

急性淋巴细胞白血病单链抗体(scFv)的筛选与鉴定*

马巍娜¹, 刘雪林², 宋宏彬², 沈建良¹, 黄友章¹, 刘毅¹, 向丹¹

(1. 中国人民解放军海军总医院血液科, 北京 100037;

2. 中国人民解放军军事医学科学院十所, 北京 100039)

摘要:目的 筛选急性淋巴细胞白血病病人单链可变区 scFv 抗体, 为进一步表达并得到其特异性强的抗体片段创造条件。方法 实验利用初诊急性淋巴细胞性白血病病人血清为包被抗原, 采用噬菌体表面展示技术, 从半合成的人源噬菌体抗体库中筛选其特异性噬菌体抗体, 首先把靶抗原包被于免疫平板后, 加入噬菌体抗体库, 这样能与靶抗原特异性结合的噬菌体就被固定在免疫平板上, 不能特异结合的噬菌体则被漂洗掉; 将特异结合的噬菌体洗脱下来, 感染大肠埃希菌, 就可以得到含特异抗体基因的噬菌粒。结果 经过3轮“吸附-洗脱-扩增”筛选过程, 获得抗原特异性较强的白血病病人可变区噬菌体抗体片段并鉴定。结论 获得了一株亲和性较好的抗体片段, 为下一步片段表达、鉴定及临床应用研究创造了条件。

关键词: 抗体; 噬菌体表面展示技术; 急淋白血病; scFv

中图分类号: R557.4; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)05-046-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.012

Screening and Characterization of Human Phage Antibody to Permethrin

MA Wei-na¹, LIU Xue-lin², SONG Hong-bin², SHEN Jian-liang¹, HUANG You-zhang¹, LIU Yi¹, XIANG Dan¹ (1. Department of Hematology, General Hospital of PLA Navy, Beijing 100037, China; 2. PLA Disease Control and Prevention, Beijing 100039, China)

Abstract: **Objective** To do screening acute lymphoblastic leukemia patients scFv antibody single chain variable region to create conditions for the expression and obtain further specificity of antibody fragments. **Methods** In this study, patients with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia serum as coating antigen using phage display technology, screening phage antibody specificity from the semi-synthetic human phage antibody libraries, the first to target the immune antigen-coated tablet, phage library was added, so that with the target antigen-specific binding phage antibody was immobilized on plates immunization, could not be specifically bound phages were rinsed. The eluted specific binding phage, *E. coli* infection. Could get the specific antibody gene containing phagemid. **Results** After three “adsorption-elution-amplification” screening process, got stronger leukemia patient antigen-specific phage antibody variable region fragment and identification. **Conclusion** Got better strain affinity antibody fragments, to create the conditions for the next fragment expression, identification and clinical application.

Keywords: antibodies; phage display technology; acute lymphoblastic leukemia; scFv

我国作为世界人口第一大国, 是白血病的高发国家, 而白血病作为一种全身性的恶性血液系统疾病, 纵观其发展情况, 不容乐观; 白血病是一类造血干细胞恶性克隆性疾病, 纵观其发展情况, 不容乐观。克隆性白血病细胞因为增殖失控、分化障碍、凋亡受阻等机制在骨髓和其他造血组织中大量增殖累积, 并浸润其它组织和器官, 同时正常造血受到抑制, 临床可见不同程度的贫血、出血、感染发热以及肝、脾、淋巴结肿大和骨骼疼痛等症状并可危及生命, 因而初诊白血病的分型成为白血病治疗的关键所在。

噬菌体人源抗体库构建的基本原理是从人外周血淋巴细胞或脾细胞中提取 mRNA, 反转录为 cDNA; 设计重链和轻链引物, 所建库不同, 要扩增的片段也不同, 组建 scFv 库扩增 VH, VL 片段。

将扩增片段随机重组于噬菌体或噬菌粒的表达载体上, 与噬菌体外壳蛋白基因融合, 由于重链和轻链是随机配对的, 因此称组合文库; 将重组表达载体转化大肠埃希菌, 并使片段展示于噬菌体的表面, 就形成了含有全套人抗体谱的人源抗体文库。抗体库中每个噬菌体相当于一个 B 细胞表达一种特异性人抗体, 每个噬菌体的头部都带有人抗体分子, 抗体分子的种类多少就代表了库容量大小(图 1)。

