

全人源抗肝癌噬菌体单链抗体库的构建与筛选鉴定*

肖艳 李官成** 李跃辉 黄建 童永清 张志杰

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 体外致敏并用 EBV 转化肝癌患者的 PBMC, 用 PCR 分别扩增 VH 和 VL 基因并组成 ScFv 基因. 将 ScFv 基因与载体 fuse5 连接后, 电击转化大肠杆菌 MC1061, 构建噬菌体呈现型 ScFv 库. 用人肝癌细胞及人肝细胞对初级噬菌体抗体库进行亲和富集及 phage-ELISA 筛选. 筛选获得的阳性克隆进行 ELISA 及免疫组化鉴定并测序. 结果表明, 经 EBV 转化的 4 例肝癌患者 PBMC, ELISA 检测均有抗肝癌抗体产生, 经多次 PCR, 扩增出 6 种 VH(γ 、 μ)和 9 种 VL(κ 、 λ)基因, 经连接组成 54 种 ScFv 基因. 将 ScFv 基因与载体连接后, 导入大肠杆菌 MC1061, 得到库容为 1.0×10^8 的初级噬菌体抗体库, 全长 ScFv 基因的插入率为 80%. 用人肝癌细胞系 HepG2 和人肝细胞系 QSG-7701 对抗体库进行三轮正负淘选和富集后, 从中随机挑取 533 个克隆进行 ELISA 筛选, 得到 179 个阳性克隆, 阳性率为 33.6%. 将 179 个阳性克隆进一步进行其他细胞系的鉴定, 发现克隆 A82 对肝癌细胞系 HepG2、人胚肾上皮细胞系 HEK293 呈强阳性反应, 免疫组织化学结果显示与人肝细胞癌组织有特异性反应, 而不与正常肝组织反应. 且 A82 的相对亲和力为 2.4 mol/L, 解离常数 K_d 为 5.32×10^{-9} mol/L, 显示其亲和力较高. 对克隆 A82 进行测序分析, 结果表明: A82 全长 742bp, 含 linker cDNA 序列 45 bp, 重链可变区基因与人胚系 IgVH3-23 有 94.3% 的同源性, 轻链可变区基因与人胚系 IgV4-2 有 94.9% 的同源性, V-D-J 分别属于 VH3-23-D2-21-JH6-linker-V4-2-JL2. 由上述结果可见, 应用体外抗原致敏方法和 EBV 转化技术联合噬菌体抗体库技术, 构建了库容量达 1×10^8 的全人源抗肝癌单链抗体库, 通过细胞 ELISA 和免疫细胞化学鉴定, 获得的噬菌体抗体克隆 A82 具有较强的特异性, 为肝癌的临床诊断及导向治疗奠定了基础.

关键词 EB 病毒转化, 噬菌体抗体库, 肝癌, 单链抗体

学科分类号 R739.63

肝癌是一种恶性程度极高的肿瘤, 其治疗仍以手术切除为首选, 但复发率极高, 加上肝癌早期多无临床症状, 绝大部分发现时已属于中晚期, 丧失了手术时机, 化疗药物应用于人体又会导致很大的副作用. 单克隆抗体以其特异靶向性在临床放射免疫诊断和导向治疗方面有较大的应用价值^[1,2], 但也存在诸多缺陷, 制约了其在临床的应用. ScFv 弥补了传统单克隆抗体(mAb)制备繁琐、抗原性强、穿透力弱等不足, 可望成为肝癌放射免疫诊断和导向治疗的有力工具. 本研究拟解决鼠源性单抗用于导向治疗穿透力低及易产生人抗鼠抗体反应等难题, 采用体外致敏法和 EBV 转化技术联合噬菌体展示技术构建全人源的抗肝癌 ScFv 库, 并进一步筛选获得高亲和力的抗肝癌 ScFv, 为肝癌的临床诊断及导向治疗奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

丝状噬菌体 FUSE5, K802、MC1061 大肠杆菌菌株均由本室保存. 绒猴淋巴母细胞系 B95.8, 肝癌细胞株 HepG2, 鼻咽癌细胞系 CNE2, 大肠癌细胞系 HRT-18, 宫颈癌细胞系 Caski, 肺癌细胞系 A549, 及人类正常细胞肝细胞系 QSG-7701, 人胚肾上皮细胞系 HEK293, 骨髓间质干细胞 HBMSC, 原代培养的脐静脉内皮细胞 HUVEC 等

* 湖南省卫生厅科研基金重点项目(A2003001).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805445, Email: libsun@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2008-03-29, 接受日期: 2008-05-29

