage display library containing  $2.5 \times 10^9$  clones was constructed. The recombinant phagemids were rescued by reinfection of helper phage M13K07. Recombinant phages specific for A $\beta_{1-42}$  oligomers were enriched after four rounds

**Received:** April 1, 2009; **Accepted:** May 15, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02A247), Research Foundation of Beijing Jiaotong University (No. 2007RC006).

**Corresponding author:** Jinsheng He. Tel: +86-10-51684080, Fax: +86-10-51683887, E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA02A247), 北京交通大学科技基金(No. 2007RC006)资助。

of biopanning and the antigen-positive clones were selected from the enriched clones by phage ELISA. Positive clone B19 was used to infect *E. coli* HB2151 to express soluble scFv antibody. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the soluble scFv B19 antibody was expressed successfully and could bind specifically to A $\beta$ <sub>1-42</sub> trimer and protofibril. The specific scFv against A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomers can be used in the therapeutic research on Alzheimer's disease.

**Keywords:** human phage display library, A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomers, single chain Fv antibody, Alzheimer's disease

老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)是一种渐进性神经退行性疾病,其病理特征是渐进性的老年斑沉积、神经突触丢失和神经纤维缠结,临床表现为记忆功能衰减及识别能力障碍,同时伴有各种神经症状和行为障碍。

越来越多的研究证明,在 AD 病理过程中,可溶性 A $\beta$ 寡聚体,亦被称作 ADDLs(A $\beta$ -derived diffusible ligands)是具有神经细胞毒性的关键部分,而非早前所提出的 A $\beta$ 单体及纤维<sup>[1-2]</sup>。根据制备的条件不同,ADDLs 主要包含 3~6 聚体,甚至到更大分子量的 24 聚体等,在纳摩尔浓度时就可以杀死海马神经元细胞<sup>[3-6]</sup>。在 APP 转基因小鼠中,少量的可溶性 A $\beta$ 寡聚体就能够暂时性并有力地阻断小鼠的学习能力而没有任何神经损伤,其中 ADDLs 的 3 聚体是主要的毒性部分,2 聚体和 4 聚体也具有一定的活性<sup>[7-8]</sup>。

随着对于 AD 致病机理研究的深入,A $\beta$ 寡聚体逐渐成为 AD 诊断和治疗的主要靶点。由于 A $\beta$ 主动免疫引起部分 AD 病人出现脑膜脑炎,因此暂停了主动免疫治疗 AD 的二期临床试验<sup>[9-10]</sup>。一般认为用于主动免疫治疗的 AN1792 的毒副作用是由于 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 含有 T 细胞抗原决定簇,引起了较强的 T 细胞和小胶质细胞反应,而且所用佐剂 QS-21 主要引起 Th1 型免疫反应,增强了 T 细胞反应,促进脑膜炎的发生<sup>[11-12]</sup>。

此后被动免疫治疗 AD 成为研究的热点。Lambert 和 Lee 等<sup>[13-15]</sup>制备了能够特异性识别 ADDLs 和 A $\beta$  纤维的单克隆抗体。通过体外和 APP 转基因小鼠实验证明,针对 A $\beta$ 寡聚体的单克隆抗体能够识别 AD 病人脑组织切片中的 A $\beta$ 斑块,并且对 APP 转基因小鼠的学习和记忆损伤有明显的改善作用,实验证明被动免疫治疗 AD 是安全、有效的替代方案。

本实验利用噬菌体展示技术(Phage display)构建了库容为  $2.5 \times 10^9$  的天然抗体库。利用 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 寡聚体作为抗原筛选获得了特异性针对 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 寡聚体的人源性单链抗体,为 AD 临床诊断治疗药物的进一

步研究奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

10 个健康人外周血浓缩白细胞购自北京市红十字血液中心;淋巴细胞分离液购自北京赛驰生物科技有限公司;Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品;A $\beta$ <sub>1-42</sub> 肽由上海生工生物工程技术有限公司合成,纯度为 95%,聚合时用六氟异丙醇充分溶解合成肽,室温在通风橱内使 HFIP 挥发,然后用 DMSO 溶解合成肽,并用 F12 培养基稀释,4 °C 放置 24 h 后分装保存至 -80 °C<sup>[16-17]</sup>;Expression Module/Recombinant phage antibody system, HRP/anti E-tag conjugate 抗体,RPAS Purification Module 购自 Amersham Pharmacia 公司;RT 试剂盒为 Promega 公司产品;BstNI 酶购自 NEB 公司;SfiI 和 NotI 限制性内切酶,Ex Taq DNA 聚合酶,T4 DNA 连接酶,胶回收试剂盒,DL2000 和 DL15000 Marker 均购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒为 OMEGA Bio-Tec 产品;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 PCR 引物

引物设计参考文献<sup>[18-20]</sup>,引物设计包括 6 种 VH 家族基因,11 种 VL 家族基因,这些抗体基因覆盖了人抗体基因多样性的 95%以上,所有引物均由北京奥科生物科技有限公司合成(表 1)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 外周血淋巴细胞的分离及 RNA 的提取