因此研究主要利用噬菌体抗体库表面展示技术(phage antibody library)^[1,2], 针对初诊急性白血病-急性淋巴细胞性白血病病人(B 细胞表达)血清进行筛选, 制备出具有高亲和力和特异性的噬菌体单链可变区 scFv 抗体片段并对其质粒(pCANTAB5E)进行表达, 构建急性白血病检测高

* 作者简介: 马巍娜(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物控制技术, Tel: 010-66958485, E-mail: mv4477@sina.com。

亲和力、高特异性噬菌体单链抗体的高效抗体制备技术,目的是得到一株较好的抗体基因片段以备用于临床或 CAR-T 细胞治疗。现报道如下:

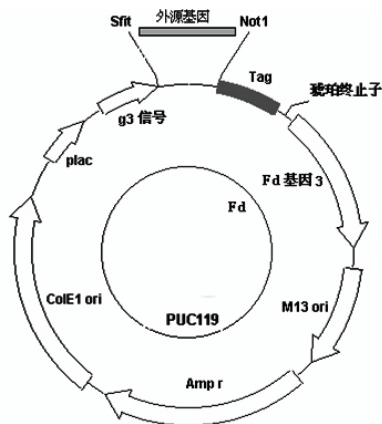


图1 噬菌体抗体库组成排列

1 材料与方法

1.1 患者资料 张××,女性,42岁,患者因持续发热半月余,白细胞 $240 \times 10^9/L$,由门诊收入我科,入科后患者一般情况可,骨穿和免疫分型最后确诊为“急性淋巴细胞性白血病(ALL)”,ph(-),B细胞表达,收集标本时已取得患者本人同意。

1.2 试剂 人源化噬菌体抗体文库为轻链可变区和重链可变区经甘氨酸接头(Gly4Ser)3连接的半合成抗体文库来自英国剑桥大学;应用的菌株为TG1,本实验室保存;盐酸克伦特罗抗原购自国家标准物质中心;辅助噬菌体 M13KO7(北京纽英伦生物技术有限公司),Wizard 质粒 DNA 提取纯化试剂盒(美国 Promega 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗 M13 噬菌体(HRP/Anti-鼠抗 M13)单克隆抗体(美国 GE 公司),大肠埃希菌 XL1-Blue 为本实验室保存。Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、修饰酶购自 TaKaRa 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 制备具有性纤毛的大肠埃希菌宿主菌的方法:噬菌体感染大肠埃希菌的前提是与其性纤毛结合。为了能够产生足够的性纤毛进行有效感染,37℃培养的大肠埃希菌必须在对数期内(OD600 为 0.4~0.6)。

1.3.2 辅助噬菌体(M13KO7)的制备:将原液浓度稀释至 1×10^{12} CFU/ml。如上例:需将原液作 265 倍稀释,取 100 μl 原液加入到 26.5 ml TE 中,分装至 EP 管(1 ml/管),-20℃保存备用。

1.3.3 筛选前抗体多样性的验证噬菌体单链的提取:将 1 μl 抗体库梯度稀释后侵染 OD600=0.5 的 TG1 涂 2×YT/AG 固体平板,37℃过夜培养,经过培养、离心、过夜、洗涤后,用 15 μl 溶解沉淀,即

得到噬菌体单链。DNA 指纹鉴定为证明噬菌体单链抗体,未插入片段前以 Not I /Sfi I 双酶切验证。

1.3.4 噬菌体的制备扩增噬菌体抗体库:取 500 μl 冻存的次级抗体库(或 100 μl 原抗体库),接种到 100 ml 2×YT(100 μg/ml 氨苄青霉素和 20 g/dl 葡萄糖),37℃摇床培养到对数期(OD600 为 0.4~0.6),水浴,10 800 g(或 12 000 r/min),4℃离心 15 min,收集上清,彻底混合后 4℃静置 2 h 以上(可过夜)。再次离心,噬菌体上清可在 4℃短期保存,若加 15 g/dl 甘油,可在 -70℃长期保存。噬菌体滴度测定噬菌体保存液的滴度应在 $10^{10} \sim 10^{12}$ CFU/ml 之间。

1.3.5 噬菌体抗体的免疫亲和筛选:筛选具体步骤:抗体库预处理后将靶抗原用包被缓冲液 1:6 稀释包被 48 孔免疫培养板(1 个孔),200 μl/孔,于 4℃包被过夜,BSA 封闭、弃上清,洗涤、Tris 中和和后感对数期 TG1 菌、测滴度,加辅助噬菌体(M13KO7),离心并收集上清,重复进行 3 轮“吸附-洗脱-扩增”筛选。