均由本室保存。胎牛血清(FCS)及小牛血清(NBS)为杭州四季青公司产品。rhIL-2、谷氨酰胺、丙酮酸钠及环孢菌素 A 均为 Sigma 公司产品。RPMI1640、琼脂糖和细菌培养基,均购自 Gibco/BRL 公司。TRIzol 为 Invitrogen 公司产品。cDNA 合成试剂盒为 Fermentas 公司产品。PCR 产物纯化试剂盒,小量质粒抽提试剂盒购自长沙赢润生物技术有限公司。*Sfi* I 限制性内切酶为 Fermentas 公司产品, Taq DNA 酶和 T4 DNA 连接酶为华美生物公司产品。HRP 标记的羊抗人 IgG/M 购自 Pharmacia Biotech 公司。30 份肝癌患者(经病理检查确诊)的外周血标本分别采自湖南省肿瘤医院和湘雅二医院,术前一天采血。

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞抗原的制备。将培养的肝癌细胞用 0.25%胰酶消化并计数,按 10^6 细胞加 0.5 ml 丝裂霉素 C(1 g/L),于 37℃ 处理 30 min,每 10 min 摇动一次。用 D-Hank's 液洗 4 次后,加入含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基,分装,保存于 -20℃。

1.2.2 肝癌病人 PBMC 的体外致敏。无菌抽取 20 例肝癌患者外周血各 5~8 ml,肝素钠抗凝并采用密度梯度离心法分离其 PBMC,按细胞密度 10^9 个/L 于 24 孔板中培养。将肝癌病人 PBMC 用肝癌细胞抗原致敏,按肝癌细胞:PBMC=1:10 加入培养的 PBMC 中,于 37℃ 培养 4~5 天。培养基为含 10%FCS 的 RPMI1640 完全培养基(含 2×10^4 U/L IL-2 及 2mg/L 环孢菌素 A)。

1.2.3 EBV 转化。培养 B95.8 细胞至对数生长期,取上清,经 0.22 μ m 滤膜过滤后收集滤液。PBMC 体外致敏后,按 4×10^6 PBMC 加入 1 ml EBV 培养上清,于 37℃ 孵育 3 h,吸弃上清,加入含 100 ml/L FCS 的 RPMI1640 完全培养基,培养 2 周后,换用含 200 ml/L NBS 的 RPMI1640 完全培养基。转化细胞培养上清的筛选采用间接 ELISA 法。用肝癌细胞株 HepG2 作为肿瘤细胞抗原固相板,收集的 B 细胞培养上清作为一抗,HRP 标记的羊抗人 IgG/M (HRP-GAH-IgG/M)为二抗。将阳性孔的细胞扩大培养至 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞。

1.2.4 提取总 RNA 及合成 cDNA 第一条链。用 TRIzol 试剂分别提取扩大培养的 B 细胞中的总 RNA。用分光光度计测 260 nm 和 280 nm 波长的吸光度值,计算 A_{260}/A_{280} ,鉴定 RNA 浓度,以琼脂糖凝胶电泳证实其完整性。将各例 RNA 混合后,用 RT 试剂盒逆转录为 cDNA(第一链合成)。

1.2.5 VH 和 VL 基因的 PCR 扩增与连接。按文献 [3]设计合成扩增人抗体基因的引物。以 cDNA 第一链为模板,在 TaqDNA 酶作用下,进行 PCR 扩增 VH 和 VL 基因。并通过编码连接肽(Gly₄Ser)₃ 使 VH 和 VL 基因连成 ScFv 基因。回收 PCR 产物并测定其浓度。

1.2.6 噬菌体 scfv 抗体库的构建。从含 fUSE5 的 K802 细菌中,用质粒小抽提纯化试剂盒提取和纯化 fUSE5 RF。用 *Sfi* I 酶分别酶切 fUSE5 RF 和总 scfv,进行电泳鉴定,并用 DNA 多功能纯化试剂盒进行回收纯化。取酶切纯化后的 10 μ g fUSE5 RF 和 2 μ g scfv 及 2 000 U 的 T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs),于 4℃ 作用 24 h。连接产物用 DNA 多功能纯化试剂盒纯化回收,溶于 50 μ l 亚沸水中。将此连接产物用电穿孔法转化新鲜制备的感受态细菌 MC1061,电感条件为 1.68 kV, 25 μ F。每次转化后用 1 ml SOC 洗下细菌。将转化后的细菌于 37℃ 以 220 r/min 摇动 1 h,涂于含 15 mg/L 四环素的 2 $\times$ YT 平皿上,37℃ 过夜。根据长出的克隆数计算库容量。并向平皿中加入含 40 mg/L 四环素的 LB 培养基,刮下平皿上所有菌落,于 37℃ 以 220 r/min 摇动 1 h,再以 5 000 g 离心 20 min。取上清,用 0.45 μ m 的滤膜过滤后,滤液即为噬菌体单链抗体库(初级抗体库)。将初级抗体库经 20% PEG 8000, 2.5 mol/L NaCl 沉淀 2 次后,溶解于 PBS 中,保存于 4℃。

