

谱柱在位复性的效果进行了比较. 为定量比较几种复性方法的效果, 我们假定分泌型表达的可溶性 ScFv 在大肠杆菌中折叠后具有 100% 的活性, 以此为参照系 (见实验方法 1.3.5), 计算各种复性样品的相对复性率 (表 1). 通过对几种方法的相对复性率, 蛋白质回收率的比较发现; ScFv 在铜金属螯合亲和层析柱可进行在位复性, 但与透析法相比无明显优势. 其相对回收率低于透析法, 蛋白质丢失较多, 原因可能是在用不同浓度尿素的缓冲液长时间流洗过程中蛋白质也随之脱附. 其相对复性率略高于透析法, 远低于凝胶色谱法, 国外有人用铜金属螯合亲和层析柱柱透析的方法对 rh TIMP-2 复性取得了较好的结果^[5], 我们的结果不理想的原因可能是在我们的体系中 ScFv 分子中的聚组氨酸尾巴被固定于柱上限制了分子的自由折叠. 抗 HBsAg ScFv 经凝胶色谱 Sephacryl S-200 可进行柱复性 (相对复性率 98%, 蛋白质回收率 81%, 蛋白质纯度达 95% 以上), 复性效果明显优于前二者. 我们对抗胃癌鼠单抗 3H11 ScFv 包含体应用凝胶色谱法进行柱复性也取得了良好的结果. 凝胶色谱柱复性的成功可能是由于凝胶色谱可使分子在温和的条件下缓慢去除变性剂近似分子的自然重排, 另外凝胶色谱法在纯化复性过程中可使复性分子与错误重排的及多聚体分子分离. 由于其将纯化与复性结合在一起简化了操作程序, 提高了蛋白质回收率, 值得进一步推广应用.

参 考 文 献

- 1 王 琰, 刘群英, 高荣凯, 等 (Wang Y, Liu Q Y, Gao R K, *et al*). 单链抗体 (ScFv) 表达载体的构建及抗 HBsAg 的表达. 中华微生物学和免疫学杂志 (Chinese J Microbiol Immunol), 1997, 17 (1): 68~ 71
- 2 高荣凯, 王 琰, 刘群英, 等 (Gao R K, Wang Y, Liu Q Y, *et al*). 抗乙肝病毒表面抗原单链抗体在大肠杆菌中的高效表达. 中国免疫学杂志 (Chinese J Immunol), 1999, 15 (2): 122~ 123
- 3 朱迎春, 王 琰, 刘群英, 等 (Zhu Y C, Wang Y, Liu Q Y,

et al). 重组人 Fab 金属螯合层析法纯化条件的研究. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1997, 24 (2): 136 ~ 139

- 4 Werner M H, Clore G M, Gronenborn A M, *et al*. Refolding proteins by gel filtration chromatography. FEBS letters, 1994, 345 (2): 125~ 130
- 5 Negro A, Onisto M, Masiero L, *et al*. Synthesis and refolding of human TIMP-2 from *E. coli* with specific activity for MMP-2. FEBS letters, 1995, 360 (1): 52~ 56
- 6 Zhang H, Lake D F, Barbuto J A M, *et al*. A human monoclonal antimeelanoma single-chain Fv antibody derived from tumor-infiltrating lymphocytes. Cancer Research, 1995, 55 (12): 3584 ~ 3591
- 7 Kurucz I, Titus J A, Jost C R, *et al*. Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv protein from bacterial inclusion bodies. Molecular Immunology, 1995, 32 (17): 1443~ 1452
- 8 Kipriyanov S M, Dubel S, Breitling F, *et al*. Recombinant single-chain Fv fragments carrying C-Terminal cysteine residues: production of bivalent and biotinylated miniantibodies. Molecular Immunology, 1994, 31 (14): 1047~ 1058

In Situ Refolding of Bacterially Expressed ScFv on Column. ZHU Ying-Chun, WANG Yan, GAO Rong-Kai, LIU Qun-Ying, HUA Bing, CHEN Yu-Ping (Navy General Hospital, Beijing 100037, China).