1.3.6 鉴定噬菌体抗体:经 3 轮筛选获得的克隆体生长在 96 孔酶联免疫板上,按上面的过程用 M13KO7 也可以收集到噬菌体抗体,但特异的与 ALL 噬菌体上清液就需用间接酶联免疫吸附法进行测定。

间接酶联免疫吸附法可以鉴定每轮筛选经聚乙二醇沉淀的结合噬菌体,与噬菌体克隆结合的是 ALL 抗体片段,而不是 BSA 或甘氨酸都独立存在。

1.3.6.1 ELISA 鉴定、竞争抑制 ELISA 鉴定噬菌体抗体:从第 3 轮筛选抗体滴度测定平板中挑取单克隆菌落 90 个。接种到含 500 μl 2×YT 培养液(100 μg/ml Amp,20 g/dl 葡萄糖)的 Ep 管中,200 r/min,37℃摇床培养过夜。包被、封闭、洗涤后,弃去洗涤液,加入底物显色液,37℃静置 10~30 min 显色,得到竞争抑制 ELISA 鉴定结果。

1.3.6.2 酶切鉴定质粒的提取和双酶切:结合 3 次 ELISA 重复试验的 A 值,对其进行双酶切鉴定,该噬菌体抗体联于 pHEN 载体中,确定插入酶切位点后,从噬菌体抗体阳性克隆中提取质粒,将选取鉴定阳性的克隆,接到 5 ml 的含有氨苄青霉素的 2×YT 培养液中,培养至对数期后提取质粒,用 Nanodrop 核酸定量分析仪测定质粒的浓度。用内切酶 NotI 和 SfiI 进行双酶切,双酶切的反应体系如下:质粒 10 μl(2 μg),NotI 2 μl,SfiI 2 μl,10×M buffer 4 μl,加水补齐至终体积为 20 μl 体系 37℃水浴 4 h 后 50℃水浴 2 h。后行 1 g/dl 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切产物。

2 结果

2.1 具有免疫活性的噬菌体单链抗体库的筛选

单链可变区抗体特异性噬菌粒得到了富集:第1轮产出率(产出率=捕获的噬菌体数量/投入的噬菌体数量)为 2×10^7 ,淘洗次数的增加,从固相平板洗脱下来的噬菌粒数显示了增加的趋势,在第3轮筛选后结合到包被 ALL 噬菌体(产出率为 1.0×10^{-4})与第1轮相比,富集了20倍,富集倍数(富集倍数=第3轮产出率/第1轮产出率)。

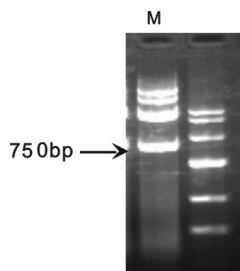
2.2 ALL 单链可变区抗体的鉴定 从第3轮筛选后得到的细菌集落中随机挑选90克隆,用ELISA方法测定上清液中含有的噬菌体单链可变区抗体与 ALL 抗原结合活性。其中有15株ELISA的吸光度(A)值在490 nm读数数值较高。对这些噬菌体抗体进行与BSA的交叉反应试验后,确有7个(ALL1~5)交叉反应较弱,数据见表1(抑制率=抑制前-抑制后/抑制前数值)。

2.3 对初筛出 ALLscFv 抗体的酶切鉴定 分别接种所选阳性克隆于5 ml $2 \times$ YT 培养液中,37℃,200 r/min 过夜振荡培养。采用 Not I 与 Sfi I 进行双酶切鉴定。1 g/dl 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切产物。结合3次ELISA重复试验的A值,对其进行双酶切鉴定,该噬菌体抗体联于 PHEN 载体中,确定插入酶切位点后,从噬菌体抗体阳性克隆中提取质粒,经 Sfi I /Not I 酶切后,片段大小约为750 bp 左右,与目的基因片段相符,见图2。

表1 A 值

序号	ELISA		竞争抑制 ELISA
	抑制前	抑制后	
1	1.164±0.279	1.023±0.277	0.579±0.152
2	1.014±0.075	1.130±0.073	0.759±0.171
3	0.279±0.051	0.404±0.127	0.232±0.144
4	0.900±0.184	0.793±0.374	0.450±0.124
5	0.740±0.047	0.735±0.147	0.444±0.200
6	0.710±0.208	0.704±0.045	0.399±0.159
7	1.009±0.072	1.150±0.024	0.902±0.207