1.2.7 噬菌体抗体库的富集淘选。待 QSG-7701 细胞和 HepG2 细胞分别在 35 cm² 的培养瓶中培养至基本融合时,戊二醛固定, PBS 液洗, 2% BSA-PBS (含 0.02% NaN₃) 37℃ 封闭 2 h。弃封闭液,取噬菌体抗体库 1 ml (1×10^{11} TU) 加入到一瓶 QSG-7701 细胞中, 37℃ 轻轻摇晃 1 h,吸出上清,重新和另一瓶 QSG-7701 细胞室温下摇晃孵育 1 h,得到递减的噬菌体上清。将此上清加入到培养的 HepG2 细胞,室温下轻轻摇晃 1 h。去掉上清,立即用 PBST 冲洗细胞 10 次,加 2 ml E- 缓冲液 (0.1 mol/L 甘氨酸, pH2.2/0.1%BSA),室温下作用 10 min,用 0.375 ml N- 缓冲液 (1 mol/L Tris-HCl, pH 9.1)中和。将洗脱的噬菌体抗体与 15 ml 对数生长长期的大肠杆菌 K91Kan 于 37℃ 静止感染 30 min。将细菌铺到含四环素的 LB 琼脂糖平皿上, 37℃ 培养 16 h,以扩增噬菌体抗体。将长出的菌落用含四环素的 LB 培养基刮下, 37℃ 摇菌 1 h。离心、取上清,经 0.45 μ m 滤膜过滤除菌后,用 PEG/NaCl 沉

噬菌体抗体, 将沉淀溶解于 PBS 中. 如此进行 3 轮淘选和富集.

1.2.8 抗肝癌噬菌体单链抗体的筛选. 从第 3 轮淘选后涂布的 LB 平皿上挑取单克隆至 2 ml 含 40 mg/L 四环素的 LB 培养基中, 37℃ 摇菌过夜. 离心, 取上清, 分别加入到固定有 HepG2 细胞抗原并经 2% BSA 封闭的酶标板中, 100 μ l/ 孔, 于 37℃ 作用 2 h. PBST 洗板 5 次后, 按 100 μ l/ 孔加入 HRT 标记的抗 M13 单克隆抗体(1: 2500), 37℃ 作用 1 h. 用 PBST 充分洗涤后, 以 ABTS 显色, 于长波 405 nm 处测定吸光度值(A). 以空白噬菌体 fUSE5 作为阴性对照. 阳性阈值为阴性对照孔 (fUSE5) A_{405} 值的均值($\bar{x}$)与其 3 倍标准差(s)之和. 将阳性克隆扩增, 用于下一步其他细胞系的鉴定.

1.2.9 免疫细胞化学鉴定. 培养的细胞接种于灭菌的载玻片上, 于 37℃ 5% CO₂ 孵箱培养过夜, 待细胞长满后用冷丙酮固定 15 min. 2% BSA 封闭 2 h. 去掉封闭液, 加 100 μ l 经 PEG 纯化浓缩的噬菌体抗体克隆至载玻片上, 4℃ 孵育过夜. PBS 洗, 滴加 HRP 标记的羊抗 M13 单克隆抗体(1: 100), 37℃ 1 h. PBS 洗, DAB 显色 5~10 min, 自来水充分冲洗, 苏木素复染, 自来水洗 15 min. 玻片置于 70%→80%→90%→100%→100% 的乙醇溶液各 5 min, 逐级脱水, 二甲苯透明 5 min, 中性树脂胶封片.

1.2.10 免疫组织化学鉴定. 将肝癌和正常肝组织石蜡切片脱蜡, 抗原修复, 3% H₂O₂- 甲醇室温孵育以消除内源性过氧化物酶的活性. 再用 2% BSA 封闭 2 h. 其余步骤同免疫细胞化学.

1.2.11 DNA 序列测定. 将初步筛选出的阳性噬菌体抗体克隆, 用质粒小抽提试剂盒抽提并纯化噬菌体, 将纯化后的噬菌体交由上海博亚进行测序. 引物为: ① 5' TGA TTT TCT GTA TGA GG 3'; ② 5' ACC CGA CCC ACC ACC GCC CGA 3'.