将血液用等量的 PBS 缓冲液稀释后缓慢加到盛有淋巴细胞分离液的离心管中,血液与淋巴细胞分离液的体积比是 2:1,2000 r/min 离心 20 min,小心吸取淋巴细胞絮状带到另一离心管中,用 PBS 缓冲液洗淋巴细胞 2 次,离心后尽量吸去管内液体,细胞计数后冻存于 -80 °C 冰箱。Trizol 试剂提取细胞总 RNA。凝胶电泳观察 RNA 的完整性,紫外分光光度计测定  $A_{260}/A_{280}$  比值,鉴定 RNA 的质量。

表 1 用于人 scFv 文库构建的引物

Table 1 Primers used for the construction of human scFv library

Primers (5'-3')
Human VH forward primers
VH1af: act gcg gcc cag ccg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct gg
VH2af: act gcg gcc cag ccg gcc cag gtc aac tta agg gag tct gg
VH3af: act gcg gcc cag ccg gcc cag gtg cag ctg gtg gag tct gg
VH4af: act gcg gcc cag ccg gcc cag gtg cag ctg cag gag tct gg
VH5af: act gcg gcc cag ccg gcc cag gtg cag ctg ttg cag tct gg
VH6af: act gcg gcc cag ccg gcc cag gta cag ctg cag cag tca gg
scFvf: atc gac gct act gcg gcc cag ccg gcc cag gt
Human HJ reverse primers
HJ1-2ar: tcc gcc aga acc gcc tcc acc tga gga gac ggt gac cag ggt gcc
HJ3ar: tcc gcc aga acc gcc tcc acc tga aga gac ggt gac cat tgt ccc
HJ4-5ar: tcc gcc aga acc gcc tcc acc tga gga gac ggt gac cag ggt tcc
HJ6ar: tcc gcc aga acc gcc tcc acc tga gga gac ggt gac cgt ggt ccc
Human V $\kappa$ forward primers
V $\kappa$ 1af: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc gac atc cag atg acc cag tct cc
V $\kappa$ 2af: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc gat gtt gtg atg act cag tct cc
V $\kappa$ 3af: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc gaa att gtg ttg acg cag tct cc
V $\kappa$ 4af: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc gac atc gtg atg acc cag tct cc
V $\kappa$ 5af: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc gaa acg aca ctc acg cag tct cc
Human J $\kappa$ reverse primers
J $\kappa$ 1r: gcg tca gag tgc ggc cgc acg ttt gat ttc cac ctt ggt ccc
J $\kappa$ 2r: gcg tca gag tgc ggc cgc acg ttt gat ctc cag ctt ggt ccc
J $\kappa$ 3r: gcg tca gag tgc ggc cgc acg ttt gat atc cac ttt ggt ccc
J $\kappa$ 4r: gcg tca gag tgc ggc cgc acg ttt gat ctc cac ctt ggt ccc
J $\kappa$ 5r: gcg tca gag tgc ggc cgc acg ttt aat ctc cag tgc tgt ccc
scFvr1: acg gct gcg tca gag tgc ggc cgc acg ttt
Human V $\lambda$ forward primers
V $\lambda$ 1f: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc cag tct gtg ttg acg cag ccg cc
V $\lambda$ 2f: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc cag tct gcc ctg act cag cct gc
V $\lambda$ 3af: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc tcc tat gtg ctg act cag cca cc
V $\lambda$ 3bf: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc tct tct gag ctg act cag gac cc
V $\lambda$ 4f1: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc cac gtt ata ctg act caa ccg cc
V $\lambda$ 5f: ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc cag gct gtg ctc act cag ccg tc
Human V $\lambda$ reverse primers
J $\lambda$ 1r: gcg tca gag tgc ggc cgc acc tag gac ggt gac ctt ggt ccc
J $\lambda$ 2-3r: gcg tca gag tgc ggc cgc acc tag gac ggt cag ctt ggt ccc
J $\lambda$ 4-5r: gcg tca gag tgc ggc cgc acc taa aac ggt gag ctg ggt ccc
scFvr2: acg gct gcg tca gag tgc ggc cgc acc ta
Linker sequences
Linker <sup>+</sup> : tca ggt gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggc tca ggc ggt gga ggc tgc
Linker <sup>-</sup> : cga gcc tcc acc gcc tga gcc acc tcc gcc aga acc gcc tcc acc tga

### 1.3.2 cDNA 第一链的合成及全套 VH 和 VL 基因片段的扩增

按照 Promega 公司 RT 试剂盒说明书, 以总 RNA 为模板, 用随机六聚体引物, M-MLV 酶反转录合成

cDNA 第一链。然后再以 cDNA 为模板, 分别用 VH 和 VL 上下游引物, Ex Taq 酶扩增全套 VH 和 VL 基因。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并用 TaKaRa 胶回收试剂盒回收 VH 和 VL 目的片段。

### 1.3.3 重叠 PCR 法拼接扩增 scFv 片段

首先利用延伸引物, 以回收的 VH 和 VL 片段为模板分别在 VH 的下游和 VL 的上游分别加上 Linker 的部分序列, 并且引入酶切位点。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并用胶回收试剂盒回收 VH+Linker<sup>-</sup>和 Linker<sup>+</sup>+VL 目的片段。

再将等量 VH+Linker<sup>-</sup>和 Linker<sup>+</sup>+VL 回收片段一起加入 50  $\mu$ L PCR 反应体系中, 重叠延伸 PCR 拼接成 scFv 片段, 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 40 s, 50 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 10 个循环。然后在上述体系中加入 scFvf 和 scFvr1(scFvr2)酶切位点引物, 补加 Ex Taq 酶及 buffer, 用水补至终体积为 100  $\mu$ L 继续扩增, 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并用胶回收试剂盒回收 scFv 片段。轻链分 $\kappa$ 和 $\lambda$ 亚型, 共连接了 66 管。