Abstract Purification and refolding of bacterially expressed anti HBsAg ScFv by means of *in situ* refolding on column were investigated. Three refolding approaches were adopted: dialysis, *in situ* refolding via metal chelated chromatography and via gel filtration chromatography. The relative refolding index and relative recovery of the ScFv inclusion body were compared using the three procedures. The results showed that the refolding on gel filtration column (sephacryl S-200) was far more efficient than the other two approaches, with relative refolding index of 98% and relative recovery of 81%, illustrating the potential of this technique in production of recombinant ScFv.

Key words single-chain Fv (ScFv), inclusion bodies, purification, refolding

PCR 条件及程序改变对抗体库多样性的影响*

田学军 寿成超 孟 麟

(北京医科大学临床肿瘤学院, 北京 100034)

董志伟

(中国医学科学院肿瘤医院, 北京 100021)

摘要 用家族特异性免疫球蛋白可变区基因引物两两组合分别对轻、重链进行 RT-PCR 扩增. 在不同退火温度下得到了全部轻链及大部分重链 (13/16) 可变区基因. 当先用免疫球蛋白信号肽序列 5'-端引物与未扩出基因 3'-

* 国家“863”高技术项目资助 (编号 86310209). 收稿日期: 1998-03-16, 修回日期: 1998-08-03

端引物组合进行一次 PCR, 再以该产物为模板进行二次 PCR, 则获得了未扩出三条重链的 PCR 产物. 这表明通过 PCR 反应条件的改变及程序调整, 可增加所获得可变区基因的种类及数量, 从而增加抗体库的多样性.

关键词 退火温度, 抗体库, 多样性, 半套式 PCR

学科分类号 Q753

噬菌体抗体库技术是 90 年代初兴起的一门新技术, 它的出现为单克隆抗体制备开辟了全新的技术路线^[1,2]. 在过去的几年里人们已构建了多个已经或未经免疫的人源抗体库, 并筛选获得了抗 HBsAg、抗人血型抗原及抗自身细胞结构蛋白单抗, 最近, Mahler 等^[3]利用抗体库技术制备了人源化抗 TNF- α 抗体.

一个好的抗体库应该包容针对任意抗原的相应抗体, PCR 的应用使从生物个体内扩增出整套抗体可变区基因成为可能^[4]. 我们通过改变 PCR 反应条件, 主要是退火温度, 获得了全部轻链及 13/16 条重链可变区基因产物. 对于未扩出的三条重链, 通过半套式二次扩增^[5]获得了特异性较高的该重链可变区基因.

1 材料与方法

1.1 mRNA 来源及 cDNA 合成

从未经免疫的 114 例肿瘤病人, 38 例心血管病人及 5 名正常人分别抽取 5 ml 外周血, 用淋巴细胞分离液 (中国医学科学院天津血液学研究所产品) 分离淋巴细胞. 按总 RNA 提取试剂盒 (美国 GIBCO BRL 公司生产) 说明书所述步骤提取总 RNA, 取 20 μ g 总 RNA, 以 Olig dT 为引物用逆转录试剂盒 (美国 GIBCO BRL 公司生产) 合成 cDNA, 具体方法按说明书进行, 反应总体积为 50 μ l.

1.2 PCR 引物设计及扩增

1.2.1 引物及扩增条件选择: 引物设计参照 Kang 等^[6]报道的序列加以适当改动 (表 1). PCR 反应

表 1 人免疫球蛋白可变区基因 PCR 引物

人重链 3' 端引物	
5'-CTC GAC ACT AGT TTT GCG CTC AAC TGT CTT-3'	CG2A
5'-TGT GTG ACT AGT CTC ACC AAG TGG GGT TTT-3'	CG3A
5'-GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG-3'	CG1Z
5'-GCT CAC ACT AGT AGG CAG CTC AGC AAT CAG-3'	CM1
人重链可变区 5' 端引物	
5'-(C/G)AG GTG CAG CTC GAG (C/G)AG TCT GGG-3'	VH1.3A
5'-(C/G)AG GTG CAG CT(A/G) CTC GAG TCT GG-3'	VH1.2.3F
5'-CAG GTG CAG CT(A/G) CTC GAG T(C/G)G GG-3'	VH4F.G
5'-CAG GTA CAG CTC GAG CAG TCA GG-3'	VH6A
人 λ 链 3' 端引物	
5'-CGC CGT CTA GAA TTA TGA ACA TTC TGT AGG-3'	CL2
人 λ 链可变区 5' 端引物	
5'-AAT TTT GAG CTC ACT CAG CCC CAG-3'	VL1
5'-TCTG(C/T) (C/G) GAG CTC CAG CC(T/G) (C/G)CC TC(A/C) GTG-3'	VL2.3
5'-TCT GAA GAG CTC CAG GAC CCT GTT GTG TCT GTG-3'	VL4
5'-CAG (G/T)(C/T)T GAG CTC AC(G/T) CA(A/G) CCG CCG-3'	VL5.7
5'-CAG ACT GAG CTC ACT CAG GAG CCC-3'	VL6
人 κ 链 3' 端引物	
5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CGG GCG AAC TCA G-3'	C κ 1D
人 κ 链可变区 5' 端引物	
5'-GAC ATC GAG CTC ACC CAG TCT CG-3'	V κ 1S
5'-GAA ATT GAG CTC ACA CAG TCT CCA-3'	V κ 3B
5'-GA(C/T) AT(C/T) GAG CTC AC(T/C) CAG TCT CCA-3'	V κ 1.3A