2 结 果

2.1 EBV 成功转化 PBMC

成功转化 4 例肝癌病人的 B 细胞, 其中有 2 例经抗原体外致敏. 用肝癌细胞抗原体外致敏的 PBMC 培养至 6~8 天时, 可见集落样淋巴母细胞化. 两组 PBMC 在加入 EBV 上清后, 细胞的形态表现相似, 开始可见大量淋巴细胞死亡. 2 周左右时, 可见肝癌细胞抗原致敏组的细胞有少量克隆生成, 主要分布于孔周围, 并逐渐长成团(图 1). 经

EBV 转化的 4 例肝癌患者的 PBMC 培养 6~8 天后, ELISA 检测其上清, 经抗原体外刺激的两例 B 细胞上清均呈阳性反应.

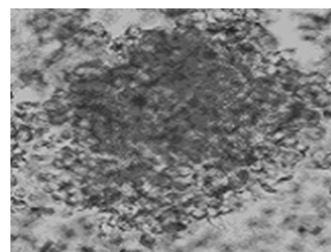


Fig. 1 EBV-transformed B lymphocytes (100 $\times$)

2.2 PCR 扩增免疫球蛋白基因

用 RT 试剂盒分别逆转录 4 例总 RNA, 将逆转录产物 cDNA(第一链)混合, 以此为模板, 扩增出 3 种 VH-CH1(γ), 3 种 VH-CH1(μ), 3 种 V κ -C κ , 3 种 V λ -C λ 基因, 其分子质量均为~700 bp (图 2). 以上述产物为模板, 再次进行 PCR, 扩增出 3 种 VH-JH(γ), 3 种 VH-JH(μ), 6 种 V κ -J κ 和 3 种 V λ -J λ 基因, 其分子质量大小均为~400 bp (图 3). 6 种 VH 基因和 9 种 VL 基因经连接组成 54 种 scFv 基因, 其分子质量均为~800 bp(图 4).

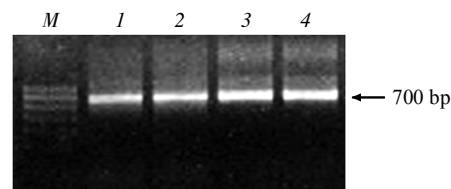


Fig. 2 VH-CH1 and VL-CL genes amplified from EBV transformed B lymphocytes of hepatic cancer patients
1: IgG VH-CH1; 2: IgG VL-CL; 3: IgM VH-CH1; 4: IgM VL-CL; M: Marker.

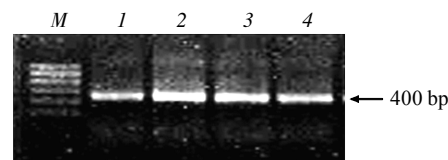


Fig. 3 VH and VL genes cloned with degenerated primers
1: IgG-VH; 2: IgM-VH; 3: VL- λ ; 4: VL- κ ; M: Marker.

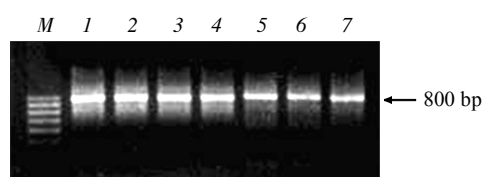


Fig. 4 54 single chain Fv genes combined with VH and VL genes through linker
M: Marker; 1~7: Scfv genes.

2.3 噬菌体抗独特型抗体库的建立

将 scFv-fUSE5 RF 经电穿孔法导入感受态细菌 MC1061. 经四环素抗性筛选后, 根据转化产物在 LB 平皿上长出的克隆数, 计算所构建的重组噬菌体抗独特型抗体的库容量为 1.0×10^8 个克隆. 从中随机挑取 20 个菌落, 经 PCR 扩增 scFv 基因, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 其中 16 个克隆有 scFv 全长基因的插入, 插入率为 80%.

2.4 初级抗体库的淘选

以正常肝细胞和肝癌细胞对初级抗体库进行三轮正负淘选, 每轮淘选均投入约 1×10^{11} 的噬菌体, 洗脱的噬菌体产率显示第二轮和第三轮的回收率逐级增加, 说明经过淘选后阳性克隆已得到富集, 富集倍数为 1 250(表 1).

Table 1 The recovery rate of phage in every round biopanning

Round	Input phage/TU	Eluted phage/TU	Recall rate/%
1	1×10^{11}	3×10^5	3×10^{-6}
2	1×10^{11}	1×10^6	1×10^{-5}
3	1×10^{11}	3.75×10^8	3.75×10^{-3}

The recovery rate = Eluted phage titer/Input phage titer.

