

- 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  $\lambda$ . *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<sup>[1~3]</sup>. 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  $\beta$ -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<sup>[4~6]</sup>. 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

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

噬菌体随机肽库 X6 (6 肽库) 由 University of Missouri, Columbia 的 Smith 教授惠赠, 亲和素-碱性磷酸酶 (AV-AP) 购自 Gibco BRL 公司, HRP-羊抗鼠抗体 (HRP-GAM) 和抗 TNF 抗体由本室制备, HRP-antiM13 Ab 为 Pharmacia 产品, 碱性磷酸酶 (AP) 底物液: 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 9.5, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 临用时加 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸 (BCIP) 及氮蓝四唑 (NBT) (Gibco BRL 产品), DNA 测序试剂盒购自 USB 公司, <sup>32</sup>P-dATP 购自北京亚辉生物工程公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 抗体识别抗原状态分析:** 抗体与 NC 膜上的天然状态抗原及 SDS-PAGE 电转至 NC 膜上的抗原反应, 以 HRP-GAM、二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 观察不同状态抗原与抗体的结合。

**1.2.2 抗原位点分析:** 以加成法分析多株抗同一抗原的单抗是否识别相同的抗原位点<sup>[7]</sup>。

**1.2.3 抗体中和试验:** 选 TNF 敏感细胞 L929 细胞株, 以抗体与 TNF 结合后是否阻断 TNF 对细胞的杀伤作用为指标, 分析各株单抗能否中和 TNF 细胞毒的作用<sup>[8]</sup>。

**1.2.4 NC 膜斑点印迹法富集分析:** 抗体对随机肽库筛选三轮<sup>[9]</sup>。取一至三轮亲和筛选的噬菌体及随机肽库, 并按 4 倍梯度各自稀释 4 个浓度, 点 NC 膜。BSA 封闭后用筛选 Bio-McAb、AV-AP、AP 底物液显色, 观察斑点显色情况。

**1.2.5 ELISA 法富集分析:** 筛选所用抗体包被 96 孔板, 加一至三轮亲和筛选扩增后的噬菌体, 与包被抗体充分结合后, 以 HRP-anti M13 Ab, 邻苯二胺 (OPD) 显色, 比较各轮吸光度变化。

**1.2.6 DNA 测序法富集分析:** 取一至三轮亲和筛选扩增后的噬菌体, 提取 ssDNA, 测 DNA 序列, 观察 DNA 序列变化情况。

**1.2.7 竞争性 ELISA 分析:** 抗体分别与不同量的阳性克隆噬菌体反应, 并以随机肽库做对照。将各反应混合物加至相应抗原包被孔, 加 HRP-GAM 及 OPD 显色。观察阳性克隆噬菌体对抗体与抗原结合的阻断作用。

**1.2.8 线性表位分析:** 抗线性抗原的抗体所筛选到的结构相似群, 可以用蛋白质序列库 (如我们使

用的 Goldkey 序列库) 或查询 EMBL 序列库 (电子信箱地址: Blitz@EMBL, Heidelberg, DE), 确认其与天然抗原的同源性。

## 2 结果

### 2.1 抗体识别抗原位点分析

四株单抗均能识别天然状态的 TNF 及经 SDS-PAGE 电转至 NC 膜上的变性抗原, 表明四株单抗均结合抗原一级结构上连续的氨基酸残基。加成实验结果显示, 每二抗体之间加成指数 (AI): T<sub>5</sub> 与 Z<sub>8</sub>、T<sub>5</sub> 与 S<sub>3</sub>、S<sub>3</sub> 与 Z<sub>8</sub> 之间分别为 26.0%、11.0%、24.2%。以 AI ≤ 20% 为一个位点判断, T<sub>5</sub> 与 S<sub>3</sub> 识别抗原同一位点, 其他抗体识别位点不相同。

### 2.2 抗体中和试验

相同浓度的四种抗体 (20 mg/L) 对 TNF (12.5 U/ml) 细胞杀伤的阻断作用各有差异, S<sub>3</sub> 能中和 TNF 细胞毒性作用的 39.1% ± 13.8%, T<sub>5</sub>、Z<sub>8</sub>、Z<sub>12</sub> 分别为 42.3% ± 4.5%、80.6% ± 8.7%、86.7% ± 11.6%。表明 S<sub>3</sub> 与 T<sub>5</sub> 的中和作用较弱, Z<sub>8</sub> 与 Z<sub>12</sub> 有较强的中和作用。

### 2.3 筛选富集效果的分析

Z<sub>8</sub> 及 Z<sub>12</sub> 对 X6 肽库筛选六轮, 用 ELISA 法定量检测肽库富集情况。从图 1 可以看出, 3~4 轮富集已比较满意, 第四轮以后富集的程度无明显增加。以后我们多采用 3~4 轮筛选。