体积为 50 μ l, 其中 cDNA 用量 2 μ l. PCR 循环前先在 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后进行 DNA 扩增, 由以下程序组成: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 分别选择退火温度 50 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C 扩增轻链, 退火温度 50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 扩增重链, 退火时间 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 继续反应 5 min.

1.2.2 轻、重链 5' 端引物与 3' 端引物组合: 用 λ 链 3' 端引物分别同 λ 链可变区 5' 端引物配对, κ 链 3' 端引物分别同 κ 链可变区 5' 端引物配对, 组成八对轻链引物; 四组重链 5' 端引物与四条 3' 端引物分别两两配对, 组成十六对重链引物分别进行 PCR 反应.

1.2.3 二次 PCR 程序设计: 按照 Kabat 等^[7] 报道的免疫球蛋白序列设计信号肽引物 (表 2), 先用这几个 5' 端引物分别与表 1 中重链 3' 端引物 CG3A/CG1Z/CM1 配对进行 PCR 扩增, 程序如下: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 加入 Taq DNA 聚合酶, 再在 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 48 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min. 25 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 继续反应 5 min. 取该产物 2 μ l 为模板, 在 54 $^{\circ}$ C 退火温度下, 其余操作按 1.2.1 所述方法进行扩增.

所有引物由 ACGT Corporation 公司 (加拿大) 合成; 所用 PCR 仪为 PTC-200 型 (MJ Research INC. Watertown, Mass USA).

表 2 人免疫球蛋白重链信号肽 PCR 引物

5'-ATG GAC TGG ACC TGG AGG (A/G)TC (C/T)TC T(G/T)C-3'
5'-ATG GAG (C/T)TT GGG CTG A(C/G)C TGG (C/G)TT T(C/T)T-3'
5'-ATG (A/G)A(A/C) (A/C)(A/T)A CT(G/T) TG(G/T) (A/T)(C/G)C (A/T)(C/T)(C/G CT(C/T) CTG-3'

2 结 果

2.1 轻链可变区基因扩增结果

用表 1 所列 PCR 引物对免疫球蛋白轻链 (λ 、 κ) 进行扩增. 该引物 5' 端与轻链可变区第一框架区保守序列互补, 3' 端与恒定区序列互补. 所得产物约为 660 bp, 包括整个轻链 (CL+ VL). 各取 PCR 产物 5 μ l 在 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定.

用 5' 端 λ 链七条引物和 κ 链四条引物, 以 cDNA 为模板进行扩增表明. 在 50 $^{\circ}$ C 退火条件下 (图 1), V κ 1S 在 660 bp 处出现较强的特异条带. 而其他 κ 链及所有 λ 链均无特异条带出现; 在 52 $^{\circ}$ C 退火条件下 (图 2), VL1、V κ 3B 可见清晰的特异

条带, V κ 1S 及其他轻链均无特异条带; 而在 55 $^{\circ}$ C 退火条件下 (图 3), VL2.3、VL4、VL5.7、VL6、V κ 1.2A 均出现较强特异条带, 余者不清.