2.5 ELISA 筛选

初级抗体库经过三轮富集淘选后, 将回收得到

的噬菌体感染细菌, 铺到含四环素 LB 平皿上, 随机挑取单克隆菌落摇菌扩增, 取其上清在 HepG2 细胞抗原板上经 ELISA 初步筛选. ELISA 实验所使用的单克隆重组噬菌体的滴度统一稀释为 1×10^{14} U/ml. 阳性孔阈值为阴性对照孔(fUSE5) A_{405} 值 ($\bar{x}$)与其 3 倍标准差(s)之和, A_{405} 值 > 0.2 . 随机挑取的 533 个单菌落中获得 179 个阳性克隆, 阳性率为 33.6%.

2.6 ELISA 鉴定

将 179 个阳性克隆同时用 HepG2、QSG-7701 细胞固相板做 ELISA, 发现大部分与 HepG2 阳性反应的克隆也与 QSG-7701 反应阳性. 经过多次筛选鉴定, 最后选出与 HepG2 强阳性反应, 而与 QSG-7701 弱反应的 3 个克隆 B14、A82、B65, 将这 3 个克隆再分别与人类肿瘤细胞系(鼻咽癌细胞系 CNE2、大肠癌细胞系 HRT-18、宫颈癌细胞系 Caski、肺癌细胞系 A549)及人类正常细胞(人胚肾上皮细胞系 HEK293、骨髓间质干细胞 HBMSC、原代培养的脐静脉内皮细胞 HUVEC)进行 ELISA 鉴定, 每种细胞系的鉴定均设 3 个平行孔, 以空白噬菌体 fUSE5 作为阴性对照. 结果发现克隆 A82 对肝癌细胞系 HepG2、人胚肾上皮细胞系 HEK293 呈强阳性反应, 而与正常肝细胞系 QSG-7701、原代培养的脐静脉内皮细胞 HUVEC 反应呈弱阳性, 与骨髓间质干细胞 HBMSC 及其他人肿瘤细胞系不反应. 结果见表 2.

Table 2 ELISA results of selected anti-hepatoma single-chain Fv fusion phage clones for binding to cultured human cell lines

Cell lines	$A_{405}(\bar{x} \pm s)$			
	B14	B65	A82	空白载体
HepG2	1.119 ± 0.121	1.530 ± 0.023	1.063 ± 0.213	0.093 ± 0.002
QSG-7701	0.468 ± 0.054	0.657 ± 0.062	0.380 ± 0.020	0.145 ± 0.012
HEK293	0.454 ± 0.129	0.387 ± 0.034	1.507 ± 0.004	0.078 ± 0.006
HUVEC	1.103 ± 0.045	1.260 ± 0.006	0.365 ± 0.017	0.094 ± 0.011
HBMSC	0.223 ± 0.031	0.509 ± 0.062	0.160 ± 0.015	0.036 ± 0.010
Caski	0.759 ± 0.005	0.399 ± 0.023	0.054 ± 0.001	0.054 ± 0.003
CNE2	0.834 ± 0.008	0.361 ± 0.020	0.099 ± 0.006	0.060 ± 0.003
A549	1.316 ± 0.239	0.273 ± 0.040	0.049 ± 0.004	0.072 ± 0.050
HRT-18	0.518 ± 0.056	0.709 ± 0.330	0.055 ± 0.009	0.032 ± 0.008

2.7 NH₄SCN 洗脱法相对亲和力测定

用 NH₄SCN 洗脱法测定三个阳性克隆 B14、A82、B65 的相对亲和力(图 5)。B14、A82、B65 的相对亲和力指数分别为 2.1、2.4、1.8 mol/L。

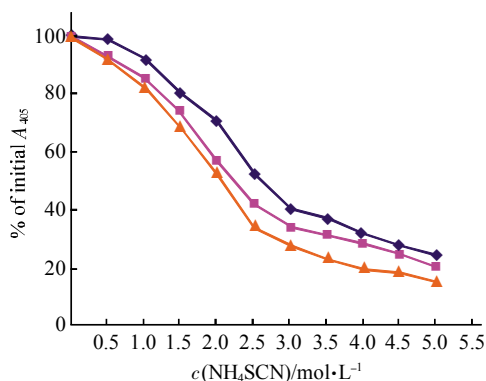


Fig. 5 Relative affinities of 3 phage antibodies

◆: A82; ■: B14; ▲: C65.