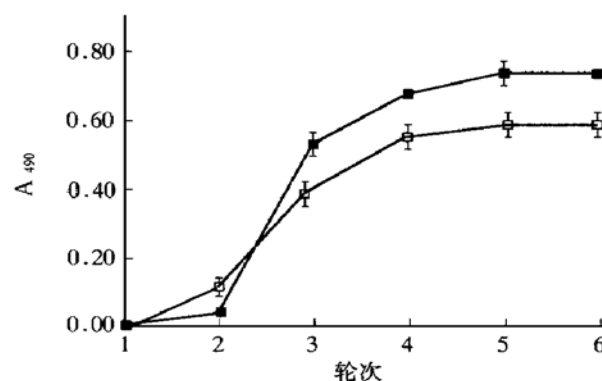


图 1 Z<sub>8</sub> 及 Z<sub>12</sub> 筛选六轮 ELISA 富集检测

■—■: Z<sub>8</sub>; □—□: Z<sub>12</sub>.

T<sub>5</sub> 单抗筛选 6 肽库三轮的 NC 膜斑点印迹法及 ELISA 富集检测结果见图 2、表 1。二种方法结果相一致, 均显示有良好的富集效果。

Z<sub>8</sub> 单抗 1~3 轮筛选、扩增的噬菌体 DNA 测序结果 (图 3) 显示, 第一轮富集不明显, 肽库 DNA 仍呈随机性, 第二轮出现明显的集中趋势,

第三轮已近似单一的碱基排列, 且与单个克隆测序结果中的优势克隆相一致。

表 1  $T_5$  单抗筛选 ELISA 富集检测

| 轮次  | $A_{490}$       |
|-----|-----------------|
| I   | $0.02 \pm 0.00$ |
| II  | $0.11 \pm 0.02$ |
| III | $0.33 \pm 0.07$ |

肽库为 O.

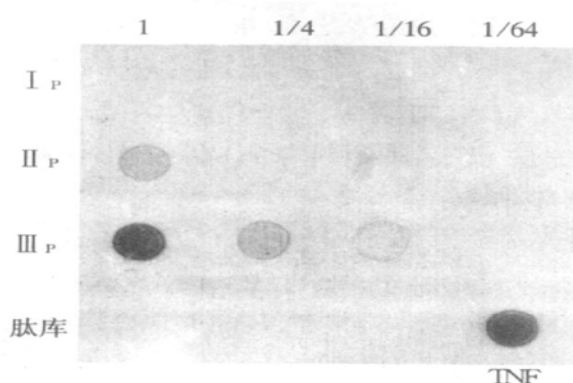


图 2  $T_5$  单抗筛选斑点印迹法富集检测

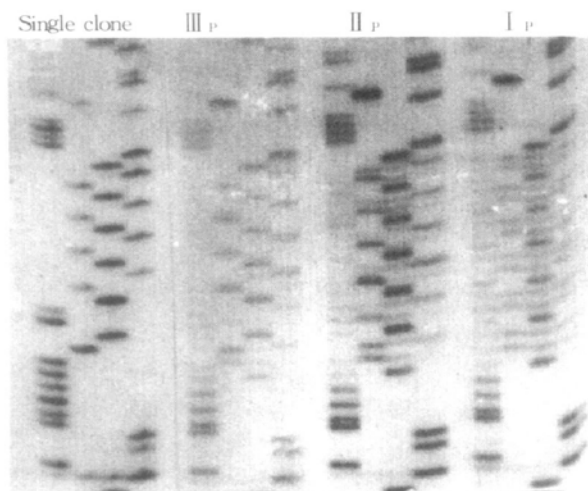


图 3  $Z_8$  单抗 1~3 轮筛选噬菌体 DNA 序列分析

## 2.4 抗体识别表位分析

从  $T_5$  单抗筛选 X6 肽库第三轮的噬菌体中, 随机测序 17 个克隆, 推出外源短肽的氨基酸序列. 17 个克隆氨基酸的序列分别为: LHPGVC (3 个克隆)、LHPGIL (4 个克隆)、PPWQHY (5 个克隆)、AWLTYS (4 个克隆) 和 GEHAMM (1 个克隆). 由 Goldkey 查询与 TNF 的同源性表明, 后三种氨基酸序列与 TNF 无同源性, 前二种序列与 TNF 第 51~56 肽段有较高的同源性, 初步认为 LHPGIL 与 LHPGVC 可能为  $T_5$  单抗的噬菌体呈现

表位。

为验证 LHPGIL 能否与  $T_5$  单抗的抗原结合位点结合, 进一步做竞争性 ELISA 阻断试验, 结果见表 2.