### 1.3.4 人源性天然抗体库的构建

将纯化的 scFv 片段与 pCANTAB5E 噬菌体载体用 Sfi I、Not I 双酶切后纯化, 并用 T4 连接酶于 16 °C 连接 16 h。连接产物电转化至感受态 TG1 细胞, 电转化后立即加入 2 $\times$ YT-AG 培养液中, 于 37 °C、250 r/min 培养 1 h。取少量菌液, 用 2 $\times$ YT 培养液以 10 倍梯度稀释后, 分别取 100  $\mu$ L 涂布 SOBAG 平板, 30 °C 培养过夜, 计算菌落数, 测定库容。其余转化后的菌液以 100  $\mu$ L 每板涂布 SOBAG 平板, 30 °C 培养过夜, 2 $\times$ YT 洗下菌落, 加入无菌甘油使终浓度为 20%, 混匀后于 -80 °C 低温冰箱保存。因为抗体轻链又分为 $\kappa$ 和 $\lambda$ 亚类, 所以建库时将 VH 与 V $\kappa$ , VH 和 V $\lambda$  拼接的 scFv 分别转化后构建了 $\kappa$ 和 $\lambda$ 抗体库。

### 1.3.5 抗体库重组率的检测及多样性的鉴定

从 $\kappa$ 库和 $\lambda$ 库 SOBAG 平板上各随机挑取 10 个菌

落, 分别加入 5 mL 的 2×YT-AG 培养基中, 37 °C、250 r/min 培养过夜, 碱裂解法提取质粒, 以质粒为模板, 以 scFvF 和 scFvr1(scFvr2)为引物, 进行 PCR 扩增, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。检测是否含有插入子, 算出实际库容量。用 *Bst*NI 酶切, 4%凝胶电泳鉴定酶切产物, 观察每个质粒酶切片段的差异来确定单链抗体库的多样性。

### 1.3.6 单链抗体基因的表面展示及筛选

取适量单链抗体库于 2×YT-AG 培养基中培养至对数生长期, 加入感染复数为 20 的 M13K07 超感染, 离心弃上清, 2×YT-AK 重悬沉淀, 30 °C、250 r/min 培养过夜。离心取上清, 即为重组噬菌体表面展示抗体库, 加入 1/5 体积的 PEG/NaCl 沉淀上清中的重组噬菌体, 2×YT 培养基悬浮沉淀。

以 20 μg/mL 浓度的  $A\beta_{1-42}$  寡聚体包被 96 孔酶标板, 经 3% BSA 封闭后, 加入用 1% BSA 稀释到  $10^{12}$  CFU 的噬菌体抗体库, 37 °C 温育 1 h 后, PBS、PBST 各洗 5 次(第 2 轮到第 4 轮筛选, PBS、PBST 各洗 10 次)。用 0.1 mol/L Gly-HCl (pH 2.2)室温洗脱抗原吸附的重组噬菌体, 然后加入 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)进行中和。洗脱下的噬菌体加入 10 mL 对数生长期 TG1 菌中, 于 37 °C 温育 30 min 后, 37 °C、250 r/min 振荡培养 1 h。离心后沉淀用 10 mL 2×YT-AG 液悬浮, 振荡培养至对数生长期。培养至对数生长期的细菌再用 M13K07 辅助噬菌体超感染, 即可生成富集克隆的噬菌体表面呈现文库。如此“吸附-洗脱-扩增”的过程重复 4 轮。

### 1.3.7 ELISA 法筛选阳性克隆

取第 4 轮富集筛选后再感染的菌液涂布 SOBAG 平板, 30 °C 培养 20 h 以上。挑取单菌落并经 M13K07 辅助噬菌体拯救获得单个重组噬菌体。加入预先用 10 μg/mL pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释的  $A\beta_{1-42}$  寡聚体包被的酶标板中(阳性对照孔加  $A\beta$  商品化抗体 6E10、阴性对照孔加辅助噬菌体 M13K07, 空白对照孔加 2×YT 培养基)。37 °C 温育 2 h, PBST 洗 3 次后加入 1:5000 稀释的 HRP-鼠抗 M13 单抗(阳性对照孔二抗为 HRP/山羊抗小鼠 IgG)。37 °C 温育 1 h。PBST 洗板 6 次, 加入 TMB 底物, 室温温育 10 min 显色。每孔加入 50 μL 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止显色反应

后, 在 490 nm 下测每孔 OD 值。

### 1.3.8 单链抗体的可溶性表达及鉴定

取 ELISA 鉴定阳性的单克隆噬菌体上清 2 μL 加入 400 μL 对数生长期 *E. coli* HB2151 中, 37 °C 水浴 30 min 感染 *E. coli* HB2151。感染后的菌液 10 倍比稀释后涂 SOBAG-N 平板, 30 °C 培养 20 h 以上直到长出分离良好的菌落。挑取单菌落至 5 mL 2×YT-AG 培养基, 30 °C、250 r/min 培养过夜, 次日将 5 mL 菌液加入 50 mL 2×YT-AG 培养基中, 30 °C、250 r/min 培养至  $A_{600}$  约为 0.6, 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清。用 50 mL 2×YT-AI 培养基重悬细菌沉淀, 30 °C、250 r/min 培养过夜。4000 r/min 离心 20 min, 利用渗透休克法提取细菌周质中的可溶性 scFv 抗体。将诱导前、后细胞周质中的 scFv 抗体, 以 12% SDS-PAGE 进行初步鉴定, 并用 Western blotting 分析 scFv 抗体与抗 E-tag 抗体的特异性结合, TMB 法观察结果。