2.8 解离常数测定

将经过 PEG8000 沉淀浓缩的噬菌体抗体梯度稀释以后用 HepG2 抗原板进行间接法 ELISA, 方法同前。当吸光度降低为最大值 50% 时的噬菌体抗体的浓度即为解离常数(K_d), 用 mol/L 表示。A82 噬菌体抗体浓缩后利用梯度稀释法测定其滴度为 1.6×10^{15} /ml。间接法 ELISA 结果显示, 吸光度降低为最大值 50% 时的稀释度为 1:500(图 6), 因此解离常数 $K_d = 5.32 \times 10^{-9}$ mol/L。

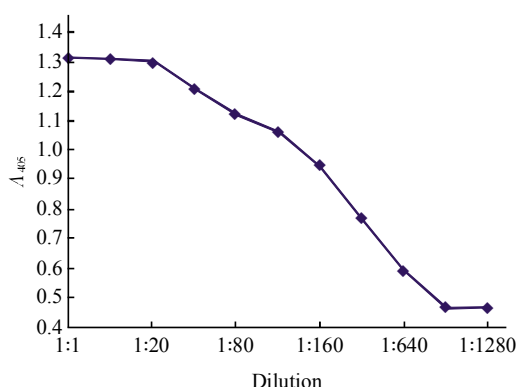


Fig. 6 Dissociation Constant of A82

2.9 免疫化学分析

检测克隆 A82 对肝癌细胞系 HepG2, 正常肝细胞系 QSG-7701, 人胚肾上皮细胞系 HEK293, 骨髓间质干细胞 HBMSC, 原代培养的脐静脉内皮细胞 HUVEC, 宫颈癌细胞系 Caski, 肺癌细胞系 A549 的反应性, 结果显示克隆 A82 与肝癌细胞系 HepG2、人胚肾上皮细胞系 HEK293 呈强阳性反

应, 显色部位主要见于胞膜、胞浆, 与其他细胞反应不明显(图 7)。这进一步证实了 ELISA 结果的正确性。

将克隆 A82 上清与 20 例肝癌组织石蜡切片及 5 例正常肝组织石蜡切片进行免疫组化检测, 观察发现 A82 与 13 例肝癌组织切片反应阳性, 阳性率为 65%。而与 5 例正常肝组织中均无反应。以上结果显示 A82 与人肝细胞癌组织有特异性反应, 反应部位主要见于胞膜、胞浆(图 7)。

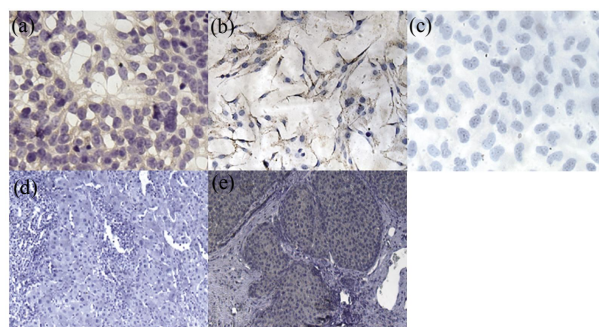


Fig. 7 Immunohistochemical staining of cultured cells and liver cancer tissue with A82

(a) HEK293 with A82. Cell membrane and plasmic staining is predominant. 100 $\times$. (b) HepG2 with A82. Cell membrane and plasmic staining is predominant. 100 $\times$. (c) QSG-7701 with A82. Cells are stained weakly. 100 $\times$. (d) Normal liver tissue with A82. Tissue are stained weakly. 100 $\times$. (e) Liver cancer tissue with A82. Cells are stained prominent. 100 $\times$.

2.10 DNA 序列测定和分析

经过对抗体克隆 A82 进行 DNA 测序后, 其测序结果与其 PCR 产物大小一致。经 Immunoglobulin BLAST(IgBlast)程序分析: VH 处于 linker 上游, VL 处于 linker 下游, A82 全长 742 bp, 含 linker cDNA 序列 45 bp, 重链可变区基因与人胚系 IgVH3-23 有 94.3% 的同源性, 轻链可变区基因与人胚系 IgV4-2 有 94.9% 的同源性, V-D-J 分别属于 VH3-23-D2-21-JH6-linker-V4-2-JL2。

3 讨 论

目前, 国内外制备的单链抗体(ScFv)既有从鼠源性杂交瘤细胞, 也有从正常人或患者 B 细胞中获得。从鼠源性杂交瘤得到的 ScFv, 虽极大地减少了用于人体内所产生的 HAMA 反应, 但终究是鼠源性的, 临床应用必将受到很大限制。近年来, 由于噬菌体抗体库技术的建立和逐渐成熟, 从正常人或患者 B 细胞获得全人源化的分子抗体已成为可能。用 EBV 转化肿瘤患者 B 细胞, 虽已制备

了一些人源化抗肿瘤抗体^[4],但转化的B细胞分泌抗体的量少且极不稳定^[5],而且从抗体中去除EBV的过程繁琐,故用于制备临床应用的抗体受到极大限制.同时在构建噬菌体抗体库时,高度多样化的VH与VL cDNA是随机配对的,据估计,如果要包括将所有的VH与VL配对,其文库的大小应在 10^{14} 以上,但目前构建的抗体库能力一般在 $10^4 \sim 10^9$ 之间,这样基本上是不可能得到一个抗体基因原始的VH与VL结构亚单位的配对^[6].