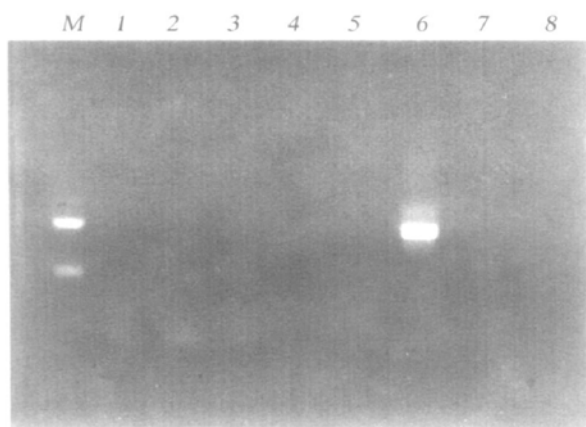


图 1 50 $^{\circ}$ C 退火温度下轻链 PCR 扩增结果

M: 685/385 bp 分子质量标准; 1: VL1; 2: VL2.3; 3: VL4; 4: VL5.7; 5: VL6; 6: V κ 1S; 7: V κ 3B; 8: V κ 1.2A.

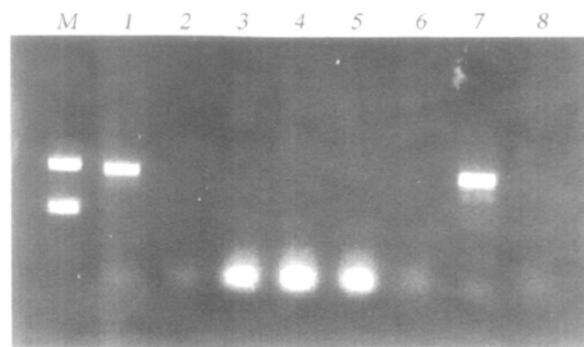


图 2 52 $^{\circ}$ C 退火温度下轻链 PCR 扩增结果

M: 685/385 bp 分子质量标准; 1: VL1; 2: VL2.3; 3: VL4; 4: VL5.7; 5: VL6; 6: V κ 1S; 7: V κ 3B; 8: V κ 1.2A.

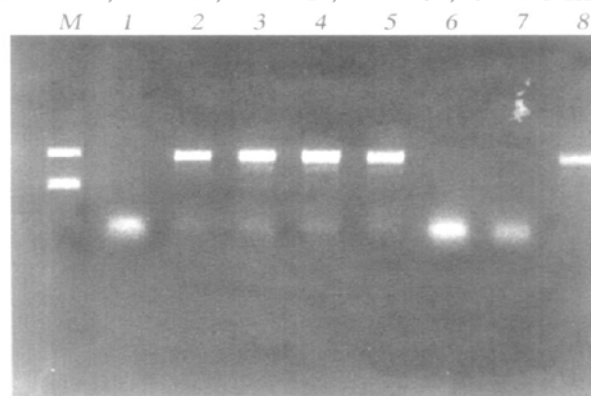


图 3 55 $^{\circ}$ C 退火温度下轻链 PCR 扩增结果

M: 685/385 bp 分子质量标准; 1: VL1; 2: VL2.3; 3: VL4; 4: VL5.7; 5: VL6; 6: V κ 1S; 7: V κ 3B; 8: V κ 1.2A.

2.2 重链可变区基因扩增结果

用表 1 引物对免疫球蛋白重链进行扩增得到的产物为终止于绞链区的外显子第一半胱氨酸密码子 3' 端的可变区基因, 基因片段大小约 660 bp. 用表 1 中引物在不同退火温度下扩增得到了 13 条重链, 电泳结果见图 4, 其中 VH1.3A-CG1Z 的退火温度为 50℃; VH1.3A-CG2A, VH1.2.3F-CG2A, VH6A-CG2A, VH4FG-CG2A, VH1.2.3F-CG3A, VH4FG-CG1Z 的退火温度为 55℃; VH1.3A-CM1, VH6A-CM1, VH4FG-CM1, VH1.2.3F-CG1Z, VH4FG-CG3A 的退火温度为 58℃; VH1.3A-CG3A 的退火温度为 60℃. 而 VH6A-CG3A, VH6A-CG1Z 和 VH1.2.3F-CM1 在不同退火温度下均未有特异条带出现 (图中未显示).