### 1.3.9 阳性克隆 scFv 抗体基因序列的测定

挑取阳性克隆单个菌落至 5 mL 2×YT-AG 中, 37 °C、250 r/min 振荡培养过夜, 碱裂解法提取质粒, 以 pCANTAB5E 载体两端固定序列 S1(5'-CAACgTgAAAAAATTATTATTCgC-3') 和 S6: (5'-gTAAATgAATTTCTgTATgAgg-3')为测序引物, 将质粒送北京奥科生物科技有限公司测序。将获得的序列登录 NCBI 数据库与 IMGT 数据库进行基因序列同源性分析。

### 1.3.10 可溶性 scFv 抗体的亲和力分析

通过竞争 ELISA 法<sup>[21]</sup>和 Western blotting 分析了 scFv 抗体的亲和力。用 1 μg/mL 浓度的  $A\beta_{1-42}$  寡聚体包被酶标板 4 °C 过夜, 用 3%的 BSA 于 37 °C 封闭 1 h, 在另外一个酶标板中将 scFv 抗体与  $10^{-10}$ ~ $10^{-3}$  mol/L 浓度的  $A\beta_{1-42}$  寡聚体混合, 加入等体积的封闭液室温孵育 1 h。将混合液加入抗原包被孔内, 37 °C 孵育 2 h, PBST 洗涤后, 每孔加入 100 μL 1:4000 稀释的 HRP/anti E-Tag 抗体, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤后加入 TMB 显色, 测定 490 nm 吸收值。以解离常数( $K_d$ )表示亲和力的大小。解离常数用达到最大  $A_{490}$  值的 50%时  $A\beta_{1-42}$  寡聚体浓度表示。

### 1.3.11 Western blotting 分析可溶性 scFv 抗体对 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体的识别

非变性条件下, 15% SDS-PAGE 胶分离  $A\beta_{1-42}$  寡聚体, 半干转移法将目的条带转移到硝酸纤维素膜

上, 将膜用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 用 scFv 抗体 (1:50) 在室温杂交 2 h, 然后与 HRP/anti E-Tag 抗体 (1:1000) 室温杂交 1 h, 最后用化学发光法显色。

## 2 结果

### 2.1 RNA 质量分析

RNA 凝胶电泳分析结果显示有 3 条完整的条带, 分别为 28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA (图 1), 说明 RNA 的完整性好, 紫外分光光度计测得纯度 ( $A_{260}/A_{280}$ ) 为 1.757, 浓度为 8.01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

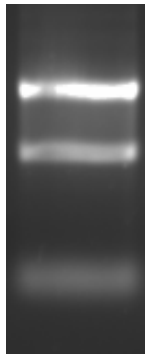


图 1 健康人外周血淋巴细胞总 RNA

Fig. 1 Total RNA extracted from peripheral blood lymphocytes of healthy donors.

### 2.2 全套 VH 和 VL 基因的扩增及 scFv 基因的拼接和扩增

分别用  $VH(\text{Rev})/VH(\text{For})$  和  $VL(\text{Rev})/VL(\text{For})$  为引物 PCR 扩增出全套  $VH$  和  $VL$  基因, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 分别可见一条特异条带,  $VH$  片段长度约为 380 bp,  $VL$  片段长度约为 330 bp, 与预期大小相符 (图 2A)。再用延伸引物 scFvf 和 scFvr1(scFvr2) 扩增  $VH+Linker^-$  和  $Linker^++VL$  片段 (图 2B)。重叠 PCR 法将  $VH$ 、 $VL$  和  $Linker$  片段拼接成  $scFv$  片段, 再将此  $scFv$  扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见约为 750 bp 条带, 与预计结果相符 (图 2C)。

### 2.3 抗体库库容, 重组率及多样性

经过多次电转化后计数长出的菌落数, 计算得到抗体库的库容量为  $2.5 \times 10^9$ , 从  $\kappa$  库和  $\lambda$  库各随机挑选 10 个菌落, 运用 scFvf 和 scFvr1(scFvr2) 引物扩增, 有 16 个菌落扩增出大小约 750 bp 的片段, 证实重组率为 80% (图 3), 从  $\kappa$  库和  $\lambda$  库中各随机取 5 个  $scFv$

扩增片段回收产物, 用内切酶  $BstN I$  酶切, 4% 琼脂糖凝胶电泳可见酶切图谱呈多样性, 证实单链抗体库多样性较好 (图 4)。

### 2.4 抗体库的富集和筛选

经过 4 轮筛选后, 针对  $A\beta_{1-42}$  寡聚体的噬菌体单链抗体增加了 500 多倍 (表 2)。将最后一轮筛选后感染的菌液铺 SOBAG 平板, 随机挑取分隔良好的菌落, ELISA 法检测单克隆噬菌体抗体与  $A\beta_{1-42}$  寡聚体的抗原亲和力, 获得阳性率较高的 B19 克隆做进一步的融合表达。