基于以上情况,我们采用了体外致敏法和EBV转化技术联合噬菌体展示技术构建全人源的抗肝癌ScFv库,本实验室已通过此种联合技术成功制备了鼻咽癌人源抗独特型单链抗体^[6]及抗大肠癌单链抗体^[7].通过前者使B细胞内抗体可变区基因发生高突变,从而产生具有不同亲和力的抗体^[8],通过EBV转化技术使B细胞永生分泌特异性抗体,通过噬菌体抗体库技术使抗体基因克隆化,从而可用基因工程技术大量获得所需抗体.EBV对人B细胞的感染是通过病毒表面蛋白质gp350/220与细胞表面的补体受体(CR2/CD21)结合而进入被感染的细胞,使B细胞能够在体外连续传代,可使数量较少的抗原特异性B细胞得到增殖,富集分泌特异性抗体的免疫球蛋白基因,同时减少下游步骤基因操作中特异性抗体基因片段VH/VL的丢失,增加VH/VL原始配对的机率^[9].

通过联合以上方法,我们构建了一个库容量为 1.0×10^8 全人源抗肝癌单链抗体库,PCR检测其目的基因插入率为80%,为进一步用肝癌细胞筛选特异性抗肝癌单链抗体奠定了重要基础.

为了提高从文库中筛选出特异性抗肝癌细胞的单链抗体的效率,本实验使用了细胞正负淘选^[10]的方法,即在用肝癌细胞富集之前,首先用正常肝细胞对文库进行吸附,以封闭文库中与肝细胞表面抗原交叉反应的抗体,此方法已有不少成功的前例,如Hemminki等^[11]利用此方法筛选到特异性明显提高的抗睾丸激素的抗体.但在本研究中结果并不很理想,大多数与HepG2细胞呈阳性反应的单链抗体与QSG-7701细胞也有不同程度的阳性反应,分析其原因,可能是由于本研究所选用的抗原并非单一抗原,而是细胞.细胞的膜成分极其复杂,膜抗原的有效浓度很低,不同抗原的有效浓度可能相差很大,这样与噬菌体-单链抗体的非特异性结合多,很难获得针对某一抗原的单链抗体.

虽然单链抗体保持了亲代抗体的特异性及结合

能力,但与抗原的结合力常常较完整抗体低,可能涉及“价”的问题.另外,在噬菌体呈现系统中,外源蛋白的表达量通常较低,这是因为P3蛋白为低拷贝外壳蛋白,其大量表达对宿主菌具有毒性效应.而其表达产物分泌于培养上清中,易被菌体蛋白酶所降解.因此,本实验在ELISA检测阳性克隆及用免疫组化鉴定时,均将培养上清经过10倍以上的浓缩,发现阳性检出率与未浓缩的相比,大大提高.

噬菌体-单链抗体与多种人肿瘤细胞系及人正常细胞系的ELISA结果、细胞免疫化学结果,显示克隆A82与肝癌细胞系HepG2、人胚肾上皮细胞系HEK293呈强阳性反应,与其他细胞反应不明显.且A82的相对亲和力为 2.4 mol/L ,解离常数 K_d 为 $5.32 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$,显示其亲和力较高.A82石蜡切片免疫组化结果也显示与人肝细胞癌组织有特异性反应,但不与正常肝组织反应.从上述结果可初步判断A82克隆对肝癌抗原具有良好的免疫特异性,但还需通过后续大量的免疫组织化学实验和动物实验来证明.