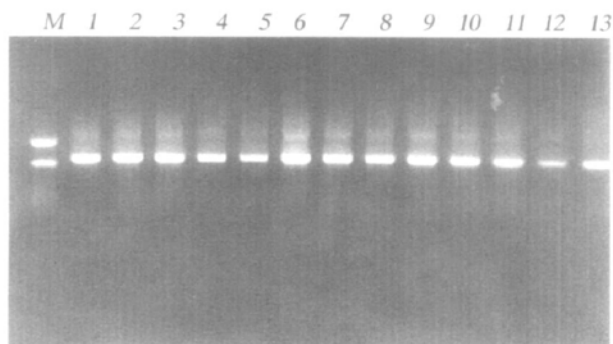


图 4 不同退火条件下重链可变区基因扩增结果

M: 585/1085 bp 分子质量标准; 1: VH1.3A-CG1Z; 2: VH1.3A-CG2A; 3: VH1.2.3F-CG2A; 4: VH6A-CG2A; 5: VH4FG-CG2A; 6: VH1.2.3F-CG3A; 7: VH4FG-CG1Z; 8: VH1.3A-CM1; 9: VH6A-CM1; 10: VH4FG-CM1; 11: VH1.2.3F-CG1Z; 12: VH4FG-CG3A; 13: VH1.3A-CG3A. 退火温度见正文

2.3 半套式 PCR 扩增重链可变区基因结果

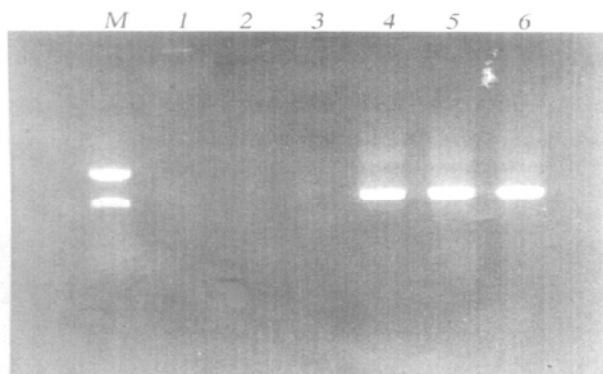


图 5 半套式 PCR 扩增重链可变区基因结果

M: 485/885 bp 分子质量标准; 1: 直接扩增 VH6A-CG3A 结果; 2: 直接扩增 VH6A-CG1Z 结果; 3: 直接扩增 VH1.2.3F-CM1 结果; 4: 半套式扩增 VH6A-CG3A 结果; 5: 半套式扩增 VH6A-CG1Z 结果; 6: 半套式扩增 VH1.2.3F-CM1 结果.

为获得所有重链可变区基因产物, 我们先用表 2 的免疫球蛋白信号肽序列引物进行第一次扩增, 再用表 1 引物扩增该三条链, 结果见图 5. 可以看出, 尽管一次 PCR 产物未见特异条带, 但二次扩增却得到了特异性较强的三条重链条带, 由此得到了全部轻、重链可变区基因片段.

3 讨 论

抗体库容大小是决定能否有效获得所需抗体的关键. 由于目前对免疫球蛋白信息的了解并不全面, 而现在所用的 PCR 引物大都是根据 Kabat 免疫球蛋白资料库的氨基酸序列设计的^[6], 因此不可能通过 PCR 扩增出全部抗体基因.

利用 Kang 等^[6]分组设计的“家族特异”性轻、重链引物, 分别在不同退火温度条件下扩增得到了全部轻链 (λ 、 κ) 及大部分重链 (扩增率 80%) 的特异 PCR 产物, 且产量较多. 由此不难想象, 当将所有引物混合后 (即通常所用的高度简并引物) 在同一退火条件下进行扩增, 虽然亦可能获得特异性较强的 PCR 产物, 但此产物实质上仅为所应扩出目的片段的一部分, 其多样性受到了很大限制. 这直接影响到所建库的有效性.

对于通过改变退火温度等 PCR 条件仍无法扩出的三条重链, 我们用半套式的两次 PCR 进行扩增得到了所需片段. 我们的工作说明在对可变区基因的扩增中, 通过改变退火温度等条件可获得种类和数量尽可能多的可变区基因片段, 而对于外周血中 mRNA 含量较低的 cDNA 引物, 通过改变 PCR 程序, 采用半套式扩增可顺利扩出. 这种将改变 PCR 反应条件和半套式扩增联合应用获得抗体可变区基因的方法, 尚未见报道. 这一方法的应用对于构建库容尽可能大的天然抗体库, 从而筛选到针对人体正常结构成分的抗体尤为重要.