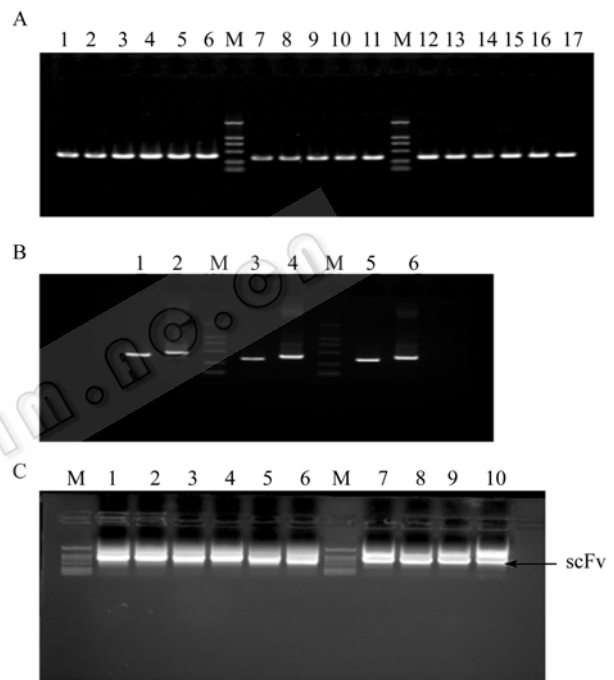


图 2  $VH$ 、 $VL$  和  $scFv$  片段 PCR 产物的凝胶电泳分析

Fig. 2 PCR products of  $VH$ ,  $VL$  and  $scFv$  fragments analyzed by agarose gel. (A) M: DNA marker; 1–6:  $VH$  PCR products; 7–11:  $V\kappa$  PCR products; 12–17:  $V\lambda$  PCR products. (B) M: DNA marker; 1:  $VH$ ; 2:  $VH+Linker$  PCR products; 3:  $V\kappa$ ; 4:  $V\kappa+Linker$  PCR products; 5:  $V\lambda$ ; 6:  $V\lambda+Linker$  PCR products. (C) M: DNA marker; 1–6:  $VH$  and  $V\kappa$  ligation; 7–10:  $VH$  and  $V\lambda$  ligation.

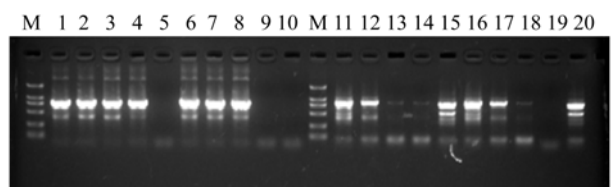


图 3 转化后抗体库的 PCR 鉴定

Fig. 3 Recombinant clones identified by PCR. M: DL2000 DNA marker; 1–10:  $scFv$  fragments amplified from  $\kappa$  library; 11–20:  $scFv$  fragments amplified from  $\lambda$  library.

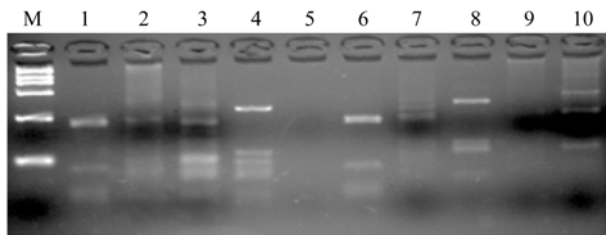


图4 scFv 基因的 BstNI 酶切图谱分析  
Fig. 4 Fingerprint analysis of scFv genes digested by BstNI. M: DL2000 DNA marker; 1-10: scFv genes from randomly picked 10 clones of the antibody library.

2.5 scFv B19 基因序列分析

测序结果显示, scFv B19 的 VH 片段长 371 bp, VL 片段长 324 bp, Linker 长 45 bp, scFv 全长 743 bp, E-tag 长 39 bp。该基因的 Blast 结果表明, VH 和 VL 都来源于人 mRNA。VH 属于重链, VL 属于轻链κ型, 同源性分别为 98%和 92%。

2.6 scFv B19 在大肠杆菌中的可溶性表达及鉴定  
阳性重组噬菌体克隆 B19 感染大肠杆菌 HB2151

并经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 结果显示在细胞周质中可表达分子量约为 31 kD 的目的蛋白。而未感染 B19 的阴性对照 E. coli HB2151 细胞周质提取物中没有目的蛋白条带(图 5A)。Western blotting 可见, 诱导后的阳性克隆细胞周质中的融合蛋白能够被 HRP/anti E-tag 抗体识别, 分子量约为 31 kD(图 5B)。

2.7 可溶性 scFv B19 的亲和力分析及对 Aβ1-42 寡聚体的特异性识别

为了确定 B19 可溶性抗体与 Aβ1-42 寡聚体的亲和力, 用竞争 ELISA 来间接测定二者的解离常数 (Kd)(图 6)。从图中可见, 所使用的竞争性抗原 Aβ1-42 寡聚体能够在约为 9×10<sup>-6</sup> mol/L 的浓度时, 达到最大 A<sub>490</sub> 值的 50%, 因此确定 B19 可溶性抗体与 Aβ1-42 寡聚体的 Kd 为 9×10<sup>-6</sup> mol/L。B19 可溶性抗体能够特异性的识别非变性状态下分离的分子量为 17 kD 和 105 kD 的 Aβ1-42 三聚体和原纤维, 而对 Aβ1-42 单体没有结合(图 7)。