注:ELISA 阴性对照:0.404±0.141,抑制前阴性对照:0.506±0.042,抑制后阴性对照:0.297±0.084,空白对照均值:0.050±0.020。



M: makerDL2000; 对应片段大小约750 bp

图2 重组质粒 NotI/SfiI 酶切鉴定电泳图

3 讨论 目前,白血病常用的检查手段,包括物理学检查、外周血象检查、骨髓象检查、免疫学检查以及影像学检查等。物理学检查:也就是常说的查体;外周血象检查:取末梢血,了解血液中各细胞成分的变化,以便了解病情程度以及病情变化。骨髓穿刺检查:是诊断白血病必不可少的检查手段。免疫学检查:绝大多数白血病可以通过骨髓和外周血细胞的形态学检查诊断和分型,但也有部分鉴别不清,可以通过细胞免疫分型标记来解决,其对于指导治疗和预后评估有重大意义。其它:如影像学等检查均对了解白血病病变程度有一定意义。然而,上述检查手段耗时相对较长,如能寻求一种急性白血病快速检测分型方法,则对于挽救病人生命有重大意义。

噬菌体抗体库技术模拟了机体免疫系统的选择作用,展示在噬菌体表面的抗体能够在体外用固相化抗原进行筛选,同时由于噬菌体对大肠埃希菌的感染性,噬菌体抗体库技术能够以淘选的方式,为快速选择特异性抗体提供了简便而高效的操作系统^[11,12]。包括:①靶抗原吸附噬菌体抗体;②洗涤去除非特异性结合,收集与抗原结合的噬菌体抗体;③感染大肠埃希菌,使特异的噬菌体抗体扩增富集。经过3轮这样的“吸附-洗脱-扩增”的淘选,可使特异性噬菌体抗体的富集率达50%以上,筛选出占库容量仅为 10^8 的噬菌体,噬菌体抗体库技术借助这种高效筛选系统,能够方便地对库容量在1 012 以上的抗体进行筛选^[3~5]。

本研究拟利用噬菌体抗体库技术筛选急性白血病病人血清以制备其噬菌体抗体,噬菌体抗体库技术与多克隆抗体和单克隆抗体相比:噬菌体抗体库能够模拟天然抗体库,不需要免疫人和动物,提供了不经免疫制备抗体的可能;而且它能够模拟抗体亲和力成熟过程,可通过链置换、PCR 错配或随机致突变技术改变抗体亲和力,且与多克隆抗体和单克隆抗体相比:噬菌体抗体库技术的筛选范围广、时间周期短、操作简便、快速、规模生产成本低廉,目前,噬菌体抗体库技术,已经获得了大量针对病原微生物的抗体^[7~10],如人类免疫缺陷病毒(HIV)和衣原体抗体^[1,2]。这些噬菌体抗体中,许多具有临床诊断和治疗的应用前景^[3~6]。

而国内外先后有学者已利用噬菌体抗体库技术筛选恶性肿瘤病人血清^[13],表明这一研究结果将开辟一种新的抗体制备方法,从而为进一步建立急性白血病分型的快速检测方法和临床治疗以及CAR-T 细胞制备奠定基础。

参考文献:

[1] 乔媛媛,王 琰,陈晓穗,等. 大容量噬菌体抗体库的

- 构建及鉴定[J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2004, 24(3):194-197.
- Qiao YY, Wang Y, Chen XS, et al. Construction of a large single-chain phage antibody library[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2004, 24(3):194-197.
- [2] 南清振, 高蕾, 肖冰, 等. 大肠癌噬菌体抗体库的构建及初步鉴定[J]. 现代消化及介入诊疗, 2008, 13(1):1-5.
- Nan QZ, Gao L, Xiao B, et al. Construction and identification of the phage display antibody library of human colorectal cancer[J]. Modern Digestion and Interventional, 2008, 13(1):1-5.
- [3] 张建琼, 谢维, 张雪萍, 等. 人源抗丙型肝炎病毒噬菌体抗体库的构建、筛选及表达[J]. 上海免疫学杂志, 2000, 20(5):304-307.
- Zhang JQ, Xie W, Zhang XP, et al. Construction, screening and expression of hepatitis C virus specific phage antibodies combinatorial library[J]. Shanghai Journal of Immunology, 2000, 20(5):304-307.
- [4] 傅蓉, 刘刚, 戴红梅, 等. 利用 HER2/neu 胞外配体结合区 2 从噬菌体抗体库中筛选抗体及其初步鉴定[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(4):574-576.
- Fu R, Liu G, Dai HM, et al. Use of HER2/neu extracellular ligand binding area 2 from phage antibody libraries antibody screening and preliminary identification[J]. Journal of Biotechnology Communications, 2006, (4):574-576.
- [5] 葛晓冬, 刘友生, 王晓东, 等. 人源噬菌体抗体库的构建及抗人 NH-LBP 抗体的筛选与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(2):180-184.
- Ge XD, Liu YS, Wang XD, et al. Construction of human phage antibody library and screening and characterization of phage antibodies against N-terminal fragment of human lipopolysaccharide binding protein[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2005, 21(2):180-184.
- [6] Meulemans EV, Slobbe R, Wastervall P, et al. Selection of phage displayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody[J]. J Mol Biol, 1994, 244(4):353-360.
- [7] Moran MJ, Andris JS, Matsumoto Y, et al. Variable region genes of anti-HIV human monoclonal antibodies: Non-restricted use of the V gene repertoire and extensive somatic mutation[J]. Molecular Immunology, 1993, 30(16):1543-1551.
- [8] He F, Nie Y, Han Z, et al. Production of phage-displayed anti-idiotypic antibody single chain variable fragments to MG7 monoclonal antibody directed against gastric carcinoma[J]. J Chin Med Sci, 2001, 81(1):33-36.
- [9] 钟彦伟, 成军, 王刚, 等. 乙肝病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(2):153-154.
- Zhong YW, Cheng J, Wang G, et al. Screening on human phage gantibody of hepatitis B virus core antigen[J]. China Public Health, 2002, 18(2):153-154.
- [10] 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 的研究进展[J]. 国外医学病毒学分册, 2000, 7(1):14-17.
- Cheng J, Chen JM. The research progress of hepatitis C virus(HCV) non structural protein NS4A[J]. Foreign Medical Toxicology Pathol, 2000, 7(1):14-17.
- [11] 马巍娜, 刘雪林, 宋宏彬, 等. 抗甲硝唑人源 scFv 抗体筛选与鉴定[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(4):7-10.
- Ma WN, Liu XL, Song HB, et al. Screening and characterization of human phage antibody to metronidazole[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(4):7-10.
- [12] 马巍娜, 刘雪林, 宋宏彬, 等. 三聚氰胺人源 scFv 抗体筛选与鉴定[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3):10-13.
- Ma WN, Liu XL, Song HB, et al. Screening and characterization of human phage antibody to melamine[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(3):10-13.
- [13] 刘美红, 贺海平. 噬菌体肽库在宫颈癌血清肿瘤标志物筛选中的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(7):908-910.
- Liu MH, He HP. Application of phage display peptide library in screening of the tumor markers in the serum of cervical cancer[J]. J Mod Oncolo, 2015, 23(7):908-910.
- (上接 45 页)
- Pharm, 2015, 32(8):1028-1032.
- [20] Kulikov SN, Khairullin RZ, Varlamov VP. Influence of polycations on antibacterial activity of lysostaphin[J]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2015, 51(6):610-615.
- [21] Thangamani S, Mohammad H, Abushahba MF, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens[J]. Sci Rep, 2016(6):22571.
- [22] Askoxylakis V, Marr A, Altmann A, et al. Peptide-based targeting of the platelet-derived growth factor receptor beta[J]. Mol Imaging Biol, 2013, 15(2):212-221.
- [23] Forsman H, Onnheim K, Andreasson E, et al. Reactivation of desensitized formyl peptide receptors by platelet activating factor: a novel receptor cross talk mechanism regulating neutrophil superoxide anion production[J]. PLoS One, 2013, 8(3):e60169.
- [24] Xiao S, Charonko JJ, Fu X, et al. Structure, sulfatide binding properties, and inhibition of platelet aggregation by a disabled-2 protein-derived peptide[J]. J Biol Chem, 2012, 287(45):37691-37702.

收稿日期:2016-01-09

修回日期:2016-01-29

收稿日期:2016-05-04

修回日期:2016-07-04