参 考 文 献

- 1 Dresel S, Kirsch C M, Tatsch K, *et al.* Detection of hepatocellular carcinoma with a new alpha-fetoprotein antibody imaging kit. Clin Oncol, 1997, **15**(7): 2683~2690
- 2 Lee E Y, Kang J H, Kim K A, *et al.* Development of a rapid, immunochromatographic strip test for serum asialo alpha1-acid glycoprotein in patients with hepatic disease. Immunol Methods, 2006, **308**(1-2): 116~123
- 3 Cai X H, Garen A. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92**(14): 6537~6541
- 4 Abe T, Fukumoto M, Tsuchiya K, *et al.* Human monoclonal antibodies against cytokeratin 18 generated from patients with gastric cancer. Jpn J Cancer Res, 1989, **80**(3): 271~276
- 5 Roder J C, Cole S P, Kozbor D. The EBV-hybridoma technique. Methods Enzymol, 1986, **121**: 140~167
- 6 何小鹏, 李官成, 朱建高等. 鼻咽癌人源抗独特型单链抗体的制备及筛选. 癌症, 2004, **23**(2): 124~129
He X J, Li G C, Zhu J G, *et al.* Chin J Cancer, 2004, **23**(2): 124~129
- 7 朱建高, 李跃辉, 胡锦跃等. 用EBV转化的大肠癌患者B细胞构建噬菌体抗体库. 细胞与分子生物学杂志, 2000, **16**(6): 495~498
Zhu J G, Li Y H, Hu J Y, *et al.* Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2000, **16**(6): 495~498
- 8 Allen D, Cumano A, Dildrop R, *et al.* Timing, genetic requirements

- and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development. *Immunol Rev*, 1987, **96**: 5~22
- 9 Duenas M, Chin L T, Malmberg A C, *et al.* *In vitro* immunization of naive human B cells yields high affinity immunoglobulin G antibodies as illustrated by phage display. *Immunology*. 1996, **89**(1): 1~7
- 10 Parsons H L, Earnshaw J C, Wilton J, *et al.* Directing phage selections towards specific epitopes. *Protein Engineering*, 1996, **9** (11): 1043~1049
- 11 Hemminki A, Niemi S, Hoffren A M, *et al.* Specificity improvement of a recombinant anti-testosterone Fab fragment by CDR III mutagenesis and phage display selection protein. *Engineering*, 1998, **11**(4): 311~319

Construction and Screening of Human Anti-hepatoma Single-chain Fv Fusion Phage Libraries*

XIAO Yan, LI Guan-Cheng**, LI Yue-Hui, HUANG Jian, TONG Yong-Qing, ZHANG Zhi-Jie

(Cancer Research Institute, Xiang-Ya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract To construct and screen fully human anti-hepatoma single-chain Fv fusion phage libraries, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with liver cancer were sensitized *in vitro* and transformed by Epstein-Barr virus (EBV). VH and VL genes were reamplified by PCR and combined to single-chain fragment of variable region (ScFv) genes. ScFv genes were cloned into vector fuse5 and transformed into MC1061 by electroporation to construct the ScFv-displaying phage library. The library was subjected to three rounds of positive and negative cell panning and enrichment, then was screened by phage-ELISA. The binding specificity of phage antibodies with hepatoma carcinoma cells was confirmed by immunohistochemistry with cultured cells and tissue sections. Detection of ELISA showed that 4 liver cancer patients' B cells transformed by EBV could produce specific antibodies to hepatoma carcinoma cell. 6 types of VH genes and 9 types of VL genes were obtained by PCR reamplification then connected with (Gly4Ser)₃ linker to form 54 types of ScFv genes. ScFv genes digested with *Sfi* I were cloned into vector fuse5 and transformed into MC1061 *via* electroporation. Phage antibody library with sink size being 1.0×10^8 was obtained through tetracycline-resistant screening. The percentage of full-length ScFv gene inserted into phage DNA was 80%. The library was subjected to three rounds of positive and negative cell panning and enrichment, then was selected by phage-ELISA. After primacy test by HepG2 cell ELISA, 179 clones of phage antibody with positive ELISA reaction were picked out of 533 clones. The percentage of positive clones was 33.6%. Though further screened by a panel of cultured cells ELISA, the clone A82 was found to react strongly with HepG2, HEK293, but not with other human tumor cell lines. It also reacted weakly with human hepatic cell line QSG-7701. The results of immunohistochemistry with cultured cells were same as the results of ELISA. A82 was further analyzed after the DNA sequencing. The sequence of A82 was identical. The length of A82 was 742 bp. The VDJ regions of A82 belonged to VH3-23-D2-21-JH6-linker-V4-2-JL2. It can be concluded that fully human anti-hepatoma single-chain Fv fusion phage libraries with sink size being 1.0×10^8 was constructed by means of phage antibody library technique in combination with *in vitro* immunization method and EBV transformation technique. By cell ELISA and immunohistochemistry with cultured cells and tissue sections, the clone A82 was confirmed to specific bind with hepatoma carcinoma cells. The ScFv fragment against hepatoma may be further developed and applied to clinical diagnosis and therapy.

Key words EBV immortalization, phage antibody libraries, liver cancer, single-chain Fv

*This work was supported by a grant from Department of Public Health of Hunan Province, P.R.China (A2003001).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-4805445, Email: libsun@public.cs.hn.cn

Received: March 29, 2008 Accepted: May 29, 2008