表 2 针对 Aβ1-42 寡聚体噬菌体单链抗体的筛选

Table 2 Selection of scFv displaying phage binding to Aβ1-42 oligomers

Panning rounds	1	2	3	4
Total input phage (pfu)	10 <sup>12</sup>	10 <sup>12</sup>	10 <sup>12</sup>	10 <sup>12</sup>
Total output phage (pfu)	1.14×10 <sup>4</sup>	2.13×10 <sup>5</sup>	7.26×10 <sup>5</sup>	5.20×10 <sup>6</sup>
Ratio (output phage/input phage)	1.14×10 <sup>-8</sup>	2.13×10 <sup>-7</sup>	7.26×10 <sup>-7</sup>	5.20×10 <sup>-6</sup>

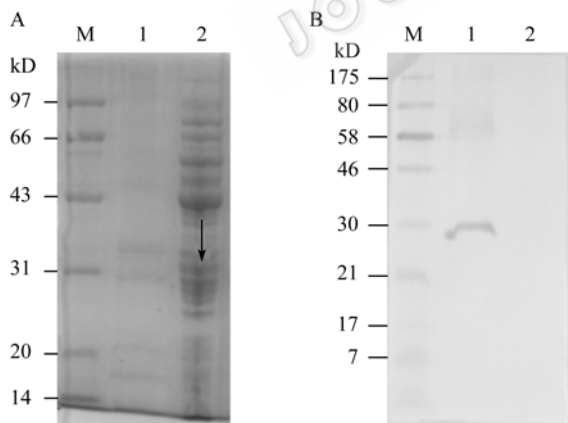


图 5 B19 在 E. coli HB2151 中的表达及鉴定  
Fig.5 Expression and identification of B19 in E. coli HB2151. (A) M: protein marker; 1: uninfected E. coli HB2151 periplasmic extract; 2: B19 infected and IPTG induced E. coli HB2151 periplasmic extract. (B) M: prestained protein marker; 1: B19 infected and IPTG induced E. coli HB2151 periplasmic extract; 2: uninfected E. coli HB2151 periplasmic extract.

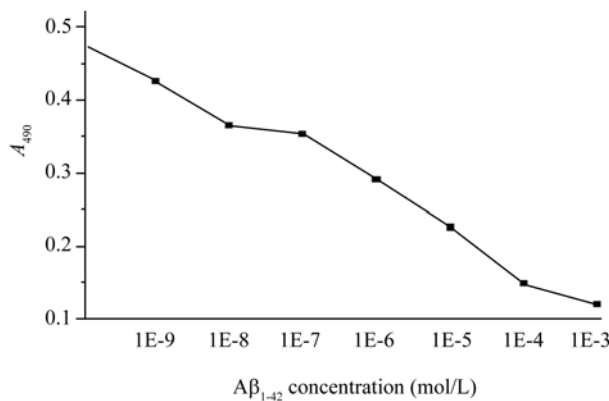


图 6 B19 可溶性抗体与 Aβ1-42 寡聚体的亲和力测定  
Fig. 6 Determination of dissociation constants(Kd) of soluble scFv B19 specific against oligomeric Aβ1-42 by ELISA.

3 讨论

针对 Aβ 的免疫治疗已经成为 AD 治疗中最有希

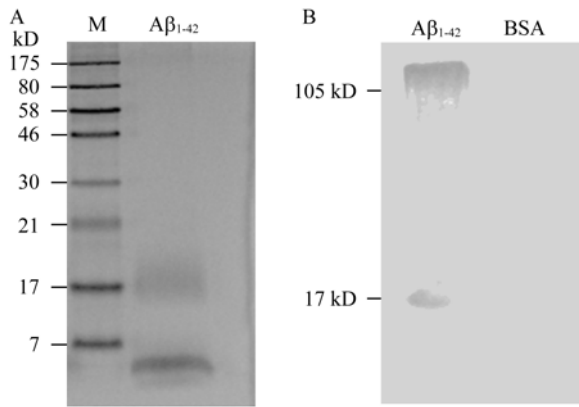


图7 Western blotting 分析 B19 可溶性抗体对 A $\beta_{1-42}$  寡聚体的识别

Fig. 7 Specificity of soluble scFv B19 against A $\beta_{1-42}$  oligomers analyzed by Western blotting. (A) SDS-PAGE analysis of non-denatured A $\beta_{1-42}$  oligomers. (B) Western blotting analysis of soluble B19 specific binding to oligomeric A $\beta_{1-42}$ .