参 考 文 献

- 1 McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, *et al.* Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990, **348** (6301): 552~ 554
- 2 Kang A S, Barbas C F, Janda K D, *et al.* Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab library along phage surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (10): 4363~ 4366
- 3 Mahler S M, Marquis C P, Brown G, *et al.* Cloning and expression of human V-genes derived from phage display libraries as fully assembled human anti-TNF alpha monoclonal antibodies. *Immunotechnology*, 1997, **3** (1): 31~ 35

- 4 Orlandi R, Gussow D H, Jones P T, *et al.* Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (10): 3833~3837
- 5 Wang X, Wang H T, Chen W L, *et al.* Amplification of human antibody genes with half-nested PCR to increase the diversity of antibody library. *Bull Acad Mil Med Sci*, 1996, **20** (1): 45~48
- 6 Kang A S, Burten D R, Lerner R A. Combinatorial immunoglobulin libraries in phage λ . *Companion Methods Enzymol*, 1991, **2** (): 111~121
- 7 Kabat E A, Wu T T, Perry H M, *et al.* Sequences of proteins of immunological interest. 5th. Washington D C: NIH Publication, 1991, 2176~2597

Effect of Different PCR Procedures and Conditions to the Diversity of Humanized Phage Display Antibody Library. TIAN Xue-Jun, SHOU Cheng-Chao, MENG Lin (*School of Oncology, Beijing Medical University, Beijing 100034, China*); DONG Zhi-Wei (*Institute of Cancer Research, Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China*).

Abstract Human immunoglobulin heavy chain and light chain genes were separately amplified by PCR with cDNA as templates from human peripheral lymphocytes, using four 5'-primers and four 3'-primers corresponding to heavy chain, eight 5'-primers and two 3'-primers corresponding to light chain. At different annealing temperature, using the primers described above, all the light chain PCR products and 80% heavy chain PCR products were yielded. When signal sequences of immunoglobulin were used as 5' primers, all remain heavy chain products were obtained by this half-nested PCR. This results indicate that more immunoglobulin variable region genes can be obtained by PCR through changed of procedures and reaction conditions, which can increased the diversity of antibody library.

Key words annealing temperature, antibody library, diversity, half-nested PCR

噬菌体显示技术用于抗体表位的筛选*

杨子义 王 鑫 董家新 姚志建 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 利用噬菌体随机肽库筛选抗 TNF 单抗表位的研究中, 就抗体的选择、肽库富集的检测、筛选得到的表位多肽的验证及如何提高筛选的成功率等, 进行了一些初步探索. 实验结果表明, 由识别线性抗原位点的抗体较容易筛选到噬菌体呈现表位, 具有较强中和活性的抗体, 因多识别空间构型抗原位点而增加筛选难度. NC 膜斑点印迹、ELISA 及 DNA 测序均可作为筛选富集的检测方法. 用与天然抗原同源比较的方法及竞争性 ELISA 分析, 可以帮助确定噬菌体呈现多肽是否是抗体表位.

关键词 噬菌体显示技术, 抗体, 表位

学科分类号 R731.3

噬菌体显示技术 (phage display) 作为一种揭示蛋白质相互作用的快捷、有效的工具, 已受到广泛的重视, 并在细胞因子与受体活性中心的研究, 小分子肽疫苗设计, 抗体表位的确定中显示出优势^[1~3]. 抗原-抗体反应一直是免疫学、分子生物学研究中的重要课题, 从 1988 年噬菌体显示技术产生之日起, 即致力于抗体识别抗原表位 (epitope) 的研究, 迄今已将数百个抗体的表位阐明, 如抗 β -内啡肽、白介素-1、碱性成纤维生长因

子、乙酰胆碱受体抗体等^[4~6]. 然而研究者的实践经验表明, 有很大比例的抗体没有能够从噬菌体随机肽库中筛选到相应的噬菌体呈现表位 (phagotop). 分析其原因大致有随机肽库的完整性及筛选方法是否正确二方面的因素. 就如何提高抗体筛选的成功率, 我们做了一些技术上的初步探索, 并从几株单抗的筛选中积累了一些经验.

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(102-09-03-04).

收稿日期: 1997-10-15, 修回日期: 1998-02-19