表 2 竞争性 ELISA 抑制效果

| 噬菌体量/TU            | $A_{490}$         | 抑制率                 |
|--------------------|-------------------|---------------------|
| 0                  | $0.305 \pm 0.052$ | 0                   |
| $5 \times 10^{10}$ | $0.255 \pm 0.058$ | $16.36\% \pm 2.1\%$ |
| $1 \times 10^{11}$ | $0.201 \pm 0.017$ | $26.92\% \pm 0.7\%$ |
| $2 \times 10^{11}$ | $0.132 \pm 0.021$ | $55.16\% \pm 0.9\%$ |

竞争性 ELISA 实验证明 LHPGIL 与  $T_5$  相应抗原 TNF 能竞争性地与单抗结合。

## 3 讨 论

利用噬菌体随机肽库寻找抗体表位, 首先是获得库容量大、结构多样性全的肽库. 在此前提下, 实验的关键将是筛选方法及验证方法的可靠与准确. 此外, 选择合适的抗体也是筛选成功的重要一环. 抗体最好是识别抗原一级结构上连续氨基酸残基构成的线性位点, 这样很容易通过噬菌体呈现多肽与天然抗原间的同源性比较, 确定筛选是否正确. 而空间结构依赖性抗原位点, 往往是空间构象中相互接近, 但一级结构中互不连续的几个氨基酸, 用线性多肽模拟的空间结构依赖性抗原位点称为模拟表位 (minotope). 由抗空间结构依赖性抗原位点的抗体筛选得到的多肽, 无法用同源性比较而只能通过功能分析来判断该多肽是否为抗体的模拟表位<sup>[10]</sup>, 分析难度加大, 而且其筛选往往需要构象限定性随机肽库 (conformational constrained library)<sup>[11, 12]</sup>. 具有中和作用的抗体, 不仅可筛选到表位, 而且能为细胞因子等活性蛋白与靶蛋白作用位点的研究提供重要的线索. 抗同一位点的多株单抗应避免同时筛选, 以免得到相似的多肽而与交互污染相混淆。

筛选后富集的检测以膜斑点印迹法最为常用, 结合 ELISA 法则更为准确. 二种方法都可显示肽库中阳性克隆富集的程度, 这与 DNA 测序法有所不同. DNA 测序法仅显示肽库经筛选后有无富集集中趋势, 有集中趋势的肽库是否是阳性克隆的富集无一致关系. 但 DNA 测序法在富集的验证上, 是一个很明确的指标, 可以与其他二种检测方法结合使用。

## 参 考 文 献

- 1 Scott J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, **249**: 386~ 390
- 2 Wrighton N C, Farrell F X, Chang R, *et al.* Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science*, 1996, **273**: 458~ 461
- 3 Phizicky E M, Fields S. Protein-protein interaction: methods for detection and analysis. *Microbiological Rev*, 1995, **59** (1): 94 ~ 104
- 4 Felici F, Castagnoli L, Musacchio A, *et al.* Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol*, 1991, **222** (2): 301 ~ 310
- 5 Yayon A, Avier D, Safran M, *et al.* Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage epitope library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (23): 10643~ 10647
- 6 Balass M, Helman Y, Cabilly S, *et al.* Identification of a hexapeptide that mimics a conformation-dependent binding site of acetylcholine receptor by use a phage epitope library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (23): 10638~ 10642
- 7 Frigut B, Djavadi-Ohanian L, Goldberg M. *Immunoenzymatic Techniques*. Netherland: Elsevier Science Publishers, 1993. 171 ~ 174
- 8 周廷冲主编. 多肽生长因子——基础与临床. 北京: 科学出版社 (Zhuo T C. Peptide growth factor: Basic and Clinic. Beijing: Science Press), 1992. 512~ 513
- 9 Parnley S F, Smith G P. Antibody-selectable filamentous phage vector: affinity purification of target genes. *Gene*, 1988, **73** (2): 305~ 318
- 10 Luzzago A, Felici F, Tramontano A, *et al.* Mimicking of discontinuous epitope by phage-displayed peptides, I. epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene*, 1993, **128** (1): 51~ 57
- 11 McLafferty M A, Kent R B, Lader R C, *et al.* M13 bacteriophage displaying disulfide-constrained microprotein. *Gene*, 1993, **128** (1): 29~ 36
- 12 Lader R C. Constrained peptides as binding entities. *TIBTECH*, 1995, **13**: 426~ 430

**Searching Epitopes of a Group of McAbs Against TNF with Phage Display.** YANG Zi-Yi, WANG Xin, DONG Jia-Xin, YAO Zhi-Jian, SHEN Bei-Fen (*Institute of Basic Medical Science, Beijing 100850, China*).

**Abstract** Three monoclonal antibodies against tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) were selected to biopanning a 6-mer phage-displayed random peptide library. After biopannings, the enrichment of binding phages were estimated using a dot blot, ELISA, DNA sequence methods. These results showed that three to four rounds of biopanning could be enriched enough and the results also revealed that the screening of epitope would be easier with an antibody recognized a conformation-independent antigen than conformation-dependent one. Competitive ELISA assay and homological comparison between the original antigen and the motifs were helpful to identification of epitopes.

**Key words** phage display, monoclonal antibody, epitope