望实现突破的一种策略。世界著名的医药企业和研究机构都纷纷加强了 AD 免疫治疗药物的研发步伐, 已经有 3 种主动免疫治疗药物和 4 种被动免疫药物进入临床二期或三期实验<sup>[22-24]</sup>。本实验构建了人源性天然噬菌体抗体库, 并从中筛选针对 A $\beta$  寡聚体特异性的人源性单链抗体, 避免了需经过免疫制备人源性抗体的难题。

为了易于筛选到针对目标抗原分子高亲和力、高特异性的单链抗体, 噬菌体单链抗体库必须具有足够大的容量以及抗体序列多样性<sup>[25]</sup>。结果表明, 10 个健康人的外周血淋巴细胞为我们提供了潜在的抗体的基因谱。并且采用改进的 SOE-PCR 方法组装单链抗体, 使组装过程更加简单, 效率更高<sup>[26-27]</sup>。通过运用最有效的电转化法, 获得了库容大 ( $2.5 \times 10^9$ )、多样性好、重组率高(80%)的高质量人源性天然噬菌体单链抗体库。该单链抗体库的库容和多样性足以能筛选到针对特定抗原的特异性单链抗体。

噬菌体抗体库的筛选效能与许多因素有关<sup>[28]</sup>, 一般来说每一轮“吸附-洗涤-洗脱-扩增”的筛选可以使抗体富集 20~2000 倍<sup>[29]</sup>。本研究结果显示经过 4 轮的富集筛选, 噬菌体抗体库产出率上升了 500 多倍, 说明抗原特异性抗体得到有效地富集。

ELISA、SDS-PAGE 和 Western blotting 结果显示, 本实验获得了特异性针对可溶性 A $\beta_{1-42}$  寡聚体

及纤维的单链抗体 B19, 亲和力( $K_d$ )为  $9 \times 10^{-6}$  mol/L, 发现 B19 对变性条件下的 A $\beta_{1-42}$  寡聚体没有结合活性(结果未显示)而且对非变性条件下的 A $\beta_{1-42}$  单体也没有结合活性, 推断 B19 可能为构象依赖性抗体<sup>[30]</sup>。虽然可溶性单链抗体经诱导得以表达, 但是还存在一些急待解决的问题: 1) 单链抗体与抗原结合力偏低, scFv 属于单价抗体, 只有一个抗原结合位点, 因而其亲和力、稳定性比单克隆抗体低。可以通过单链抗体的体外亲和力成熟来提高单链抗体的亲和力<sup>[31-33]</sup>。2) 可溶性单链抗体表达量较低。本试验中, 得到的单链抗体是以可溶性的形式表达在细胞质中的, 表达量非常低。本实验也尝试了利用工程菌对单链抗体进行表达, 但大部分的单链抗体以不可溶性的形式在包涵体内表达, 包涵体内表达的单链抗体不具备生物学功能, 需经变性及复性处理后恢复其活性。充分的复性是获得高亲和力 scFv 的关键。复杂的复性流程不可能获得理想的结果。为了提高可溶性单链抗体的表达量, 采用了杆状病毒表达系统, 一方面将可溶性的 scFv 在昆虫细胞中表达可保持 scFv 的生物学功能, 另一方面可通过在 scFv 片段上连接组氨酸标签可简化表达产物的纯化过程。此工作目前正在进行中。

本研究构建了针对可溶性 A $\beta_{1-42}$  寡聚体的人源性天然噬菌体抗体库, 获得了针对可溶性 A $\beta_{1-42}$  寡聚体及纤维的特异性单链抗体, 该特异性单链抗体的获得对于 AD 的被动免疫治疗具有一定的意义。单链抗体的应用将为 AD 的预防及治疗开辟新的途径。

## REFERENCES

- [1] Alpár A, Ueberham U, Brückner MK, *et al.* Different dendrite and dendritic spine alterations in basal and apical arbors in mutant human amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Res*, 2006, **1099**(1): 189–198.
- [2] Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, *et al.* The relationship between A $\beta$  and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2002, **22**(5): 1858–1867.
- [3] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8**(2): 101–112.

- [4] Ferreira ST, Vieira MN, De Felice FG. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life*, 2007, **59**(4/5): 332–345.
- [5] Glabe CC. Amyloid accumulation and pathogenesis of Alzheimer's disease: significance of monomeric, oligomeric and fibrillar A $\beta$ . *Subcell Biochem*, 2005, **38**: 167–177.
- [6] De Felice FG, Vieira MN, Saraiva LM, *et al.* Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: inhibitors of A $\beta$  oligomerization. *FASEB J*, 2004, **18**(12): 1366–1372.
- [7] Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci*, 2005, **8**(1): 79–84.
- [8] Townsend M, Shankar GM, Mehta T, *et al.* Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol*, 2006, **572**(2): 477–492.
- [9] Birmingham K, Frantz S. Set back to Alzheimer vaccine studies. *Nat Med*, 2002, **8**(3): 199–200.
- [10] Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A $\beta$ 42 immunization. *Neurology*, 2003, **61**(1): 46–54.
- [11] Cribbs DH, Ghochikyan A, Vasilevko V, *et al.* Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int Immunol*, 2003, **15**(4): 505–514.
- [12] Asuni AA, Boutajangout A, Scholtzova H. Vaccination of Alzheimer's model mice with A $\beta$  derivative in alum adjuvant reduces A $\beta$  burden without microhemorrhages. *Eur J Neurosci*, 2006, **24**(9): 2530–2542.
- [13] Lambert MP, Velasco PT, Chang L, *et al.* Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A $\beta$ . *J Neurochem*, 2007, **100**(1): 23–35.
- [14] Lacor PN, Buniel MC, Chang L. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci*, 2004, **24**(45): 10191–10200.
- [15] Lee EB, Leng LZ, Zhang B, *et al.* Targeting amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in A $\beta$  precursor protein (APP) transgenic mice. *J Biochem*, 2006, **281**(7): 4292–4299.
- [16] Lambert MP, Viola KL, Chromy BA, *et al.* Vaccination with soluble A $\beta$  oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *J Neurochem*, 2001, **79**(3): 595–605.
- [17] Klein WL. A $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int*, 2002, **41**(5): 345–352.
- [18] Sblattero D, Bradbury A. A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions. *Immunotechnology*, 1998, **3**(4): 271–278.
- [19] Marks JD, Tristem M, Karpas A. Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur J Immunol*, 1991, **21**(4): 985–991.
- [20] Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*, 1994, **12**: 433–455.
- [21] Friguet B, Chaffotte AF, Djavadi-Ohanian L, *et al.* Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*, 1985, **77**(2): 305–319.
- [22] Cheryl A. Hawkes, JoAnne McLaurin. Clinical immunotherapy trials in Alzheimer's disease. *Drug Discov Today*, 2008, **5**(3): 177–183.
- [23] Touchon J, Vellas B, Katchaturian Z. Editorial: CTAD international research conference: clinical trials in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging*, 2009, **13**(3): 204.
- [24] Hawkes CA, McLaurin J. Immunotherapy as treatment for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*, 2007, **7**(11): 1535–1538.
- [25] Smothers JF, Henikoff S, Carter P. Phage display: affinity selection from biological libraries. *Science*, 2002, **298**(5593): 621–622.
- [26] Tang XM, Yang JT, Wang QM, *et al.* Application of an improved efficient SOE PCR in assembling scFv genes during construction of large human antibody library. *Acta Univ Med Anhui*, 2006, **41**(1), 10–12.  
唐晓明, 杨俊涛, 王清明 等. 新式 SOE PCR 高效组装人单链抗体在高容量人天然噬菌体抗体库中的应用. *安徽医科大学学报*, 2006, **41**(1), 10–12.
- [27] Tang XM, Wand QM, Yand JT, *et al.* Construction, characterization and preliminary application of a large naive human antibody library. *China Biotechnol*, 2005, **25**(10), 17–24.  
唐晓明, 王清明, 杨俊涛, 等. 大容量人天然抗体库的构建、鉴定及初步应用. *中国生物工程杂志*, 2005, **25**(10), 17–24.
- [28] Hughes-Jones NC, Bye JM, Gorick BD, *et al.* Synthesis of Rh Fv phage-antibodies using VH and VL germline genes. *Br J Haematol*, 1999, **105**(3): 811–816.
- [29] De Kruijff J, Terstappen L, Boel E, *et al.* Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(9): 3938–3942.
- [30] Yoshihara T, Takiguchi S, Kyuno A, *et al.* Immunoreactivity of phage library-derived human



- single-chain antibodies to amyloid beta conformers *in vitro*. *J Biochem*, 2008, **43**(4): 475–486.
- [31] Yang GH, Yoon SO, Jang MH, *et al*. Affinity maturation of an anti-hepatitis B virus PreS1 humanized antibody by phage display. *J Microbiol*, 2007, **45**(6): 528–533.
- [32] Steidl S, Ratsch O, Brocks B, *et al*. *In vitro* affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification. *Mol Immunol*, 2008, **46**(1): 135–144.
- [33] Kwong KY, Baskar S, Zhang H, *et al*. Generation, affinity maturation, and characterization of a human anti-human NKG2D monoclonal antibody with dual antagonistic and agonistic activity. *J Mol Biol*, 2008, **384**(5): 1143–1156.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 废水生物处理原理 (翻译版)

〔德〕Udo Wiesmann In Su Choi Eva Maria Dombrowski 著

盛国平 王曙光 译

978-7-03-024675-2 ¥65.00 2009年6月出版

本书在阐述废水生物处理基本原理的基础上,广泛论述了废水生物处理理论和实践的最新进展。主要内容包括微生物的新陈代谢过程及该过程中的化学计量学和动力学,氧气在气液界面的传质,处理高浓度有机废水的厌氧工艺,持久性污染物生物处理的最新研究结果,生物法脱氮、除磷过程的化学计量学和动力学,活性污泥数学模型,以及废水生物处理中的膜技术等。本书既注重基本知识和基本概念的介绍,又注重该领域的最新发展。

本书可作为环境及相关专业高年级本科生及研究生的教材和参考书,也可供相关专业的教师及科技人员参考。



### 动物遗传育种与克隆的分子生物学基础研究

李宁 朱作言等 著

978-7-0-023246-5 ¥86.00 2009年6月出版

本书介绍了“973”计划项目“农业动物遗传育种与克隆的分子生物学基础研究”的研究成果,内容包括:肉、奶产量及其品质性状主基因的分离、克隆、测序、定位分析和性状基因的表达调控,农业动物杂种优势的分子机理和分子遗传标记辅助选择改良机理的研究进展,以及体细胞克隆胚胎核质互作中细胞核活动规律、农业动物克隆繁殖的分子生物学机理的研究成果。这些重大科学问题的阐明,将为我国在21世纪的动物农业提供高产、优质、高效发展的遗传理论基础和高新技术。

本书可作为农业院校动物遗传育种专业和综合性大学动物科学相关专业研究生的参考用书,也可供以动物为研究对象的科研院所的研究人员参考阅读。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:阮芯 联系电话:010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>